



Universidade de Aveiro Departamento de Química
2011

Ana Teresa Peixoto de Campos Gomes **NOVOS DERIVADOS PORFIRÍNICOS: SÍNTESE E
POTENCIAIS APLICAÇÕES EM PDT**



**Ana Teresa Peixoto de
Campos Gomes**

**NOVOS DERIVADOS PORFIRÍNICOS: SÍNTESE E
POTENCIAIS APLICAÇÕES EM PDT**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Química, realizada sob a orientação científica do Doutor José Abrunheiro da Silva Cavaleiro, Professor Catedrático do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e da Doutora Maria da Graça Pinho Morgado Silva Neves, Professora Associada com Agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.

Apoio financeiro do POCTI no âmbito do III Quadro Comunitário de Apoio.

Apoio financeiro da FCT e do FSE no âmbito do III Quadro Comunitário de Apoio.

Ciência. Inovação
2010



The most exciting phrase to hear in science, the one that heralds the most discoveries, is not "Eureka! (I Found it!)", but "That's funny..."

Issac Assimov

Aos meus pais, por acharem um absurdo desistir.
Ao Luís, por tudo...

o júri

presidente

Prof. Doutora Maria Celeste da Silva do Carmo
Professora Catedrática do Departamento de Física da Universidade de Aveiro

Prof. Doutor Carlos Alberto Mateus Afonso
Professor Catedrático da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa

Prof. Doutor José Abrunheiro da Silva Cavaleiro
Professor Catedrático do Departamento de Química da Universidade de Aveiro
(Orientador)

Prof. Doutor Artur Manuel Soares da Silva
Professor Catedrático do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Prof. Doutora Amélia Pilar Grases Santos Silva Rauter
Professora Associada com Agregação da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa

Prof. Doutora Maria Matilde Soares Duarte Marques
Professora Associada com Agregação do Departamento de Engenharia Química do Instituto Superior Técnico

Prof. Doutora Maria da Graça de Pinho Morgado da Silva Neves
Professora Associada com Agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro (Co-orientadora)

agradecimentos

Este trabalho só foi possível graças à ajuda e disponibilidade de diversas pessoas. Aqui presto-lhes o meu maior reconhecimento:

Aos meus orientadores, Professor José Cavaleiro e Professora Graça Neves, pela competência científica e orientação dada. Agradeço toda a compreensão, todo o incentivo nos momentos de maior desmotivação, toda a disponibilidade, toda a ajuda e dedicação durante este trabalho. Obrigada por me ensinarem com prazer e dedicação parte do que hoje sei e, sobretudo, por me fazerem crescer.

Ao Professor Augusto Tomé, por sempre me ter acolhido como se fosse sua orientanda.

Ao Professor Artur Silva, pela disponibilidade e preciosa ajuda na elucidação estrutural de todos os compostos e resolução de alguns problemas que surgiram ao longo deste trabalho.

A todo o grupo de Química Orgânica da Universidade Federal Fluminense, Niterói, em particular ao Professor Vítor Ferreira e Professora Cecília Souza, pela cooperação com o nosso grupo de investigação através da cedência de alguns compostos usados para a elaboração deste trabalho e que nos permitiu colher “frutos muito saborosos”. Agradeço ao Fernando Carvalho e à Anna Cláudia Cunha, com quem trabalhei directamente, toda a ajuda, disponibilidade e dedicação mesmo a tantos quilómetros de distância.

Ao Professor Francisco Sanz e à Professora Angeles Juarranz do Departamento de Biologia da Universidade Autónoma de Madrid, agradeço por me terem recebido no seu grupo de investigação e pelo apoio e interesse dedicado na avaliação biológica de alguns compostos sintetizados ao longo deste trabalho.

À Doutora Josane Mittmann da Universidade do Vale do Paraíba, Brasil pela realização dos ensaios biológicos de alguns compostos sintetizados neste trabalho.

Ao Dr. Hilário, pela ajuda na aquisição dos espectros de RMN e pela paciência que sempre teve comigo nos momentos de maior desorganização.

Ao grupo de Espectrometria de Massa de Universidade de Aveiro. À Professora Maria do Rosário Domingues pela valiosa cooperação, disponibilidade e ajuda na interpretação dos espectros de massa.

Ao Doutor Filipe Paz, pela obtenção da estrutura de raios-X descrita neste trabalho.

À Professora Amparo Faustino, agradeço toda a ajuda prestada ao longo destes anos e pelo contacto com o grupo da Professora Angeles Juarranz.

À Dr. Fátima Condesso, por tomar conta de nós como se fossemos todos seus filhos.

À Mônica Macedo, da Fundação Oswaldo Cruz, agradeço a sua colaboração e o seu empenho neste trabalho, e principalmente, a sua amizade.

Ao Departamento de Química da Universidade de Aveiro por me proporcionar as condições necessárias para o desenvolvimento desta dissertação.

À Fundação para a Ciência e a Tecnologia, pela bolsa de doutoramento e pelos subsídios atribuídos para a participação em congressos internacionais bem como para o estágio realizado em Madrid.

À cooperação bilateral FCT-CAPES pelo intercâmbio Universidade de Aveiro – Universidade Federal Fluminense, o qual permitiu a colaboração entre os grupos português e brasileiro traduzido pela realização do presente trabalho.

A todos os meus amigos e colegas. À Mafalda Pereira agradeço o carinho com que sempre me acolheu.

À Eliana Carvalho pela ternura da sua amizade e pelas palavras certas nos momentos certos.

À Carla Carvalho, pela amizade de tantos anos, pela compreensão, por todos os bons momentos partilhados e, sobretudo, por nem precisar de falar quando preciso de ajuda.

À minha imensa e, agora, nova família.

Ao meu pai, à minha mãe e à minha irmã, por serem os pilares da minha vida. Obrigada por caminharem ao meu lado, pelo apoio, pela compreensão de todas as minhas “ausências”, dando-me sempre o aconchego emocional da sua presença incondicional e por fazerem de mim o que eu sou hoje.

Ao Luís, o maior prejudicado desta aventura. A ele devo o profundo agradecimento pelo modo como me aturou, pelo modo como sempre me apoiou e acompanhou ao longo desta árdua caminhada. Pelas alegrias, momentos felizes, desânimos, angústias, compreensão e essencialmente por tomar conta de mim. A ele devo também um pedido de desculpas, pela ausência, mesmo estando presente, por nem sempre estar disponível para ajudar, por tantas vezes dizer “não posso”.

palavras-chave

Macrociclos tetrapirrólicos, porfirinas, fotossensibilizadores, terapia fotodinâmica, diazo compostos, carbenos, glicoporfirinas, reacção de Suzuki-Miyaura, quinolonas, reacção de metátase, triazóis.

resumo

O trabalho apresentado nesta dissertação descreve estudos desenvolvidos segundo três metodologias para a funcionalização de *meso*-tetra-arylporfirinas; uma delas baseada na funcionalização com diazo compostos, outra na reacção de Suzuki-Miyaura e a terceira na reacção de metátase. O presente documento é composto por quatro partes distintas. Na primeira parte são feitas considerações gerais sobre propriedades e aplicações de macrociclos porfirínicos. Na segunda parte é apresentado o trabalho realizado na funcionalização de porfirinas com diazo compostos através de reacções de inserção com um catalisador de ródio(II). Este estudo envolveu a preparação de duas porfirinas com grupos O-H e N-H nas posições *para* dum substituinte *meso*-fenilo. Os estudos iniciaram-se com a reacção de 5-(4-hidroxifenil)-10,15,20-trifenilporfirinatozínco(II) com diazoacetato de etilo na presença de $Rh_2(OAc)_4$. Obteve-se o produto esperado de inserção com bons rendimentos. A reacção de 5-(4-aminofenil)-10,15,20-trifenilporfirinatozínco(II) com esse diazo composto na presença de $Rh_2(OAc)_4$ mostrou um perfil diferente do da reacção com o outro porfirinato. Foram obtidos três produtos, a saber: produto de bis-inserção e dois outros contendo o grupo funcional amida. Este capítulo descreve ainda a síntese de glicoporfirinas e de glicoclorinas através de reacções de inserção e de ciclopropanação envolvendo, respectivamente, os complexos 5-(4-hidroxifenil)-10,15,20-trifenilporfirinatozínco(II) e 5,10,15,20-tetraquis(pentafluorofenil)porfirinatozínco(II) com α -diazoacetatos com substituintes sacarídicos. Foram usados, como catalisadores, $Rh_2(OAc)_4$ e CuCl, respectivamente, na reacção de inserção e na de ciclopropanação. Tendo em vista a sua aplicação em PDT, os novos produtos foram descomplexados e a unidade glicosídica foi desprotegida. Estudos de geração de oxigénio singuleto mostraram que os compostos obtidos são bons geradores dessa espécie citotóxica. Foram também realizados estudos de avaliação da actividade fotodinâmica em células humanas tumorais HeLa e em células humanas saudáveis HaCaT. Estudos de viabilidade celular, após tratamento fotodinâmico, mostraram que as glicoclorinas são mais eficazes na foto-inactivação das células tumorais. Apenas o derivado da clorina com a unidade de galactose mostrou selectividade para a linha celular tumoral, inibindo o crescimento desta e não causando efeito significativo na linha celular saudável. Este fotossensibilizador não foi tóxico na ausência de luz e depois do tratamento fotodinâmico e em condições sub-letais, provocou vacuolização citoplasmática e retracção pronunciada nas células tumorais, enquanto que nas células saudáveis os danos sofridos foram escassos. Nos estudos de localização celular este fotossensibilizador localizou-se na membrana citoplasmática e nos lisossomas tanto nas células HeLa como nas HaCaT. Na terceira parte deste trabalho são descritos os resultados obtidos nos estudos de funcionalização de porfirinas através da reacção de Suzuki-Miyaura. O complexo 2-(4,4,5,5,-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-5,10,15,20-tetrafenilporfirinatozínco(II) foi o composto escolhido como reagente de partida. Usando a reacção de Suzuki foi possível sintetizar complexos β -bromo-arylporfirínicos em bons rendimentos. Estes complexos foram sujeitos à reacção de Suzuki com pinacolborano, tendo sido possível obter os produtos de acoplamento esperados e ainda derivados diméricos de complexos porfirínicos ligados por unidades fenileno. Esta metodologia reacional, catalisada por paládio, permitiu ainda sintetizar novos derivados quinolona-porfirina através da reacção do complexo porfirínico β -borilado anteriormente referido com bromo-quinolonas *N*-substituídas com grupos alquílicos e glicosídicos. Deste modo foram obtidos derivados quinolona-porfirina em bons rendimentos. Com vista a realizar estudos de potencial aplicação em PACT, foram hidrolisados os grupos éster da unidade de quinolona e clivados os grupos protectores das unidades glicosídicas desses derivados. No estudo por MS Tandem (MS/MS) foi possível verificar que os isómeros dos derivados quinolona-porfirina sofrem as mesmas vias de fragmentação, confirmando as suas estruturas análogas. Foi possível ainda distinguir os derivados em que a unidade de porfirina está ligada à quinolona através da posição C-6 da quinolona daqueles em que a unidade de porfirina está ligada à quinolona através da sua posição C-7.

Os estudos de geração de oxigénio singuleto mostraram que as porfirinas β -substituídas com unidades de quinolona são melhores geradoras desta espécie citotóxica do que a tetrafenilporfirina e que a eficiência que têm em gerar essa espécie é afectada pela posição da ligação entre a porfirina e a quinolona, assim como com o tipo do *N*-substituinte da quinolona. As bases livres dos conjugados quinolona-porfirinas foram testadas como fotossensibilizadores em PACT em células do parasita *Leishmania Braziliensis*, tendo-se observado que estes compostos têm capacidade para fotoactivar este parasita.

Na quarta parte deste trabalho são descritos os resultados dos estudos de funcionalização de porfirinas através da reacção de metátese com catalisador de Grubbs, visando a obtenção de novos macrociclos com grupos triazolilo. Verificou-se que a eficiência da reacção de metátese cruzada entre 2-vinil-5,10,15,20-tetrafenilporfirinatozínco(II) e 4-vinil-1,2,3-triazóis *N*-substituídos dependia das condições reaccionais e do triazol usado em cada caso. Foi possível ainda concluir que o impedimento estérico das espécies envolvidas é um dos responsáveis pelo ciclo catalítico prosseguir por uma via secundária, originando uma espécie de ruténio pouco eficiente como catalisador. Este estudo foi estendido à reacção dos 4-vinil-1,2,3-triazóis seleccionados com 2-butadienil-5,10,15,20-tetrafenilporfirinatoníquel(II); em cada caso foi possível obter uma mistura de isómeros dos derivados triazol-porfirina, geralmente em maiores rendimentos globais do que na reacção com 2-vinil-5,10,15,20-tetrafenilporfirinatozínco(II). Este facto será indicativo de que a reacção de metátese com esse derivado porfirínico segue, predominantemente, a via mais eficiente.

Keywords

Tetrapyrrolic macrocycles, porphyrins, photosensitisers, photodynamic therapy, diazo compounds, carbenes, glycoporphyrins, Suzuki-Miyaura reaction, quinolones, metathesis, triazoles.

asbtract

The work presented in this dissertation reports studies carried out according three different methodologies for the functionalization of *meso*-tetra-arylporphyrins: one is related with the functionalization with diazo compounds, another one considers the Suzuki-Miyaura approach and the third one the metathesis reaction. This document has four parts.

The first one relates the main properties and applications of porphyrin derivatives.

The second part reports results on studies carried out for the functionalization of porphyrins with diazo compounds through insertion reactions catalyzed by a rhodium-based catalyst. This study involved the preparation of two porphyrins with OH and NH groups in the *p*-position of one *meso*-phenyl substituent of those macrocycles. Reaction of 5-(4-hydroxyphenyl)-10,15,20-triphenylporphyrinatozinc(II) with ethyl diazoacetate in the presence of $\text{Rh}_2(\text{OAc})_4$ gave rise to the expected insertion product in good yields. In the reaction of 5-(4-aminophenyl)-10,15,20-triphenylporphyrinatozinc(II) with such diazo compound in the presence of $\text{Rh}_2(\text{OAc})_4$ a different profile was observed. Three products were obtained: one corresponding to the bis-insertion product and the other two having each one an amide function. This part of the thesis also describes the synthesis of glycoporphyrins and glycochlorins through insertion and cyclopropanation methodologies, respectively, in reactions with 5-(4-hydroxyphenyl)-10,15,20-triphenylporphyrinatozinc(II) and 5,10,15,20-tetrakis(pentafluorophenyl)porphyrinatozinc(II) with carbohydrate substituted α -diazoacetates. As catalysts were used $\text{Rh}_2(\text{OAc})_4$ for the insertion reactions and CuCl for the cyclopropanation ones. Having in mind their potential applications in PDT, the new derivatives obtained were demetallated and the sugar units were deprotected. Studies on the singlet oxygen generation by the new compounds have shown that these derivatives are good generators of that cytotoxic species. The new compounds were tested as photosensitisers in PDT, on a cancer cellular line, HeLa and on a normal cell line, HaCaT. Studies on cell viability after PDT treatment have shown that glycochlorins are more effective in the photoinactivation of the tumor cell line. Only the galactose-chlorin derivative showed selectivity for HeLa cells, inhibiting the growth of this tumoral cell line and causing no significant effect on the normal cell line. This photosensitiser was not toxic in the absence of light and it caused cytoplasmatic vacuolization and pronounced retraction in tumoral cell line, while in HaCaT the damages were scarce. In the study of cellular localization, this photosensitiser was located in the cytoplasmic membrane and lysosomes in both HeLa and HeCat cells.

The third part of this dissertation describes the results obtained on the functionalization of porphyrins under the Suzuki-Miyaura reaction conditions. The 2-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)-5,10,15,20-tetraphenylporphyrinatozinc(II) was chosen for being used in this reaction. Using the Suzuki methodology it was possible to synthesize β -bromo-arylporphyrinic complexes in good yields. These brominated porphyrinates were used in the Suzuki reaction with pinacol borane; it was possible to obtain novel coupling product derivatives and also porphyrin dimers linked by phenylene units. This reaction catalyzed by palladium also allowed us to synthesize new quinolone-porphyrin derivatives by the reaction of the β -borylated porphyrinic complex with *N*-substituted bromo-quinolones with alkyl and glycosyl groups affording quinolone-porphyrin derivatives in good yields. It was also performed the hydrolysis of the ester groups of the quinolone moieties and the deprotection of the glycosidic units of the quinolone-porphyrin derivatives, having in mind their potential application in PACT. In the electrospray tandem mass spectrometry (MS/MS) of the quinolone-porphyrin derivatives it was possible to verify that isomeric porphyrin-quinolone derivatives give rise to similar fragmentation pathways, confirming their analogous structures. Due to the relative abundance of some peaks it was possible to distinguish between derivatives with the porphyrin moiety linked at C-6 of the quinolone unit from those having the porphyrin moiety linked to the 7-position of the quinolone moiety. Singlet oxygen studies have shown that all the β -substituted porphyrin-quinolones are better singlet oxygen generators than TPP and that the efficiency of these compounds to generate singlet oxygen is affected by the linkage position between the porphyrin and the quinolone moieties, and also by the type of the *N*-substituent of the quinolone group. The free bases of quinolone-porphyrin conjugates were tested as photossensitizers in PACT against the *Leishmania Braziliensis* parasite cells; it was observed that these compounds are able to photoinactivate such parasite.

photoinactivate such parasite.

In the fourth part of this document it is described the results obtained in the study of the functionalization involving triazolyl groups of porphyrin macrocycles by the metathesis reaction using the Grubbs catalyst. It was found that the reaction between 2-vinyl-5,10,15,20-tetraphenylporphyrinatozinc(II) and *N*-substituted 4-vinyl-1,2,3-triazoles are dependent on the reaction conditions and on the triazole. The best conditions found were used for the synthesis of new triazole-porphyrin derivatives. The study of the reaction mechanism has shown that the steric hindrance between the two species involved is a main reason for the catalytic cycle to continue on a path characterized by the poor efficiency. This study of the metathesis reaction was extended to the reaction of selected *N*-substituted 4-vinyl-1,2,3-triazoles with 2-butadienyl-5,10,15,20-tetraphenylporphyrinatonicel(II) (a porphyrinic complex with less steric hindrance) affording a mixture of isomeric triazole-porphyrin derivatives, in higher global yields than the reactions with 2-vinyl-5,10,15,20-tetraphenylporphyrinatozinc(II). This might indicate that the metathesis reactions with the former porphyrin follows, predominantly, the more efficient route.

Agradecimentos	I
Resumo	II
Abstract	IV
Índice	1
Abreviaturas	5
Capítulo I	9
1. Introdução	11
1.1. Macrociclos tetrapirrólicos.....	11
1.1.1. Nomenclatura de derivados porfirínicos.....	13
1.1.2. Aromaticidade do macrociclo porfirínico.....	13
1.1.3. Reactividade de macrociclos tetrapirrólicos.....	16
1.1.4. Síntese de macrociclos tetrapirrólicos.....	19
1.2. Aplicações de porfirinas.....	23
1.3. Referências Bibliográficas.....	33
Capítulo 2	37
2. Compostos α-diazocarbonílicos na síntese de novos derivados porfirínicos.	
Avaliação biológica de novos derivados glicoporfirínicos	39
2.1. A química dos diazo compostos.....	40
2.2. Funcionalização de macrociclos tetrapirrólicos com diazo compostos na presença de metais de transição como catalisadores.....	51
2.3. Estudos de funcionalização de <i>meso</i> -tetra-arilporfirinas com diazo compostos envolvendo reacções de inserção.....	56
2.3.1. Reacção de 5-(4-hidroxifenil)-10,15,20-trifenilporfirinatozinco(II) 23 com EDA catalisada por $Rh_2(OAc)_4$	60
2.3.2. Reacção de 5-(4-aminofenil)-10,15,20-trifenilporfirinatozinco(II) 24 com EDA catalisada por $Rh_2(OAc)_4$	62
2.4. Síntese de novos derivados glicoporfirínicos.....	72
2.4.1. Síntese de novos derivados glicoporfirínicos através de reacções de inserção de α -diazocetatos glicosídicos.....	75
2.4.2. Síntese de novos derivados de tipo glicoclorinas através de reacções de ciclopropanação com α -diazocetatos glicosídicos.....	81

2.5. Avaliação da actividade fotodinâmica dos derivados glicoporfirínicos 31a-d e 36a-d em células tumorais.....	87
2.5.1. Estudos de geração de oxigénio singuleto dos derivados glicoporfirínicos 31a-d e 36a-d	88
2.5.2. Estudos <i>in vitro</i> da actividade fotodinâmica das glicoporfirinas 31a-d e glicoclorinas 36a-d em células HeLa e HaCaT.....	93
2.5.2.1. Testes de viabilidade celular.....	97
2.5.2.2. Alterações morfológicas causadas pelo tratamento fotodinâmico com o fotossensibilizador 36d	105
2.5.2.3. Localização celular do fotossensibilizador 36d	107
2.6. Conclusão.....	110
2.7. Parte experimental.....	112
2.8. Referências Bibliográficas.....	141
Capítulo 3	145
3. Reacção de Suzuki e macroilos tetrapirrólicos: síntese de β-arilporfirinas e de derivados quinolo-porfirina com potenciais aplicações em PACT	147
3.1. Reacção de Suzuki-Miyaura.....	147
3.2. Funcionalização de porfirinas através da reacção de Suzuki.....	151
3.3. Estudos de funcionalização de porfirinas através da reacção de Suzuki.....	160
3.3.1. Síntese de β -arilporfirinas através da reacção de Suzuki.....	161
3.3.2. Caracterização espectroscópica dos derivados 62a,b , 64a,b , 65 e 66	168
3.3.3. Síntese de novos derivados quinolona-porfirina com potenciais aplicações em PDT.....	174
3.3.3.1. Reacção de Suzuki entre a porfirina β -borilada 54 e as bromo-quinolonas 67a-d	175
3.3.3.2. Caracterização estrutural dos conjugados quinolona-porfirina 69a-d e 70a-d	179

3.3.4.	Caracterização dos conjugados quinolona-porfirina 69a-d e 70a-d por Espectrometria de Massa.....	187
3.3.4.1.	Espectrometria de massa por electrospray (ESI-MS).....	187
3.3.4.2.	Caracterização dos conjugados quinolona-porfirina 69a-d	189
3.3.4.3.	Caracterização dos conjugados quinolona-porfirina 70a-d	193
3.4.	Avaliação da actividade fotodinâmica dos derivados quinolona-porfirina 70a-d em <i>Leishmania Braziliensis</i>	197
3.4.1.	Estudos de geração de oxigénio singuleto dos derivados quinolona-porfirina 70a-d	199
3.4.2.	Estudos <i>in vitro</i> da actividade fotodinâmica antimicrobiana dos derivados quinolona-porfirina 70a-d	200
3.5.	Conclusão.....	203
3.6.	Parte experimental.....	205
3.7.	Referências Bibliográficas.....	221
Capítulo 4	225
4.	Síntese de porfirinas β-substituídas com grupos triazolilo por reacção de metátase	227
4.1.	Reacção de metátase.....	227
4.2.	Funcionalização de porfirinas através da reacção de metátase.....	233
4.3.	Estudos de funcionalização de <i>meso</i> -tetra-arilporfirinas com grupos triazolilo por reacção de metátase.....	239
4.3.1.	Reacção de metátase cruzada entre o 2-vinil-5,10,15,20-tetrafenilporfirinatozinco(II) 80 e os 4-vinil-1,2,3-triazóis 95a-f	247
4.3.1.1.	Caracterização espectroscópica dos derivados triazol-porfirina 98a-e	271

4.3.2.	Reacção de metátase cruzada entre o 2-butadienil-5,10,15,20-tetrafenilporfirinato níquel(II) 90 e os 4-vinil-1,2,3-triazóis 95a-f	275
4.3.2.1.	Descomplexação dos derivados triazol-porfirina 113d e 114d	281
4.3.2.2.	Caracterização espectroscópica dos derivados triazol-porfirina 113a-e e 114a-e	283
4.4.	Conclusão.....	292
4.5.	Parte experimental.....	294
4.6.	Referências Bibliográficas.....	315

Abreviaturas

δ - desvio químico

β -H – prótons β -pirrólicos

ϵ - absorvidade molar

η - rendimento

λ - comprimento de onda

$\lambda_{\text{máx}}$ - comprimento de onda para os máximos de absorvência

ϕ - rendimento quântico de oxigênio singuleto

AB - sistema AB

ADMET - metátese por polimerização em dienos acíclicos

Ar - arilo

AR% - abundância relativa

b – sinal largo

BINAP - 2,2'-bis(difenilfosfino)-1,1'-binaftilo

BNCT - terapia de captura de neutrões de boro

CM - metátese cruzada

COSY - espectro bidimensional de correlação espectroscópica homonuclear

Cu-TPP – 5,10,15,20-tetrafenilporfirinatocobre(II)

d - duplete

dd - duplo duplete

DDQ - 2,3-diciano-5,6-diclorobenzoquinona

DFiBF – 1,3-difenilisobenzofurano

DMEM- Meio de cultura celular (“Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium”)

DMF - *N,N*-dimetilformamida

DMSO - dimetilsulfóxido

DNA - ácido desoxirribonucleico

DPPC- dipalmitoilfosfatidilcolina

dt - duplo tripleto

EDA- diazoacetato de etilo

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético

equiv. - equivalente

ESI - ionização por electrospray

Et- etilo

EYM - metátese alceno/alcino

[FeCl(tdcpp)] - cloro[*meso*-tetraquis(2,6-diclofenil)porfirinato]ferro(III)

HaCaT - linha celular humana de queratinócitos desenvolvida em meio com baixa concentração de cálcio e a elevada temperatura (**H**uman **A**dult **C**alcium **T**emperature)

HeLa - linha celular humana de um carcinoma cervical isoladas de **Henrietta Lacks**

H-*m*-Ph - prótons *meta* do grupo fenilo das posições *meso* do macrociclo porfirínico

HMBC - correlação espectroscópica heteronuclear a longa distância

H-*o*-Ph – prótons *orto* do grupo fenilo das posições *meso* do macrociclo porfirínico

H-*p*-Ph – prótons *para* do grupo fenilo das posições *meso* do macrociclo porfirínico

HRMS - espectrometria de massa de alta resolução

HSQC - correlação espectroscópica heteronuclear

int. rel. - intensidade relativa

IUPAC - União Internacional de Química Pura e Aplicada

J - constante de acoplamento

m – multiplete

M- ião metálico

(M)⁺ - ião molecular

MALDI - ionização por desorção por laser assistida por matriz

mRNA - ácido ribonucleico mensageiro

MTT - 4,5-dimetil-3-tiazolil-2,5-difeniltetrazolio

MW - Microondas

[M+H]⁺ - ião resultante da protonação molecular

MS - espectrometria de massa

m/z - razão massa/carga

NBA - Álcool 3-nitrobenzílico

NBS - *N*-bromossuccinimida

Ni-TPP – 5,10,15,20-tetrafenilporfirinatoniquel(II)

nm - nanômetros

NOESY - correlação espectroscópica de efeito nuclear de Overhauser

Bz - benzoílo

PACT - inativação fotodinâmica de microrganismos

Abreviaturas

PBS - tampão fosfato salino

PDT - terapia fotodinâmica

Ph - fenilo

PMNP - Polimixina B (“Polymyxin B nonapeptide”)

ppm - partes por milhão

PyD - piridina deuterada

RCM - metátese por ciclização

R_f - factor de retardamento

RMN de ¹³C - ressonância magnética nuclear de carbono 13

RMN de ¹⁹F - ressonância magnética nuclear de flúor 19

RMN de ¹H - ressonância magnética nuclear de protão

RNA - ácido ribonucleico

ROM - metátese por abertura do anel

s - singuleto

SFB – soro fetal bovino

SIDA – síndrome de imunodeficiência adquirida

t - tripleto

t.a. - temperatura ambiente

TFA - ácido trifluoroacético

THF - tetra-hidrofurano

Ti(OⁱPr)₄ – *iso*-propóxido de titânio

TLC - cromatografia de camada fina

TMS - tetrametilsilano

TMSOTf - trifluorometanossulfonato de trimetilsililo (triflato de trimetilsililo)

TOF - analisador de tempo de voo

TPP - 5,10,15,20-tetrafenilporfirina

TPP-NH₂ - 5-(4-aminofenil)-10,15,20-trifenilporfirina

TPP-OH - 5-(4-hidroxifenil)-10,15,20-trifenilporfirina

TPP-PF - 5,10,15,20-tetraquis(pentafluorofenil)porfirina

UV-vis - espectrofotometria de ultravioleta-visível

Capítulo 1

Introdução

1. Introdução

Preâmbulo

Os compostos porfirínicos demonstraram já as suas potencialidades em vários campos científicos, com principal destaque para as aplicações medicinais sendo a Terapia Fotodinâmica (PDT) de tecidos neoplásicos a mais promissora. Nos últimos anos têm sido muitos os esforços para o desenvolvimento de novos métodos para converter porfirinas em derivados com características estruturais e espectroscópicas adequadas para potenciais aplicações em PDT. Neste primeiro capítulo serão abordadas as principais características desta classe de compostos tais como reactividade, propriedades físicas e químicas, metodologias de síntese e principais aplicações.

1.1. Macrociclos tetrapirrólicos

Considerações gerais

Desde que os anatomistas do século XVII, com a ajuda do microscópio, demonstraram que o sangue é um tecido, no sentido anatómico da palavra, constituído por uma parte fluida, o plasma, e por partículas extremamente pequenas, os corpúsculos, tornou-se tarefa de químicos/bioquímicos e fisiologistas identificar esses componentes e suas funções nos processos vitais. Quanto às partículas, foi descoberto que a cor vermelha é devida a substâncias que contêm ferro, mais tarde designadas de hemoproteínas, às quais pertencem a hemoglobina e mioglobina.¹

Devido à sua forte afinidade com o oxigénio molecular, a hemoglobina assume uma importância vital na transferência do oxigénio. A hemoglobina é constituída por uma parte proteica, a globina, e quatro grupos prostéticos de cor vermelha, os grupos heme (Figura 1.1 a). No caso da mioglobina existe apenas um grupo prostético. Este grupo, depois de tratado com ácido clorídrico, é convertido num derivado designado por cloro-hemina. No entanto, muitas dúvidas prevaleceram por um longo período quanto à estrutura química deste derivado, até Hans Fischer ter identificado a composição química do grupo heme, sintetizando-o a partir de unidades precursoras

adequadas. No entanto, os seus trabalhos não se limitaram aos pigmentos vermelhos presentes no sangue. Fischer correlacionou a estrutura do grupos heme com a estrutura dos pigmentos das plantas verdes responsáveis pela fotossíntese, as clorofilas (Figura 1.1 **b**), e demonstrou que estes pigmentos possuem idêntico esqueleto base que o das porfirinas. A importância de todas estas descobertas foi devidamente assinalada pela Academia Sueca de Ciências ao atribuir a H. Fischer o Prémio Nobel da Química em 1930.²

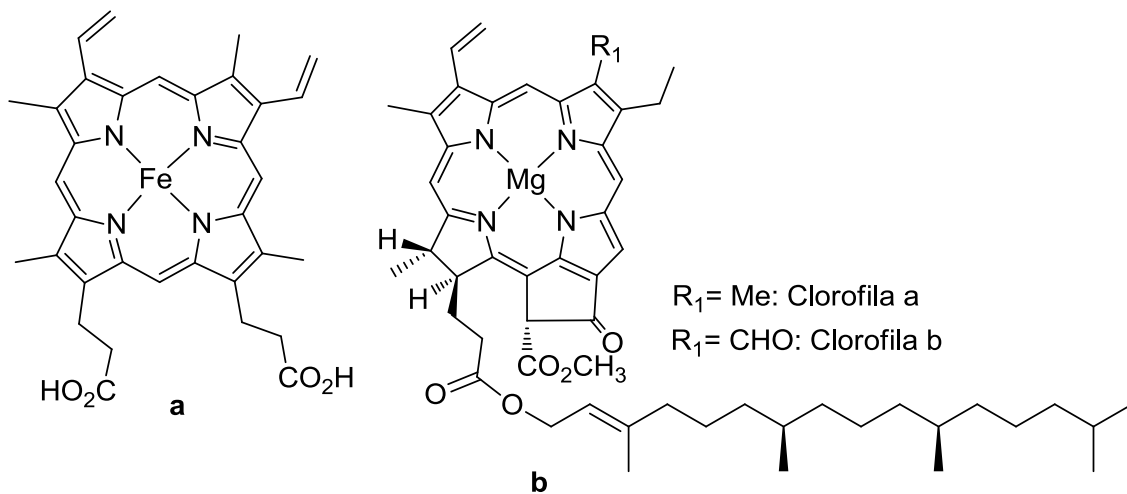


Figura 1.1. Estrutura do grupo heme (a) e das clorofilas a e b (b).

Existem ainda outros sistemas tetrapirrólicos de elevada importância biológica, como é o caso dos citocromos. Estes participam na transferência de electrões, produção de energia celular, biossíntese de esteróides e em mecanismos de detoxificação.¹

Assim, os sistemas tetrapirrólicos, nas suas várias formas reduzidas, oxidadas e complexadas estão presentes em importantes funções vitais, tais como a respiração, o transporte de electrões, a fotossíntese, diversas funções enzimáticas e ainda na detoxificação de drogas.^{3,4}

1.1.1. Nomenclatura de derivados porfirínicos

Existem dois sistemas de nomenclatura para estes macrociclos, um proposto por H. Fischer e o outro, mais recente, proposto pela IUPAC.⁵

Na nomenclatura proposta por Fischer, os carbonos externos dos anéis pirrólicos são numerados de 1 a 8 - posições também designadas por β -pirrólicas. As pontes metínicas (posições inter-pirrólicas) são designadas pelas letras gregas α , β , γ , δ e são também designadas por posições *meso* (Figura 1.2). A síntese de novas porfirinas e o desenvolvimento de técnicas de análise (e.g. RMN de ^{13}C ou Raio X) revelou que o sistema proposto por Fischer não era o mais conveniente. Com o sistema proposto pela IUPAC, foram introduzidas regras mais claras que contemplavam todos os átomos do anel. Assim, os vinte e quatro átomos pertencentes ao macrociclo foram numerados de 1 a 24. As designações *meso* e β -pirrólicas continuam a ser largamente utilizadas (Figura 1.2).^{5,6}

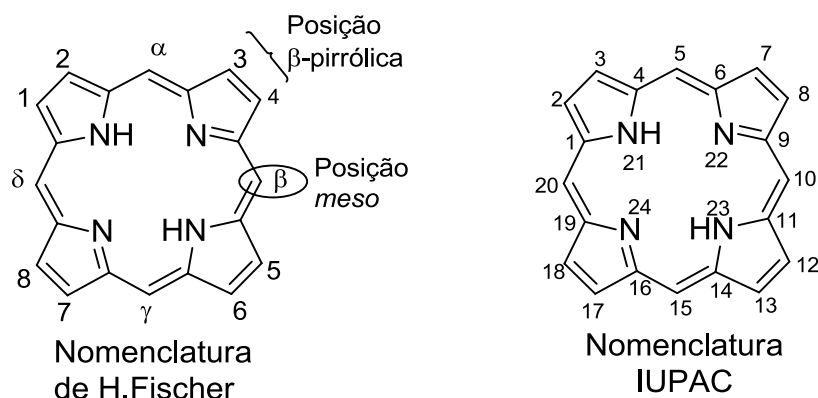


Figura 1.2. Nomenclatura de porfirinas por H. Fischer e pela IUPAC.

1.1.2. Aromaticidade do macrociclo porfirínico

As porfirinas são compostos que apresentam elevado carácter aromático (Figura 1.3), onde apenas 18 electrões π , dos 22 que possuem, são responsáveis pela aromaticidade. As análises por Raio X de porfirinas e de metaloporfirinas sugerem que o esqueleto porfirínico é planar, o que está de acordo com o carácter aromático.⁷

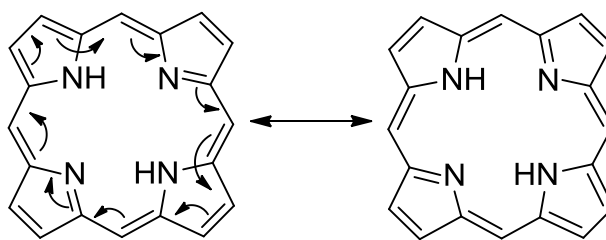


Figura 1.3. Deslocalização electrónica do macrociclo porfirínico.

A elevada aromaticidade apresentada por este tipo de compostos é responsável pelo aparecimento em espectros de RMN de ^1H de sinais correspondentes à ressonância dos prótons internos $-\text{NH}$ a desvios químicos baixos (entre -2 e -5 ppm), enquanto que os prótons das pontes metínicas surgem a desvios químicos mais altos (a aproximadamente 10 ppm) devido ao efeito desprotector provocado pela corrente de anel gerada pelos electrões π .⁷

Devido à elevada conjugação apresentada pelas porfirinas, estes compostos são altamente corados; as espécies não complexadas possuem um espectro de visível muito característico, constituído por uma banda de absorção a aproximadamente 400 nm denominada banda Soret, e por quatro outras bandas de absorção a comprimentos de onda superiores, denominadas bandas Q. A banda Soret é a banda mais intensa que surge no espectro de visível das porfirinas sendo o coeficiente de absorção molar da ordem dos $10^5 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3 \cdot \text{cm}^{-1}$.⁷ Esta banda encontra-se em todos os macrociclos tetrapirrólicos que possuam um núcleo completamente conjugado.

O facto de apenas 18 electrões π serem responsáveis pela aromaticidade deste tipo de compostos, permite que o núcleo porfirínico possa perder uma ligação ou duas duplas ligações, formando novas estruturas que continuam a possuir carácter aromático (Figura 1.4).^{5,7}

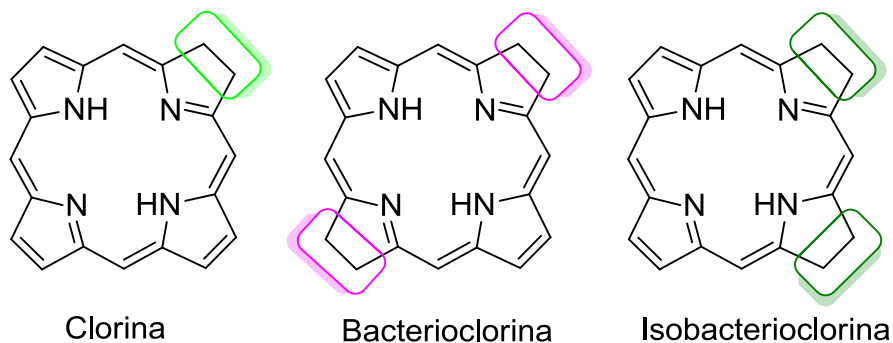


Figura 1.4. Estruturas dos derivados reduzidos de macrociclos porfirínicos

Assim, a redução de uma dupla ligação de uma porfirina origina uma clorina com um anel pirrólico com dois centros sp^3 . Comparando com a das porfirinas, a última banda Q das clorinas está deslocada 20-30 nm para a zona do vermelho do espectro de visível e têm uma intensidade 10 vezes maior face à correspondente banda nas porfirinas (Figura 1.5).⁷ Se por outro lado, a porfirina perder duas ligações duplas, definidas pela presença de dois anéis pirrólicos com dois centros sp^3 em posições opostas e adjacentes, formam-se as bacteriocloriginas e isobacteriocloriginas, respectivamente. As bacteriocloriginas apresentam uma banda de forte absorção na zona dos 700-750 nm. As isobacteriocloriginas apresentam três bandas Q de intensidade crescente entre os 500 e 600 nm seguidas e por uma banda de menor intensidade na região dos 650 nm.^{5,7}

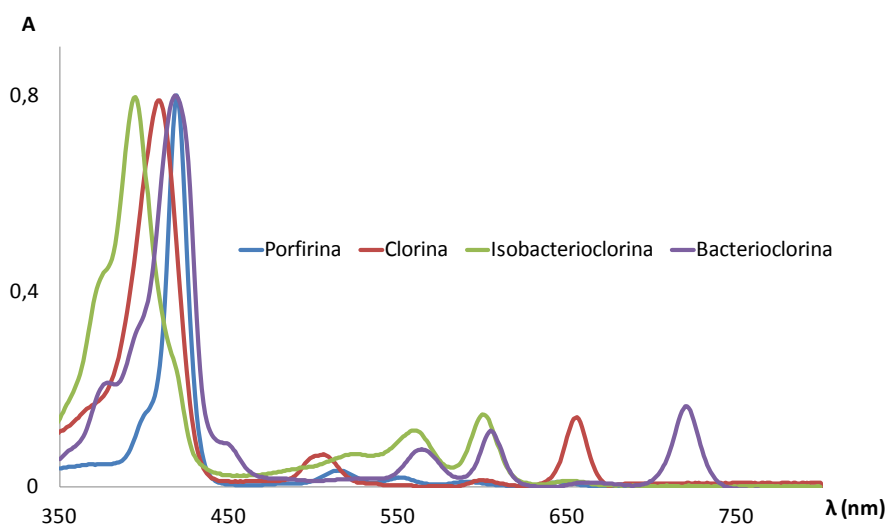


Figura 1.5. Espectros de UV-Vis de alguns derivados porfirínicos.

A intensidade, posição e número destas bandas Soret e Q é influenciado tanto pelos substituintes do anel como pelo metal que as porfirinas possam possuir. Assim, a complexação do anel geralmente aumenta a intensidade da Soret e reduz, no mínimo, as bandas Q para duas. Os substituintes sacadores de electrões também influenciam a posição das bandas, deslocando-as para maiores comprimentos de onda.^{5,7}

Por outro lado, a presença de substituintes nas posições β -pirrólicas conjugadas com o sistema porfirínico, formando sistemas estendidos π provoca o deslocamento da absorção da última banda Q para a zona do vermelho do espectro de radiação.⁸

1.1.3. Reactividade de macrociclos tetrapirrólicos

As porfirinas, na sua forma livre, podem comportar-se como bases ou como ácidos. Estas propriedades ácido-base são devidas aos azotos pirrólicos, dois dos quais podem ganhar protões e os outros dois apresentam a capacidade de os perderem (Figura 1.6).⁷

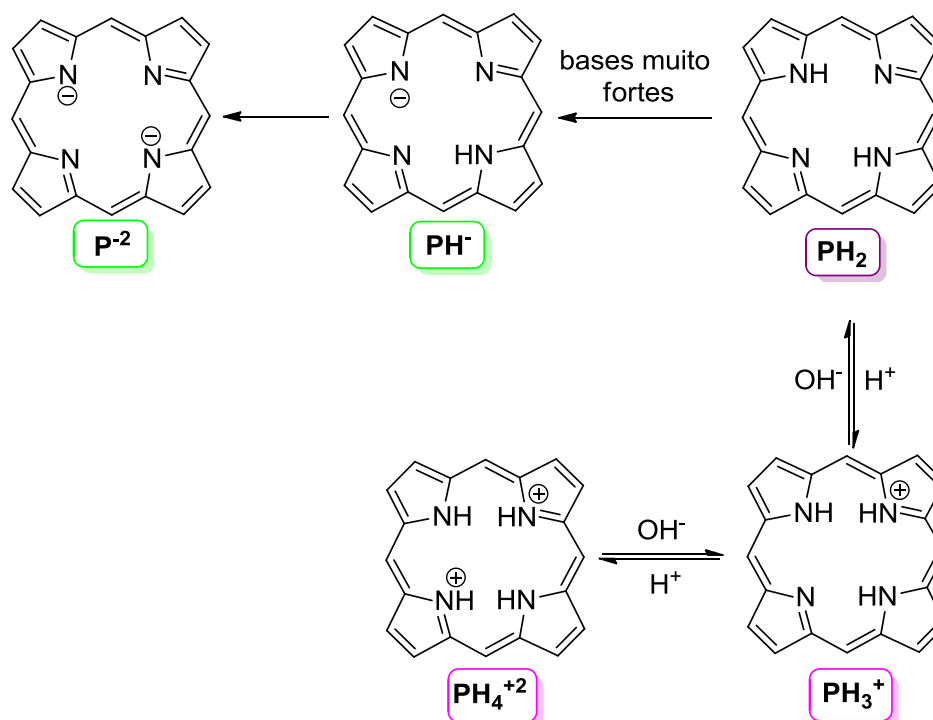


Figura 1.6. Características ácido-base das porfirinas.

Os quatro átomos de azoto no interior do macrociclo são ideais para complexar com catiões metálicos, formando metaloporfirinas. Estes complexos têm vindo a ser estudados extensivamente e quase todos os metais da tabela periódica foram inseridos no macrociclo porfirínico, apesar de na Natureza apenas se encontrarem complexadas com alguns deles, como é o caso dos iões magnésio, ferro, zinco, manganês, cobre, níquel e cobalto. As metaloporfirinas desempenham um papel importante em processos biológicos. Por exemplo, o ião Fe(II) complexa com a protoporfirina IX, formando, como já foi referenciado, os grupos prostéticos da hemoglobina e da mioglobina. Estas ligam-se reversivelmente ao oxigénio molecular. A hemoglobina transporta o oxigénio no plasma sanguíneo e a mioglobina armazena-o nas células. O mesmo complexo forma, também, o grupo prostético de catalases e peroxidases, que são componentes essenciais da defesa biológica contra a toxicidade de drogas exógenas.⁹

Os complexos metálicos das porfirinas podem sofrer uma grande variedade de reacções, nomeadamente de substituição aromática electrofílica. A complexação das porfirinas com metais de baixa electronegatividade aumenta a densidade electrónica na periferia do anel porfirínico convertendo-o numa espécie muito reactiva em relação a moléculas electrofílicas e, além disso, o ião metálico evita a protonação dos azotos pirrólicos e consequente formação do dicatión porfirínico não nucleofílico.^{7,10}

Os complexos metálicos com iões magnésio(II) e zinco(II), são complexos de baixa electronegatividade, o que torna o macrociclo mais rico em electrões, logo ideais para reacções com oxidantes e electrófilos. No entanto, estes complexos são muito lábeis em meio ácido, razão pela qual em reacções em que se utilizam condições reaccionais acídicas (como reacções de formilação e de nitração) se opte pela utilização de complexos mais estáveis como os de níquel(II) ou de cobre(II). Já os metais com elevada electronegatividade, como o de estanho(IV), são mais indicados para reacções de redução e nucleofílicas.^{7,9}

Relativamente às transformações periféricas de macrociclos porfirínicos, estas podem ocorrer nas posições *meso* ou β -pirrólicas.¹¹ Estes compostos são moléculas aromáticas, e como tal, participam em reacções típicas deste tipo de compostos: substituições electrofílicas, como a nitração, halogenação, formilação, sulfonação, alquilação e acilação. A activação das posições β -pirrólicas ou das posições *meso* é

conseguida através da modelação da electronegatividade do macrociclo. Os iões metálicos divalentes (Mg(II), Zn(II), Cu(II), Ni(II) e Pd(II)) induzem electronegatividade crescente no anel, tornando-o mais susceptível a substituições electrofílicas nas posições *meso*, metais com estado de oxidação mais elevado como o Sn(IV), ou as porfirinas livres, tendem a desactivar estas posições e activar as posições β -pirrólicas. No entanto, a grande maioria dos complexos metálicos de porfirinas sem substituintes nas posições *meso* sofrem reacções preferencialmente nessas posições e não nas posições β -pirrólicas. Por outro lado, sabe-se que as clorinas exibem maior tendência para a substituição nas posições *meso* adjacentes às do anel pirrólico reduzido.^{7,11}

Os macrociclos tetrapirrólicos podem, ainda, sofrer reacções de substituição nucleofílica, redução, oxidação e cicloadição.⁷ A possibilidade de se poderem realizar transformações nas posições periféricas das porfirinas, capazes de lhes induzir alterações estruturais significativas, constitui uma das formas mais eficazes de alterar as propriedades exibidas por estes compostos.

No entanto, durante os últimos anos, outras metodologias têm vindo a ser exploradas de forma obter novos derivados porfirínicos. Destas metodologias destacam-se as transformações catalisadas por metais de transição. A aplicação desta metodologia na funcionalização de porfirinas provou ser bastante importante, desenvolvendo novos tipos de compostos porfirínicos com propriedades interessantes.¹² As reacções catalisadas por metais de transição permitem obter elevadas selectividades e eficiência, permitindo, também, novas transformações que são difíceis de realizar com os métodos convencionais.¹²

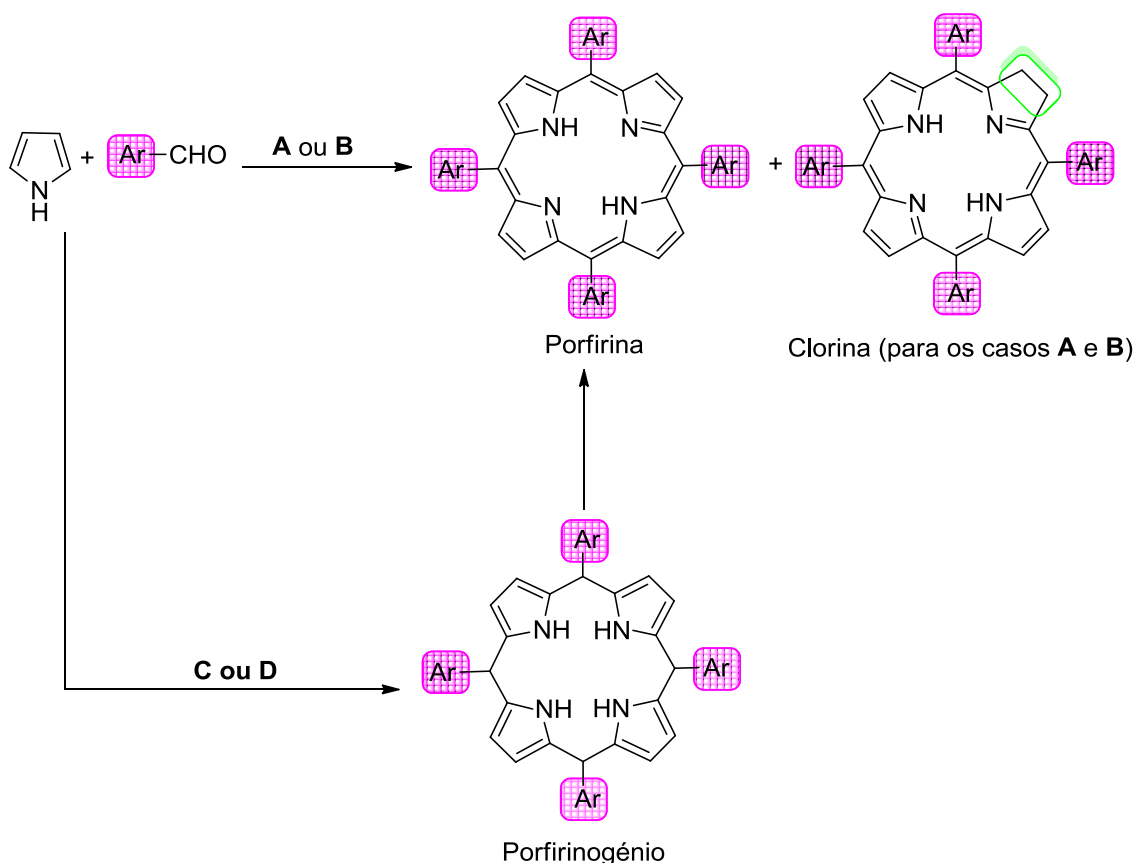
Devido à importância que as reacções catalisadas por metais desempenham na Química Orgânica, nesta dissertação será apresentada a síntese de novos derivados porfirínicos recorrendo a reacções catalisadas por metais de transição, como é o caso das reacções com carbenóides gerados a partir da decomposição catalítica de diazo compostos, da reacção de Suzuki e da reacção de metátese.

1.1.4. Síntese de macrociclos tetrapirrólicos

Os derivados porfirínicos com diversas estruturas químicas e características podem ser isolados da natureza ou sintetizados em laboratório. A síntese de materiais porfirínicos pode ocorrer segundo duas vias: através de intermediários pirrólicos ou introduzindo modificações em pigmentos naturais ou mesmo em porfirinas já sintetizadas.

Dada a existência de várias rotas de síntese de macrociclos tetrapirrólicos, abordaremos, de forma breve, apenas os processos de síntese de macrociclos porfirínicos do tipo estudado neste trabalho, porfirinas *meso*-substituídas. Estas podem ser sintetizadas por vários métodos, sendo o processo mais utilizado o da condensação de pirrol com um aldeído. No entanto, se na reação de condensação for usada uma mistura de aldeídos obtêm-se porfirinas assimétricas.

A primeira referência à síntese de porfirinas *meso*-substituídas deve-se a Rothmund, em 1935, que preparou mais de trinta porfirinas, entre as quais a 5,10,15,20-tetrafenilporfirina (**TPP**).¹³ Esta porfirina foi preparada através do aquecimento do pirrol e o correspondente benzaldeído em piridina a 220°C durante 48 horas em condições anaérobias (Esquema 1.1 **A**). Apesar da simplicidade deste método, os produtos eram obtidos com rendimentos muito baixos (inferiores a 5%) e por norma as porfirinas encontravam-se contaminadas com a correspondente clorina.



Condições:

A. Rothmund: piridina, 220°C, 48 h, condições anaérobias.

B. Adler e Longo: CH₃CH₂CO₂H, 141°C, 30min, O₂

C. Ciclização com BF₃ e oxidação com DDQ: 1. CH₂Cl₂, t.a., BF₃, N₂;
2. DDQ

D. Oxidação com nitrobenzeno: C₆H₅NO₂, CH₃CO₂H, 120°C, 1h

Esquema 1.1

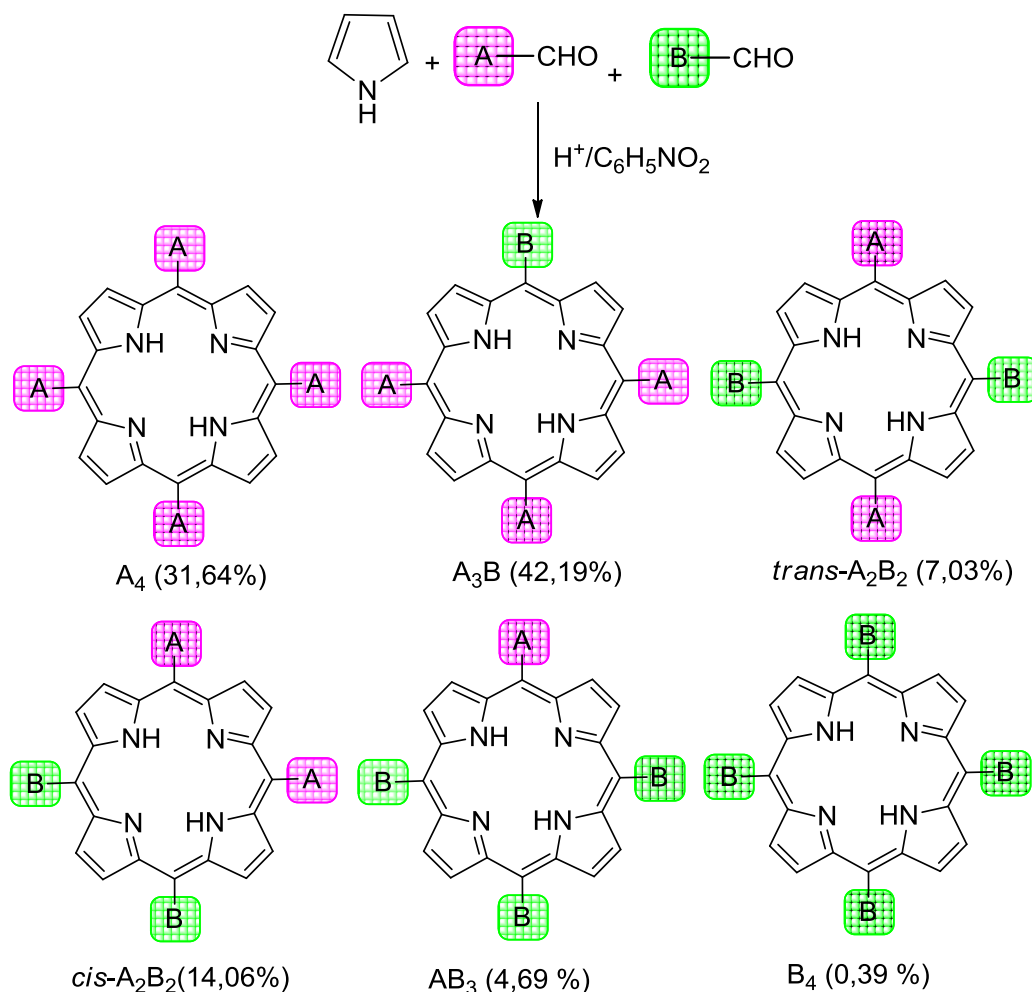
As desvantagens do método proposto por Rothmund levaram a que, mais tarde, Alder e Longo alterassem as condições da reacção. No método proposto por estes investigadores, a reacção de condensação entre pirrol e benzaldeídos ocorria em meio ácido e em condições aeróbias. Assim, a **TPP** foi obtida refluxando o pirrol e o benzaldeído em ácido propiónico durante 30 minutos, obtendo-se o produto final na forma cristalina directamente do meio reaccional (Esquema 1.1 **B**). Porém, e tal como na metodologia proposta por Rothmund, o macrociclo porfirínico encontrava-se contaminado com a correspondente clorina, embora em pequenas quantidades.¹⁴

Entre 1985 e 1986, Lindsey¹⁵ e Gonsalves¹⁶ desenvolveram uma nova metodologia de síntese considerando dois passos reaccionais para a síntese de

macrociclos porfirínicos. O primeiro envolvia a formação do porfirinogénio e o segundo a oxidação deste a porfirina (Esquema 1.1 C). Na metodologia proposta por Lindsey a condensação do pirrol e do aldeído ocorria numa solução de diclorometano seco na presença de um catalisador ácido (BF_3 , TFA ou BCl_3), à temperatura ambiente sob atmosfera de azoto e protegido da luz; numa segunda fase, o porfirinogénio formado era oxidado por adição de um agente oxidante (DDQ ou *p*-cloranil) originando a correspondente porfirina livre dos derivados reduzidos. No método proposto por Gonsalves a formação do porfirinogénio ocorria através da condensação de pirrol e aldeídos alifáticos em tetracloreto de carbono na presença de TFA a 60°C. A oxidação deste derivado foi realizada com DDQ ou *p*-cloranil ou através da oxidação fotoquímica. Este método, como qualquer outro, possui vantagens e desvantagens. Por um lado as condições reaccionais suaves e a elevada diluição dos reagentes permitem utilizar a maioria dos aldeídos, por outro, o uso de elevadas quantidades de quinonas e o recurso a técnicas cromatográficas para isolar a porfirina, tornam-no um processo sintético caro. Assim, este método só deverá ser empregue quando se pretende preparar uma pequena quantidade de porfirina. Quando o objectivo é a preparação de quantidades apreciáveis de material porfirínico, será de todo o interesse que a porfirina se possa isolar directamente do meio reaccional como acontece no método de Adler e Longo.

Estudos desenvolvidos mais tarde por Gonsalves e seus colaboradores, demonstraram que era possível preparar, num só passo, porfirinas *meso*-tetra-aril-substituídas com bons rendimentos e sem estarem contaminadas com a respectiva clorina. Este processo consistiu na condensação do pirrol e do benzaldeído numa mistura de ácido acético ou ácido propiónico com 30% de nitrobenzeno como solventes, a 120°C, durante 1 hora e em condições aeróbias (Esquema 1.1 D).¹⁷ As excelentes características oxidantes do nitrobenzeno, permitiram a oxidação do porfirinogénio a porfirina, evitando assim a presença de clorina como contaminante desta reacção. Este método permitiu ainda a síntese de porfirinas *meso*-substituídas não simétricas, através da condensação do pirrol com uma mistura de aldeídos. A quantidade dos diferentes compostos formados depende da proporção de aldeídos presente na mistura reaccional e da sua reactividade. Se for considerada uma mistura de dois aldeídos, A-CHO e B-CHO na razão 3:1 é possível obter, com rendimentos

diferentes, a combinação de porfirinas representadas no esquema 1.2, supondo que a reactividade dos aldeídos é igual.



Esquema 1.2.

O uso da radiação microondas em síntese orgânica tornou-se uma ferramenta muito importante em diversas metodologias sintéticas. É reconhecido que a activação por microondas ocorre a nível molecular o que torna estas reacções mais rápidas do que os métodos tradicionais. Nos últimos quinze anos têm surgido diversos trabalhos inovadores na aplicação da radiação por microondas na área da síntese e funcionalização de porfirinas, com bons resultados.¹⁸ Foi demonstrado que, através do uso de microondas, é possível sintetizar porfirinas, assim como os seus complexos metálicos, com bons rendimentos e baixos tempos de reacção. Para isso, têm vindo a

ser estudadas várias condições, como é o caso da adaptação das metodologias anteriores para o método de síntese em microondas.¹⁸

1.2. Aplicações de porfirinas

Devido às suas propriedades químicas e físicas, os compostos porfirínicos podem ser aplicados em áreas distintas.¹⁹ O grande interesse nestes compostos baseia-se na sua importância biológica e na possibilidade de serem aplicados em áreas como as de catálise, catálise enzimática,^{20,21} modelos de sistemas fotossintéticos,²² transportadores artificiais de oxigénio, sensores químicos,²³ sistemas optoelectrónicos, semicondutores, supercondutores, cristais líquidos,²⁴ agentes biocidas, tais como fungicidas²⁵ e insecticidas.²⁶ No entanto, é na medicina que o uso destes compostos ganha maior destaque, onde são aplicados com sucesso em PDT, na detecção de tecidos neoplásicos e na inibição de agentes virais presentes no sangue. Tem sido também avaliada a sua aplicabilidade como agentes intercalantes do DNA, no tratamento de doenças da pele (acne, eczema, psoríase, etc.), arteriosclerose, artrites e na degeneração da mácula da retina.^{27,28,29,30}

A PDT é já uma modalidade usada no diagnóstico e tratamento do cancro e o seu princípio está a ser aplicado a muitas outras áreas, nomeadamente na inactivação ou eliminação de microrganismos,³¹ vírus³² e príões⁵ em fluídos ou materiais contaminados e em infecções.³³

A terapia fotodinâmica é, sem dúvida, a aplicação mais conhecida e reconhecida pela comunidade científica, quer na fotoinactivação de células tumorais (PDT) quer na fotoinactivação de microrganismos (PACT). Devido à importância desta terapia e uma vez que o objectivo do trabalho desenvolvido durante esta dissertação foi a síntese de novos derivados porfirínicos com potenciais aplicações em terapia fotodinâmica, serão apresentados, nos pontos seguintes, os fundamentos teóricos da PDT e da PACT.

A Terapia Fotodinâmica do Cancro (PDT)

Nos dias de hoje, existem diversos meios de tratamento de cancro que incluem a cirurgia, para casos de tumores sólidos localizados, a radioterapia e a quimioterapia, para o caso de tumores não localizados. Todos estes tratamentos causam graves danos físicos e emocionais aos pacientes, e muitas vezes não eliminam o cancro, apenas o remetem para um estado de latência temporária. Por isto surgiu a necessidade de descobrir outros agentes terapêuticos que permitam a eliminação do cancro com danos mínimos para o paciente. A aplicação das propriedades fotossensibilizadoras na terapia do cancro pode ser uma das alternativas e os macrociclos tetrapirrólicos possuem estas propriedades. Na realidade, os fotossensibilizadores mais estudados em PDT são macrociclos porfirínicos e seus derivados.

A PDT tem sido usada no tratamento de tumores e o primeiro passo desta terapia envolve a administração, geralmente intravenosa, do fotossensibilizador que se liga às lipoproteínas de baixa densidade da corrente sanguínea. Uma vez que as células tumorais possuem maior quantidade de lipoproteínas de baixa densidade do que as células normais e como, apesar da elevada irrigação sanguínea, a drenagem linfática é reduzida, o fotossensibilizador concentra-se nestes tecidos e a sua eliminação é mais lenta. O fotossensibilizador é então activado com luz a um determinado comprimento de onda onde absorve extensamente comparado com os crómoforos endógenos. Quando activado, o fotossensibilizador converte o oxigénio molecular em oxigénio singuleto, que reage imediatamente com os componentes celulares vitais que conduzem à morte celular.^{34,35} O tumor é, então, destruído selectivamente (Figura 1.7).

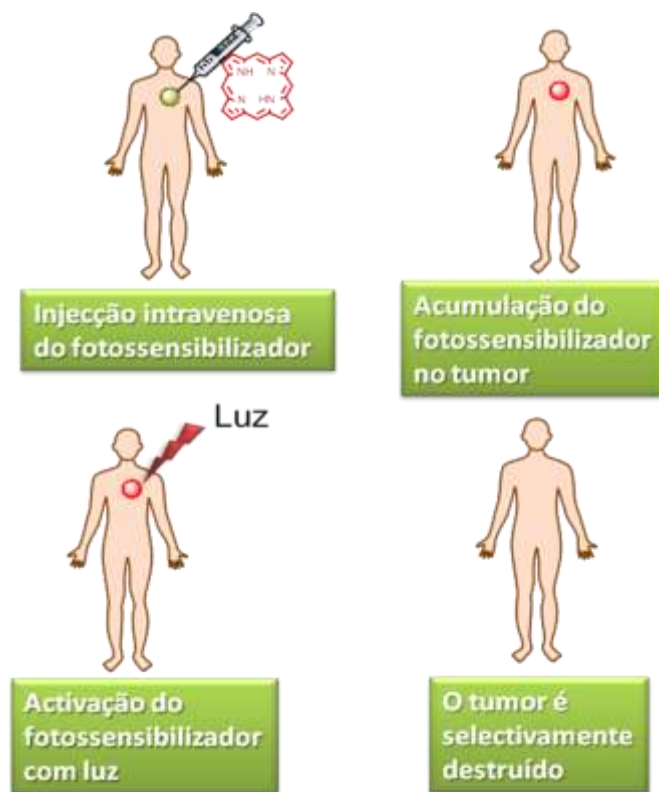


Figura 1.7. Fases de tratamento de um tumor por PDT.

A aplicação desta terapia no tratamento de neoplasias foi iniciada com uma mistura de oligómeros, obtidos a partir da hematoporfirina, e que se encontra comercializada sob as designações de Photosan[®], Photogem[®] e Photofrin[®]. Estes fotossensibilizadores são denominados fotossensibilizadores de 1^a geração (Figura 1.8).³⁶

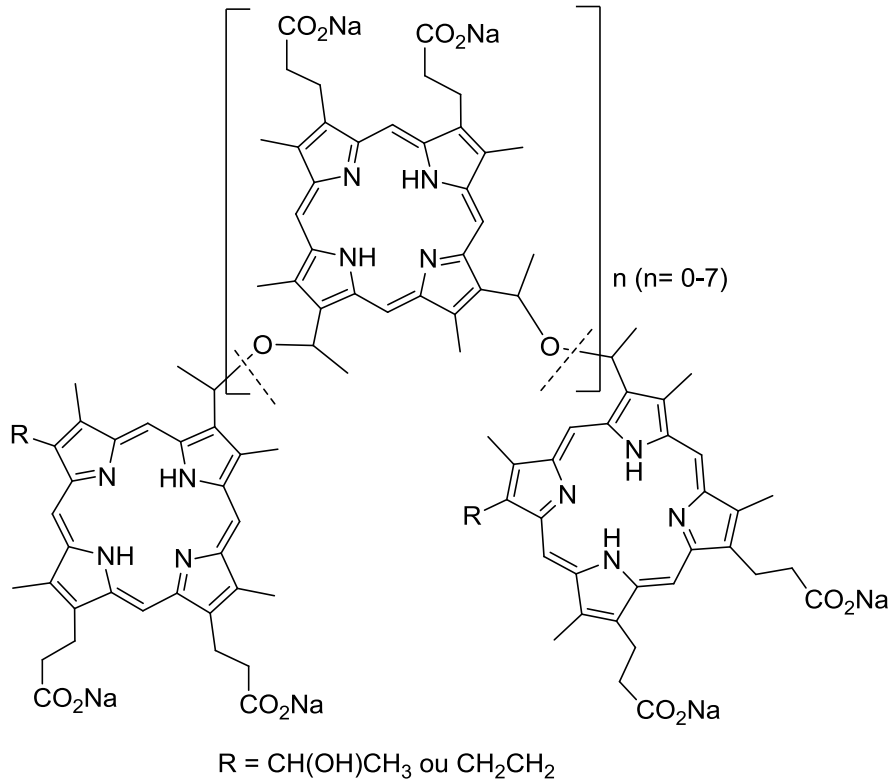


Figura 1.8- Representação de algumas ligações existentes entre os monómeros constituintes do Photofrin®.

Apesar destes fotossensibilizadores terem sido objecto de vastos ensaios clínicos e se encontrarem no mercado, apresentam algumas desvantagens, como por exemplo:

- baixa selectividade para com o tecido tumoral;
- fotossensibilidade cutânea durante algumas semanas;
- a banda de absorção onde a droga é fotoactivada (zona do vermelho) é fraca e não se encontra na zona ideal do espectro;
- são misturas de composição variável, não tendo sido possível isolar nem caracterizar o principal composto activo.³⁶

Na tentativa de colmatar as falhas dos fotossensibilizadores de 1ª geração, têm-se vindo a desenvolver novas moléculas cuja selectividade e actividade se revele melhor do que as dos que já se encontram em comercialização. Surgem, então, os fotossensibilizadores de 2ª geração, como é o caso do Visudyne® e o Foscan® (Figura 1.9). Estas moléculas apresentam algumas diferenças quando comparadas com as primeiras, quer nos intervalos que medeiam entre a administração do

fotossensibilizador e a irradiação do tecido neoplásico, quer no que se refere à dose de fotossensibilizador administrada e luz requerida para provocar necrose. A síntese destes fotossensibilizadores permitiu estabelecer as características ideais para um composto poder ser usado em PDT, tais como:

- solubilidade adequada em líquidos corporais, o que condiciona tanto o seu transporte como o tempo de retenção;
- elevada selectividade para o tecido neoplásico em relação ao tecido normal;
- não possuir toxicidade na ausência da luz;
- absorver perto do vermelho do espectro do visível ($\lambda > 650$ nm), já que a radiação deste comprimento de onda tem maior poder de penetração nos tecidos;
- elevado rendimento de oxigénio singuleto, e por isso deverá possuir um estado excitado tripleto com tempo de vida e energia adequados;
- não sofrer degradação pela luz, já que tal se pode reflectir negativamente no rendimento quântico do oxigénio singuleto;
- síntese curta e de elevado rendimento;
- ser uma substância pura e de composição constante;
- e, fundamentalmente, que provoque necrose dos tecidos neoplásicos.

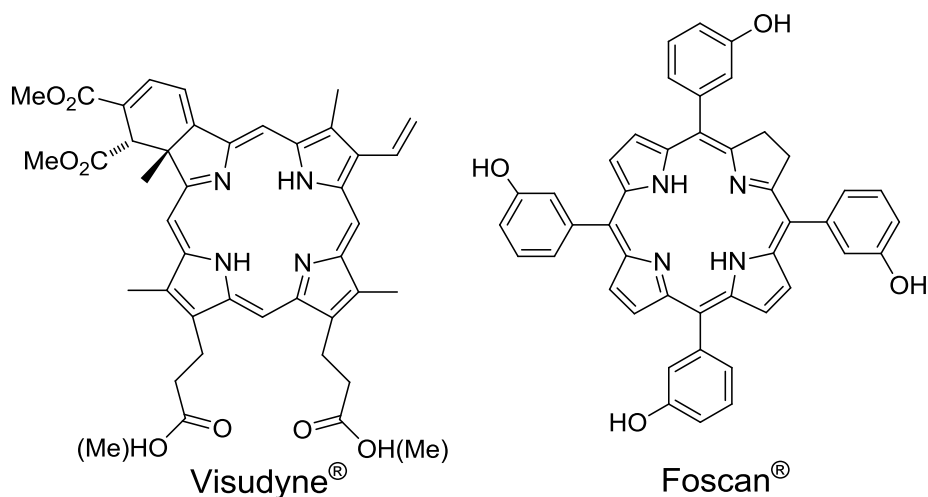


Figura 1.9. Estruturas do Visudyne® e do Foscan®.

Alguns destes fotossensibilizadores de 2ª geração são derivados de clorinas, bacterioclorinas, benzoporfirinas, ftalocianinas e naftalocianinas. Estes são compostos que apresentam algumas propriedades fotofísicas desejáveis, como é o caso das clorinas e as bacterioclorinas que apresentam uma banda de absorção intensa entre os

660-690 nm e a 730 nm, respectivamente; as ftalocianinas e naftalocianinas apresentam uma banda intensa entre os 670 nm e os 820 nm e as benzoporfirinas apresentam grande aptidão para se localizarem rapidamente nas células neoplásicas.³⁶

Mecanismo de acção fotodinâmica

O mecanismo de acção fotodinâmica foi sendo estabelecido ao longo do século XX, sendo o seu conhecimento responsável pelo grande desenvolvimento da PDT.³⁶

Nos anos 30 foi conhecida a dependência da presença de oxigénio e da acumulação do fotossensibilizador para obter o efeito fotodinâmico e com isto foram propostos vários mecanismos para o explicar. Mais recentemente, foi sugerido que o resultado da PDT é devido a vários processos fotoquímicos e biológicos e é este conceito que ainda prevalece para explicar o efeito fotodinâmico.³⁶

Este processo pode ser explicado recorrendo ao diagrama de Jablonski modificado (Figura 1.10), que apresenta as diversas transições que um electrão sofre após passar ao estado excitado.

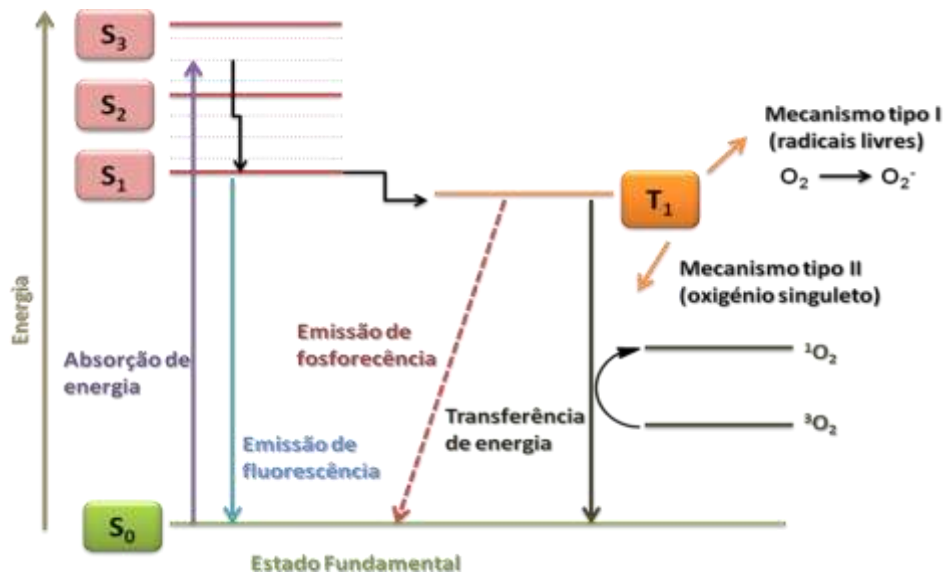


Figura 1.10- Diagrama de Jablonski modificado.

Assim, quando um fotossensibilizador for excitado através da absorção de radiação, este passará do seu estado fundamental singuleto (S₀) para um estado excitado singuleto (S₂ ou S₃) cujo tempo de vida é muito curto. O electrão poderá

passar a estados excitados de menor tempo de vida, mas processos de conversão interna conduzem o fotossensibilizador ao estado excitado singuleto de menor energia (S_1). Após alguns nanossegundos esta espécie volta ao estado fundamental (S_0). Este retorno ao estado de menor energia poderá ocorrer de três formas diferentes:

- Por decaimento não radiativo, onde ocorre a libertação de calor.
- Por decaimento radiativo por emissão de luz, onde é emitida fluorescência a comprimentos de onda superiores ao absorvido.
- Por cruzamento de intersistemas (ISC), ocorre uma inversão de spin e o fotossensibilizador é convertido num estado excitado tripleto. O decaimento para o estado S_0 pode ocorrer com emissão de fosforescência. No entanto, esta é uma transição proibida uma vez que neste estado, o fotossensibilizador apresenta tempos de vida bastante longos o que aumenta a probabilidade de transferência de energia para outras moléculas.³⁷

Assim, neste estado excitado tripleto, podem ocorrer alterações químicas em moléculas que se encontrem próximas ao fotossensibilizador, através de dois mecanismos:

- Mecanismo tipo I, em que o fotossensibilizador reage directamente com biomoléculas por processos de transferência de electrões formando espécies radicalares. Por exemplo, no caso em que o oxigénio é o substrato, este forma $O_2^{\cdot -}$ que se converte em radicais do tipo OH^{\cdot} , que podem reagir com outras moléculas originando processos em cadeia.
- Mecanismo tipo II, em que o fotossensibilizador transfere a energia para moléculas no estado fundamental. Para que ocorra a conservação de spin, ambos têm de se encontrar no estado tripleto, sendo, obviamente, necessário que a energia do estado tripleto do substrato seja menor que a do fotossensibilizador. A maior parte dos substratos orgânicos possui uma energia de estado tripleto alta relativamente a fotossensibilizadores como as porfirinas, ao contrário do O_2 que no estado fundamental se encontra no estado tripleto (3O_2). A energia proveniente do fotossensibilizador pode ser transferida para 3O_2 que passa ao estado de singuleto

(¹O₂).³⁶ Esta é uma espécie altamente reactiva e oxidante, reagindo indiscriminadamente com uma série de biomoléculas que constituem as membranas de organelos celulares, como por exemplo lípidos insaturados, colesterol e aminoácidos. Dado que as membranas celulares desempenham importantes funções biológicas, tais como delinear e organizar os sistemas biológicos, a sua destruição pode levar à destruição do sistema vascular de um tumor ou à inactivação de microrganismos.^{38,39}

Esta característica confere às porfirinas o papel de fotossensibilizadores e a sua combinação com luz e oxigénio é a base da PDT. No entanto, vários são os estudos com o objectivo de averiguar o mecanismo de acção dos fotossensibilizadores na inactivação de células tumorais. Para além do rendimento quântico de oxigénio singuleto, existem outros factores que contribuem para o efeito terapêutico da PDT. Um destes factores prende-se com as características estruturais do fotossensibilizador a usar.

Assim, quando um fotossensibilizador é lipofílico ou aniónico espera-se que os danos celulares ocorram nas membranas dos constituintes das células, como é o caso das membranas do citoplasma, mitocôndrias, lisossomas, núcleo e retículo endoplasmático. Nestes casos, é normal a oxidação de fosfolípidos, afectando, gravemente, a permeabilidade celular e o normal funcionamento de enzimas e receptores membranares.⁴⁰ Se o fotossensibilizador a usar for catiónico, este acumula-se preferencialmente nas mitocôndrias, afectando o seu normal funcionamento desencadeando processos de morte celular.⁴⁰ No caso de drogas hidrofílicas, ocorre a acumulação preferencial nos lisossomas, destruindo-os, e consequentemente, libertando as enzimas hidrolíticas no citoplasma, constituindo um factor de letalidade.⁴⁰

A fotoinactivação de microrganismos (PACT)

As propriedades fotodinâmicas das porfirinas também têm sido estudadas para a sua aplicação na destruição de bactérias, vírus e outros microrganismos.⁴¹ A terapia de fotoinactivação de microrganismos é designada pela comunidade científica de PACT (Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy).

A PACT baseia-se nos três conceitos da PDT: a acumulação preferencial do fotossensibilizador na célula microbiana, a irradiação da célula, a um comprimento de onda adequado, que induz a activação fotoquímica do O₂ para o seu estado excitado (¹O₂), reagindo com várias macromoléculas da bactéria (de acordo com a localização subcelular do fotossensibilizador) provocando-lhe danos letais.⁴²

Estudos realizados demonstraram que a fotoinactivação é muito promissora no caso de bactérias Gram positivas, *mycoplasmas* e leveduras, contudo a fotoinactivação de bactérias Gram negativas revelou-se ineficaz.^{41,42} Este insucesso atribuí-se ao facto das bactérias Gram negativas possuírem uma membrana externa que protege a parede celular impedindo a ligação da porfirina à membrana celular. Para superar esta barreira, o fotossensibilizador pode ser aplicado juntamente com um agente desorganizador da membrana não citotóxico como a Polimixina B (Polymyxin B nonapeptide - PMNP) ou então usando fotossensibilizadores catiónicos que interagem com organelos da membrana externa, desorganizando-a e aumentando a sua permeabilidade.^{41,42}

Quanto à fotoinativação de vírus, resultados francamente animadores têm sido obtidos na inactivação de vírus *Herpes simplex* e do vírus da estomatite vesicular.^{43,44}

O grande objectivo da fotoinactivação de microrganismos visa, sobretudo, a sua aplicação na foto-esterilização do sangue e produtos derivados contaminados com o vírus da Imunodeficiência Adquirida (SIDA). Para tal, será necessário efectuar muitos estudos neste sentido.

Como já foi referido anteriormente, este trabalho teve como objectivo a síntese, através de metodologias usando complexos de iões metálicos de transição como catalisadores, de novos derivados porfirínicos com potenciais aplicações em terapia fotodinâmica. Assim, utilizando a abordagem do acoplamento de porfirinas e

moléculas farmacologicamente activas, foram sintetizados novos derivados glicoporfirínicos e glicoclorínicos e as suas propriedades fotodinâmicas foram estudadas na foto-inactivação de células de uma linha tumoral humana de cancro cervical (células HeLa). Utilizando esta abordagem foram, também, sintetizados novos derivados quinolona-porfirina e triazol-porfirina. As propriedades fotodinâmicas dos derivados quinolona-porfirina foram estudadas na foto-inactivação do parasita *Leishmania Braziliensis*, responsável pelo aparecimento de Leishmaniose cutânea no Brasil.

1.3. Referências Bibliográficas

1. Manso, C. In *Bioquímica Humana*, 2ª Ed., Fundação Calouste Gulbenkian: Lisboa, **1977**.
2. http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1930/
3. Manso, A.; Freire, A.; Azevedo, M. In *Introdução à Bioquímica*, Fundação Calouste Gulbenkian: Lisboa, **1986**.
4. Cavaleiro, J. A. S.; Smith, K. M. *Rev. Port. Quím.*, **1989**, 31,29-33.
5. Milgrow, L. R. In *The Colours of Life*, Oxford University Press: Oxford, **1997**.
6. Moss, G. P. *Pure Appl. Chem.*, **1987**, 59, 779-832.
7. Scheer, H.; Kats, J. J. In *Porphyrins and Metalloporphyrins*, Smith, K. M. (Ed.), Elsevier Scientific Publishing Company: Amsterdam, **1975**.
8. Moser, J. G. In *Photodynamic Tumour Therapy – 2nd and 3rd Generation Photosensitizers*, Harwood Academic Publishers: Amsterdam, **1998**.
9. Cowan, J. A. In *Inorganic Biochemistry: an introduction*, 2ª Ed., Wiley-VCH: New York, **1997**.
10. Smith, K. M. In *Comprehensive Organic Chemistry-The Synthesis and Reactions of Organic Compounds*, Barton, D.; Ollis, W. D. (Eds.), Pergamon Press: Oxford, **1979**.
11. Janson, T. R.; Katz, J. J. In *The Porphyrins: Physical Chemistry- Part. B*, Dolphin, D. (Ed.), Academic Press: New York, **1978**.
12. Shinokubo, H.; Osuka, A. *Chem. Commun.*, **2009**, 1011–1021.
13. Rothmund, P. *J. Am. Chem. Soc.*, **1936**, 58, 625-627.
14. Adler, A. D.; Longo, F. R.; Finarelli, J. D.; Goldmecher J.; Assour, J.; Korsakoff, L. *J. Org. Chem.*, **1967**, 32, 476-476.
15. Lindsey, L. S.; Schreiman, I. C.; Hsu, H. C.; Kearney, P. C.; Marguerattaz, A. M. *J. Org. Chem.*, **1987**, 52, 827-836.
16. Gonsalves, A.M.D.R.; Pereira, M.M. *J. Heterocycl. Chem.* **1985**, 22, 931-933.
17. Gonsalves, A. M. R.; Varejão, J. M. T. B.; Pereira, M. M. *J. Heterocycl. Chem.*, **1991**, 28, 635-641.
18. Cavaleiro, J. A. S.; Tomé, A. C.; Neves, M. G. P. M. S. In *Handbook of Porphyrin Science*; Vol. 2; Kadish, K.; Smith, K. M.; Guillard, R., Eds.; World Scientific Publishing Company: Singapore, **2010**.
19. Pandey, R. K.; Zheng, G., in *The Porphyrin Handbook- Applications: Past, Present and Future* Kadish, K. M.; Smith, K. M.; Guillard, R. (Eds.), Academic Press: New York, **2000**, vol.6.
20. Ortega, Y. R.; Toledano, C. A.; Rosales, D. R.; Sandoval A. S.; Vergara, E.G.; Ulloa, R. Z. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, **1998**, 667-674.

21. Murakami, Y.; Kikuchi, J.; Hisaeda, Y.; Hayashida, O. *Chem. Rev.*, **1996**, 96, 721-758.
22. Solladié, N.; Hamel, A.; Gross, M. *Tetrahedron Lett.*, **2000**, 41, 6075-6078.
23. Purrello, R.; Gurrieri, S.; Lauceri, R. *Coord. Chem. Rev.*, **1999**, 190, 683-706.
24. Tian, H. J.; Inoue, K.; Yoza, K.; Ishi-I, T.; Shinkai, S. *Chem. Lett.*, **1998**, 871-874.
25. Carré, V.; Gaud, O.; Sylvain, I.; Bourdon, O.; Spiro, M.; Blais, J.; Granet, R.; Krausz, P.; Guilloton, M. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, **1999**, 48, 57-62.
26. Ben Amor, T.; Tronchin, M.; Bortolotto, L.; Verdiglione, R.; Jori, G. *Photochem. Photobiol.*, **1998**, 67, 206-211.
27. Zhao, P.; Xu, L.C.; Huang, J.W.; Zheng, K.C.; Liu, J.; Yu, H.C.; Ji, L.N. *Biophysical Chemistry* **2008**, 134, 72-83.
28. Kormeili, T.; Yamauchi, P.S.; Lowe, N.J. *British J. Dermatol.* **2004**, 150, 1061-1069.
29. Funke, B.; Jungel, A.; Schastak, S.; Wiedemeyer, K.; Emmrich, F.; Sack, U. *Lasers in Surgery and Medicine* **2006**, 38, 866-874.
30. Awan, M. A.; Tarin, S. A. *Surgeon* **2006**, 4, 231-236.
31. Carvalho, C. M. B.; Gomes A. T. P. C.; Fernandes, S. C.; Prata, A. C. B.; Faustino, M. A. F.; Tomé, J. P. C., Neves, M.G. P.M. S.; Tomé, A. C.; Lin, Z.; Rainho, J. P.; Almeida, M. A.; Cunha, M. A.; Rocha, J.; Cavaleiro, J. A. S. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, **2007**, 88, 112-118.
32. Tomé, J. P. C.; Silva, E. M. P.; Pereira, A. M. V.M.; Alonso, C. M. A.; Faustino, M. A. F.; Neves, M. G. M. S.; Tomé, A. C.; Cavaleiro, J. A. S.; Tavares, S. A. P.; Duarte, R. R.; Caeiro, M. F.; Valdeira, M. L. *Bioorg. Med. Chem.*, **2007**, 15, 4705-4713.
33. Bonnet, R., In *Chemical Aspects of Photodynamic Therapy*, Gordon and Breach Science Publishers:London, **2000**.
34. Sternberg, E. D.; Dolphin, D. *Tetrahedron*, **1998**, 54, 4151-4202.
35. Jori, G; Berg, K.; Young, A. R., In *The Fundamental Bases of Phototherapy*, OEMF spa: Milano, **1996**.
36. Bonnett, R. In *Chemical Aspects of Photodynamic Therapy*, Gordon and Breach Science Publishers: Amsterdam, **2000**.
37. DeRosa, M. C.; Crutchley, R. J. *Coord. Chem. Rev.*, **2002**, 351, 233-234.
38. www.photobiology.com
39. <http://pt.wikipedia.org/wiki/Cancro>
40. Kudinova, N. V.; Berezov, T. T. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry*, **2010**, 4, 95-103.
41. Jori, G.; Brown, S. B. *Photochem. Photobiol.*, **2004**, 3, 403-405.

42. Jori, G.; Perria, C., In *Photodiagnosis and Phototherapeutic Techniques in Medicine*, Documento Editoriale srl.: Milano, **1995**.
43. Tomé, J. P. C.; Neves, M. G. P. M. S.; Tomé, A. C. ; Cavaleiro, J. A. S.; Mendonça, A. F.; Pegado, I. N.; Duarte, R.; Valdeira, M. L. *Bioorg. Med. Chem.*, **2005**, *13* , 3878-3788.
44. Gomer, C. J. *Photochem. Photobiol.*, **1991**, *54*, 1093-1107.

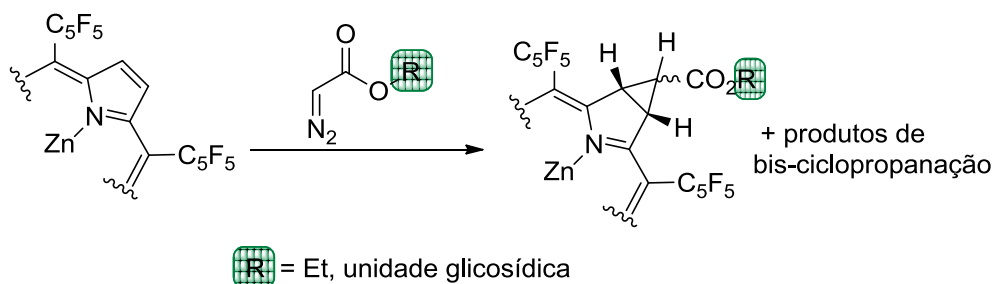
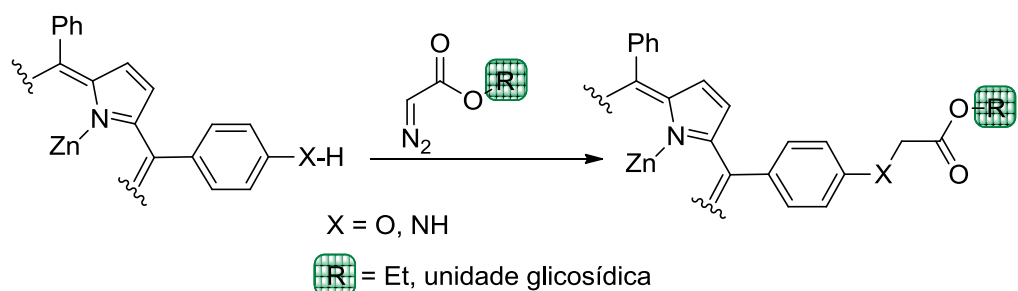
Capítulo 2

**Compostos α -diazocarbonílicos na síntese de novos compostos porfirínicos.
Avaliação biológica de alguns derivados glico-conjugados.**

2. Compostos α -diazocarbonílicos na síntese de novos compostos porfirínicos. Avaliação biológica de alguns derivados glico-conjugados.

Preâmbulo

No segundo capítulo desta tese serão apresentados os estudos realizados na funcionalização de porfirinas contendo ligações O-H e N-H, através da reacção de inserção de diazo compostos na presença de um catalisador de ródio. Aproveitando a versatilidade destes compostos com a função diazo e, também, com base em estudos anteriores desenvolvidos pelo nosso grupo de investigação, foi, também, proposta a síntese de glico-porfirinas e de glico-hidroporfirinas através de reacções de inserção e de ciclopropanação, respectivamente, com α -diazacetatos contendo unidades glicosídicas na presença de metais de transição como catalisadores (ver estruturas a seguir indicadas).



Por fim, os derivados glicoporfirínicos que se mostraram mais eficientes na geração de oxigénio singuleto foram usados como fotossensibilizadores na fotoinactivação de uma linha celular tumoral humana de cancro cervical. A sua actividade fotodinâmica foi ainda avaliada numa linha não tumoral de queratinócitos humanos. Estes estudos

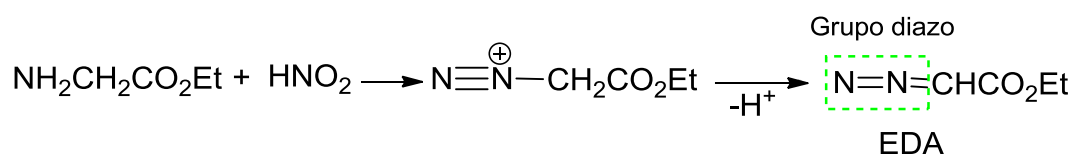
Compostos α -diazocarbonílicos na síntese de novos compostos porfirínicos.
Avaliação biológica de alguns derivados glico-conjugados.

de avaliação biológica serão apresentados no final deste capítulo. No entanto, para uma melhor compreensão da química dos diazo compostos serão abordados alguns aspectos importantes sobre esta classe de compostos. Será, também, apresentado trabalho já reportado na literatura sobre funcionalização de macrociclos tetrapirrólicos com diazo compostos.

2.1. A química dos diazo compostos

A descoberta

A era dos diazo compostos começou quando Peter Griess, em 1858, descobriu os diazo compostos aromáticos. Este investigador estudou esta classe de compostos durante mais de duas décadas, mas só depois de 10 anos da sua descoberta é que foi estabelecida a sua síntese.¹ Apenas em 1883 é que foi sintetizado o primeiro diazo composto alifático, o diazoacetato de etilo (EDA), por Theodor Curtius, através da diazotização do α -aminoacetato de etilo (Esquema 2.1).^{1,2}



Esquema 2.1.

Desde então, esta classe de compostos tem fascinado os químicos orgânicos devido às inúmeras reacções que podem ocorrer na sua presença, recorrendo a diferentes condições experimentais: com aquecimento, com irradiação de luz, com ácidos de Lewis e de Brönsted e por decomposição sob acção catalítica de metais de transição. Durante muito tempo o conhecimento da química destes compostos foi escasso, e só nas últimas décadas é que esta teve maior desenvolvimento. Esta classe de substâncias contendo o grupo diazo constitui uma ferramenta importante para a síntese de compostos orgânicos, principalmente porque permite a formação de novas ligações carbono-carbono, as quais poderão ser difíceis de obter por outras metodologias.^{1,2}

A classificação

Em termos de classificação os diazo compostos dividem-se em dois grupos: os diazo compostos alifáticos e os diazo compostos α -carbonílicos. Estas substâncias diferenciam-se principalmente pela estabilidade e facilidade de preparação. Os diazo compostos alifáticos são mais instáveis e com métodos de preparação mais elaborados. Um exemplo destes é o diazometano, cuja síntese requer um procedimento elaborado.³ Os diazo compostos α -carbonílicos são mais estáveis e a sua síntese é mais fácil, sendo até alguns comerciais,² como é o caso do EDA.

Os compostos diazo α -carbonílicos participam em várias reacções das quais se destacam as reacções de substituição, reacção de inserção em ligações C-H ou X-H (X = N, O, S), ciclopropanação, formação de íletos, rearranjo de Wolf, oxidação, ciclização catalisada por ácido, cicloadição 1,3-dipolar, formação de íletos seguida por rearranjo, entre outras.^{1,2,4}

Durante este trabalho foram usados compostos diazo α -carbonílicos para os estudos de funcionalização de macrociclos tetrapirrólicos. Assim, serão apresentadas seguidamente algumas considerações sobre as reacções em que estes compostos participam.

As espécies envolvidas

Como já foi referido, a decomposição de diazo compostos pode ser provocada, por exemplo, por termólise e por irradiação com luz (fotólise directa). Desta decomposição resulta a formação de compostos com um átomo de carbono di-radicalar. Tais espécies, designados por carbenos, são intermediários altamente reactivos, mas com baixa selectividade. Por este motivo, têm sido pouco usados em síntese orgânica.^{1,2}

A decomposição de diazo compostos pode ocorrer, também, na presença de complexos de metais de transição, formando intermediários complexados com o ião metálico, designados de carbenóides. Estes são espécies mais estáveis e selectivas,

pois a coordenação do carbeno com o centro metálico modera a reactividade da espécie resultante e aumenta a sua selectividade.^{1,2}

Assim, os métodos catalíticos suplantaram a decomposição térmica e fotolítica e são procedimentos eficientes para reacções de ciclopropanação, inserção e formação de iletos, etc. Para além disso, os recentes avanços na compreensão mecanística das transformações catalisadas por metais de transição desmistificaram o enigma que era associado a este tipo de processos.¹

Para melhor perceber o mecanismo das reacções que envolvem tais compostos, é importante conhecer melhor as espécies intermediárias (carbenos e carbenóides) que se formam durante estes processos.

Os carbenos são espécies neutras que contêm um átomo de carbono divalente com apenas seis electrões de valência e a sua fórmula geral é $R_1R_2C:$. Este átomo de carbono tem hibridação sp^2 . A orbital p está vazia ou semi-preenchida e é perpendicular ao plano que contem R_1 , R_2 e o par de electrões não compartilhado.^{5,6}

Os carbenóides são moléculas em que todos os átomos de carbono são tetravalentes, mas que têm as mesmas propriedades dos carbenos. Normalmente, os carbenóides têm átomos de carbono que estão simultaneamente ligados a iões metálicos ou a halogénios. É difícil ter a certeza se numa reacção a espécie reactiva é um carbeno livre ou um carbenóide.^{1,10}

A decomposição de diazo compostos catalisada por complexos de iões metálicos de transição

Devido à sua selectividade, a formação de carbenóides através da decomposição de diazo compostos por iões de metais de transição tem sido amplamente usada para a síntese de diversos compostos de valor acrescido, substituindo a decomposição térmica e fotolítica destas espécies. Também no presente trabalho se considerou a decomposição destes compostos por iões de metais de transição para a funcionalização de macrociclos tetrapirrólicos, e por isso, nesta parte do trabalho, focalizar-nos-emos apenas neste processo, explicando a formação de carbenóides e o mecanismo das reacções em que participam.

Iões de metais de transição, como Cu(I) e Cu(II), Pd(II), Rh(II), etc, catalisam a decomposição de compostos diazo através da formação de complexos ião metálico-carbeno (carbenóides), fornecendo, assim, métodos sintéticos muito úteis.^{3,7}

O uso deste processo catalítico foi iniciado em 1952 por Yates¹ que postulou que catalisadores de iões de metais de transição reagem com diazo compostos através da formação de um complexo intermediário electrofílico ião metálico-carbeno. A actividade catalítica destes complexos metálicos depende da coordenação do seu ião metálico central, que permite que eles reajam como electrófilos com diazo compostos. Doyle⁴ propôs um ciclo catalítico para a formação de um carbenóide e a sua reacção com um substrato rico em electrões, S:. Assim, a adição electrofílica do diazo composto ao ião metálico causa a perda de azoto e a formação de complexo metal-carbeno estabilizado (A). A transferência do carbeno para um substrato rico em electrões (B) completa o ciclo catalítico (Figura 2.1).^{1,8}

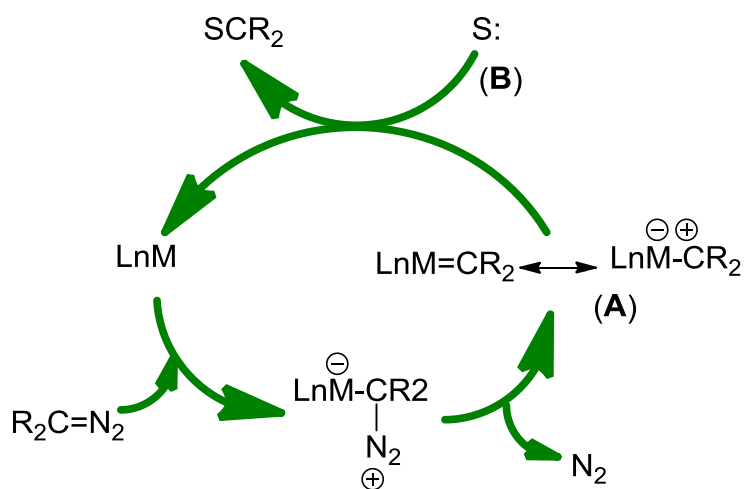


Figura 2.1. Ciclo catalítico da adição de um carbeno a um substrato rico em electrões.

Apesar de muitos complexos de metais de transição formarem carbenóides, o desenvolvimento de carboxilatos de ródio (Rh) permitiu obter maior selectividade (químico, regio e estereo) em reacções com compostos diazo carbonílicos.⁹

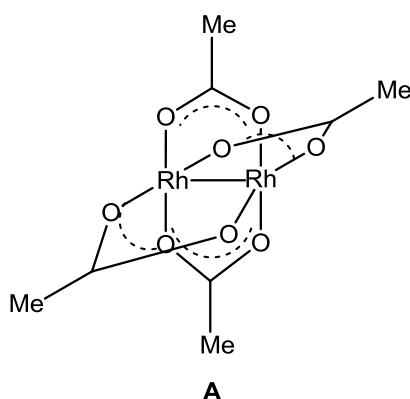
Um dos carboxilatos mais usados, o $\text{Rh}_2(\text{OAc})_4$, é um composto binuclear com quatro ligandos de acetato e possui um local de coordenação vazio por ião metálico (Figura 2.2 **A**). A decomposição de compostos diazo carbonílicos catalisada por $\text{Rh}(\text{II})$ envolve o intermediário electrofílico ião metálico-carbeno (**D**), que pode ser

considerado um ileto com polaridade invertida (**E**). Este é estabilizado pelo ião ródio por cedência de um electrão, mas destabilizado pelo grupo carbonílico sacador de electrões. Este tipo de ileto invertido nunca foi isolado e não induz metátese de alcenos. A pureza do $\text{Rh}_2(\text{OAc})_4$ parece ser crucial para a elevada actividade catalítica, particularmente, para reacções intramoleculares.

A selectividade na formação de carbenóides de ródio pode ser influenciada por factores electrónicos dos ligandos carboxilatos bidentados. Por exemplo, o *bis*-tetratriluoracetato de ródio é mais reactivo do que o *bis*-acetato de ródio, sendo porém menos selectivo.

As reacções orgânicas que podem ocorrer através da espécie ião metálico-carbeno de diazo compostos são várias e incluem: ^{1,2,3}

- (i) ciclopropanação de alcenos e alcinos;
- (ii) inserção em ligações C-H, N-H, O-H e S-H;
- (iii) formação de iletos;
- (iv) reacção de Buchner.³



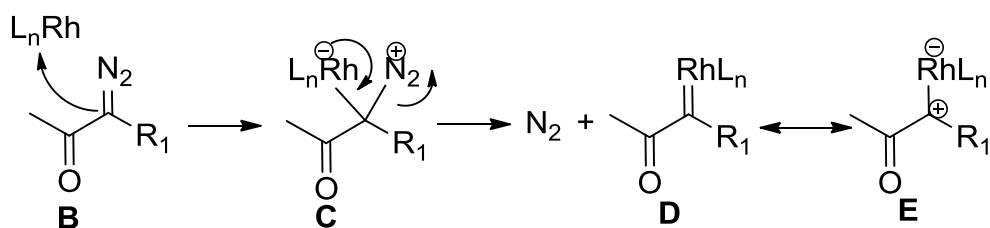


Figura 2.2. Decomposição de compostos diazo carbonílicos catalisada por um complexo de ródio.

Em seguida, serão apresentados alguns aspectos mecanísticos de reacções de decomposição de diazo compostos envolvendo iões de metais de transição consideradas relevantes para o desenvolvimento deste trabalho.

i. Reacções com ligações múltiplas – reacção de ciclopropanação

O estudo sistemático de vários complexos de iões de metais de transição revelou que as espécies de ródio são os catalisadores mais suaves e eficazes para ciclopropanação. Os carbenóides, que se formam ao complexar com carbenos gerados a partir de diazo compostos, facilmente se adicionam a ligações carbono-carbono duplas e triplas.¹

Doyle e seus colaboradores conduziram as investigações mais importantes no que diz respeito ao mecanismo das reacções de catalisadores de iões metálicos.^{4,10} Este grupo sugeriu que a reacção que ocorre entre o carbenóide e as ligações duplas favorecem, geralmente, a formação de ciclopropanos com estereoquímica *trans*. Neste mecanismo, a regioselectividade na formação do anel é determinada por efeitos estéreo-electrónicos, ou seja, por interacção entre o átomo de carbono electrofílico do alceno original com o oxigénio do grupo carbonílico (Figura 2.3 -G). Neste trabalho, Doyle concluiu, também, que alcenos ricos em electrões são mais reactivos e que no começo da reacção ocorre a associação da ligação π do alceno com o centro electrofílico do complexo ião metálico-carbeno, seguida pela formação de uma ligação σ com a eliminação do catalisador (Figura 2.3 - F).^{3,10}

Compostos α -diazocarbonílicos na síntese de novos compostos porfirínicos.
Avaliação biológica de alguns derivados glico-conjugados.

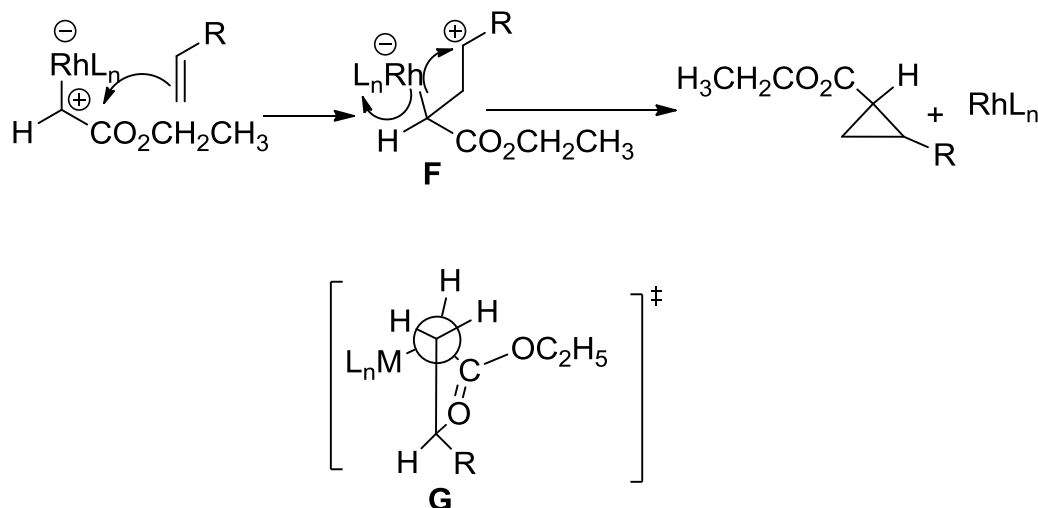


Figura 2.3. Mecanismo de ciclopropanação catalisada por metais de transição.

Esta explicação é ainda hoje considerada,^{4,11} apesar de nunca se terem observado os intermediários. No entanto, estudos computacionais corroboram este mecanismo que é consistente e torna compreensíveis as observações experimentais.
3,10,11

Este processo reaccional tornou-se comum, sendo usado na indústria farmacêutica no grupo Merck (Canadá) para a preparação de dienos *cis-trans* na síntese dos ácidos hidroxi-eicosatetraenóicos (HETEs), através da adição de diazo compostos a furano. Estes compostos são reguladores de algumas actividades dérmicas importantes.^{3,12}

ii. Reacções de inserção

Juntamente com reacções de ciclopropanação, a inserção em ligações simples é a reacção mais característica dos carbenos. A inserção de diazo compostos em ligações X-H (X= C, N, O, S) é uma transformação orgânica muito valiosa, uma vez que permite a funcionalização de ligações não reactivas, como sejam as ligações C-H.^{13,14}

A activação de ligações C-H não funcionalizadas foi intensivamente estudada na década de 80, mas o desenvolvimento de um método catalítico prático mostrou-se algo muito difícil. Apesar da activação de ligações C-H através da adição oxidativa (Figura 2.4) de um complexo metálico muito reactivo ter sido muito explorada, a

dificuldade de regenerar o complexo complicou a procura de um novo processo catalítico.¹⁵

Uma alternativa que mostrou ser bastante promissora seria a inserção C-H induzida por um carbenóide metálico (Figura 2.4).³

Na activação da ligação C-H induzida pelo carbenóide metálico, o ião metálico não interage directamente com a ligação C-H, o que difere da adição oxidativa.

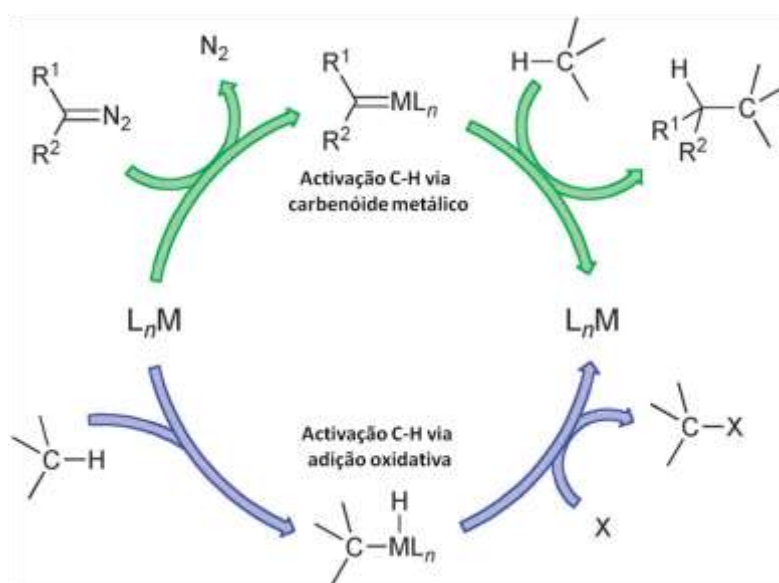
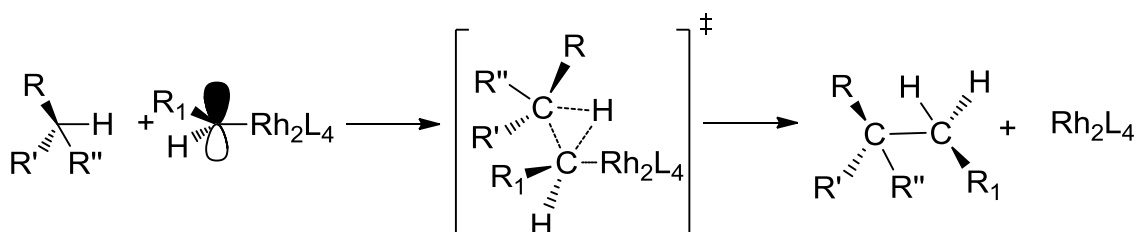


Figura 2.4. Activação de uma ligação C-H via adição oxidativa e via carbenóide metálico.

Num caso ideal, a nova ligação C-C entre dois carbonos sp^3 é criada através da activação da ligação C-H de um hidrocarboneto. Foi assumido que esta reacção envolve um complexo ródio-carbeno e que o ciclo catalítico consiste em três passos: expulsão de azoto do diazocomposto catalisada pelo ião ródio, activação da ligação C-H e formação da nova ligação C-C. Estes dois últimos passos foram assumidos como sendo uma única reacção. O primeiro passo é limitante para inserções em ligações C-H secundárias, e, uma vez que a informação mecanística desta reacção e subsequentes passos são escassas, foram várias as especulações sobre este processo.

Muito recentemente, Nakamura e seus colaboradores, através de estudos computacionais,¹⁶ confirmaram a proposta mecanística originalmente sugerida por Doyle¹⁷ em que a formação das ligações C-C com o carbono do carbeno ocorre ao

mesmo tempo da dissociação do ligando do ião metálico (Esquema 2.1).^{18,19} Antes destes estudos computacionais, existiam algumas propostas alternativas que incluíam a transferência de hidrogénio da ligação C-H para o metal do carbenóide sincronizado com a formação da ligação C-C, seguida de eliminação reductiva.²⁰ No estudo intensivo reportado por Nakamura, foi mostrado que a inserção na ligação C-H ocorre num único passo através de um estado de transição com três centros e com baixa energia de activação. Surpreendentemente, apenas um dos dois iões de ródio se liga ao carbeno e o outro serve como ligando, aumentando a electrofilicidade do intermediário, facilitando, assim, a quebra da ligação Rh-C (Figura 2.5). Nenhum dos iões de ródio interage directamente com a ligação C-H que sofre a reacção.¹⁸



Esquema 2.1.

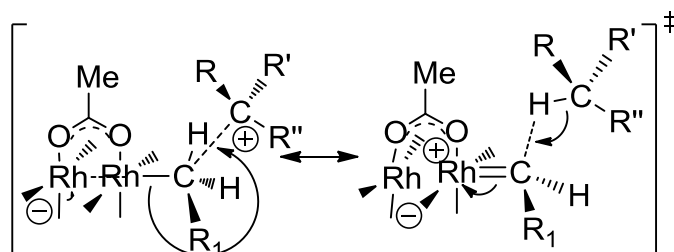


Figura 2.5. Estrutura do intermediário formado durante a reacção de inserção C-H.

Um bom catalisador para reacções de inserção C-H requer um carácter electrofílico no seu centro metálico. Porém se o ião é muito electrofílico, o catalisador tem baixa selectividade devido à elevada reactividade e é susceptível a reacções de competição indesejáveis. Se o ião não for suficientemente electrofílico, o catalisador não é reactivo para inserções C-H. Assim, grupos sacadores de electrões no ião metálico ou adjacentes ao carbono do carbenóide aumentam a electrofilicidade do

carbenóide. Os melhores complexos metálicos ligam-se ao carbono do carbenóide através de ligações σ -dativas fortes e ligações π retro-dativas fracas, que estabilizam o carbono do carbenóide, assegurando a sua electrofilicidade.

O reconhecimento do $Rh_2(OAc)_4$ como um catalisador eficaz em transformações de carbenóides, principalmente em reacções de inserção C-H, resultou na extensão da metodologia a reacções de inserção envolvendo ligações polares, X-H (X= O, N, S).

Nos anos 70, Yates reportou que a decomposição de diazocetonas com ião cobre na presença de álcoois e fenóis origina produtos resultantes da inserção de carbenos e carbenóides nas ligações O-H.²¹ Teyssié reportou a inserção do diazoacetato de etilo em ligações O-H de álcoois simples e insaturados na presença do ião ródio. Estes estudos foram estendidos a reacções de inserção em ligações N-H.^{21,22}

Apesar dos muitos estudos envolvendo reacções de inserção neste tipo de ligações, não é possível ainda encontrar uma descrição exaustiva do processo mecanístico de reacções de inserção em ligações polares X-H (X= O, S e N), tal como acontece com as reacções de inserção C-H. Para o caso das inserções em ligações O-H, foram propostas duas vias diferentes para este tipo de reacções (Figura 2.6). Nos dois casos, existe inicialmente a formação do carbenóide ródio. Num dos casos ocorre a inserção directa do carbenóide na ligação O-H de forma concertada (**A**), tal como ocorrerá nas inserções em ligações C-H.^{23,24} No entanto, esta via foi considerada impossível devido à ausência de reactividade/selectividade. A outra via sugere que esta reacção ocorre em vários passos com a formação de íletos **Y** (**B**).^{21,25}

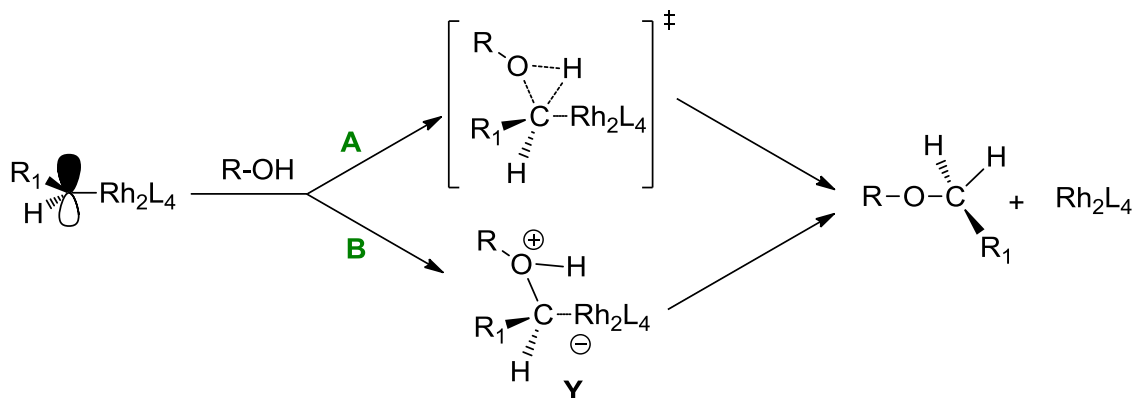
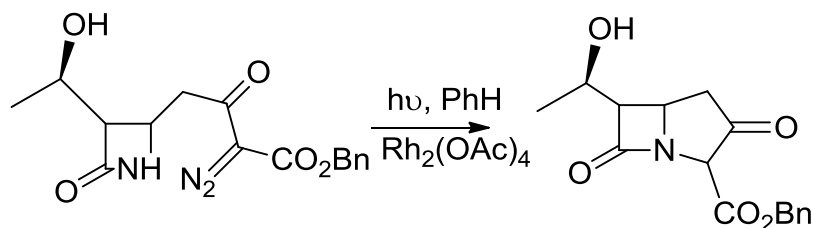


Figura 2.6. Mecanismo de inserção em ligações O-H.

Um estudo computacional recente da reacção de inserção O-H de diazo compostos em moléculas de água²⁶ demonstrou a facilidade da formação dos íletos do tipo Y descrito em cima, o que reforça a ideia de que a via concertada é a menos favorecida.

Apesar de ainda não terem sido reportados estudos mecanísticos das reacções de inserção em ligações N-H, acredita-se que estas ocorrerão da mesma forma proposta para as inserções de diazo compostos em ligações O-H.²⁷

A aplicação desta metodologia para funcionalizaçã de compostos orgânicos foi posta em prática em várias áreas. Por exemplo, investigadores da Merck incorporaram uma reacção de inserção N-H catalisada por $\text{Rh}_2(\text{OAc})_4$ na síntese do antibiótico β -lactâmico (Esquema 2.2).⁷



Esquema 2.2.

2.2. Funcionalização de macrociclos tetrapirrólicos com diazo compostos na presença complexos de iões metálicos de transição como catalisadores

Os diazo compostos têm vindo a ser usados em síntese orgânica há várias décadas,⁴ no entanto, na literatura, são escassos os trabalhos publicados referentes à funcionalização de macrociclos porfirínicos com estes compostos. Uma pesquisa bibliográfica com as palavras-chave “porphyrins” e “diazocompounds” mostra que cerca de 90% dos artigos encontrados estão relacionados com o uso de metaloporfirinas (*e.g.* complexos porfirínicos de ruténio, ródio, cobalto ou cobre) como catalisadores na decomposição de diazo compostos.²⁸ No entanto, alguns grupos de investigação têm apostado na versatilidade dos diazo compostos para a obtenção de novos macrociclos tetrapirrólicos com características estruturais importantes para a sua aplicação em diversas áreas, como, por exemplo, PDT, catálise e produção de células solares.^{29,30,31}

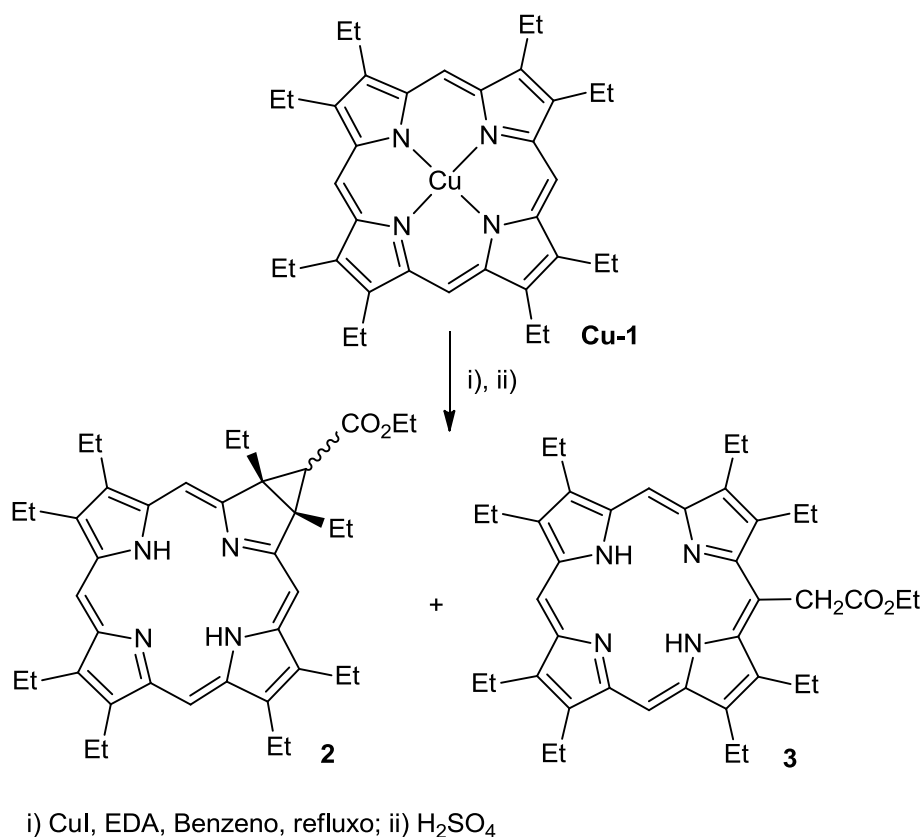
Neste ponto abordaremos, sucintamente, alguns trabalhos reportados na literatura sobre a modificação de porfirinas através da decomposição catalítica por iões metálicos de transição de diazo compostos. É importante referir a existência de um artigo de revisão que explora, de uma forma mais abrangente, a funcionalização de porfirinas usando diazo compostos.³²

Um dos primeiros grupos a estudar a funcionalização de porfirinas com diazo compostos foi o grupo de Fischer. A reacção de vinilporfirinas com EDA para formar os derivados de ciclopropano permitiu ajudar a clarificar a estrutura da protoporfirina-IX. Estes resultados foram publicados em revistas científicas alemãs durante os anos 30 e são, agora, de difícil acesso.³³

Em 1969 Callot e Johnson reportaram a reacção do complexo de cobre da octa-etilporfirina **Cu-1** com EDA na presença de iodeto de cobre(I).³⁴ Depois da descomplexação, foi possível isolar uma mistura isomérica de clorinas fundidas com o

Compostos α -diazocarbonílicos na síntese de novos compostos porfirínicos.
Avaliação biológica de alguns derivados glico-conjugados.

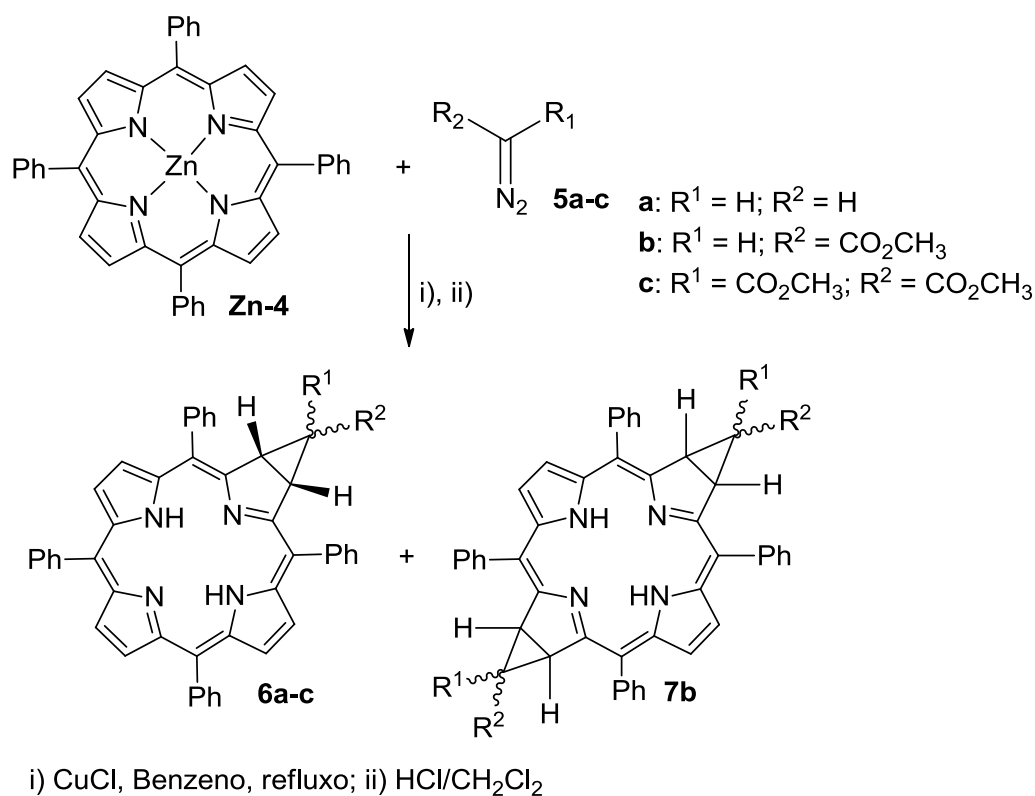
anel de ciclopropano **2** como produtos majoritários (Esquema 2.3). Foi possível, também isolar pequenas quantidades da porfirina **3**.



Esquema 2.3.

Três anos mais tarde, Callot reportou a reação do complexo de zinco da 5,10,15,20-tetrafenilporfirina (TPP) **Zn-4** com carbenos gerados a partir do diazometano **5a**, do diazoacetato de metilo **5b** e do diazomalonato de dimetilo **5c** (Esquema 2.4).³⁵ Nestas reações, após descomplexação, os produtos majoritários obtidos foram identificados como sendo as correspondentes clorinas fundidas com o anel de ciclopropano **6** (Esquema 2.4). Quando foi usado o diazo **5b**, foi ainda possível isolar a mistura isomérica das bacterioclorinas **7b**. Nestes estudos foram obtidos produtos *N*-alquilados que mostraram ser os precursores de derivados β -alquilados.³⁶

Compostos α -diazocarbonílicos na síntese de novos compostos porfirínicos.
Avaliação biológica de alguns derivados glico-conjugados.

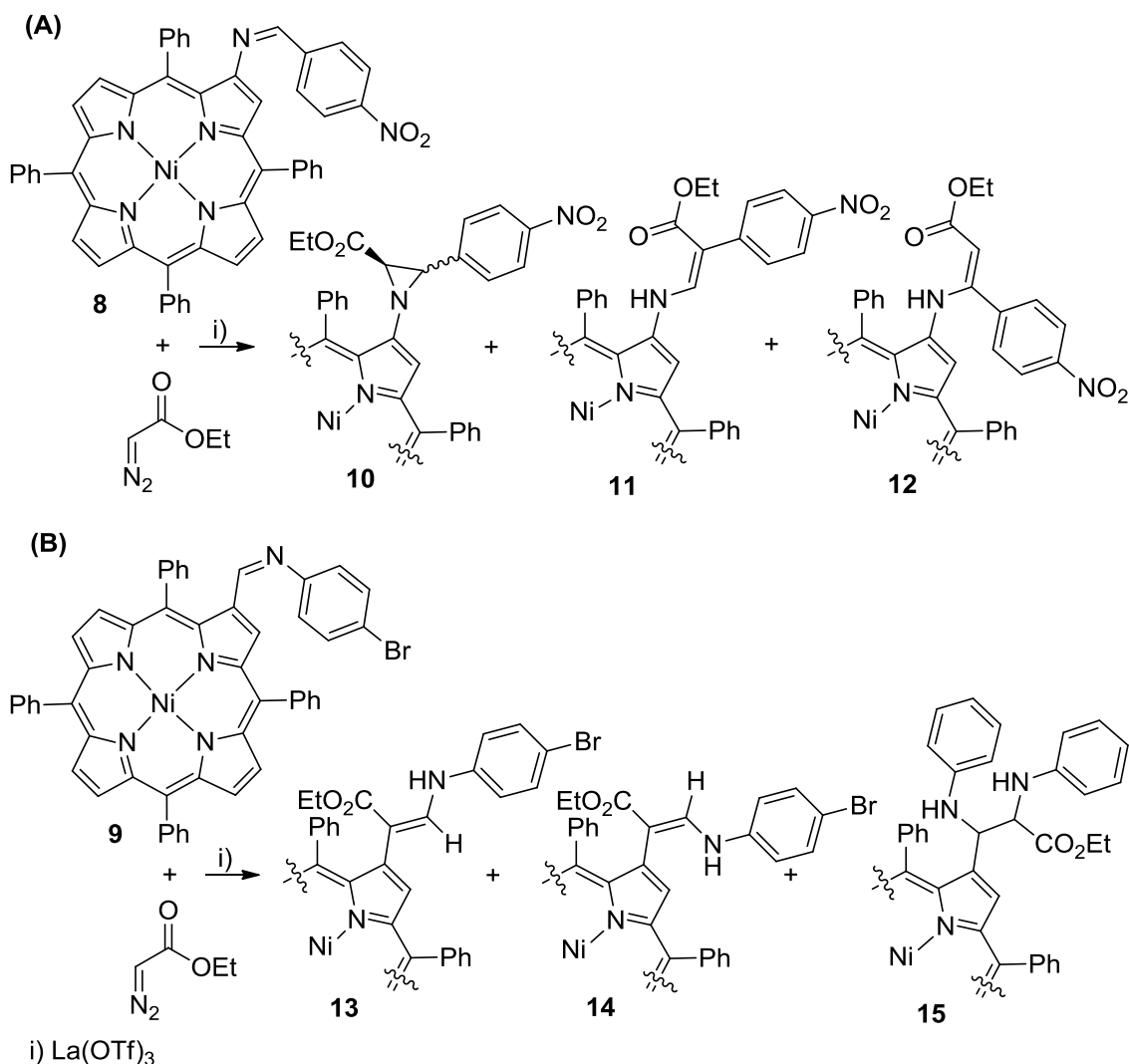


Esquema 2.4.

O período antes do ano 1980 foi dedicado a alquilações, expansões e contracções de porfirinas usando diazo compostos.³⁷ Devido a todo o trabalho desenvolvido nesta área, o trabalho de Callot foi revisto, anos mais tarde, no livro *Handbook of Porphyrins*.³⁸

Em 2006, o grupo de Aveiro estudou a possibilidade do uso β -iminoporfirinas **8** e **9** como receptores de carbenóides.³⁹ Este estudo envolveu a decomposição de EDA na presença de quantidades catalíticas de triflato de lantânio e a distribuição dos produtos é dependente do tipo de iminoporfirina usada (Esquema 2.5 A e B). A reacção com a β -iminoporfirina **8** origina os derivados aziridíneos *cis* e *trans* **10** como produtos maioritários e os ésteres β -amino- α,β -insaturados **11** e **12** como produtos minoritários. A reacção nas mesmas condições reaccionais com a imina **9** origina a mistura isomérica Z/E dos ésteres α,β -insaturados **13** e **14** e o éster α,β -diamínico **15**.

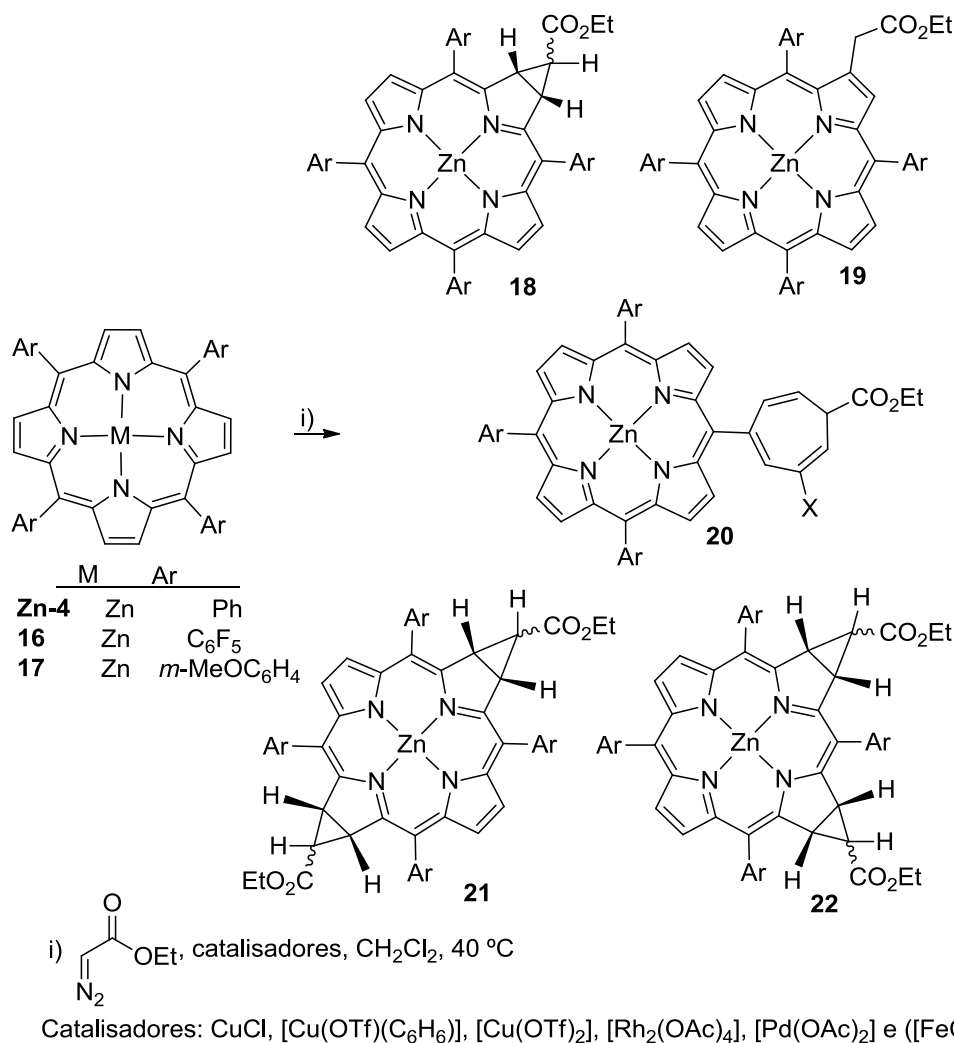
Compostos α -diazocarbonílicos na síntese de novos compostos porfirínicos. Avaliação biológica de alguns derivados glico-conjugados.



Esquema 2.5.

Em 2008 mesmo grupo de investigação avaliou a decomposição de EDA por vários catalisadores na presença de complexos de zinco de *meso* tetra-arylporfirinas com diferentes características electrónicas. Os catalisadores seleccionados foram o CuCl , $[\text{Cu}(\text{OTf})(\text{C}_6\text{H}_6)]$, $[\text{Cu}(\text{OTf})_2]$, $[\text{Rh}_2(\text{OAc})_4]$, $[\text{Pd}(\text{OAc})_2]$ e a cloro[*meso*-tetraquis(2,6-diclorofenil)porfirinato]ferro(III) ($[\text{FeCl}(\text{tdcpp})]$).⁴⁰ Foi mostrado que a distribuição dos produtos é dependente do catalisador usado e das características electrónicas dos grupo arilo das posições *meso*. Estas reacções permitiram obter os produtos de mono- e bis-ciclopropanação e outros produtos resultantes da inserção C-H de uma posição β -pirrólica e produtos formados por expansão de Büchner de um grupo arilo da posição *meso* (Esquema 2.6).

Compostos α -diazocarbonílicos na síntese de novos compostos porfirínicos.
Avaliação biológica de alguns derivados glico-conjugados.



Esquema 2.6.

Nestas reacções foi observado que os catalisadores de ródio e de cobre são aqueles que promovem maiores conversões das porfirinas de partida **Zn-4** e **17**. O catalisador de cobre foi aquele que se mostrou mais selectivo para a reacção de ciclopropanação, formando, preferencialmente, o isómero *trans* das clorinas **18**. Por sua vez, o catalisador de ródio foi o único que promoveu a formação dos produtos de inserção C-H **19**. Nestas reacções foi ainda possível obter outros produtos minoritários, os derivados **20** e **21** e a sua formação é dependente do catalisador usado e das características electrónicas dos grupos arilo das posições *meso*. No caso em que foi usada a porfirina **16**, que contém grupos sacadores de electrões nas posições *meso*, observou-se um perfil muito diferente dos anteriores. Neste caso, o catalisador de ródio mostrou-se menos eficiente, enquanto que o CuCl foi particularmente eficaz na

reacção de ciclopropanação, formando as clorinas **18** e as isobactericlorinas **22** com bons rendimentos.

Como é possível observar, são escassos os trabalhos reportados na literatura sobre a funcionalização de porfirinas com diazo compostos na presença de iões de metais de transição como catalisadores. No entanto esta abordagem é bastante versátil, promovendo diversas alterações em macrociclos porfirínicos através da formação compostos com características estruturais adequadas para poderem ser aplicados em várias áreas e não é de espantar se mais exemplos destes sejam reportados num futuro próximo.

2.3. Estudos de funcionalização de meso-tetra-arilporfirinas com diazo compostos envolvendo reacções de inserção

Como já foi realçado, o uso de diazo compostos tem atraído muita atenção por parte de químicos orgânicos devido à sua versatilidade em várias transformações. Em particular, a inserção catalítica de compostos diazo α -carbonílicos em ligações X-H, em que X pode representar C, N, O ou S é considerada uma transformação orgânica versátil para preparar moléculas complexas com grandes potencialidades em áreas como a medicina. Apesar do conceito da inserção de carbenóides em ligações X-H ser conhecido há mais de três décadas, são raros os estudos de funcionalização de macrociclos tetrapirrólicos envolvendo este tipo de abordagem. Como já foi referido anteriormente, em 2008 o nosso grupo de investigação mostrou que o $\text{Rh}_2(\text{OAc})_4$ tem a capacidade de catalisar a reacção de inserção do carbeno/carbenóide gerado a partir EDA numa ligação C-H de uma posição β -pirrólica de complexos de zinco de meso-tetra-arilporfirinas.⁴⁰

Seguindo o interesse no desenvolvimento de novos métodos de funcionalização para preparar novos derivados porfirínicos, decidiu-se visitar este tema, mas agora explorando as reacções de inserção de compostos diazo α -carbonílicos em ligações O-H e N-H na presença de um catalisador de ião Rh. Para este estudo foram seleccionadas porfirinas com grupos O-H e NH_2 : a 5-(4-hidroxifenil)-10,15,20-trifenilporfirinatozinco (II) **23** e a 5-(4-aminofenil)-10,15,20-trifenilporfirinatozinco (II)

24 (Figura 2.7). O uso destas porfirinas na forma de complexos metálicos de zinco teve como objectivo evitar que a reacção de inserção dos carbenos pudesse ocorrer nas ligações N-H do interior dos macrociclos.

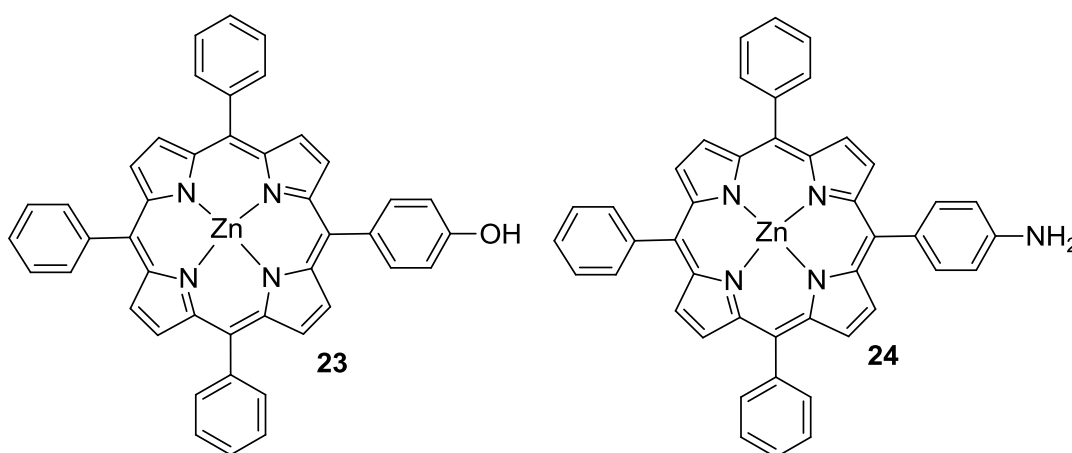
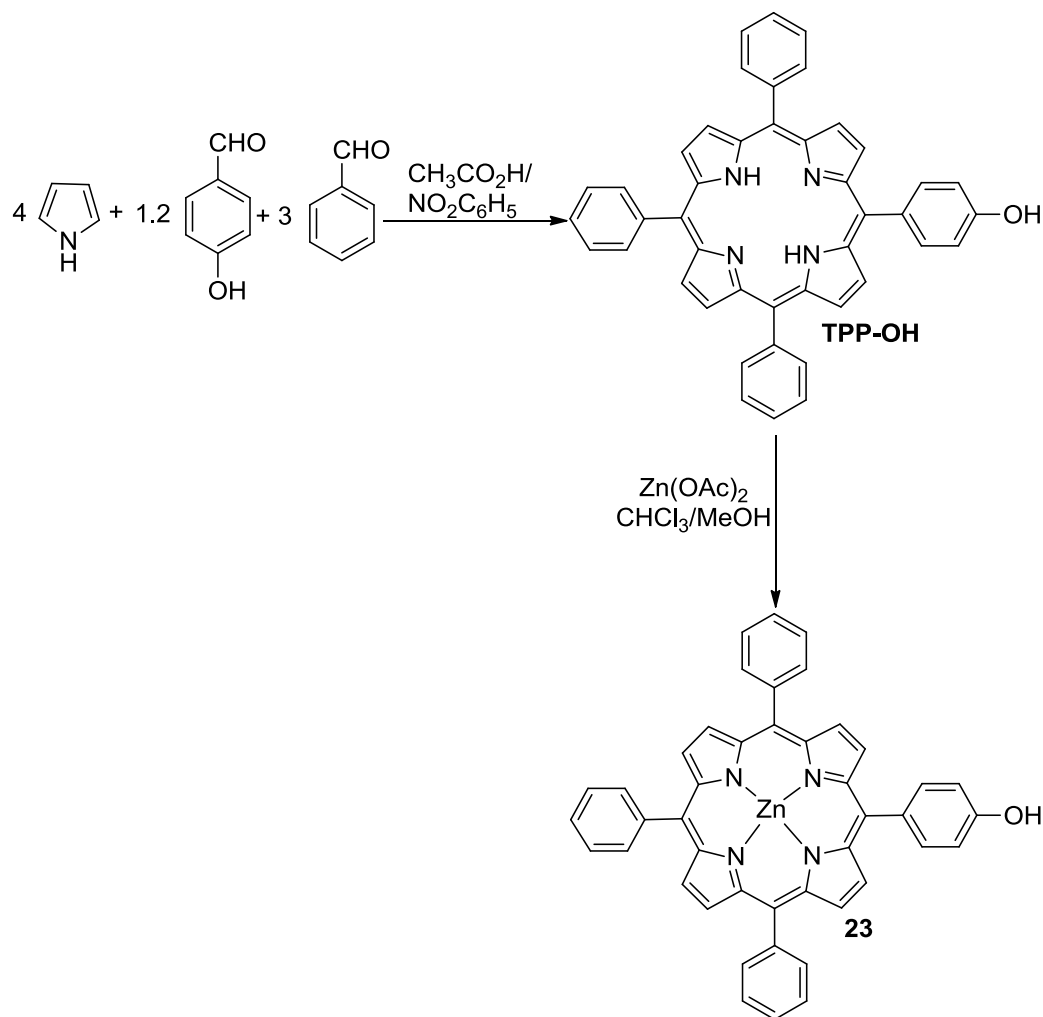


Figura 2.7. Estruturas das porfirinas seleccionadas para o estudo das reacções de inserção.

Preparação dos materiais de partida

A síntese da 5-(4-hidroxifenil)-10,15,20-trifenilporfirinatozínco(II) **23** foi realizada, numa primeira etapa, recorrendo à condensação de pirrol com uma mistura de 4-hidroxibenzaldeído e benzaldeído em quantidades estequiométricas adequadas para a obtenção preferencial do derivado mono-substituído (Esquema 2.7). A reacção foi realizada numa mistura de ácido acético e nitrobenzeno a refluxo de acordo com o descrito na literatura.⁴¹ O processo de purificação tornou-se bastante moroso uma vez que se trata de uma porfirina assimétrica e foi necessário separá-la das outras porfirinas resultantes das combinações possíveis da mistura de aldeídos utilizada. Depois do processo de purificação por cromatografia em coluna de sílica usando como eluente uma mistura de clorofórmio com 1% de metanol, foi possível obter a 5-(4-hidroxifenil)-10,15,20-trifenilporfirina (**TPP-OH**) com um rendimento de 34% (Esquema 2.7). O tratamento de uma solução desta porfirina em clorofórmio com uma solução metanólica de acetato de zinco originou quantitativamente o complexo de zinco **23** (Esquema 2.7).

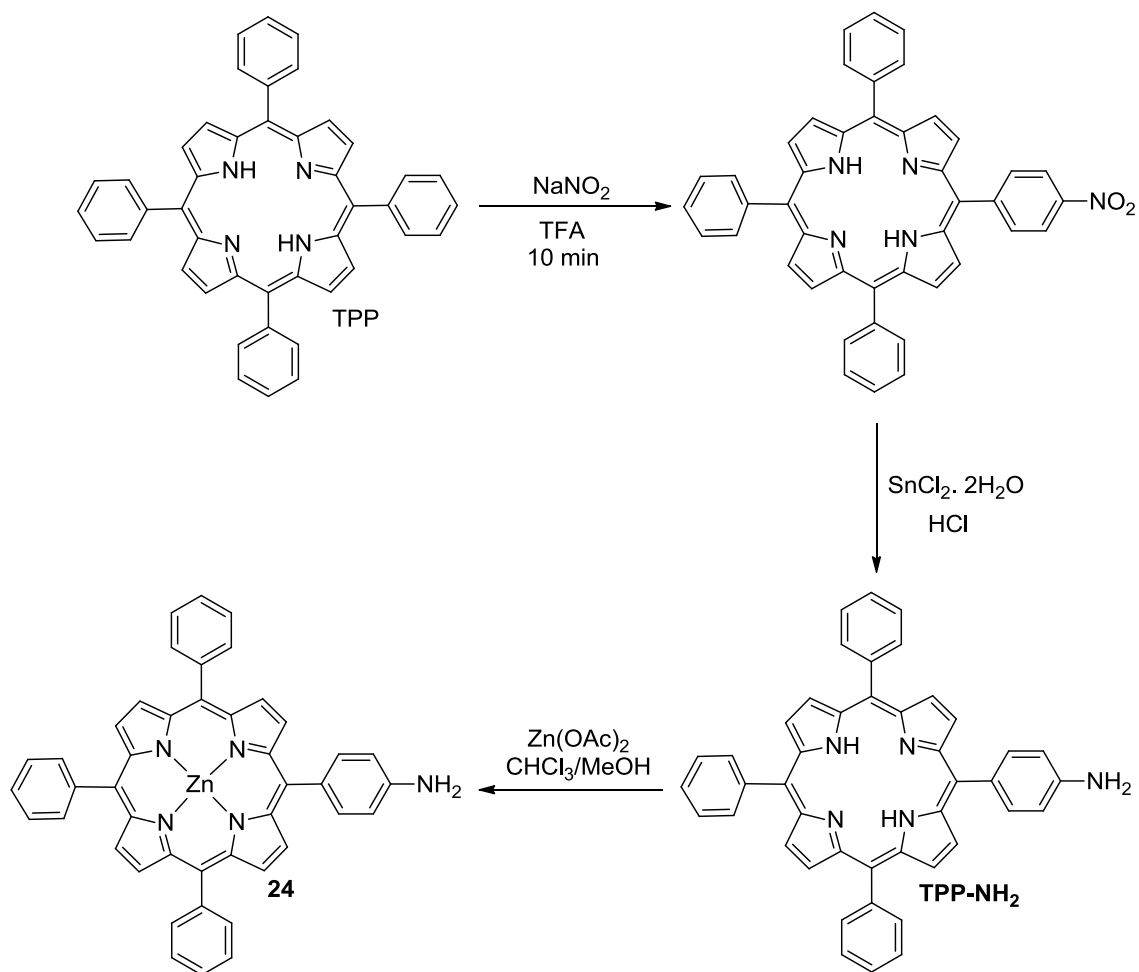
Compostos α -diazocarbonílicos na síntese de novos compostos porfirínicos.
Avaliação biológica de alguns derivados glico-conjugados.



Esquema 2.7.

O complexo 5-(4-aminofenil)-10,15,20-trifenilporfirinatozínco(II) **24** foi preparado a partir da *meso*-tetrafenilporfirina (TPP) de acordo com a sequência reaccional apresentada no esquema 2.8.⁴² Depois do processo inicial de nitração com nitrito de sódio e TFA e purificação do derivado nitrado, seguiu-se a redução com cloreto de estanho(II) em HCl. A 5-(4-aminofenil)-10,15,20-trifenilporfirina (TPP-NH₂) pretendida foi obtida, após purificação em coluna e cristalização, com um rendimento de 77%. O complexo de zinco desta porfirina foi preparado através do mesmo procedimento usado para a porfirina **23** (Esquema 2.8).

Compostos α -diazocarbonílicos na síntese de novos compostos porfirínicos.
Avaliação biológica de alguns derivados glico-conjugados.

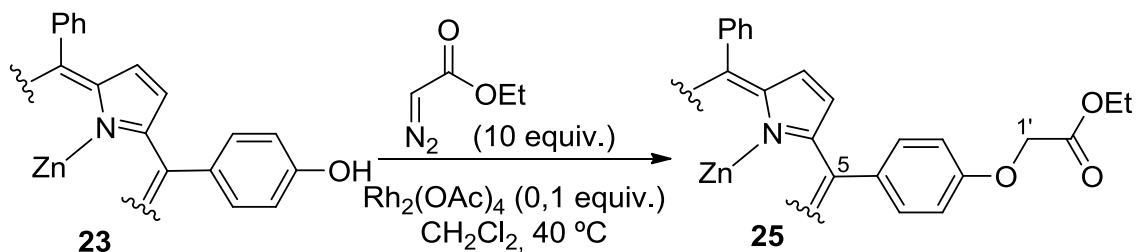


Esquema 2.8.

O estudo das reacções de inserção foram realizados com EDA – um diazo α -carbonílico reactivo e disponível comercialmente – na presença de quantidade catalítica de $\text{Rh}_2(\text{OAc})_4$ (0,1 equiv.). As reacções foram realizadas em diclorometano a refluxo e o EDA diluído (10 equivalentes em 5 mL de diclorometano) foi lentamente injectado (adição de 0,5mL/hora) com recurso a um injector automático. A adição lenta do diazo composto teve como objectivo minimizar as reacções paralelas que possam, eventualmente, vir a ocorrer.⁴⁰

2.3.1. Reacção de 5-(4-hidroxifenil)-10,15,20-trifenilporfirinatozínco(II) **23** com EDA catalisada por $\text{Rh}_2(\text{OAc})_4$

A reacção do complexo porfirínico **23** com EDA foi realizada nas condições descritas anteriormente. Assim, o complexo **23** e o $\text{Rh}_2(\text{OAc})_4$ (0,1 equiv.) foram dissolvidos em diclorometano e mantidos em agitação e refluxo enquanto foram adicionados 10 equivalentes de EDA gota a gota durante 10 horas. Finda a adição, a reacção permaneceu em agitação e refluxo durante mais 8 horas. Findo este tempo, a reacção foi terminada evaporando o solvente a pressão reduzida. O resíduo obtido foi, então, purificado por cromatografia em coluna de sílica gel usando como eluente diclorometano. A primeira fracção recolhida foi identificada como sendo o composto resultante da reacção de inserção do carbeno gerado a partir do EDA na ligação O-H, o composto **25**. Este derivado foi obtido com 51% de rendimento e da reacção foi possível recuperar cerca de 20% do complexo de partida **23** (Esquema 2.9).



Esquema 2.16.

O composto **25** foi analisado por espectrometria de massa por ionização em electrospray em modo positivo de alta resolução (HRMS-ESI). A análise deste espectro mostra um pico a $m/z = 778.1917$ referente ao ião molecular $[\text{M}]^+$ confirmando a inserção do carbeno gerado a partir do EDA na porfirina **23**.

A estrutura deste composto foi ainda confirmada por RMN de ^1H e de ^{13}C e por estudos de correlação espectroscópica heteronuclear ($^1\text{H}/^{13}\text{C}$, HMBC, HSQC). O seu espectro de RMN de ^1H encontra-se apresentado na figura 2.7.

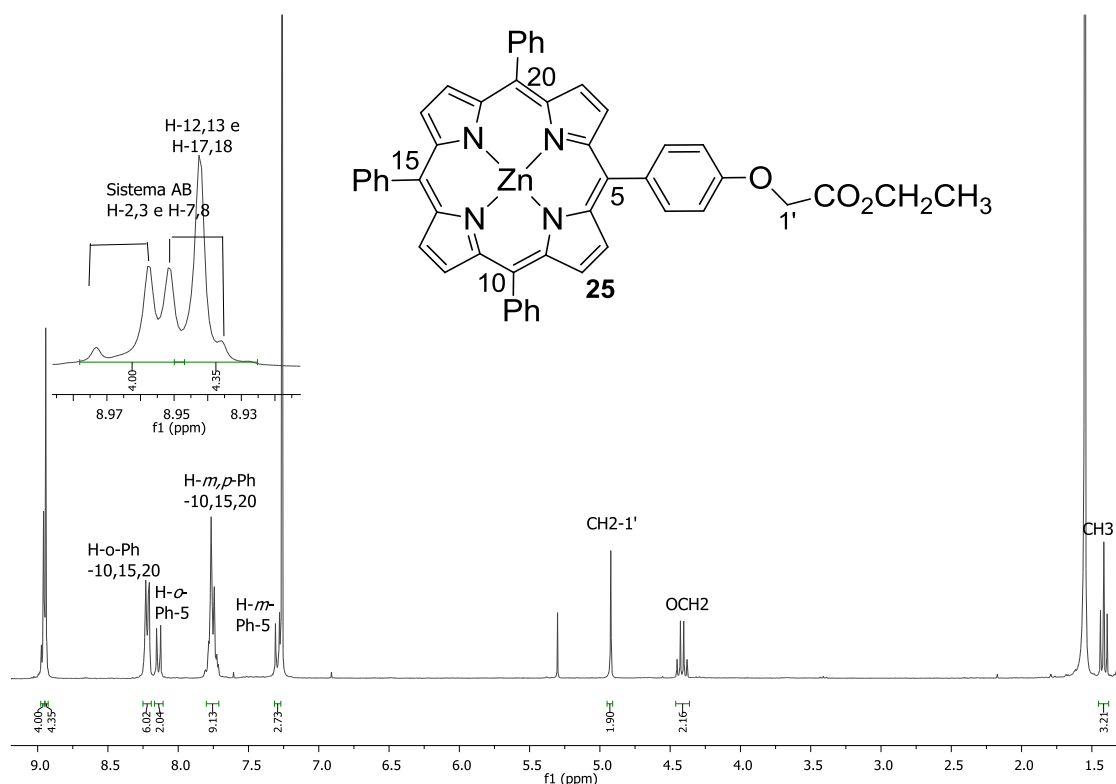


Figura 2.7. Espectro de RMN de ^1H do derivado **25**.

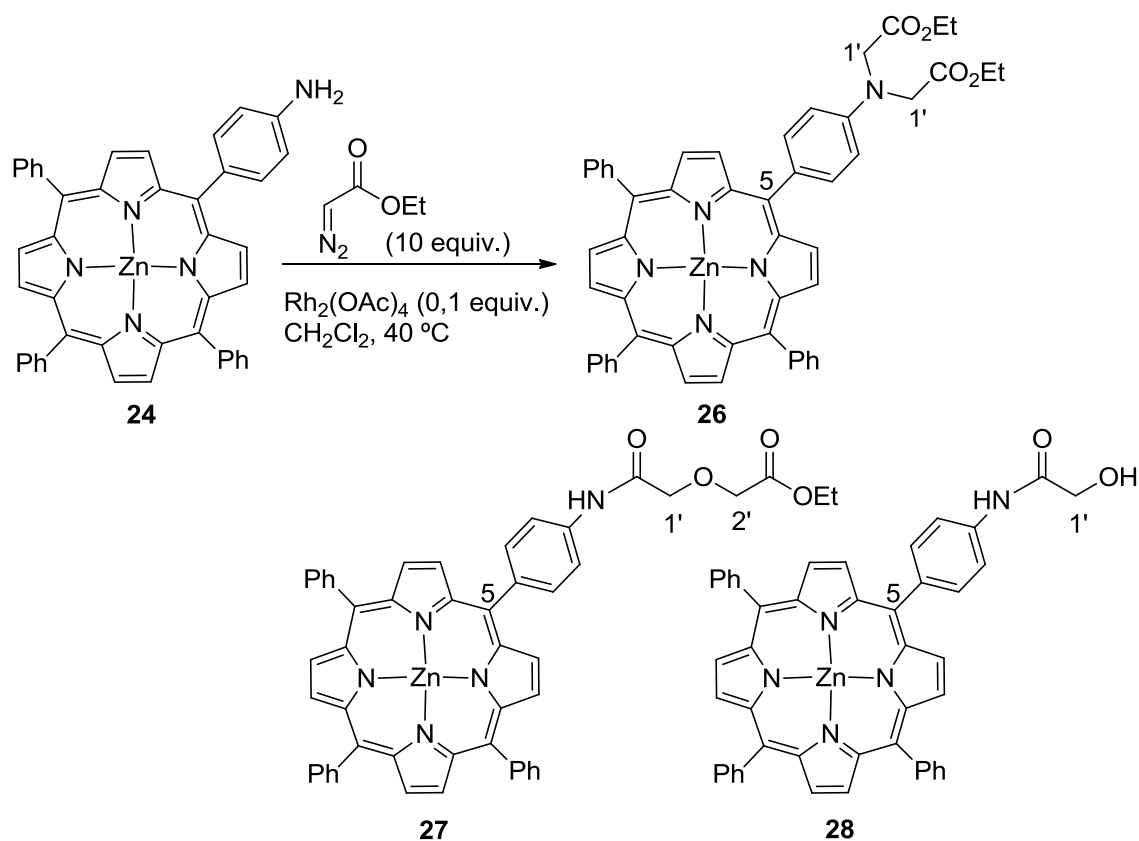
Na zona alifática do espectro de RMN de ^1H é possível identificar os sinais relacionados com a parte do carbeno inserido na ligação O-H do grupo hidroxifenilo do complexo **23**. Assim, o sinal na forma de singuleto que surge a 4,97 ppm é referente à ressonância dos prótons $\text{CH}_2\text{-1}'$ e os sinais que surgem na forma de um quarteto e um triplete a 4,46 e a 1,46 ppm ($J = 7,1$ Hz) são devidos às ressonâncias dos prótons OCH_2 e CH_3 do grupo etilo, respectivamente. Este espectro mostra também dois sinais sob a forma de multipletos a 8,29 - 8,25 e a 7,83 - 7,76 ppm que foram atribuídos à ressonância dos prótons *orto* (H-o-Ph-10,15,20) e *meta+para* (H-m,p-Ph-10,15,20) dos anéis fenilo das posições *meso*-10,15,20, respectivamente. A ressonância dos prótons *orto* e *meta* do anel fenilo *p*-substituído da posição 5 geram dois dupletos a 8,18 e 7,34 ppm ($J = 8,6$ Hz), respectivamente. Em relação aos prótons β -pirrólicos, é possível identificar a presença de um sistema AB a 9,00 e 8,998 ppm ($J = 4,6$ Hz) referente à ressonância dos prótons H-2,3 e H-7,8. Os restantes prótons β -pirrólicos H-12,13 e H-17,18 surgem como um singuleto largo a 8,99 ppm. Estes dados de RMN são compatíveis com a inserção do carbeno na ligação O-H da porfirina **23**.

2.3.2. Reacção da 5-(4-aminofenil)-10,15,20-trifenilporfirinatozinco(II) **24** com EDA catalisada por $\text{Rh}_2(\text{OAc})_4$

Uma vez conseguida com sucesso a inserção de EDA em ligações O-H, estendeu-se este estudo à reacção do complexo porfiríco **24** com o diazoacetato de etilo na presença de $\text{Rh}_2(\text{OAc})_4$.

Assim, a reacção do complexo **24** com EDA foi realizada nas condições descritas para o complexo **23**. Findo o tempo reaccional, verificou-se por TLC que o perfil desta reacção era muito diferente do observado com a porfirina hidroxilada. De facto, a TLC da mistura reaccional mostrou a formação de três novos compostos (Esquema 2.10): um menos polar do que a porfirina de partida **24**, que foi identificado como sendo o derivado **26**, e outros dois compostos mais polares do que o composto de partida **24**, que foram identificados como sendo os derivados **27** e **28**. A reacção foi terminada evaporando o solvente a pressão reduzida e o resíduo obtido foi fraccionado numa coluna de sílica gel usando como eluente diclorometano. Desta coluna foi possível isolar 3 fracções: a primeira constituída, maioritariamente pelo composto **26**, a segunda pela porfirina **24** que não reagiu (8% de recuperação) e a terceira pela mistura dos compostos **27** e **28**. A primeira e a terceira fracção foram purificadas por TLC preparativa usando uma mistura de hexano e acetato de etilo (4:1) como eluente. No final da purificação os compostos **26**, **27**, e **28** foram isolados com rendimentos de 14%, 12% e 16%, respectivamente.

Compostos α -diazocarbonílicos na síntese de novos compostos porfirínicos.
Avaliação biológica de alguns derivados glico-conjugados.



Esquema 2.10.

As estruturas dos compostos obtidos nesta reação foram confirmadas por espectroscopia de RMN de ^1H e de ^{13}C e as suas fórmulas moleculares foram comprovadas por HRMS-ESI. Para a identificação inequívoca da ressonância de alguns prótons foi necessária a obtenção dos espectros de RMN 2D (COSY, HSQC e HMBC).

Assim, a partir dos estudos espectroscópicos confirmou-se que estrutura do composto **26** corresponde à inserção de duas unidades de carbeno, gerado a partir de EDA, nas ligações N-H do grupo aminofenilo da posição *meso*-5. A sua fórmula molecular foi confirmada por HRMS-ESI cujo espectro mostra a presença do pico a m/z 863,2445 correspondente a M^+ . O espectro de RMN de ^1H (Figura 2.8) mostra um perfil muito semelhante ao do derivado **25**, principalmente no que diz respeito à ressonância dos prótons β -pirrólicos e prótons dos grupos fenilo das posições *meso*. Já na parte alifática deste espectro surgem, também, os sinais referentes à ressonância dos prótons da unidade de carbeno que se inseriu nas ligações N-H (Figura 2.8). É importante referir que a integração destes sinais permitiu-nos concluir estarmos perante o produto da dupla inserção. Assim, a ressonância dos prótons dos grupos

Compostos α -diazocarbonílicos na síntese de novos compostos porfirínicos.
Avaliação biológica de alguns derivados glico-conjugados.

etilo surgem como um quarteto e um triplete a 4,33 e 1,37 ppm ($J = 7,1$ Hz). O sinal referente aos prótons $\text{CH}_2\text{-1}'$ surge como um singuleto a 4,38 ppm.

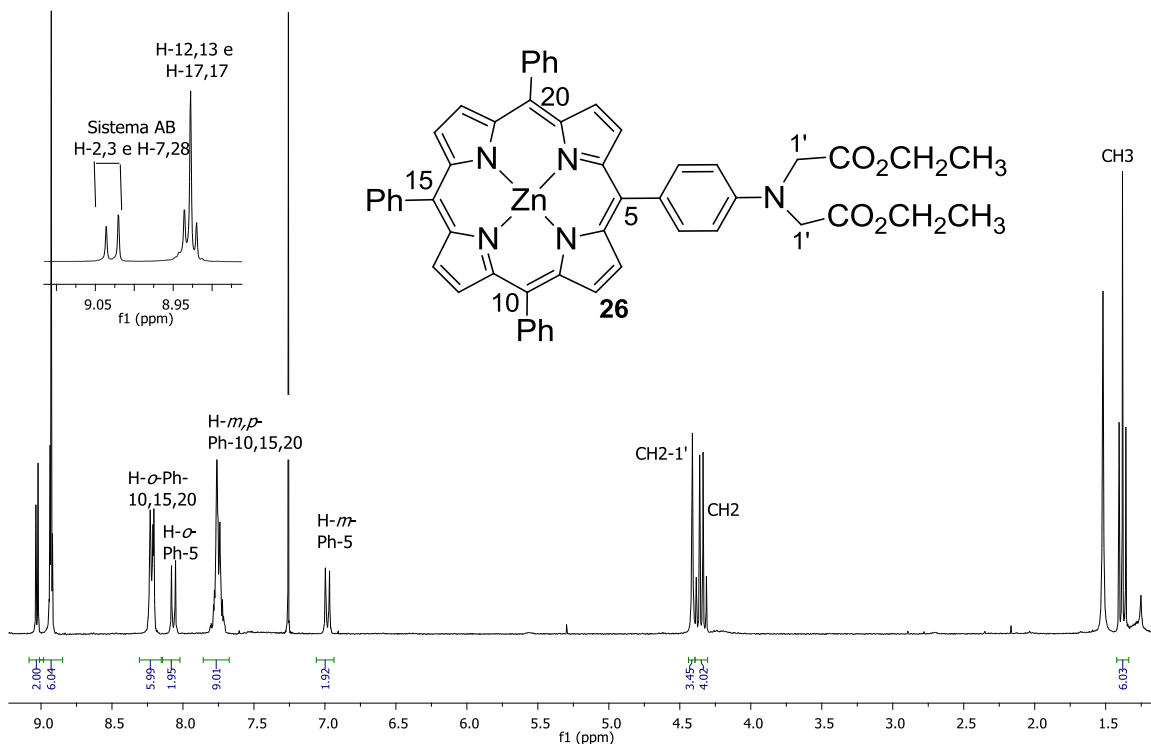


Figura 2.8. Espectro de RMN de ^1H do derivado **26**.

Uma característica importante da estrutura deste composto é que o espectro de HMBC mostra que os sinais referentes aos prótons $\text{CH}_2\text{-1}'$ se correlacionam com o carbono do grupo carbonílico e com o carbono da posição *para* do anel da posição *meso* 5 (Figura 2.9).

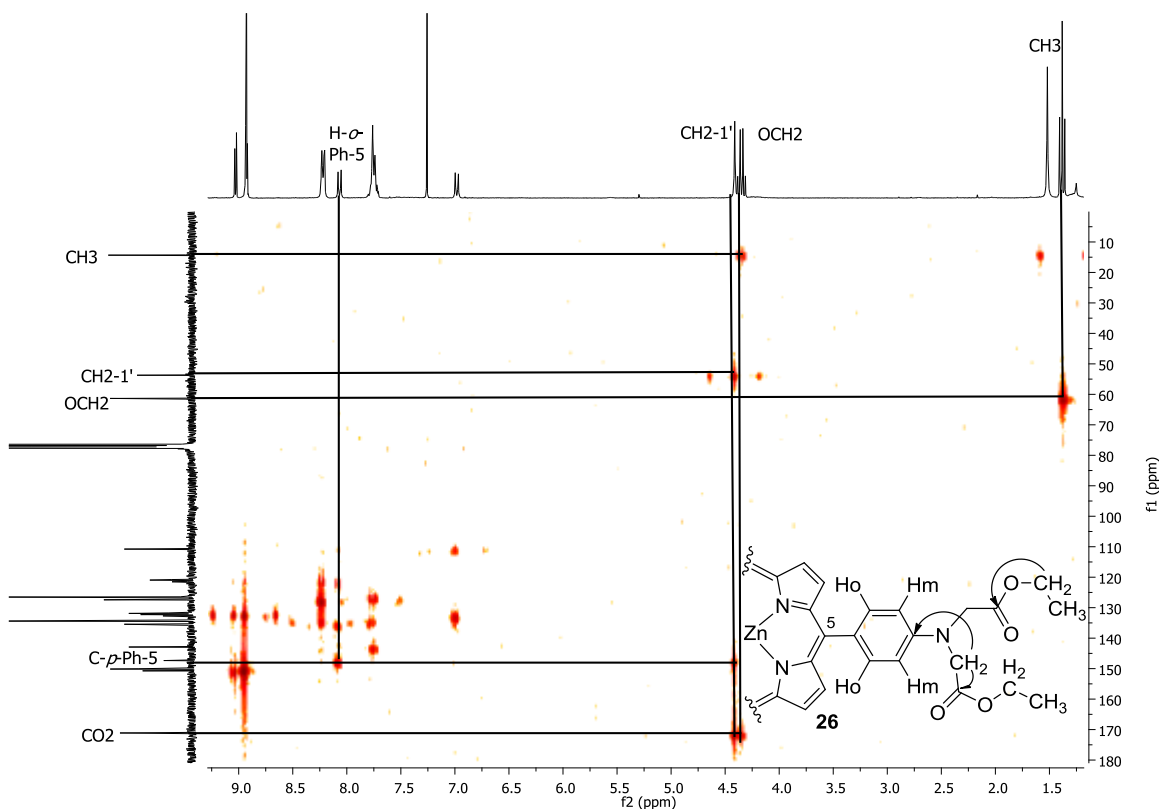


Figura 2.9. Espectro de HMBC do derivado **26** com representação das principais correlações.

A estrutura molecular do composto **27** foi, também, confirmada por HRMS-ESI cujo espectro mostra um pico a m/z 853,2131 correspondente a M^+ . Quanto ao espectro de RMN de ^1H deste derivado é possível encontrar na zona alifática o perfil típico da ressonância dos prótons do grupo etilo onde podemos observar um sinal na forma de quarteto a 4,40 ppm referente à ressonância dos prótons OCH₂ e um tripleto a 1,34 ppm referente à ressonância dos prótons CH₃. Nesta zona do espectro é ainda possível identificar dois sinais na forma de singuleto a 3,79 e 4,16 ppm referentes à ressonância dos prótons CH₂-1' e CH₂-2', respectivamente. A atribuição inequívoca destes sinais foi realizada através das correlações observadas no espectro de HMBC (Figura 2.10).

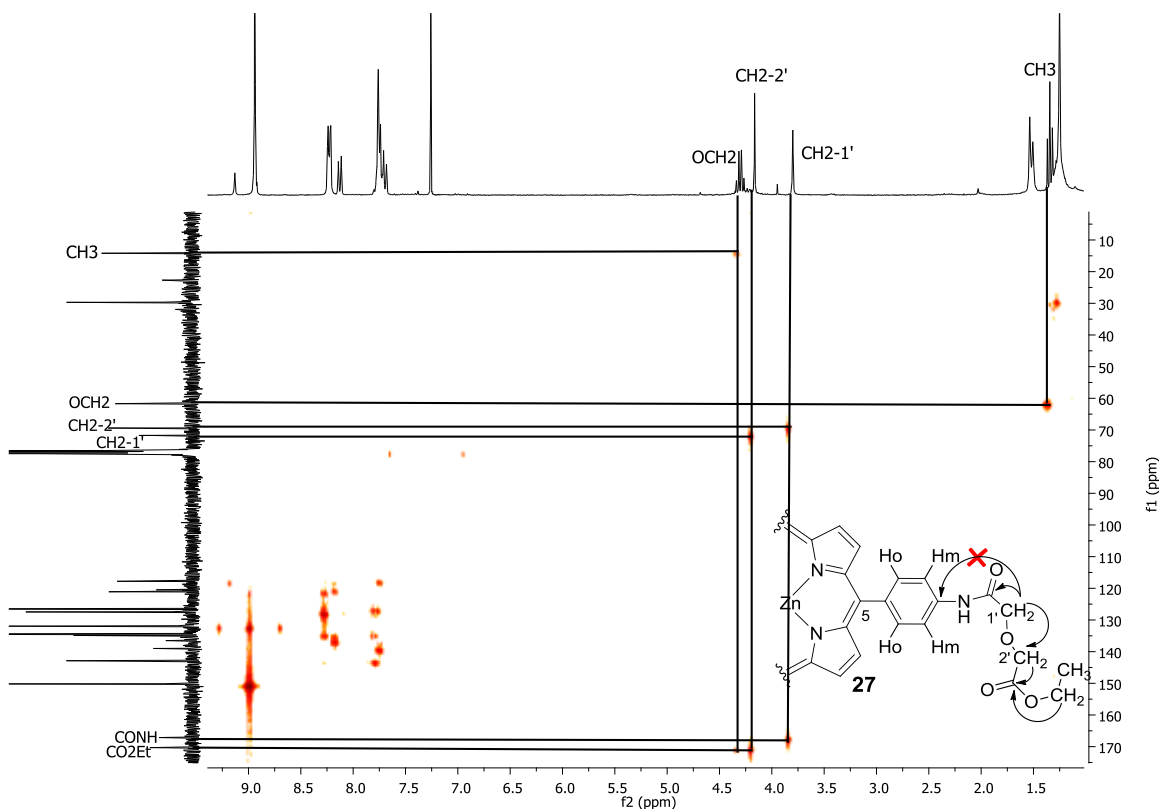


Figura 2.10. Espectro de HMBC do derivado **27** com representação das principais correlações.

Ao contrário do que foi observado para o composto **26**, este espectro de RMN de 2D não mostra qualquer correlação entre o sinal referente à ressonância dos prótons CH₂-1' e qualquer carbono do grupo fenilo da posição *meso* 5. Este facto confirma que o composto **27** é um derivado de amida e não um derivado de amina *N*-substituído. Na zona aromática do espectro de RMN de ¹H é possível identificar a ressonância do próton NH do grupo amida que surge na forma de um singuleto a 9,13 ppm e ainda os sinais referentes à ressonância dos prótons β -pirrólicos e dos prótons dos grupos *meso*-arilo, que surgem com desvios químicos semelhantes aos observados para os derivados anteriores.

A estrutura do composto **27** foi ainda confirmada por difractometria de raios-X, e os resultados obtidos confirmam a estrutura proposta (Figura 2.11). Estes resultados mostram ainda que as moléculas individuais de **27** se organizam em forma de espiral em que o ião zinco de uma molécula de **27** coordena com o átomo de oxigénio do

Compostos α -diazocarbonílicos na síntese de novos compostos porfirínicos.
Avaliação biológica de alguns derivados glico-conjugados.

carbonílo do grupo éster de uma outra molécula, formando um sistema supramolecular quiral (Figura 2.12).

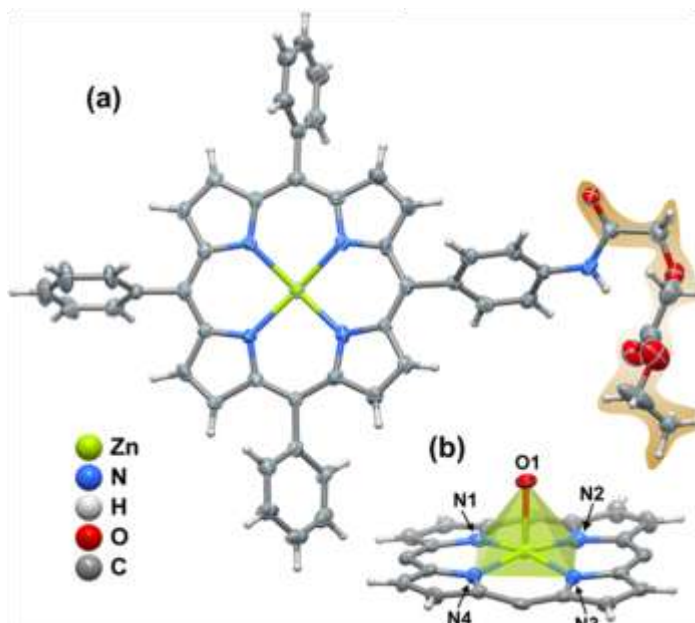


Figura 2.11. Representação esquemática da unidade molecular do derivado **27**.

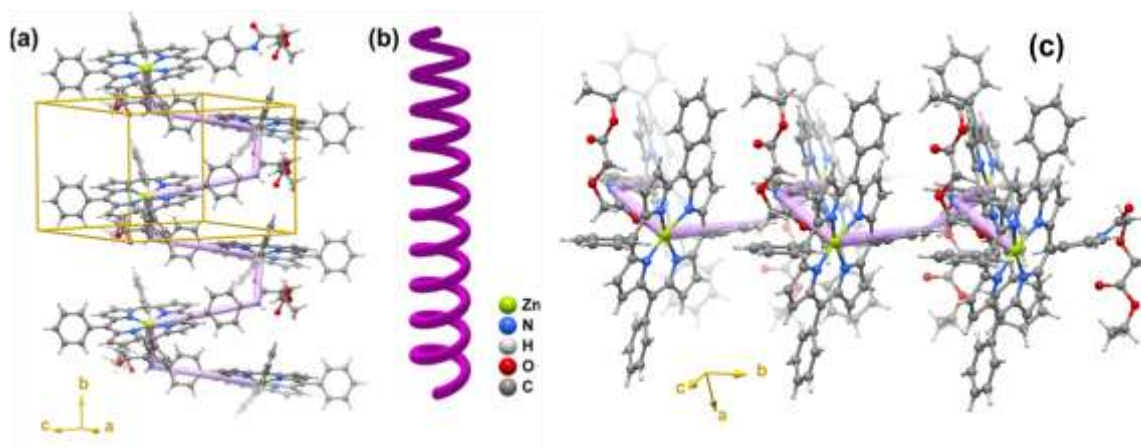


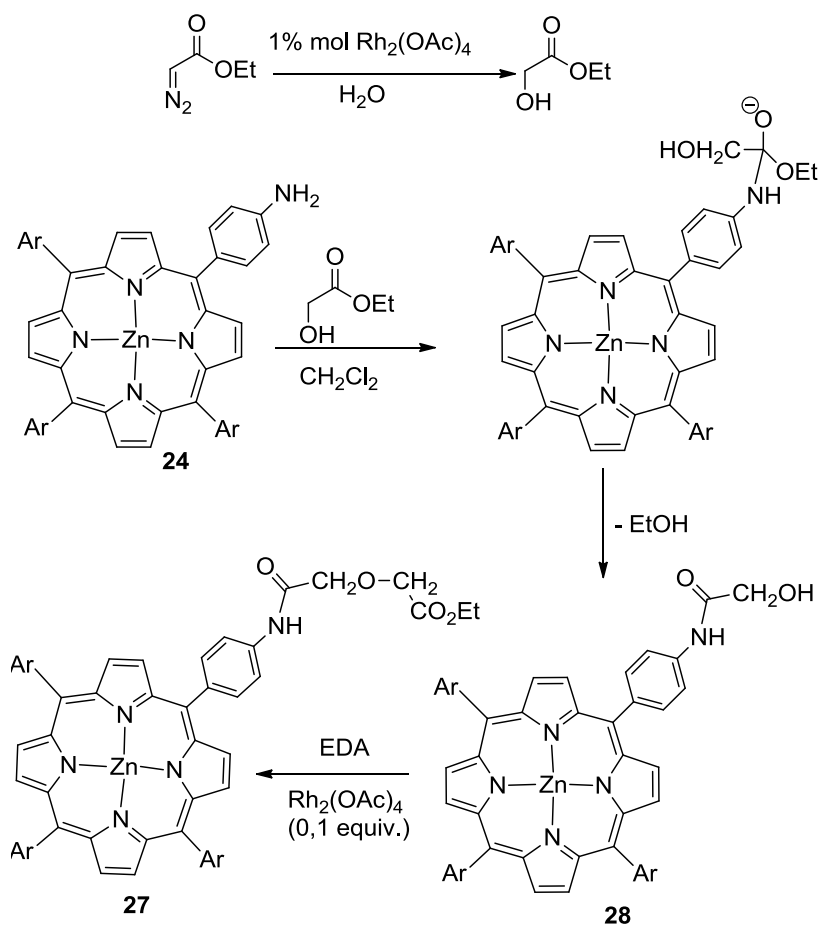
Figura 2.12. Representação esquemática do sistema supramolecular quiral formado pelo composto **27**.

Quanto ao composto **28**, o seu espectro de HRMS-ESI mostra um pico a m/z 749,1764 correspondente a M^+ , confirmando, assim, a sua fórmula molecular. O seu espectro de RMN de 1H é muito semelhante ao observado para os restantes derivados, no entanto, destaca-se a ausência de qualquer sinal referente ao grupo etilo na zona alifática do espectro. Nesta é possível, apenas, identificar o sinal referente à

ressonância do próton $\text{CH}_2\text{-1}'$ a 4,30 ppm na forma de um singuleto. No espectro de HMBC, este sinal não se correlaciona com nenhum carbono do anel de fenilo da posição *meso* 5, indicando que o composto **28** é também um derivado de amida. Na realidade, é possível identificar no espectro de RMN de ^1H o sinal referente à ressonância do próton NH que surge como um singuleto a 8,93 ppm. Também a desvios químicos mais elevados encontram-se os sinais referentes à ressonância dos prótons β -pirrólicos, assim como, os referentes à ressonância dos prótons dos grupos fenilo das posições *meso*.

A formação inesperada dos derivados de amida **27** e **28** pode ser explicada através da formação, no meio reaccional, de glicolato de etilo. A formação deste éster pode ocorrer através da reacção de inserção de carbeno gerado a partir do EDA numa molécula de água presente no meio reaccional (Esquema 2.11).⁴³ Assumindo a formação de glicolato de etilo no meio reaccional, a sua reacção com o complexo **24** pode explicar a formação do derivado **28**. Depois, a reacção de inserção O-H de um carbeno gerado a partir de EDA nesta hidroxí-amida pode, facilmente, justificar a formação do composto **28** (Esquema 2.11).

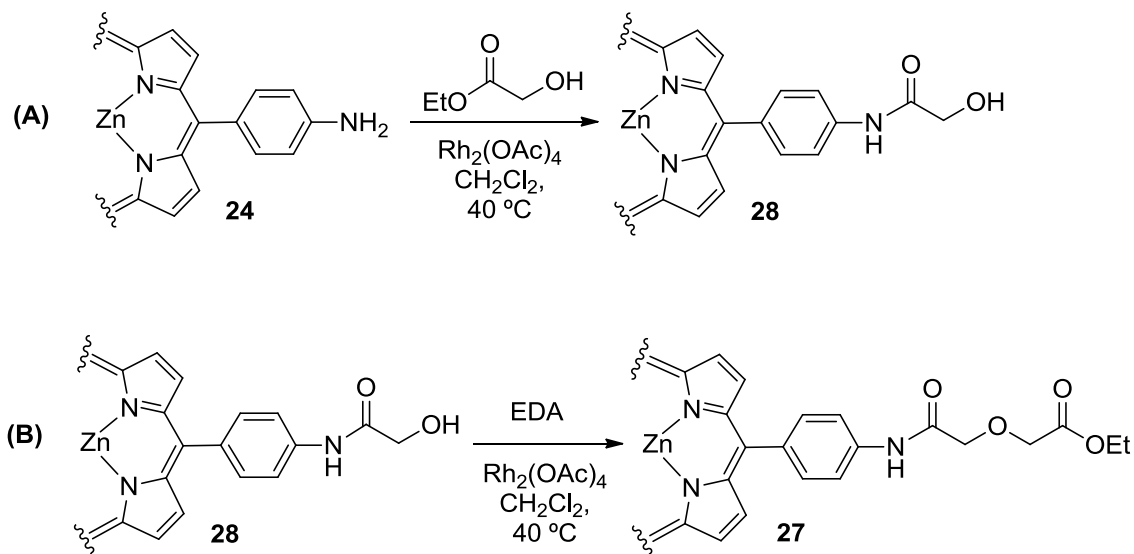
Compostos α -diazocarbonílicos na síntese de novos compostos porfirínicos.
Avaliação biológica de alguns derivados glico-conjugados.



Esquema 2.11.

Assim, para confirmar esta hipótese, realizaram-se duas experiências distintas. A primeira, envolveu a reacção do complexo **24** com o glicolato de etilo disponível comercialmente em diclorometano a refluxo. Como esperado, observou-se a formação do composto **28** (Esquema 2.12 A). A segunda consistiu na reacção do derivado amida **28** com EDA na presença de $\text{Rh}_2(\text{OAc})_4$, nas mesmas condições reaccionais descritas para a reacção da porfirina **24** com EDA. Nesta reacção observou-se a formação do derivado amida **27** (Esquema 2.12 B), suportando, assim, o mecanismo proposto.

Compostos α -diazocarbonílicos na síntese de novos compostos porfirínicos.
Avaliação biológica de alguns derivados glico-conjugados.



Apesar de esta reacção nos permitir sintetizar compostos muito diferentes e até um composto que forma, no estado sólido, um sistema supramolecular quiral, os rendimentos desta reacção ficam um pouco aquém das expectativas e, para além disso, a reacção é pouco selectiva. Com o objectivo de avaliar a forma como os equivalentes de EDA adicionados e o modo de adição deste afecta a distribuição dos produtos, foi decidido testar algumas alterações nas condições experimentais. As alterações efectuadas foram: a adição de 10 equivalentes de EDA (1mL/h); a adição de 5 equivalentes de EDA (0,5mL/h e de 1mL/h). Os resultados obtidos são apresentados na tabela 2.1. Para uma melhor comparação, foram também introduzidos nesta tabela os resultados obtidos para a reacção da porfirina **24** com 10 equivalentes de EDA com adição de 0,5mL/h.

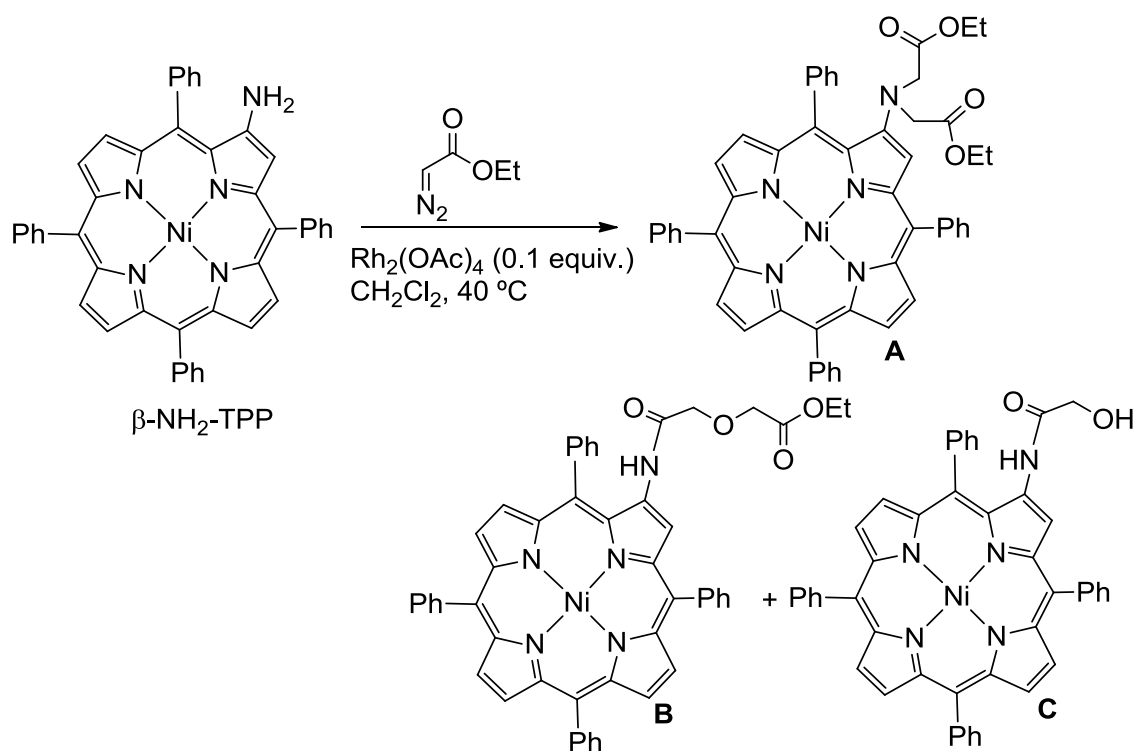
Os resultados obtidos mostram que a distribuição dos produtos é afectada pelas condições reaccionais, mas, de uma forma geral, a formação dos derivados de amida **27** e **28** são favorecidos quando comparados com a formação do produto de **26**.

Tabela 2.1. Resultados da reacção do complexo porfirínico **24** com EDA presença de $\text{Rh}_2(\text{OAc})_4$

Entrada	Condições	Complexo 24 recuperado (%)	η de 26 (%)	η de 27 (%)	η de 28 (%)
1	10 equiv.EDA (0,5 mL/h)	8,0	14,3	16,2	12,4
	0,1 equiv. $\text{Rh}_2(\text{OAc})_4$				
2	10 equiv.EDA (1 mL/h)	20,7	-	10,4	9,9
	0,1 equiv. $\text{Rh}_2(\text{OAc})_4$				
3	5 equiv.EDA (1 mL/h)	-	6,3	25,0	9,7
	0,1 equiv. $\text{Rh}_2(\text{OAc})_4$				
4	5 equiv.EDA (0,5 mL/h)	10,3	Vest.	3,9	5,8
	0,1 equiv. $\text{Rh}_2(\text{OAc})_4$				

Ao longo deste trabalho, decidiu-se estender estas reacções de inserção do EDA a uma porfirina com um grupo NH_2 numa posição β -pirrólica, a 2-amino-5,10,15,20-tetrafenilporfirinatoniquel(II) ($\text{Ni-}\beta\text{-NH}_2\text{-TPP}$) (Esquema 2.13). Apesar de se verificar a formação de três novos produtos com rendimentos muito baixos, esta reacção não se mostrou reprodutível, logo pouco vantajosa. No entanto, os espectros de massa dos compostos obtidos (**A**, **B** e **C**) sugerem que os produtos formados sejam os análogos aos observados para a reacção com o complexo **24** (Esquema 2.13). Assim, decidiu-se abandonar esta abordagem de funcionalizar porfirinas nas posições β -pirrólicas através das reacções de inserção.

Compostos α -diazocarbonílicos na síntese de novos compostos porfirínicos.
Avaliação biológica de alguns derivados glico-conjugados.



Esquema 2.13.

2.4. Síntese de novos derivados glicoporfirínicos

Nos últimos anos, vários grupos têm dedicado a sua investigação ao desenvolvimento de novas metodologias para a síntese de novos derivados porfirínicos com características adequadas para serem usadas como fotossensibilizadores em PDT e com elevada especificidade para células tumorais. Uma das abordagens seguidas para alcançar este objectivo é a síntese de moléculas com uma dualidade de funções que podem ser obtidas através do acoplamento de entidades cuja actividade farmacológica é bem conhecida. O acoplamento de porfirinas a unidades glicosídicas pode ser considerada uma estratégia para a síntese de fotossensibilizadores promissores em PDT. Este facto pode ser explicado pelo elevado aumento da solubilidade dos fotossensibilizadores em meios fisiológicos, devido ao carácter hidrofílico das unidades de hidratos de carbono e o carácter hidrofóbico do macrociclo porfirínico. Por outro lado, estas unidades podem também actuar como transportadores do fármaco, uma vez que muitos hidratos de carbono são reconhecidos por receptores situados na membrana celular. Na realidade, os

oligossacarídicos desempenham um papel essencial em diversas actividades celulares, actuando como antígenos, alvos de infecções virais e bacterianas e agentes de adesão e metástases, onde as interacções do complexo receptor-hidrato de carbono são específicas e multivalentes.⁴⁴ Esta especificidade sugere uma potencial utilidade dos derivados sintéticos contendo unidades de açúcar como transportadores de droga. Assim, nos últimos anos têm vindo a ser reportados diversos trabalhos baseados na síntese de conjugados hidrato de carbono-porfirina como potenciais fotossensibilizadores em PDT.⁴⁵

Nesta parte do trabalho, estudou-se a síntese de derivados glicoporfirínicos recorrendo a dois tipos de reacção em que participam os compostos diazo α -carbonílicos: as reacções de inserção e as reacções de ciclopropanação. Estas reacções foram realizadas na presença de diazo compostos substituídos com resíduos glicosídicos na forma de di-acetonídeos da glucose **29a**, frutose **29c** e galactose **29d** e de mono-acetonídeo da xilose **29b**.

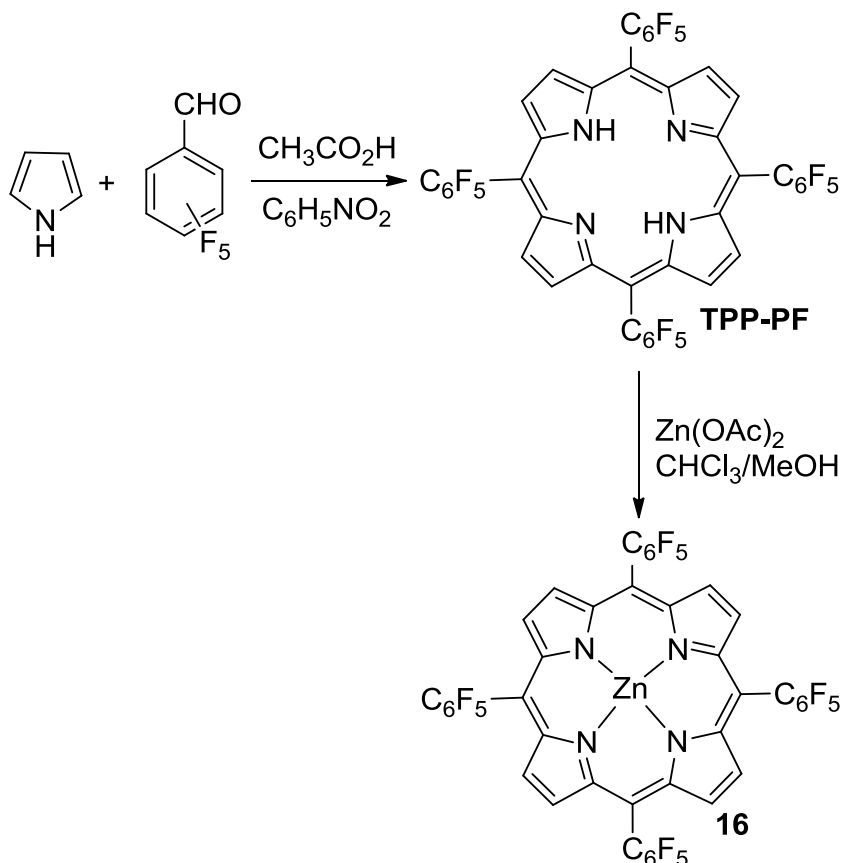
Assim, com base no estudo realizado e descrito no ponto 2.3, o complexo porfirínico **23** e o $\text{Rh}_2(\text{OAc})_4$ foram os reagente e catalisador seleccionados para os estudos de inserção na presença dos diazo ésteres com resíduos glicosídicos.

Por outro lado e como já foi referido, em 2008 o nosso grupo de investigação reportou o estudo da decomposição do EDA na presença de vários catalisadores e de três porfirinas com características electrónicas diferentes.⁴⁰ Nesse trabalho mostrou-se que clorinas e isobacterioclorinas podem ser obtidas com boas selectividades na reacção de EDA com 5,10,15,20-tetraquis(pentafluoro)fenilporfirinatozinc(II) **16** na presença de CuCl como catalisador. Com base nestes dados, decidiu-se estudar a reacção de ciclopropanação da porfirina **16** com os diazo ésteres com resíduos açúcar acima referidos, na presença de CuCl .

O complexo 5,10,15,20-tetraquis(pentafluoro)fenilporfirinatozinc(II) **16** foi sintetizado de acordo com a metodologia descrita na literatura, através da condensação de pirrol com pentaflurobenzaldeído em quantidades equimolares na presença de ácido acético e nitrobenzeno (Esquema 2.14). Desta reacção foi possível obter, depois de purificada por cromatografia em coluna de sílica e usando como

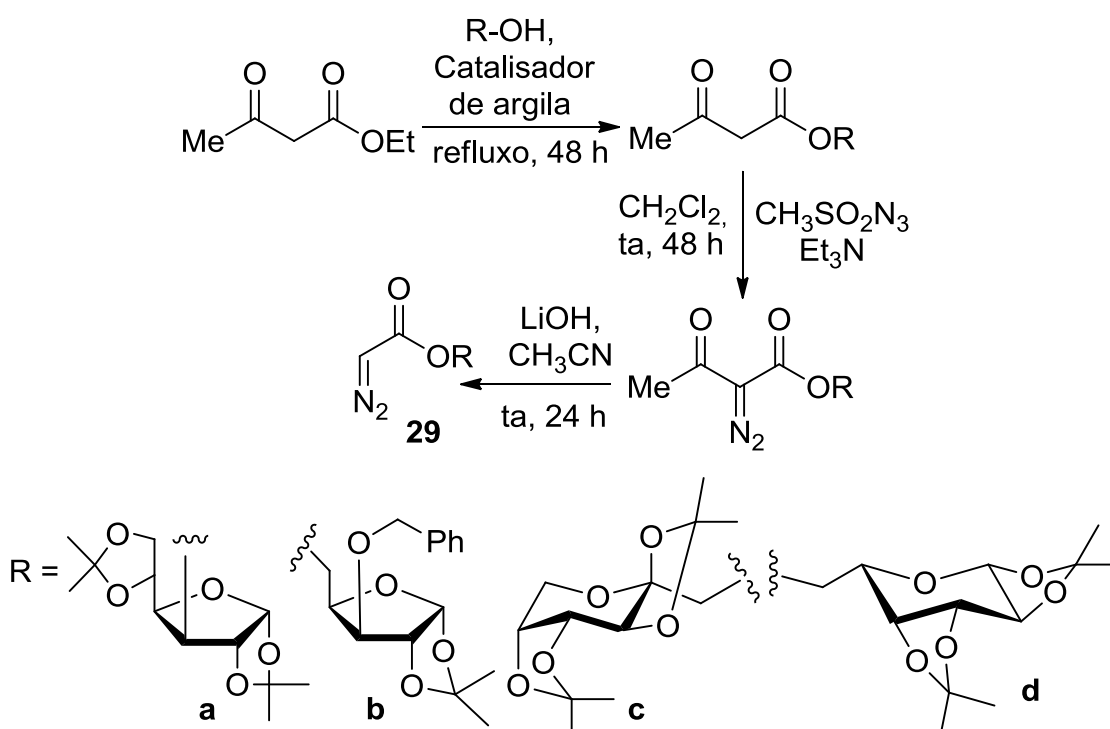
Compostos α -diazocarbonílicos na síntese de novos compostos porfirínicos.
Avaliação biológica de alguns derivados glico-conjugados.

eluente uma mistura de hexano/clorofórmio (10%), a 5,10,15,20-tetraquis(pentafluoro)fenilporfirina (**TPP-PF**) com um rendimento de 9%. O complexo de zinco desta porfirina foi preparado de acordo com as condições descritas para a preparação dos complexos **23** e **24**, obtendo-se o complexo de zinco porfirínico **16** (Esquema 2.14).



Esquema 2.14.

Os α -diazocetatos de hidratos de carbono **29a-c** foram preparados a partir do acetoacetato de etilo de acordo com a metodologia sintética apresentada no esquema 2.15. O primeiro passo envolveu a transesterificação do acetoacetato de etilo com os derivados sacarídicos (R-OH) na presença de catalisador de argila obtendo-se os respectivos β -ceto-ésteres. Seguiram-se a reacção com a azida de mesilo originando os α -diazob- β -ceto-ésteres e o processo de desacetilação na presença de LiOH , produzindo os α -diazocetatos correspondentes **29a-d**.^{46,47}



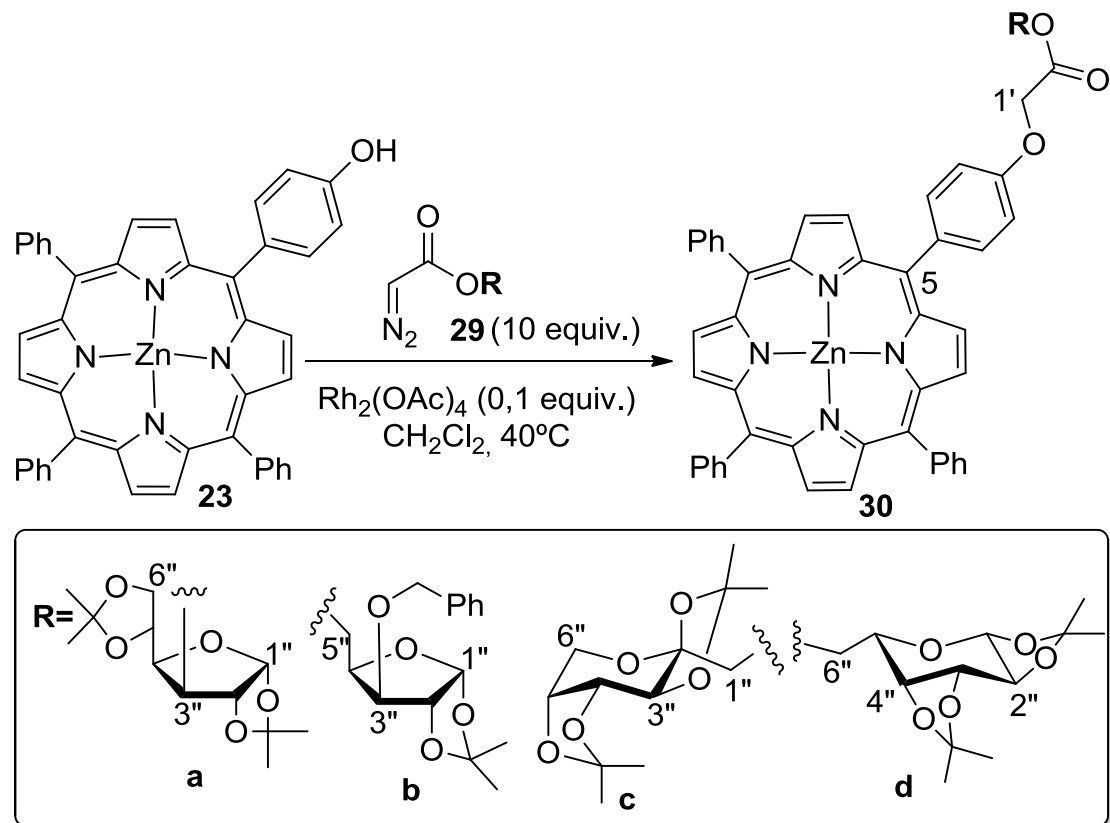
Esquema 2.15.

2.4.1. Síntese de novos derivados glicoporfirínicos através de reacções de inserção de α -diazocetatos glicosídicos

As reacções de inserção do complexo porfirínico **23** com os diazo compostos glicosilados **29a-d** foram realizadas nas condições descritas anteriormente. Assim, a porfirina **23** e o $\text{Rh}_2(\text{OAc})_4$ (0,1 equiv.) foram dissolvidos em diclorometano e mantidos em agitação a refluxo enquanto foram adicionados 10 equivalentes dos diazo compostos glicosilados gota a gota durante 10 horas. Terminada a adição, a reacção permaneceu em agitação e refluxo durante mais 8 horas. Findo este tempo, a reacção foi terminada evaporando o solvente a pressão reduzida e os resíduos obtidos foram fraccionados por cromatografia em coluna usando clorofórmio como eluente. As primeiras fracções foram identificadas como sendo os derivados glicoporfirínicos **30a-d** (Esquema 2.16) e a segunda fracção recolhida constituída pelo complexos **23** que não havia reagido. As primeiras fracções recolhidas desta coluna foram purificadas por TLC

Compostos α -diazocarbonílicos na síntese de novos compostos porfirínicos.
Avaliação biológica de alguns derivados glico-conjugados.

preparativa tendo sido isolados os produtos com rendimentos que variam entre os 30 e 35 % (Tabela 2.2.).



Esquema 2.16.

Tabela 2.2. Resultados obtidos nas reacções do complexos porfirínicos **23** com α -diazocetatos sacarídicos (**29 a-d**).

α -diazocetatos sacarídicos (29)	Complexo 23 recuperado (%)	η 30 (%)
a	11	34
b	17	32
c	5	30
d	7	35

Como é possível observar, em todas as reacções obtiveram-se como produtos maioritários os derivados glicoporfirínicos **30a-d**. Em todos os casos é possível recuperar porfirina de partida **23**. É possível também notar que o rendimento dos produtos de inserção no caso do uso dos α -diazacetatos referidos é menor do que no caso de EDA. Este facto pode ser explicado devido à baixa reactividade destes diazo compostos glicosílicos.

As estruturas dos novos derivados glicoporfirínicos **30a-d** foram confirmadas por RMN de ^1H e ^{13}C e as suas fórmulas moleculares confirmadas por HRMS-ESI.

Em todos os casos é possível observar algumas semelhanças entre os espectros de RMN de ^1H com o mesmo espectro do derivado **25**, principalmente no que diz respeito à zona aromática deste espectro. Assim, nos espectros de RMN de ^1H das glicoporfirinas **30a-d** é possível distinguir sinais na forma de multipletos entre 9,00 ppm e 8,80 ppm que dizem respeito à ressonância dos protões β -pirrólicos, sinais na forma de multipletos entre 8,25 ppm e 8,15 ppm relacionados com a ressonância dos protões-*orto* dos anéis fenilo das posições *meso* 10, 15 e 20 (H-*o*-Ph-10,15,20) e sinais na forma de dupletos a cerca de 8,13 ppm devido à ressonância dos protões *orto* do anel fenilo da posição *meso* 5 (H-*o*-Ph-5). A ressonância dos protões *meta* e *para* dos anéis fenilo das posições *meso* 10, 15 e 20 (H-*m,p*-Ph-10,15,20) surge como multipletos entre 7,99 e 7,60 ppm e a ressonância dos protões *meta* do anel fenilo da posição *meso* 5 (H-*m*-Ph-5) surge como dupletos a cerca de 7,28 ppm.

Na figura 2.13 é apresentado, como exemplo, o espectro de RMN de ^1H do derivado glicoporfirínico **30d**, onde podemos observar a δ mais elevados os sinais referentes à ressonância dos protões aromáticos desta molécula. A δ mais baixos podemos observar os sinais referentes à ressonância dos protões da unidade de galactose. O assinalamento inequívoco dos protões das unidades de hidrato de carbono de todos os derivados glicoporfirínicos foi realizado através das correlações observadas nos espectros de COSY. Assim, podemos observar a 1,49 ppm e 1,55 ppm os sinais na forma de singuleto referentes à ressonância dos grupos isopropilídenos. Os protões H-6'' surgem como dois duplos dupletos a 4,45 ppm a 4,55 ppm ($J = 11,6$ e $7,9$ Hz) enquanto que o protão H-5'' surge na forma de multipletos entre 4,20 e 4,25 ppm.

Compostos α -diazocarbonílicos na síntese de novos compostos porfirínicos.
Avaliação biológica de alguns derivados glico-conjugados.

A 4,31 ppm surge o duplo duplete ($J = 7,9$ e $1,9$ Hz) devido à ressonância do próton H-4'' que no espectro de COSY mostra correlação com o sinal a 4,65 ppm (duplo duplete com $J = 7,9$ e $2,6$ Hz) referente a H-3''. Por sua vez, este mostra correlação com o sinal referente a H-2'' que surge como um duplo duplete a 4,34 ppm ($J = 5,0$ e $2,5$ Hz). Da mesma forma, foi possível identificar o sinal referente à ressonância do próton H-1'' a 5,58 ppm como um duplete ($J = 5,0$ Hz). Nesta zona do espectro é ainda possível identificar o sinal referente à ressonância dos prótons CH₂-1' a 4,96 ppm como um singuleto. Para a simplificação desta discussão os sinais referentes à ressonância dos prótons das unidades de hidratos de carbono das glicoporfirinas **30a-c** são apresentados na tabela 2.3.

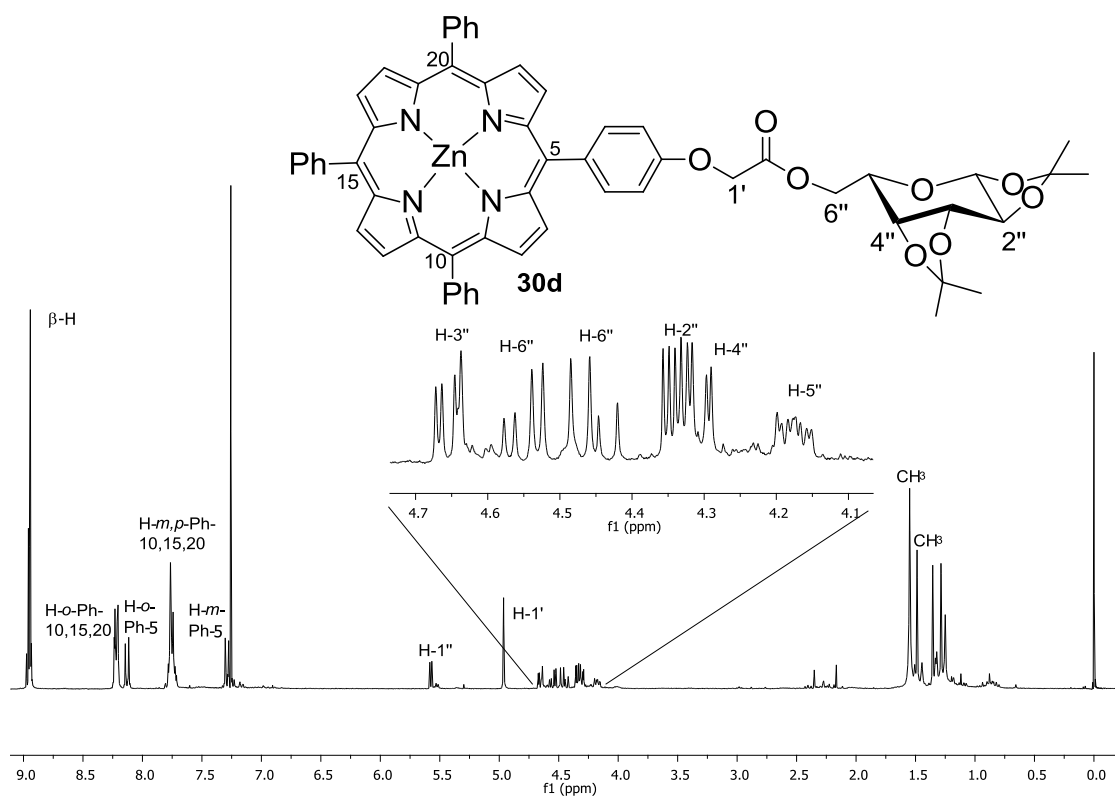


Figura 2.13. Espectro de RMN de ¹H da glicoporfirina **30d**.

Tabela 2.3. Sinais de RMN de ^1H das unidades glicosídicas dos derivados glicoporfirínicos **30a-c**.

Protão	30a	30b	30c
H-1'	4,92 ppm, s	4,89 ppm, s	4,98 ppm, s
H-1''	5,93 ppm, d, ($J = 3,7\text{Hz}$)	6,00 ppm, d, ($J = 3,8\text{ Hz}$)	4,67 ppm, d, ($J = 11,6\text{ Hz}$); 4,29 ppm, d, ($J = 11,6\text{ Hz}$)
H-2''	4,62 ppm, d, ($J = 3,7\text{Hz}$)	4,67 ppm, d, ($J = 3,8\text{ Hz}$)	—
H-3''	5,51 ppm, d, ($J = 2,0\text{Hz}$)	4,04 ppm, d, ($J = 2,8\text{ Hz}$)	4,41 ppm, d, ($J = 2,6\text{ Hz}$)
H-4''	3,98-3,92 ppm, m	4,63-4,48 ppm, m (+ $\text{CH}_2\text{-Ph} + \text{H-5''}$)	4,70-4,64 ppm, m
H-5''	4,06-4,00 ppm, m	4,63-4,48 ppm, m, (+ $\text{CH}_2\text{-Ph} + \text{H-4''}$)	4,30-4,24 ppm, m
H-6''	4,25-4,22 ppm, m	—	3,95 ppm, dd, ($J = 13,0, 1,8\text{ Hz}$) 3,80 ppm, d, ($J = 13,0\text{ Hz}$)
Grupo protector	1,36-1,31 ppm, m; 1,29-1,20 ppm, m	4,73 ppm, d, ($J = 11,9\text{ Hz}$); 1,49-1,50 ppm, m	1,59 ppm, s; 1,53 ppm, s; 1,33 ppm, s

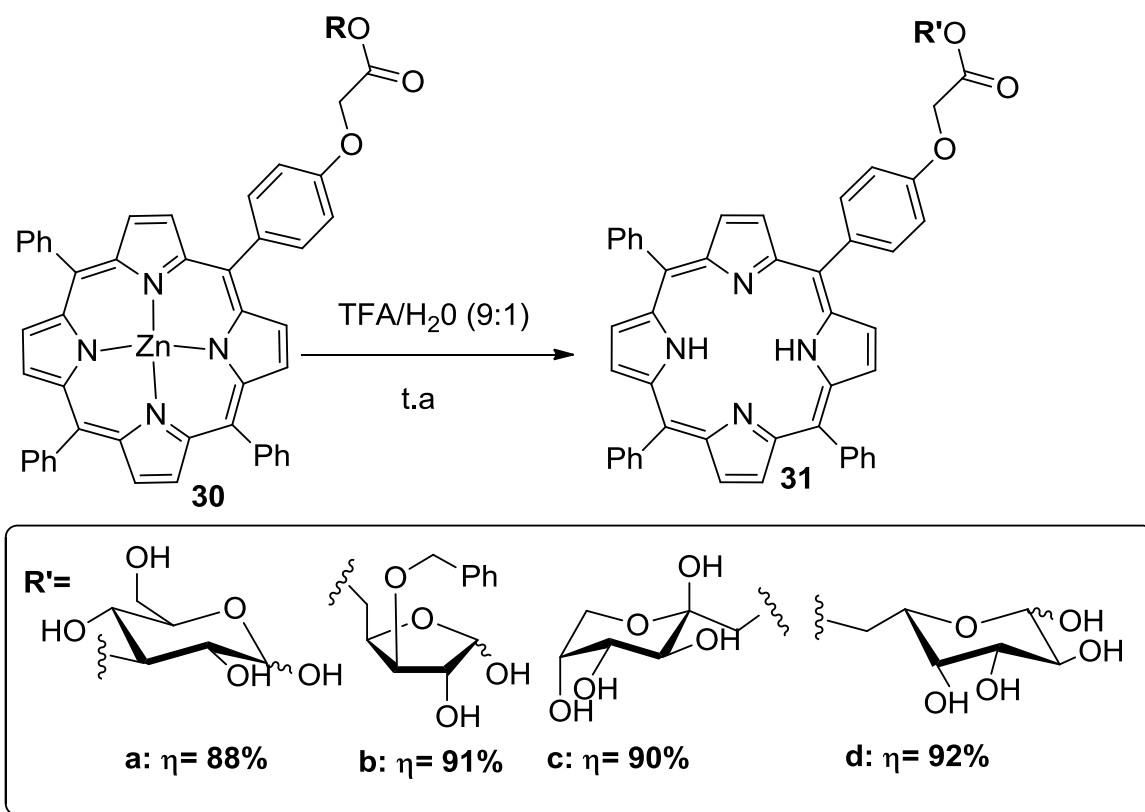
Os espectros de HRMS-ESI permitiram confirmar as fórmulas moleculares dos derivados glicoporfirínicos **30a-d**. Nestes, podemos observar picos a valores de m/z correspondente a $[\text{M}+\text{H}]^+$ para os derivados **30a** ($m/z = 992, 2758$), **30c** ($m/z = 992, 2764$) e **30d** ($m/z = 992, 2764$) e o pico a $m/z 1001, 2882$ correspondente a $[\text{M}+\text{H}]^+$ para o derivado **30b**.

Estes compostos foram também caracterizados por espectroscopia de UV-Vis observando-se que os seus espectros são característicos de *meso*-tetra-arilporfirinas complexadas.

Na tentativa de aumentar a solubilidade dos derivados glicoporfirínicos sintetizados em meios fisiológicos, foi necessário hidrolisar os grupos isopropilídenos das unidades de hidratos de carbono. Neste procedimento removeu-se, também, o ião zinco do interior destes macrociclos. Para tal, cada um dos derivados **30a-d** foi tratado com uma solução de TFA- água (9:1). As misturas reaccionais foram mantidas em agitação à temperatura ambiente durante 30 minutos. Findo este tempo, as misturas reaccionais foram neutralizadas com um solução aquosa de hidrogenocarbonato de sódio e as fases orgânicas foram extraídas com clorofórmio, lavadas com água destilada e seca em sulfato de sódio anidro. Depois de removido o solvente a pressão

Compostos α -diazocarbonílicos na síntese de novos compostos porfirínicos. Avaliação biológica de alguns derivados glico-conjugados.

reduzida, os resíduos obtidos foram purificados por cromatografia em coluna de sílica gel usando como eluente clorofórmio e metanol. Os produtos obtidos **31a-d** (Esquema 2.17) e foram obtidos com rendimentos que variam os 88 e 92%.



Esquema 2.17.

As glicoporfirinas **31a-d** foram, igualmente, caracterizadas por espectroscopia de RMN de ¹H e as suas fórmulas moleculares foram confirmadas por HRMS-ESI.

Nos espectros de RMN de ¹H destes derivados as características mais importantes são:

- a ausência dos sinais referentes à ressonância dos prótons dos grupos isopropilídenos, confirmando o sucesso da desprotecção.
- a presença dos sinais referentes à ressonância dos prótons das unidades glicosídicas entre 6,00 e 3,00 ppm, confirmando a presença da unidade de açúcar nestes derivados.

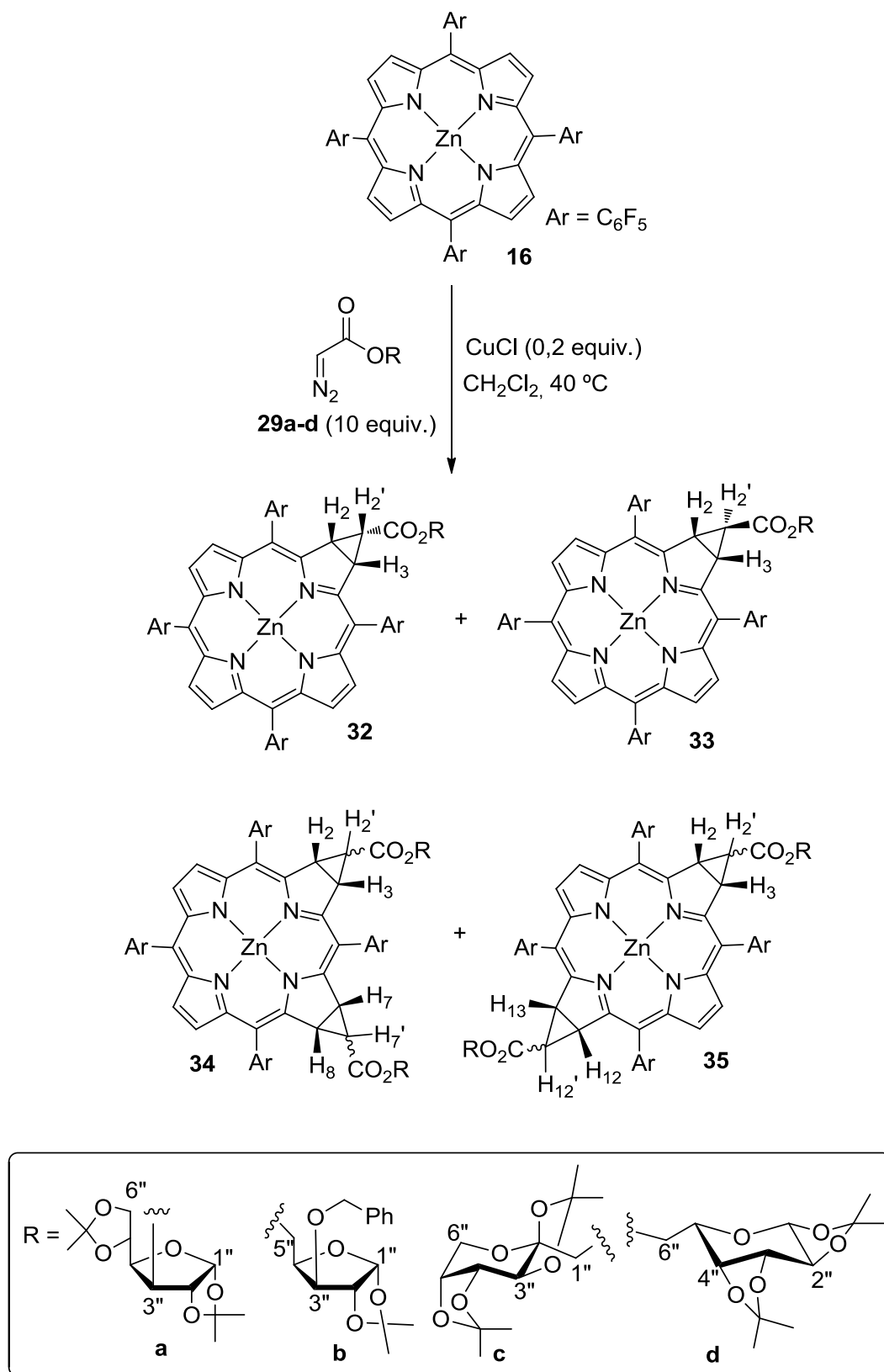
- iii. a presença, a semelhantes desvios químicos e com a mesma multiplicidade, dos sinais referentes à ressonância dos prótons β -pirrólicos e dos anéis fenilo das posições *meso* da unidade de porfirina.

Os espectros de HRMS-ESI dos derivados **31a-d** estão de acordo com as respectivas fórmulas moleculares. Assim, para todas as glicoporfirinas **31a-d** os espectros de HRMS-ESI mostram picos de iões moleculares a valores de m/z correspondentes a $[M+H]^+$ para **31a** ($m/z = 851,3074$), **31b** ($m/z = 911,3439$), **31c** ($m/z = 851,3074$) e **31d** ($m/z = 851,3074$).

2.4.2. Síntese de novos derivados de tipo glicoclorinas através de reacções de ciclopropanação com α -diazacetatos glicosídicos

As reacções de ciclopropanação do complexo porfirínico **16** com os α -diazacetatos glicosilados **29a-d** foram realizadas exactamente nas mesmas condições adoptadas para a síntese dos derivados glicoporfirínicos **30a-d**, no entanto, o catalisador usado foi o CuCl em 0,2 equivalentes. Findo o tempo de reacção, o solvente da mistura foi evaporado e o resíduo foi inicialmente fraccionado por cromatografia em coluna de sílica gel usando como eluente clorofórmio. Desta coluna foi possível recuperar três fracções: a menos polar constituída pela porfirina **16** que não reagiu, a segunda pela mistura das clorinas **32** e **33** e a mais polar constituída pela mistura das isobacterioclorinas **34** e das bacterioclorinas **35** (Esquema 2.18). Estas duas últimas fracções foram purificadas por TLC preparativo usando como eluente uma mistura de hexano/acetato de etilo (4:1). A estrutura dos compostos obtidos assim como os respectivos rendimentos obtidos são apresentados no esquema 2.18 e na tabela 2.4, respectivamente.

Compostos α -diazocarbonílicos na síntese de novos compostos porfirínicos.
Avaliação biológica de alguns derivados glico-conjugados.



Esquema 2.18.

Tabela 2.4. Resultados obtidos na reacção do complexo porfirínico **16** com os α -diazacetatos **29a-d**

α - diazacetatos sacarídicos 29	Complexo 16 recuperado (%) (Conversão %)	η 32 (%) (Selectividade%)	η 33 (%) (Selectividade%)	η 34 (%) (Selectividade%)	η 35 (%) (Selectividade%)
a	70 (30)	-	10 (33)	-	-
b	57 (43)	3 (8)	13 (30)	4 (9)	Vest. ^a
c	79 (21)	Vest. ^a	7 (31)	Vest. ^a	Vest. ^a
d	66 (34)	Vest. ^a	8 (24)	Vest. ^a	Vest. ^a

^a Detectados por UV-vis e espectrometria de massa

Através da tabela 2.4 é possível observar que a distribuição dos produtos obtidos depende da unidade de hidrato de carbono dos α -diazacetatos **29a-d** e em todos os casos o isómero *trans* da clorina **33**¹ é o produto maioritário. É importante referir que a maior selectividade é observada para a reacção da porfirina **16** com o α -diazacetato **29a**.

A estrutura das novas clorinas **32b**, **33a-d** e da isobacterioclorina **34b** foram confirmadas por espectroscopia de RMN de ¹H, ¹³C e ¹⁹F e ainda por espectroscopia de UV-Vis. A estrutura dos restantes compostos obtidos em quantidades vestigiais foram confirmadas por espectroscopia de UV-Vis. As fórmulas moleculares de todos os compostos foram confirmadas por HRMS-ESI.

No que diz respeito aos espectros de UV-Vis foi possível observar que as metaloclorinas **32** e **33** e as metaloisobacterioclorinas **34** apresentam um desvio da última banda Q para a zona do vermelho do espectro (605-620 nm). No caso das metalobacterioclorinas **35** foi possível observar que este desvio é mais significativo (727 nm). A figura 2.14 mostra, como exemplo, os espectros de UV-Vis dos produtos obtidos para a reacção com o diazo acetato **29b**.

¹ O isómero *cis* corresponde àquele em que os protões H-2, H-2' e H-3 estão no mesmo plano enquanto que no isómero *trans* o protão H-2' está num plano diferente dos outros dois protões.

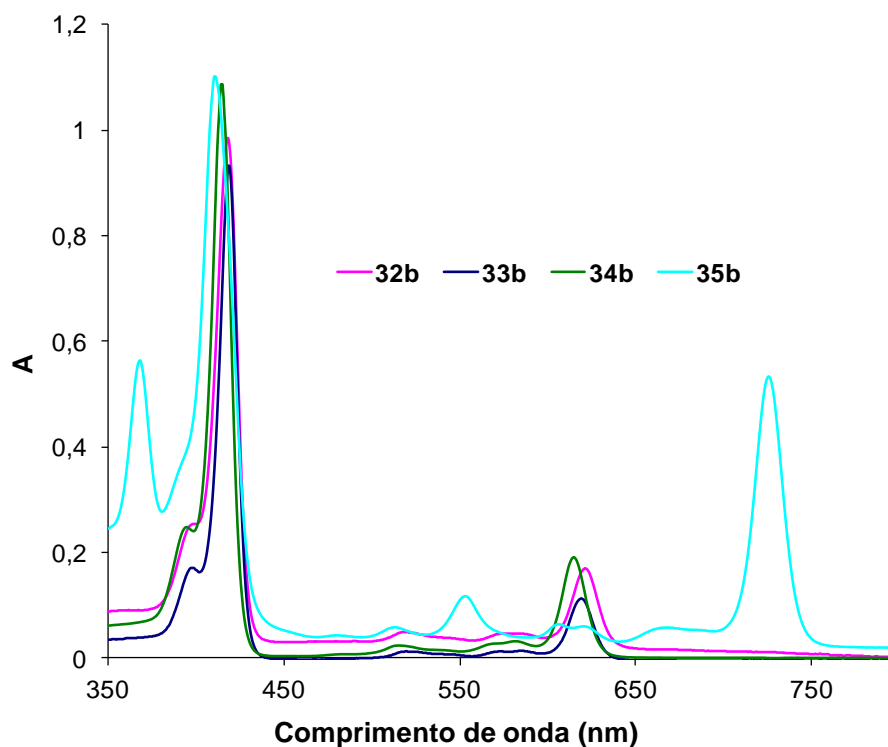


Figura 2.14. Espectros de UV-Vis dos produtos obtidos para a reação com o diazo acetato **46b**

Os espectros de RMN de ^1H das clorinas **33a-d** mostram perfis muito semelhantes, apresentando duas regiões distintas: os sinais a desvios químicos maiores devido à ressonância dos prótons β -pirrólicos (H-7,8,12,13,17,18) e os sinais a desvios químicos mais baixos devido à ressonância dos prótons dos anéis de ciclopropano e da unidade de hidrato de carbono. Na figura 2.15 é apresentado, como exemplo, o espectro de RMN de ^1H da clorina **33d**. Baseado nas atribuições previamente realizadas,⁴⁰ o sinal na forma de singuleto que surge a 8,46 ppm é devido à ressonância dos prótons H-12,13 e o duplete a 8,60 ppm e o multiplete entre 8,30 e 8,29 ppm são devidos à ressonância dos prótons H-8,17 e H-7,18, respectivamente. A constante de acoplamento entre os prótons H-2 e H-3 (dois dupletos a 4,41 e 4,45 ppm) e o próton H-2' (triplete a 1,54 ppm) do anel de ciclopropano ($J = 2,6$ Hz) confirma a configuração *trans* destes derivados clorínicos. O assinalamento dos prótons da unidade de hidrato de carbono (ver parte experimental) foi realizada através das correlações observadas no espectro de COSY que permitiu identificar inequivocamente todos os sinais desta

unidade entre 1,39 ppm a 5,45 ppm. Estes apresentam desvios químicos e multiplicidades semelhantes aos observados para as glicoporfirinas **30a-d** apresentados na tabela 2.4.

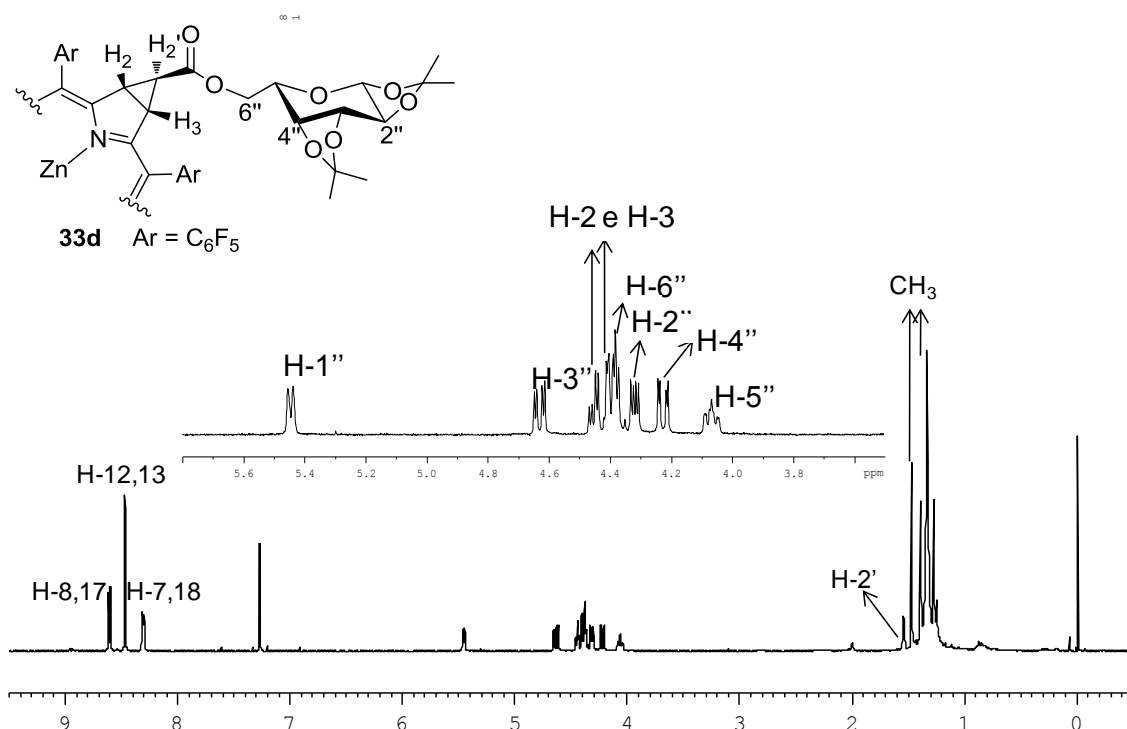


Figura 2.15. Espectro de RMN de ¹H da clorina **33d**.

A configuração *cis* da clorina **32b** está de acordo com a constante de acoplamento ($J = 8,2$ ppm) entre os prótons H-2,3 e H-2' do anel de ciclopropano. Os desvios químicos e multiplicidades dos prótons β -pirrólicos e da unidade de hidrato de carbono são muito semelhantes aos observados para o seu isômero, a clorina **33b**.

O espectro de massa de alta resolução (HRMS-ESI) da isobacterioclorina **34b** mostra o pico a valores de m/z 1709,2362, correspondendo ao pico do íon $[M+H]^+$, confirmando a adição de duas unidades de carbeno ao complexo **16**. O espectro de RMN de ¹H deste composto é possível observar a presença de dois dupletos a 7,99 e 7,96 ppm referentes à ressonância de quatro prótons β -pirrólicos ($J = 4,6$ Hz) e um multipletto a 7,60 -7,57 ppm referente à ressonância de mais quatro prótons β -pirrólicos. Este facto permite afirmar que a fracção correspondente a **34b** é constituída por dois diastereoisômeros.⁴⁰ No entanto, os sinais referentes à ressonância dos prótons

H-2, H-3, H-2', H-7, H-8 e H-7' surgem como multipletos e não permitem confirmar a configuração *trans* dos anéis de ciclopropano esperada.⁴⁰ Porém, e baseado no estudo referido anteriormente⁴⁰ é possível apresentar a estrutura destes dois diastereoisómeros com os anéis de ciclopropano com a configuração *trans* (Figura 2.16).

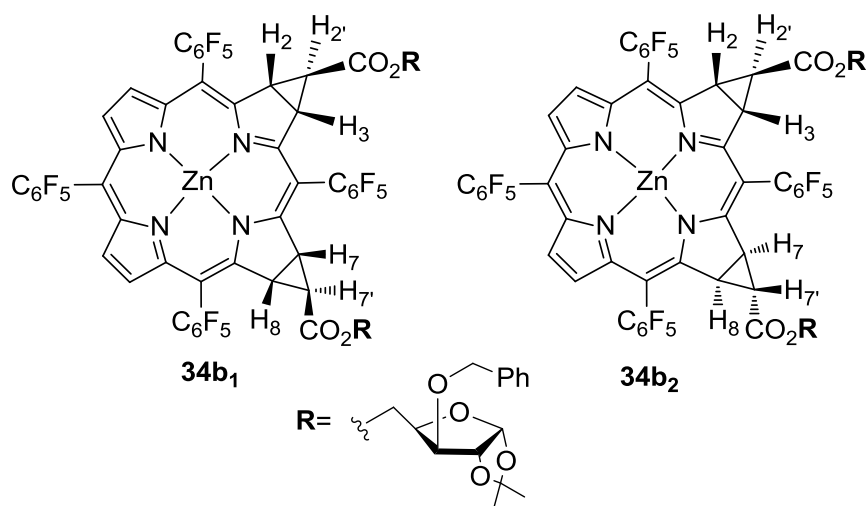
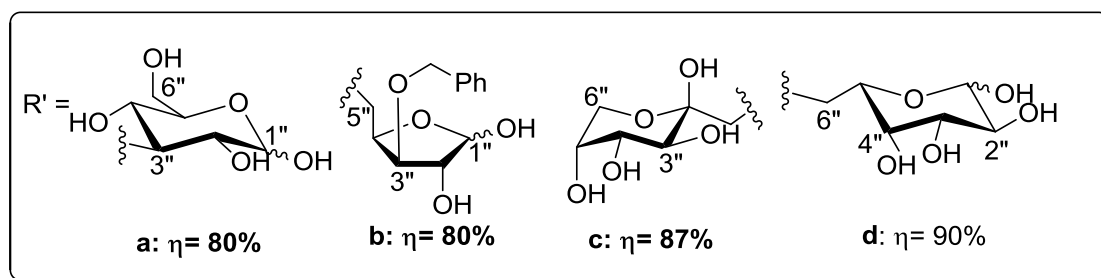
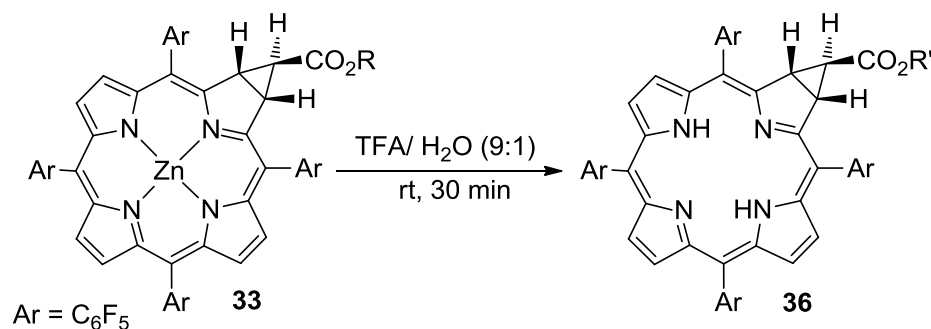


Figura 2.16. Estruturas dos diastereoisómeros da isobacterioclorina **34b**.

Também neste caso, e com o objectivo de aumentar a solubilidade destes compostos em meios fisiológicos, procedeu-se à remoção dos grupos protectores das unidades de hidratos de carbono dos produtos maioritários, as clorinas **33a-d**, assim como à remoção do ião zinco do interior do macrociclo. Esta foi realizada através da adição de TFA a uma solução das clorinas **33a-d** em clorofórmio à temperatura ambiente (Esquema 2.19). Esta reacção permitiu obter, com rendimentos superiores a 80%, as clorinas **36a-d**. A estrutura destes novos compostos foi confirmada por espectroscopia de RMN de ^1H e de UV-Vis. As suas fórmulas moleculares foram verificadas por HRMS-ESI.

Compostos α -diazocarbonílicos na síntese de novos compostos porfirínicos.
Avaliação biológica de alguns derivados glico-conjugados.



Esquema 2.19

Os espectros de RMN de ^1H das clorinas **36a-d** confirmam a desproteção das unidades de hidrato de carbono através do desaparecimento dos sinais devido à ressonância dos prótons dos grupos isopropilídenos. Apesar disto, e como esperado, não existem diferenças significativas entre os espectros destas clorinas e as clorinas **33a-d**. Estes espectros mostram ainda diversos multipletos entre 3,00 ppm e 6,00ppm devido à ressonância dos prótons das unidades de açúcar. Os espectros de UV-Vis das clorinas **36a-d** mostram, como esperado, um desvio para maiores comprimentos de onda de cerca de 35 nm quando comparados com os seus precursores, as clorinas **33a-d**.

2.5. Avaliação da actividade fotodinâmica dos derivados glicoporfirínicos **31a-d** e **36a-d** em células tumorais

Nos pontos anteriores foi mostrada a síntese de dois grupos de compostos como potenciais fotossensibilizadores em terapia fotodinâmica, as glicoporfirinas **31a-d** e as glicoclorinas **36a-d**. Tendo em conta estes estudos, torna-se interessante avaliar a actividade anticancerígena dos derivados glicoporfirínicos sintetizados. Assim, nesta parte do trabalho será descrito o trabalho realizado e os resultados obtidos na

avaliação da actividade fotodinâmica destes compostos numa linha celular tumoral. Para avaliar a selectividade tumoral, estes compostos foram também testados numa linha celular não tumoral. No capítulo 1 já foram mencionados os fundamentos teóricos da terapia fotodinâmica (PDT) e o seu mecanismo de acção. Serão, também, agora descritas as características das linhas celulares usadas neste trabalho; seguidamente serão descritos os estudos de geração de oxigénio singuleto das glicoporfirinas **31a-d** e **36a-d**. De forma a poder discriminar qual dos dois grupos de compostos seria o mais promissor na fotoinactivação de células tumorais, a glicoporfirina e glicoclorina mais eficientes na geração de oxigénio singuleto foram testadas, por tratamento fotodinâmico, numa linha celular tumoral. O composto mais eficaz neste processo, permitiu escolher o grupo de derivados glicoporfirínicos mais promissores em PDT e prosseguir os estudos de avaliação biológica.

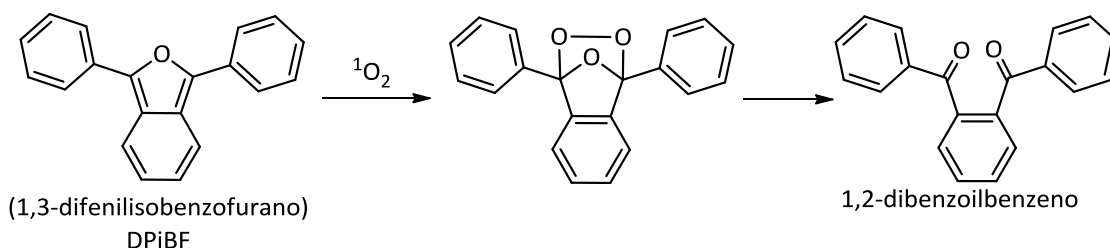
2.5.1. Estudos de geração de oxigénio singuleto dos derivados glicoporfirínicos 31a-d e 36a-d.

A actividade fotodinâmica de um fotossensibilizador está, como já foi referido, fortemente relacionada com a produção de oxigénio singuleto ($^1\text{O}_2$).⁴⁸ Os fotossensibilizadores que formam oxigénio singuleto são importantes para induzirem processos que são responsáveis pela destruição de tecidos “doentes”.^{48,49} A eficiência do processo de fotoinactivação é dependente da presença de oxigénio molecular, e do modo como o fotossensibilizador transfere energia do seu estado tripleto para o oxigénio no estado fundamental (oxigénio tripleto), gerando oxigénio singuleto. Assim, o rendimento quântico de oxigénio singuleto, ϕ , é uma das propriedades chave de um fotossensibilizador, uma vez que a formação de $^1\text{O}_2$ está indirectamente relacionada com a morte celular, como já for referido.

Tendo em conta que os derivados glicoporfirínicos **31a-d** e **36a-d** foram seleccionados para estudos de PDT decidiu-se, primeiro, estudar a sua capacidade de gerar $^1\text{O}_2$.

Existem vários métodos que permitem estudar a produção de $^1\text{O}_2$ tanto em termos qualitativos como quantitativos. Os testes qualitativos, ainda que não permitam a determinação numérica absoluta de ϕ , permitem, de uma forma rápida, comparar a eficiência de geração de $^1\text{O}_2$ de um dado composto desconhecido com um composto de referência e cuja eficiência é conhecida.⁵⁰

O 1,3-difenilisobenzofurano (DPiBF) é um composto usado para determinação relativa de produção de $^1\text{O}_2$ uma vez que pode ser considerado como detector da formação de $^1\text{O}_2$. Os furanos são, em geral, compostos sensíveis à presença de $^1\text{O}_2$, uma vez que sofrem facilmente reacções de cicloadição-1,4 com $^1\text{O}_2$. O DPiBF, composto que absorve radiação visível e apresenta um máximo de absorção a 415 nm é convertido em *o*-dibenzoilbenzeno pelo $^1\text{O}_2$ (Esquema 2.20) e esta reacção pode servir de base para a realização de um teste de determinação qualitativa de $^1\text{O}_2$.⁵¹



Esquema 2.20.

O 1,2-dibenzoilbenzeno formado pela oxidação de DPiBF pelo $^1\text{O}_2$ não absorve na região visível do espectro de radiação e portanto a medida do decréscimo da absorvência numa solução de DPiBF permite avaliar qualitativamente a formação de $^1\text{O}_2$ produzida pelo fotossensibilizador presente na solução.⁵¹ Segundo este método, o DFiBF e o fotossensibilizador são colocados num solvente que permita a dissolução de ambos e que seja o mais próximo possível com o ambiente em que fotossensibilizador será avaliado biologicamente. A concentração do DPiBF deve ser aproximadamente de 100 vezes superior à do fotossensibilizador. Se o fotossensibilizador conseguir gerar $^1\text{O}_2$, após a irradiação da solução observa-se um decréscimo na absorvência do DPiBF resultante do decréscimo da concentração deste. Os resultados podem ser apresentados sob a forma gráfico onde se relaciona a absorvência de DPiBF (ou um

valor relativo calculado a partir desta) com o tempo de irradiação a que foi sujeito o sistema. Se o estudo for feito utilizando vários fotossensibilizadores, nas mesmas condições, poder-se-á, desta forma, comparar através destes resultados a eficiência relativa de produção de $^1\text{O}_2$ de cada uma das moléculas em estudo.

Assim, para verificar a eficiência na geração de oxigénio singuleto por parte dos derivados glicoporfirínicos **31a-d** e **36a-d**, usou-se o método qualitativo do DFIBF. O solvente utilizado era constituído por numa mistura de DMF/H₂O na proporção 9:1. As medições espectrofotométricas da absorvência do DPiBF a 50 μM foram realizadas na presença de fotossensibilizador a 0,5 μM e irradiadas com luz de comprimento de onda entre 550-800 nm e com uma dose de luz de 25 mW/cm^2 .

Os resultados obtidos foram organizados na forma de gráfico onde a percentagem de decaimento da absorvência de DPiBF a 415 nm foi apresentada em função do tempo de irradiação (Figura 2.17 e Figura 2.18). Assim, quanto mais pronunciado for o decaimento, maior é a taxa de produção de $^1\text{O}_2$. Como fotossensibilizadores de referência foi usada a *meso*-tetrafenilporfirina (**TPP**) para as glicoporfirinas **31a-d** e o azul-de-metileno (**MB**) para as glicoclorinas **36a-d**, os quais são fotossensibilizadores conhecidos por gerar oxigénio singuleto.^{52,53} O uso de dois fotossensibilizadores de referência diferentes para as duas classes de compostos prende-se com o facto de o **MB** se ter mostrado muito melhor fotossensibilizador do que qualquer uma das glicoporfirinas **31a-d**, não sendo, por isso, possível a interpretação dos resultados obtidos.

Na figura 2.17 são apresentados os resultados obtidos da fotodecomposição do DPiBF pelo $^1\text{O}_2$ gerado pelas glicoporfirinas **31a-d** e pela referência TPP.

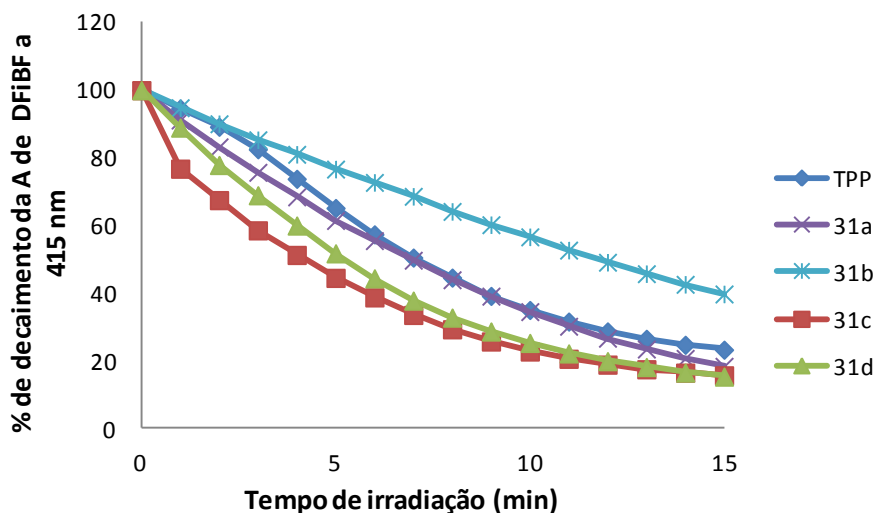


Figura 2.17. Fotodecomposição do DPiBF pelo $^1\text{O}_2$ gerado por **TPP**, **31a**, **31b**, **31c** e **31d** depois da irradiação com luz de comprimento de onda de 550 – 800 nm ($25 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$).

Como é possível observar, todos os derivados glicoporfirínicos **31a-d** mostram ser capazes de gerar $^1\text{O}_2$, uma vez que se observa fotodegradação significativa do DFIBF. Com exceção do derivado da xilose **31b**, todas as outras glicoporfirinas são melhores geradores de $^1\text{O}_2$ do que a referência **TPP**. Podemos destacar os derivados da frutose **31c** e da galactose **31d** como sendo os melhores geradores de $^1\text{O}_2$ nos presentes estudos.

Na figura 2.18 são apresentados os resultados obtidos, nas mesmas condições, da fotodecomposição do DPiBF pelo $^1\text{O}_2$ gerado pelas glicoclorinas **36a-d** e pela referência **MB**. Neste caso, observou-se que a taxa de decaimento da absorvência do DFIBF na presença dos fotossensibilizadores **36a-d** foi muito rápida, sendo que as leituras desta medida tiveram de ser realizadas de 10 em 10 segundos, para ser possível construir curvas relacionadas com a cinética de decaimento de absorvência.

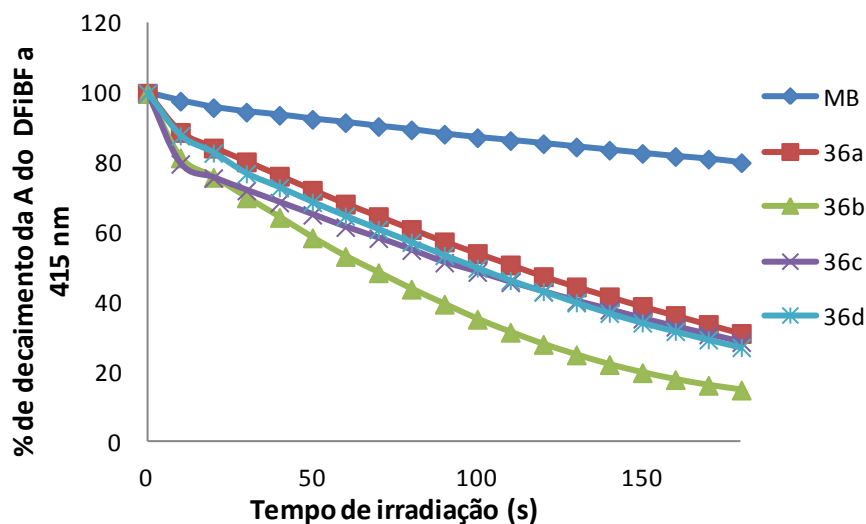


Figura 2.18. Fotodecomposição do DFIBF pelo $^1\text{O}_2$ gerado por **MB**, **36a**, **36b**, **36c** e **36d** depois da irradiação com luz de comprimento de onda de 550 – 800 nm ($25 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$).

De qualquer forma, observou-se que todas as glicoclorinas testadas são melhores geradoras de $^1\text{O}_2$ do que a referência, **MB**. Apesar das taxas de produção de $^1\text{O}_2$ das glicoclorinas não serem significativamente diferentes, é possível destacar o derivado **36b** como sendo o melhor gerador dessa espécie.

Comparando a eficiência de geração de oxigênio singuleto destas duas classes de compostos, é possível afirmar que as glicoclorinas serão mais eficientes neste processo, uma vez que para causarem uma diminuição de 80% na absorvência do DFIBF necessitam de menos tempo (cerca de 3 minutos e 20 segundos) do que para as glicoporfirinas (cerca de 15 minutos).

2.5.2. Estudos *in vitro* da actividade fotodinâmica das glicoporfirinas 31a-d e glicoclorinas 36a-d em células HeLa e HaCaT

Linhas celulares usadas na avaliação biológica dos derivados 31a-d e 36a-d

Para a avaliação da actividade fotodinâmica das glicoporfirinas **31a-d** e das glicoclorinas **36a-d** foram usadas duas linhas celulares humanas imortalizadas: uma linha celular tumoral, HeLa, e uma linha não tumoral, HaCaT.

As células HeLa provêm de uma linha celular humana imortalizada que deriva de células epiteliais humanas de um carcinoma cervical, provocado pelo papilomavírus humano. A sua designação descende no nome da paciente de onde estas células foram isoladas pela primeira vez, **Henriquetta Lacks**. Presume-se que Henriquetta Lacks tenha falecido devido ao carcinoma em Outubro de 1951.⁵⁴ Esta linha celular possui uma extraordinária durabilidade e a sua proliferação e adaptação ao crescimento em diferentes meios de cultura são singulares.⁵⁵ Estas características especiais têm permitido que esta linha celular seja intensamente usada em investigação, nomeadamente em trabalhos relacionados com o tratamento de neoplasias. De facto, as publicações existentes na literatura científica em trabalhos usando células HeLa são 60 000 até 2009.

As células HaCaT descendem de uma linha celular humana imortalizada de queratinócitos existentes na epiderme. A sua principal função é de protecção do meio externo, sendo constituída por proteínas estruturais, enzimas, lípidos e péptidos. Aquando um ataque externo, estas células produzem mediadores pró-inflamatórios que são responsáveis pela atracção dos leucócitos ao local da agressão. Esta linha celular foi desenvolvida numa cultura de queratinócitos de pele de adulto, em meio com concentração de cálcio baixa e a elevada temperatura.⁵⁶ A sua designação provém da sua origem e das condições em que foi produzida (**H**uman **A**dult **C**alcium **T**emperature).

Estas duas linhas celulares pertencem ao grupo das células eucarióticas, onde se incluem as células dos animais e plantas. Por sua vez, as bactérias e os protozoários fazem parte do grupo das células procarióticas. As células eucarióticas são

caracterizadas pela sua estrutura celular organizada contendo organelos inclusos em membranas (Figura 2.19).⁵⁷ As células eucarióticas são organismos muito mais complexos do que as células procarióticas e distinguem-se pelo facto de possuírem o seu material genético organizado num compartimento, o núcleo, que se encontra separado do resto da célula por uma membrana plasmática. No entanto, este não é o único organelo membranar das células eucarióticas. Existem outros com funções muito importantes para garantir a normal funcionalização da célula. Por exemplo, os lisossomas que contêm no seu interior enzimas hidrolíticas responsáveis pela digestão de macromoléculas e pela reciclagem de outros organelos celulares envelhecidos. As mitocôndrias são um dos componentes celulares mais importantes sendo extremamente necessárias na respiração. É neste organelo que se produz o ATP através do ciclo do ácido de Krebs. O complexo de Golgi exerce funções de modificação e distribuição de moléculas para serem excretadas. Existem dois retículos endoplasmáticos numa célula eucariótica: o liso, responsável pela degradação de medicamentos e de etanol e o rugoso, responsável pela síntese de proteínas responsáveis pela modificação e distribuição de moléculas para serem excretadas no aparelho de Golgi. Os ribossomas têm como função a tradução da informação contida no mRNA para a produção de proteínas e enzimas. Estes organelos existem tanto nas células eucarióticas como nas procarióticas, no entanto nas eucarióticas são de maiores dimensões. Os centríolos estão envolvidos em processos de divisão celular, enquanto que os microfilamentos são responsáveis pelo movimento da célula.^{57,58}

Compostos α -diazocarbonílicos na síntese de novos compostos porfirínicos.
Avaliação biológica de alguns derivados glico-conjugados.

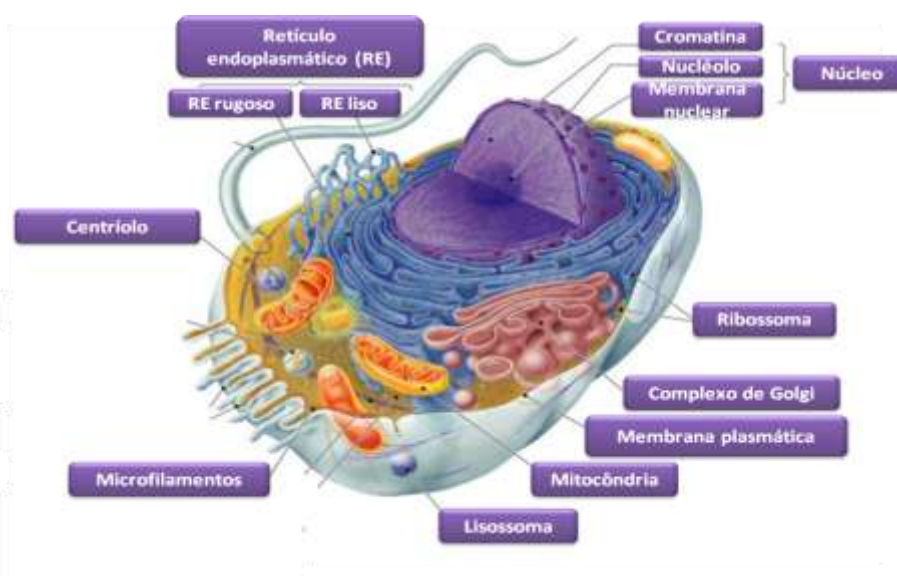


Figura 2.19- Representação esquemática de uma célula eucariótica (fonte: <http://www.simbiotica.org/celula.htm>).

Com o objectivo de avaliar a actividade fotodinâmica das glicoporfirinas **31a-d** e das glicoclorinas **36a-d** foram realizados estudos *in vitro* numa linha celular humana tumoral imortalizada, as células HeLa. Uma vez que um dos requisitos para um fotossensibilizador ser usado em PDT é a sua afinidade para as células tumorais, esperando-se que não ocorram danos nas células normais vizinhas, estes ensaios foram estendidos, como já foi referido, a uma linha celular humana não tumoral, as células HaCaT, para determinar a selectividade dos compostos sintetizados. Estes estudos foram realizados no grupo da Professora Angeles Juarranz do Departamento de Biologia da Universidade Autónoma de Madrid, sob orientação do Professor Francisco Sanz.

No entanto, a avaliação das propriedades biológicas de determinado composto é um processo moroso e dispendioso. Devido ao elevado número de compostos preparados, foi necessário estabelecer uma estratégia para escolher qual o grupo de compostos (glicoporfirinas vs glicoclorinas) seria o mais promissor como fotossensibilizador em PDT. Assim, optou-se por escolher uma glicoporfirina e uma glicoclorina com o mesmo resíduo de hidrato de carbono para realizar um teste preliminar de viabilidade celular após tratamento fotodinâmico em células HeLa. O

fotossensibilizador que permitisse obter maiores decréscimos na sobrevivência celular seria utilizado juntamente com os seus análogos, nos ensaios biológicos seguintes. Os compostos seleccionados para este ensaio preliminar foram a glicoporfirina **31d** e a glicoporfirina **36d** (derivados com resíduo de galactose), por serem o par que se mostrou como sendo dos melhores geradores de oxigénio singuleto.

Os derivados glicosilados seleccionados mostraram não ser totalmente solúveis em água, apesar de possuírem vários grupos hidroxilo. Este facto conduziu à incorporação da glicoporfirina **31d** e a glicoclorina **36d** em vesículas de lipossomas com o objectivo dos ensaios biológicos serem realizados em meio o mais semelhante possível ao meio fisiológico. Desta forma, garante-se que os fotossensibilizadores permanecem numa suspensão estável no meio aquoso de cultura nos tratamentos fotodinâmicos. Na realidade, estudos prévios mostraram que a incorporação de fotossensibilizadores em lipossomas induz um aumento significativo do efeito fotodinâmico em células tumorais, dado o aumento da acumulação destas drogas nas células.⁵⁹

Assim, foram preparadas duas soluções stock, uma de fotossensibilizador (0,5 mg de fotossensibilizador em 1 mL de piridina) e outra do lípido dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) (10,5 mg em 1 mL de etanol absoluto) (Figura 2.20). A partir destas preparou-se uma nova solução de fotossensibilizador (0,265 mL) e de DPCC (0,753 mL), que foi adicionada gota a gota a 10 mL de PBS a 55°C (temperatura de transição dos lipossomas), sob agitação magnética. Esta mistura, foi então, dialisada em PBS a 1% de forma a remover os solventes orgânicos usados na preparação desta suspensão. A suspensão resultante foi esterilizada através da filtração por um filtro Milipore de 0,22 μm de diâmetro de poro e armazenada a 4°C e no escuro.

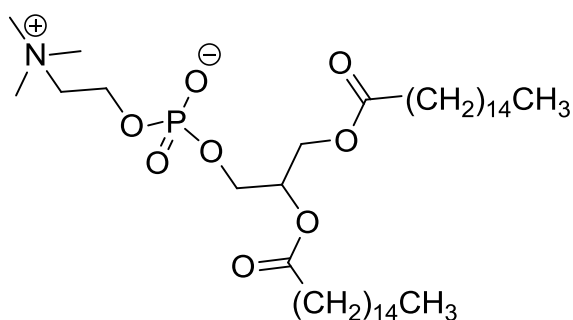


Figura 2.20. Estrutura do dipalmitoilfosfatidilcolina (DPCC).

2.5.2.1. Testes de viabilidade celular

O ensaio da viabilidade celular permite estimar a sobrevivência celular após o tratamento fotodinâmico. Numa primeira fase, realizámos o teste da viabilidade celular dos derivados glicosilados **31d** e **36d** em células HeLa, de forma a seleccionar o grupo de compostos mais promissores.

Estas células foram cultivadas em frascos de plásticos estéreis F25 em meio de cultura DMEM completo (com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de antibióticos (penicilina e estreptomicina)) (Figura 2.21). Quando se observou por microscópio que estas células apresentavam 60-70% de confluência, a suspensão celular foi amplificada, fazendo a sua inoculação em novos frascos F25 de mantimento celular. Para realizar os ensaios biológicos, parte desta suspensão celular confluenta (cerca de 1mL) foi inoculada em placas de 24 poços (ou 6 poços). As células de mantimento e as células em placas foram mantidas em ambiente estéril a 37°C e com em atmosfera com 5% de CO₂ até apresentarem 60-70% de confluência. Este processo foi repetido para os frascos F25 e as placas cultivadas foram usadas para os ensaios biológicos a realizar.

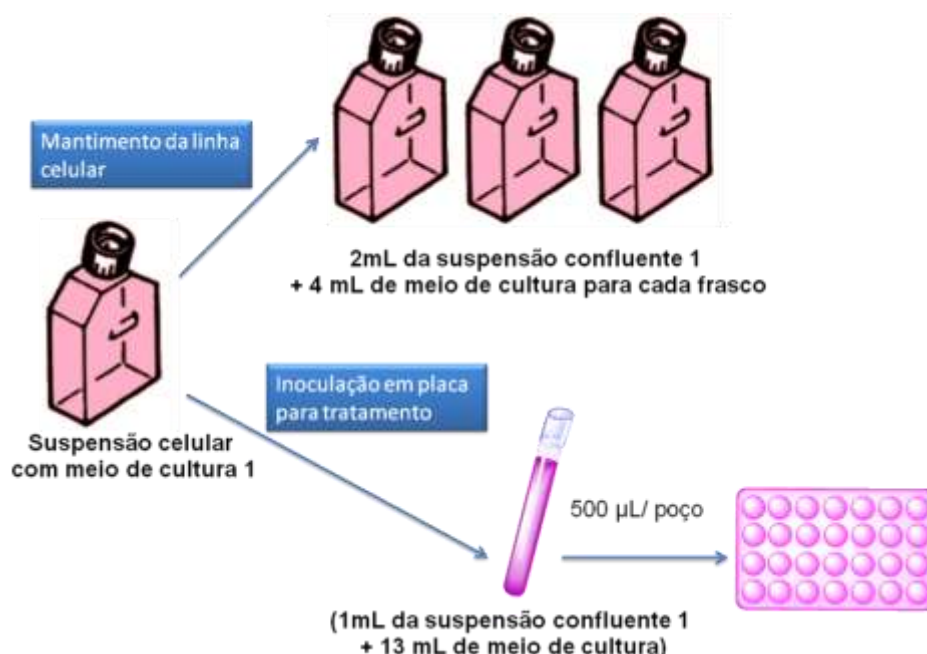


Figura 2.21. Representação esquemática do processo de mantimento e inoculação em placa de uma linha celular.

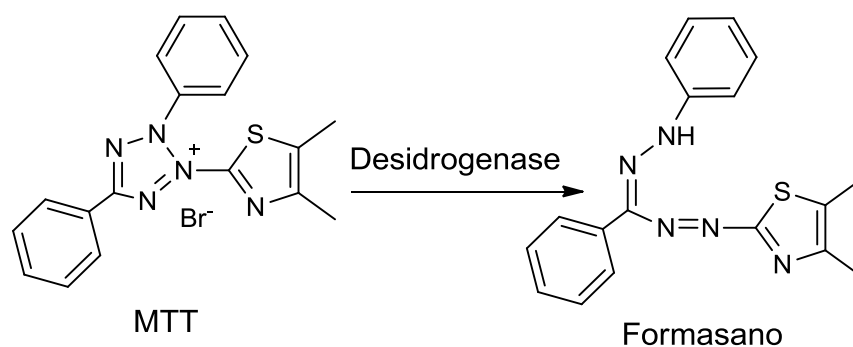
Para os ensaios de viabilidade celular as células foram inoculadas em placas de 24 poços. Uma vez confluentes, as células foram incubadas com a suspensão de fotossensibilizador-lipossomas **31d** e **36d** usando duas concentrações diferentes: 10^{-6} e 10^{-7} M. Estas soluções foram preparadas por diluição da suspensão de fotossensibilizador-lipossomas em meio DMEM sem o corante (vermelho de fenol) e sem SFB. Assim, o meio completo inicial foi aspirado e substituído pela suspensão fotossensibilizador-lipossomas em meio DMEM. Cada placa foi incubada durante 4 horas no escuro em ambiente esterilizado a 37°C e numa atmosfera com 5% CO_2 . Ao fim deste tempo, as placas foram irradiadas durante 5, 10 e 20 minutos com luz de comprimento de onda 647 ± 15 nm e com dose de luz $9,15$ mW/cm². Para cada fotossensibilizador testado foram realizados dois controlos:

- i. o controlo total, com o objectivo de avaliar a viabilidade celular na ausência de PS e radiação:
- ii. o controlo do efeito da radiação, com o objectivo de avaliar a influência da radiação, na ausência de fotossensibilizador na viabilidade celular.

Após a irradiação, a solução de fotossensibilizador-lipossoma foi substituída por igual volume de meio DMEM completo e voltou-se a incubar as placas durante 24 horas num ambiente esterilizado e procedeu-se ao teste da viabilidade celular.

A estimativa da viabilidade celular foi realizada usando o método colorimétrico MTT. Este caracteriza-se pela reacção de redução do 4,5-dimetil-3-tiazolil-2,5-difeniltetrazolio (MTT) a formazano (Esquema 2.21) pelas desidrogenases mitocondriais e outras enzimas citoplasmáticas das células viáveis. O formazano possui coloração roxa, sendo possível medir a sua absorção a 542 nm. Assim, a quantidade de formazano formado é directamente proporcional à quantidade de células vivas.⁶⁰

Compostos α -diazocarbonílicos na síntese de novos compostos porfirínicos.
Avaliação biológica de alguns derivados glico-conjugados.



Esquema 2.21.

Assim, após o período de incubação, o meio DMEM completo foi substituído por uma solução de MTT a 10% em meio completo e as placas foram incubadas a 37°C e numa atmosfera com 5% de CO₂ durante 3 horas. Passado este tempo, observou-se nos poços com células viáveis a formação de um precipitado roxo correspondente ao formasano. O líquido sobrenadante foi aspirado e o formasano foi dissolvido em DMSO por adição de 500 μ L deste solvente orgânico em cada poço. A absorção das diferentes amostras foi lida a 542 nm num espectrómetro de leitura de placas automatizado. As medições de absorção dos controlos totais foram tomadas como 100% de viabilidade celular e a partir dessas estimaram-se as percentagens de viabilidade para o resto dos controlos e para as células submetidas a tratamento completo. Os resultados obtidos são uma média de três ensaios, cada um com três réplicas.

Na figura 2.22 são apresentados os resultados obtidos no teste da viabilidade celular após o tratamento fotodinâmico usando os derivados glicoporfirínicos **31d** e **36d**.

Compostos α -diazocarbonílicos na síntese de novos compostos porfirínicos. Avaliação biológica de alguns derivados glico-conjugados.

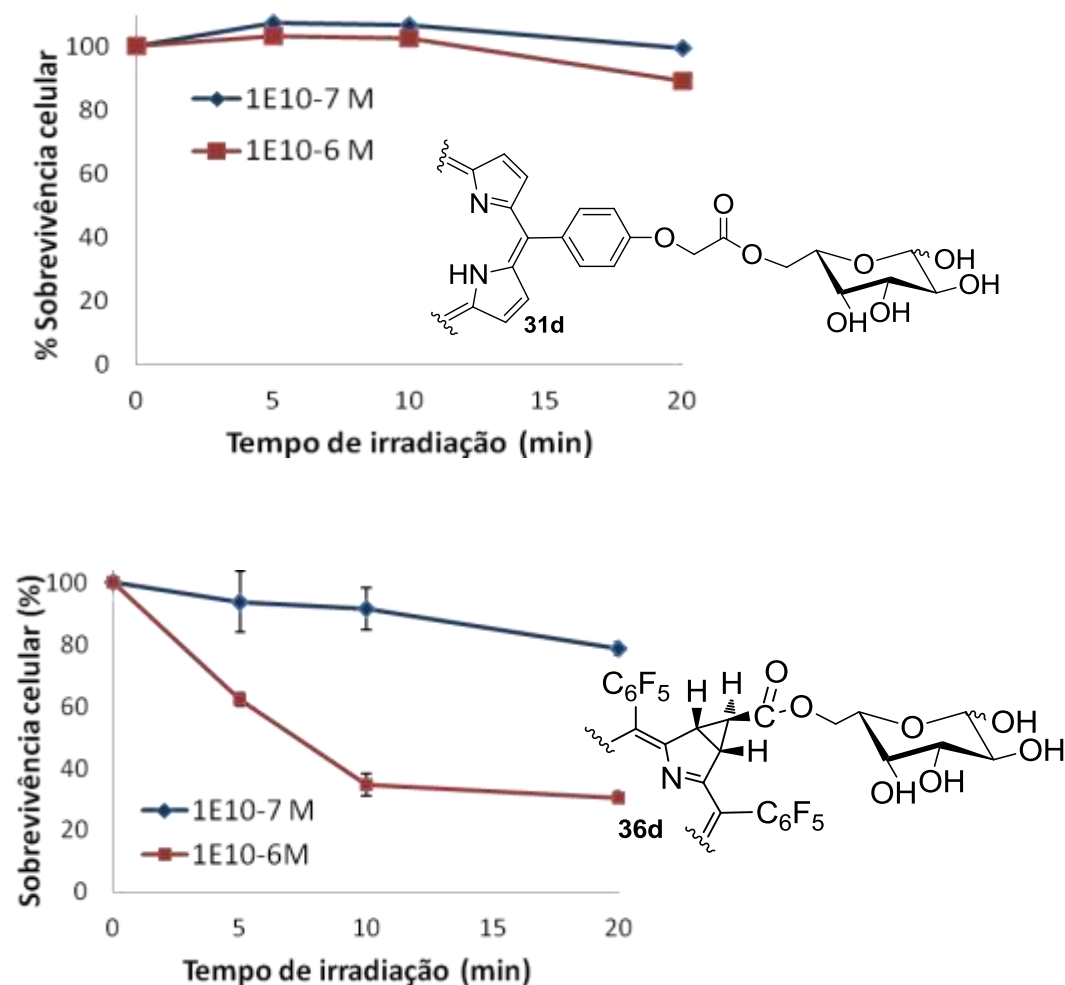


Figura 2.22. Sobrevivência celular em função do tempo de irradiação de HeLa após tratamento fotodinâmico com os derivados **31d** e **36d** a 10^{-6} e 10^{-7} M.

Como é possível observar, a porfirina **31d** não apresenta efeito fotodinâmico significativo nas células tumorais HeLa a nenhuma das concentrações usadas. No caso da clorina **36d** os resultados obtidos foram mais satisfatórios. Verifica-se que, após 20 minutos de irradiação, na concentração mais baixa ocorre um decréscimo de cerca de 20% na sobrevivência das células HeLa e na concentração mais elevada este decréscimo é cerca de 70%.

Estes resultados levantaram a suspeita de que as restantes glicoporfirinas **31a-c** fossem igualmente inactivas no tratamento fotodinâmico das células tumorais HeLa. Por este motivo, os estudos de avaliação da actividade fotodinâmica em células

tumorais prosseguiu apenas com os derivados de clorina **36a-d**. Estes estudos foram realizados, paralelamente, com a linha humana não tumoral, HaCaT, de forma a estimar a selectividade destes. Esta linha celular foi tratada nas mesmas condições usadas para a linha celular HeLa.

À semelhança do derivado **36d**, as clorinas **36a-c** foram incorporadas em vesículas de lipossomas segundo a metodologia atrás descrita. No entanto, este processo não permitiu a incorporação da clorina com resíduo de xilose, derivado **36b**, observando-se a precipitação deste composto depois do processo de diálise. Com isto, os estudos prosseguiram apenas com os derivados **36a**, **36c** e **36d**.

Foram realizados os estudos de viabilidade celular em células HeLa e HaCaT após tratamento fotodinâmico com os compostos **36a**, **36c** e **36d** exactamente nas mesmas condições referidas anteriormente. Os resultados obtidos são apresentados na tabela 2.5.

Os resultados obtidos com o derivado da glucose, a clorina **36a** mostram que para as duas linhas celulares usadas, o maior decréscimo na sobrevivência celular foi obtido para a concentração mais elevada. É possível ainda observar que o efeito fotodinâmico deste composto nas células saudáveis, HaCaT, é mais significativo do que o observado para as HeLa, qualquer que seja a concentração usada. Assim, no caso da concentração mais baixa observa-se um decréscimo de cerca de 15% na sobrevivência das células HaCaT enquanto que para as células HeLa o efeito fotodinâmico é nulo. Para o caso da concentração mais elevada, ocorre um decréscimo de cerca de 85% na sobrevivência das duas linhas celulares usadas. Estes resultados indicam que este composto não é selectivo para as células tumorais, causando efeito fotodinâmico tanto nas células HeLa como nas HaCaT, nas mesmas condições.

Tabela 2.5. Sobrevivência celular das duas linhas celulares, HeLa e HaCaT, após tratamento fotodinâmico com os derivados **36a**, **36c** e **36d** a diferentes tempos de irradiação com uma dose de luz de $9,15\text{mW}/\text{cm}^2$ e a duas concentrações diferentes.

Clorina	Concentração (M)	Tempo de irradiação (min)	Sobrevivência celular (% \pm SD)	
			HaCaT	HeLa
36a	$1,0 \times 10^{-7}$	5	$96,87 \pm 1,50$	$113,25^* \pm 1,17$
		10	$89,53 \pm 1,94$	$101,65^* \pm 3,74$
		20	$85,37 \pm 1,58$	$102,50^* \pm 1,44$
	$1,0 \times 10^{-6}$	5	$63,98 \pm 3,33$	$42,53 \pm 1,73$
		10	$32,80 \pm 0,71$	$23,37 \pm 5,51$
		20	$15,43 \pm 1,74$	$16,29 \pm 0,69$
36c	$1,0 \times 10^{-7}$	5	$70,68 \pm 1,36$	$89,44 \pm 0,89$
		10	$65,75 \pm 4,42$	$84,57 \pm 2,04$
		20	$49,97 \pm 4,26$	$60,52 \pm 2,61$
	$1,0 \times 10^{-6}$	5	$25,93 \pm 3,48$	$14,67 \pm 0,90$
		10	$21,26 \pm 0,19$	$13,50 \pm 0,15$
		20	$22,87 \pm 0,03$	$13,70 \pm 0,37$
36d	$1,0 \times 10^{-7}$	5	$102,82^* \pm 1,40$	$93,72 \pm 9,84$
		10	$102,60^* \pm 5,16$	$91,44 \pm 6,85$
		20	$106,45^* \pm 2,37$	$78,68 \pm 2,05$
	$1,0 \times 10^{-6}$	5	$90,33 \pm 9,42$	$62,12 \pm 2,05$
		10	$82,14 \pm 9,05$	$34,65 \pm 3,58$
		20	$72,86 \pm 3,85$	$30,52 \pm 2,06$

*Estes valores indicam a ausência de efeito fotodinâmico, logo, ausência de morte celular.

Quando o derivado da frutose, a clorina **36c** foi usado como fotossensibilizador, verifica-se que para as duas linhas celulares usadas, o maior decréscimo na sobrevivência celular foi obtido para a concentração mais elevada, tal como acontece no caso anterior. Para o caso das células tumorais, HeLa, a concentração mais baixa produziu um decréscimo de cerca de 40% na sobrevivência celular enquanto que para

a concentração mais elevada este decréscimo chegou aos 86,30%. Apesar de esta representar uma diminuição bastante satisfatória da linha tumoral usada, há que ter em conta que ao mesmo tempo ocorreu uma redução análoga da linha saudável. Assim, quando as células HaCaT foram tratadas com a clorina **36c** observou-se, também, um efeito significativo na sobrevivência celular para as duas concentrações testadas. A concentração de 10^{-7} M produziu um decréscimo de cerca de 50% na sobrevivência celular enquanto que a 10^{-6} M este decréscimo foi de cerca de 80%. Mais uma vez se verifica que, apesar da clorina **36c** produzir efeito fotodinâmico na linha celular tumoral, este composto não é selectivo para as HeLa, mostrando um efeito muito semelhante para a linha saudável, HaCaT.

Quando o derivado da galactose, a clorina **36d**, foi desta vez, testado nas duas linhas celulares os resultados obtidos traduzem diferenças marcantes na sua actividade fotodinâmica quando comparados com os compostos anteriores. Através da análise dos resultados podemos verificar que nas duas concentrações testadas existem diferenças significativas na fotoinactivação das células HeLa e HaCaT. Para a concentração mais baixa, este fotossensibilizador não produz qualquer efeito na sobrevivência celular da linha celular saudável HaCaT. No entanto, para esta concentração e depois de 20 minutos de irradiação observa-se que a sobrevivência celular das células HeLa é afectada em cerca de 21%, mostrando uma maior selectividade deste fotossensibilizador para a linha tumoral. Esta selectividade é também observada aquando da utilização da concentração mais elevada. Neste caso, e após 20 minutos de irradiação é possível observar um decréscimo de cerca de 70% na sobrevivência celular das HeLa, enquanto o decréscimo na sobrevivência celular das HaCaT nestas condições é de cerca de 27%.

Estes resultados mostram que as clorinas **36a** e **36c** não são selectivas para a linha celular tumoral, provocando efeitos semelhantes tanto nas células saudáveis como das tumorais. Já no caso da clorina **36d**, esta selectividade é denunciada através dos efeitos fotodinâmicos causados nas células HeLa e por um menor efeito nas células HaCaT. De acordo com requisitos solicitados para um bom fotossensibilizador, podemos considerar que os derivados **36a** e **36c** não são bons fotossensibilizadores para PDT. No entanto, o derivado **36d** apresenta-se como um bom candidato a

fotossensibilizador para esta terapia. Devido a este facto, os estudos de avaliação biológicas continuaram apenas com este composto.

Estas diferenças nos resultados obtidos na fotoinactivação das células HeLa e HaCaT produzidos pelos compostos testados podem ser justificadas pelo tipo de grupo de hidrato de carbono que estes compostos comportam. A construção destes derivados glicosilados assenta no pressuposto de que os grupos glicosídicos são reconhecidos por receptores membranares das células, receptores esses que se deverão expressar em maior quantidade nas células tumorais. No entanto, os derivados **36a** e **36c** são constituídos por unidades de glucose e frutose. Estes açúcares são fundamentais para a sobrevivência da célula participando, inclusive, na glicólise que é a principal rota de formação de energia a nível celular. Por este motivo, não é de estranhar que estes derivados sejam reconhecidos igualmente pelos dois tipos de células. A galactose não participa, activamente, em nenhum ciclo metabólico vital para a célula, estando, por norma presente na forma de oligossacarídicos em algumas plantas. Na realidade, esta unidade de hidrato de carbono tem vindo a ser preferida aquando da síntese de novos derivados porfirínicos glicosilados para PDT, uma vez que foi mostrado que algumas células tumorais possuem receptores de açúcares que expressam maior afinidade para resíduos de galactose.^{44,61,62}

Os estudos realizados até aqui mostraram que o derivado **36d** é o mais promissor para PDT, possuindo alguns dos requisitos mais importantes para um bom fotossensibilizador. No entanto, para provar a sua eficiência este fotossensibilizador não deverá produzir efeito fotodinâmico na ausência de luz. Uma vez que a acção de um fotossensibilizador na presença de luz está relacionado com a produção de oxigénio singuleto, este dado é muito importante. Este teste visa fornecer informações úteis sobre os mecanismos que provocam a diminuição da viabilidade celular das linhas estudadas. Assim, foi realizado o ensaio de viabilidade celular para o derivado **36d** nas mesmas condições atrás descritas, no entanto o período de incubação foi prolongado por 20 minutos no escuro. Os resultados obtidos são apresentados na tabela 2.6.

Tabela 2.6. Sobrevivência celular das duas linhas celulares, HeLa e HaCaT, incubadas no escuro com o derivado **36d** durante um período de 4 horas e 20 minutos a duas concentrações diferentes.

Clorina	Concentração (M)	Sobrevivência celular (% \pm SD)	
		HaCaT	HeLa
36d	$1,0 \times 10^{-7}$	179,66* \pm 29,73	101,63 \pm 4,19
	$1,0 \times 10^{-6}$	180,89* \pm 23,38	108,05* \pm 6,42

*Estes valores indicam a ausência de morte celular.

Este teste de viabilidade celular das células HeLa e HaCaT após um período de incubação no escuro mostram que, independentemente da concentração usada, não ocorre diminuição na viabilidade celular nas duas linhas testadas. Este dado mostra que o fotossensibilizador **36d** não é tóxico na ausência de luz e confirma, assim, o mecanismo de acção através da formação de oxigénio singuleto.

2.5.2.2. Alterações morfológicas causadas pelo tratamento fotodinâmico com o fotossensibilizador **36d**

A avaliação dos efeitos morfológicos causados nas células após o tratamento fotodinâmico foi realizada usando o fotossensibilizador **36d** que se mostrou mais eficaz e mais selectivo para a linha tumoral, HeLa. Este ensaio foi conduzido nas condições subletais (LD_{50}) para esta linha celular, ou seja usando a concentração de 10^{-7} M deste fotossensibilizador. A avaliação das alterações morfológicas foi realizada para as duas linhas celulares em teste, HeLa e HaCaT. Estes ensaios foram executados em placas de 6 poços contendo lamelas esterilizadas, possibilitando a observação em microscópio. Assim, e depois do cultivo celular, inoculação com o fotossensibilizador e tratamento fotodinâmico (de 5 e 20 minutos) realizados de acordo com o procedimento experimental atrás descrito, as células foram fixadas com metanol a -20°C . Depois de secas, as células foram coradas com uma solução de azul de toluidina (10%) em água, seguindo-se a lavagem exaustiva destas células com água destilada de forma a

remover o excesso do corante. Depois de conveniente preparadas, as montagens foram visualizadas a microscópio em campo claro.

Para as duas linhas celulares foi realizado um controlo em que as células não foram submetidas ao tratamento fotodinâmico. Este ensaio foi realizado duas vezes, tendo sido seleccionadas as melhores fotos dos dois ensaios. Os resultados obtidos são apresentados na figura 2.23.

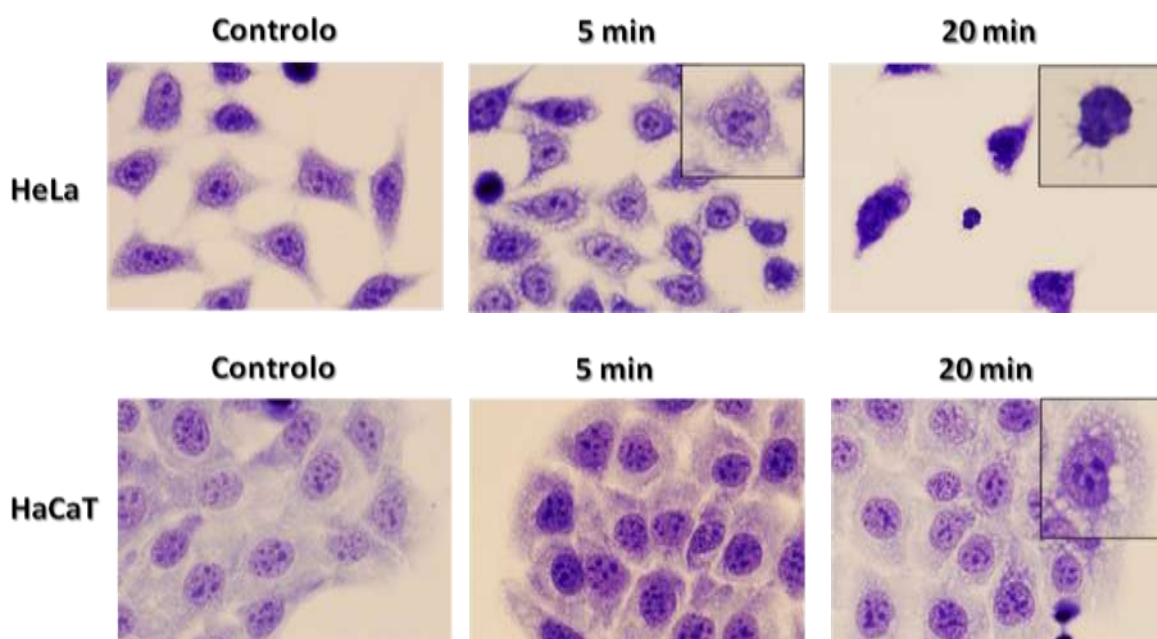


Figura 2.23. Fotografias de células HeLa e HaCaT fixadas com MeOH e coradas com azul de toluidina, após tratamento fotodinâmico com o derivado **36d**.

Depois do tratamento fotodinâmico das células HeLa com o fotossensibilizador **36d** em condições sub-letais, observa-se que após 5 minutos de irradiação as células sofreram forte vacuolização citoplasmática, indicativo de processos de degeneração da células. Após 20 minutos de irradiação, verifica-se que a morfologia das células HeLa foi bastante afectada, observando-se a presença de células fortemente retraídas. A este tempo de tratamento fotodinâmico é possível, também, observar uma diminuição do número de células presente na preparação (quando comparado com o controlo e com o resultado de 5 minutos de tratamento) o que se deve à morte celular associada a este tempo de irradiação e subsequentemente à presença de menor número de células viáveis.

No que diz respeito aos efeitos morfológicos causados pelo tratamento fotodinâmico nas células HaCaT quando foi usado o fotossensibilizador **36d** em condições sub-letais, é possível verificar que as alterações são escassas, observando-se, apenas, vacuolização citoplasmática destas células apenas ao fim de 20 minutos de tratamento. Morfológicamente, as células HaCaT tendem a formar microcolónias com um sistema de adesão muito desenvolvido. É importante referir que as alterações observadas são mais evidentes no bordo da colónia, uma vez que as células aí estão mais expostas ao fotossensibilizador. Não se observam alterações morfológicas no centro da colónia.

2.5.2.3. Localização celular do fotossensibilizador 36d

A eficiência de um fotossensibilizador, tanto em culturas celulares como em tumores, está directamente relacionada com a sua estrutura química, a sua concentração, o tempo de incubação, dose de luz e a sua localização celular. Diversos componentes celulares têm vindo a ser descritos como alvos das espécies de oxigénio citotóxicas formadas no processo fotodinâmico, como é o caso das mitocôndrias, dos lisossomas, complexo de Golgi e membrana citoplasmática. Os fotossensibilizadores que se localizam nas mitocôndrias e nos lisossomas são altamente eficientes na fotodestruição da célula, provocando necrose e apoptose.^{68,63}

Tendo em conta a importância deste facto, decidiu-se realizar estudos de localização celular durante o período de incubação das células com o fotossensibilizador mais eficaz e selectivo, o derivado **36d**. Também neste caso, as condições sub-letais do derivado **36d** foram usadas para a determinação da sua localização celular nas linhas celulares HeLa e HaCaT. Estes ensaios foram realizados em placas de 6 poços com lamelas esterilizadas, possibilitando a observação em microscópio. Assim, e depois do cultivo celular realizado de acordo com o procedimento atrás descrito, as células foram incubadas com o fotossensibilizador **36d** a 10^{-7} M durante 2, 4, 6 e 24 horas. A cada tempo de incubação, as células foram lavadas com uma solução de PBS (10%) de forma a remover o fotossensibilizador não

incorporado. Depois de convenientemente preparadas, as montagens foram visualizadas em microscópio de fluorescência usando luz azul.

Também neste caso, para as duas linhas celulares foi realizado um controlo em que as células não foram incubadas com o fotossensibilizador. Este ensaio foi realizado duas vezes, tendo sido seleccionadas as melhores fotos dos dois ensaios. Os resultados obtidos são apresentados na figura 2.24.

Assim, na linha celular tumoral (HeLa) e em condições sub-letais, o fotossensibilizador **36d** localiza-se na membrana celular após 2 horas de incubação. No entanto, à medida que o tempo de incubação vai aumentando observa-se uma redistribuição do fotossensibilizador pela membrana celular e pelos lisossomas, sendo que, após 24 horas de incubação, esta localização é exclusivamente lisossomal.

No caso das células HaCaT, observa-se um efeito semelhante ao observado para as células HeLa. A localização do fotossensibilizador em condições sub-letais ocorre na membrana celular após 2 horas de incubação, e redistribui-se na membrana celular e nos lisossomas a maiores tempos de incubação. Após 24 horas de incubação esta localização é exclusivamente lisossomal. É de referir que esta localização ocorre nas células existentes no bordo da colónia formada por esta linha celular, não se encontrando a presença de fotossensibilizador no interior da colónia.

O facto do fotossensibilizador estar presente nas duas linhas celulares após 24 horas de incubação indica que este não é facilmente metabolizado pelas células, o que do ponto de vista da sua aplicação em PDT é uma desvantagem, pois é requerido que um bom fotossensibilizador seja eliminado rapidamente. No entanto, é de referir que estes resultados são meramente exploratórios e visam estudar o comportamento deste tipo de fotossensibilizadores durante os tempos de incubação nas duas linhas celulares testadas. Para além disso, este dado não é indicativo de que o fotossensibilizador seja activo após 24 horas de incubação em meio celular.

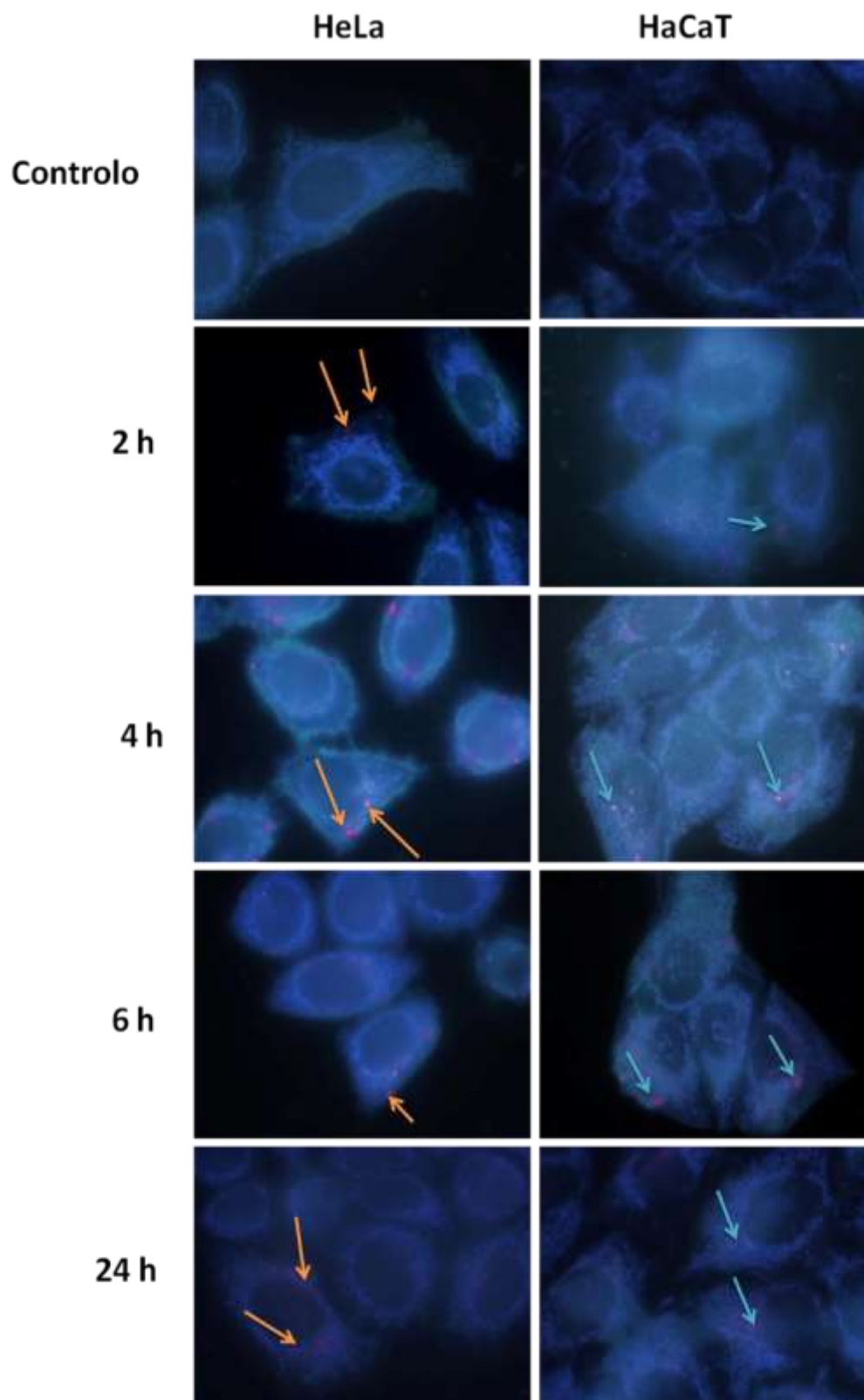


Figura 2.24. Fotografias de células HeLa e HaCaT durante o ensaio de localização celular com o derivado **36d** a diferentes tempos de incubação.

2.6. Conclusão

Neste capítulo desta dissertação foi reportado o primeiro estudo na funcionalização de porfirinas através da reacção de inserção do EDA em porfirinas contendo ligações OH e NH. Esta reacção permitiu obter com um rendimento de 51% o produto de inserção OH no complexo porfirínico **23**. Nas mesmas condições, o complexo porfirínico com o grupo NH₂ (complexo **24**) mostrou um comportamento diferente, produzindo o produto de di-inserção **26** e dois derivados de amida **27** e **28**. No estado sólido, o derivado de amida **27** forma um sistema supramolecular quiral em forma de espiral através de interacções intermoleculares. Este facto permite concluir que a reacção de inserção de diazo compostos α -carbonílicos pode ser considerada uma nova metodologia para a síntese de novos sistemas supramoleculares.

A versatilidade da química dos diazo compostos permitiu, também, a síntese de novos derivados glicoporfirínicos através da reacção de inserção de α -diazacetatos glicosídicos na ligação OH do complexo **23**, originando as glicoporfirinas **30a-d** com bons rendimentos. Com base em estudos anteriores, foi ainda possível sintetizar as novas glicoclorinas **33a-d** com boas selectividades através da reacção de ciclopropanação do complexo **16** na presença de α -diazacetatos glicosídicos. As bases livres das glicoporfirinas **30a-d** e das glicoclorinas **33a-d**, os derivados **31a-d** e **36a-d**, respectivamente, mostraram ser boas geradoras de oxigénio singuleto e por isso foram realizados estudos de avaliação da actividade fotodinâmica em células humanas tumorais HeLa e em células humanas saudáveis HaCaT. Estudos de viabilidade celular após tratamento fotodinâmico mostraram que as glicoclorinas são mais eficazes na fotoinactivação das células tumorais. No entanto, os seus derivados da glucose e frutose, **36a** e **36c**, não mostraram selectividade para as células tumorais, inactivando igualmente as células HeLa e as HaCaT. Pelo contrário, o derivado da galactose, **36d** mostrou ser bastante selectivo para a linha celular tumoral, inibindo o crescimento desta e não causando efeito significativo na linha celular saudável. Foi também mostrado que este fotossensibilizador não é tóxico na ausência de luz. Depois do tratamento fotodinâmico e em condições sub-letais com o fotossensibilizador mais eficiente e selectivo, o derivado **36d**, foi possível observar que as células HeLa sofrem

Compostos α -diazocarbonílicos na síntese de novos compostos porfirínicos.
Avaliação biológica de alguns derivados glico-conjugados.

vacuolização citoplasmática e retração pronunciada, enquanto que nas células HaCaT os danos observados são escassos, mostrando apenas vacuolização citoplasmática parcial no limite das colónias. Nos estudos de localização celular e nas mesmas condições sub-letais, o fotossensibilizador **36d** localiza-se na membrana citoplasmática e nos lisossomas tanto nas células HeLa como nas HaCaT. No caso da linha celular não tumoral o fotossensibilizador está sempre presente no limite da colónia, não sendo observado no interior desta.

É ainda importante de referir que parte do trabalho desenvolvido neste capítulo originou duas publicações em revistas científicas.^{64,65}

2.7. Parte experimental

2.7.1. Reagentes, solventes e equipamento

Os reagentes comerciais utilizados neste trabalho não sofreram qualquer purificação prévia à sua utilização.

Os solventes utilizados nas diferentes etapas de síntese e cristalização eram analiticamente puros ou, quando necessário, eram previamente secos. Os solventes utilizados para a purificação das misturas reaccionais foram destilados e passados por uma coluna de alumina neutra activada.

O diclorometano usado como solvente nas reacções foi previamente seco em hidreto de sódio a refluxo. Após 60 minutos em refluxo, o diclorometano foi recolhido, tendo-se desprezado os primeiros 20 mL.

As reacções foram seguidas por TLC, utilizando folhas plásticas revestidas por sílica gel 60 F₂₅₀. Depois da eluição, as placas foram observadas à luz ultravioleta a 254 e/ou a 366 nm. No caso da síntese dos derivados glicoporfirínicos foi necessário recorrer à revelação com vanilina e posterior aquecimento de forma a poder visualizar os diazo compostos glicosilados que não reagiram

Os espectros de visível foram registados num espectrofotómetro UV-2501PC Shimadzu em células de vidro de percurso óptico de 1 cm.

Os espectros de RMN de ¹H, ¹⁹F e ¹³C foram registados num aparelho Bruker Avance 300 a 300,13, 282,38 e 75,47 MHz, respectivamente ou num aparelho Avance 500 a 500,13 e 125,77 MHz para ¹H e ¹³C, respectivamente. O solvente utilizado para a aquisição dos espectros foi clorofórmio deuterado e TMS como referência. Os assinalamentos inequívocos das ressonâncias dos prótons e carbonos foram efectuados com recurso às técnicas bidimensionais de HSQC e HMBC e em alguns casos também à técnica de COSY e NOESY.

As purificações das misturas reaccionais foram realizadas por coluna com sílica gel 60 de 0,063-0,200 nm, da Merck, ou por cromatografia de camada fina preparativa. As placas de cromatografia utilizadas eram de vidro (20x20 cm), previamente

revestidas com uma camada de sílica gel 60 Merck, com uma espessura de 0,75 mm e posteriormente activadas na estufa a 100°C durante 10 h.

Os espectros de massa de electrospray em modo positivo de alta resolução foram efectuados na Universidade de Vigo, num espectrómetro VG Autospec M usando CHCl_3 como solvente e álcool 3-nitrobenzílico (NBA) como matriz. Os espectros de massa em MALDI foram adquiridos num espectrómetro de MALDI-TOF/TOF4800 Applied Biosystems usando clorofórmio como solvente e não tendo sido usada qualquer matriz.

2.7.2. Síntese das porfirinas de partida

A síntese das porfirinas usadas como material de partida nas reacções realizadas durante este capítulo foi realizada de acordo com procedimentos experimentais bem conhecidos e reportados na literatura. No entanto, para que a parte experimental deste documento fique completa, permitindo a reprodutibilidade da mesma, a síntese destes derivados porfirínicos será descrita pormenorizadamente.

- **Síntese da 5-(4-hidroxifenil)-10,15,20-trifenilporfirinatozinco(II) (23)**

O complexo porfirínico **23** foi sintetizada de acordo com método descrito na literatura, por condensação de pirrol com hidroxibenzaldeído e benzaldeído numa mistura de ácido acético e nitrobenzeno.⁴¹ O processo de purificação tornou-se bastante moroso uma vez que se obtiveram outras porfirinas resultantes das combinações possíveis da mistura de aldeídos utilizada. Assim, a mistura reaccional foi fraccionada por cromatografia em coluna de sílica gel usando como eluente diclorometano para remover a *meso*-tetrafenilporfirina (**TPP**) que se forma no decorrer desta síntese. A fracção correspondente à 5-(4-hidroxifenil)-10,15,20-trifenilporfirina (**TPP-OH**) foi recolhida com diclorometano/metanol (2%) e, posteriormente, purificada por cromatografia em coluna de sílica gel. Para a preparação do complexo de zinco desta porfirina colocaram-se 500 mg desta num balão de 250 mL e dissolveram-se em 190 mL de clorofórmio. O acetato de zinco (250 mg, $1,14 \times 10^{-4}$ mol) foi dissolvido em metanol (50 mL) e adicionado à solução de porfirina. A mistura foi mantida em agitação a 60°C durante cerca de 30 minutos.

Findo este tempo, a mistura reaccional foi evaporada até à secura. O resíduo foi retomado em clorofórmio e lavado com água destilada de modo a remover o excesso de acetato de zinco. Em seguida a fase orgânica foi seca através de sulfato de sódio anidro e evaporada à secura. Após remoção do solvente a pressão reduzida, o resíduo foi deixado a cristalizar em clorofórmio/metanol, obtendo-se o complexo de zinco porfirínico **23** quantitativamente.

- **Síntese da 5-(4-aminofenil)-10,15,20-trifenilporfirinatozinco(II) (24)**

A uma solução de *meso*-tetrafenilporfirina (100 mg, 0,163 nmol) em TFA (10 mL) foi adicionado nitrito de sódio (20 mg, 0,29 mmol). Depois de 3 minutos em agitação à temperatura ambiente, a mistura reaccional foi adicionada a 100 mL de água destilada e extraída com diclorometano. A fase orgânica foi lavada com uma solução saturada de NaHCO₃ e água, extraída com diclorometano e seca em sulfato de sódio anidro. Depois de removido o solvente sob pressão reduzida, o resíduo foi purificado em sílica gel usando como eluente diclorometano/éter de petróleo (2:1). A primeira fracção recolhida foi identificada como sendo a *meso*-tetrafenilporfirina (**TPP**) que não reagiu, a segunda como sendo a porfirina mono-nitrada numa posição *para* de um grupo fenilo e a terceira fracção como sendo constituída pelos produtos resultantes da polinitração.

O resíduo do derivado nitrado foi dissolvido em HCl concentrado (10 mL) e colocado em agitação. A esta solução foi adicionado, lentamente, cloreto de estanho(II) (220 mg, 0,095 mmol). A mistura final foi aquecida a 65°C durante 1 hora sob atmosfera de azoto. Findo este tempo a mistura reaccional foi adicionada a 100 mL de água destilada fria. Seguiu-se a neutralização daquela mistura reaccional até pH=8 com amónia. A solução resultante foi extraída com diclorometano e a fase orgânica seca em sulfato de sódio anidro. Depois de removido o solvente a pressão reduzida, o resíduo foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel usando diclorometano como eluente. A porfirina 5-(4-aminofenil)-10,15,20-trifenilporfirina (**TPP-NH₂**) pretendida foi obtida, após cristalização em diclorometano / éter de petróleo, com um

rendimento de 78%. O complexo de zinco desta porfirina foi preparado de forma idêntica à descrita para o complexo **23**, obtendo o complexo **24** quantitativamente.

- **Síntese da 2-amino-5,10,15,20-tetrafenilporfirinato níquel(II) (Ni- β -NH₂-TPP)**

A uma solução de *meso*-tetrafenilporfirina (500 mg, 814 μ mol) em clorofórmio (500 mL) foi adicionado nitrato de cobre tri-hidratado (500 mg, 2,1 mmol, 2,6 equivalentes) dissolvido numa mistura de anidrido acético (50 mL) e ácido acético (10 mL). A mistura foi aquecida a 30°C e mantida em agitação até à conversão quase completa da porfirina inicial (cerca de 32 horas).⁶⁶ Os solventes foram evaporados até à *secura* e o resíduo obtido foi dissolvido em diclorometano, lavado com água destilada e a fase orgânica foi extraída com clorofórmio, lavada com água destilada e seca em sulfato de sódio anidro. Depois de removido o solvente a pressão reduzida o resíduo foi sujeito a cromatografia em coluna de sílica gel usando uma mistura éter de petróleo e tolueno (1:2) como eluente, tendo sido obtido 2-nitro-5,10,15,20-tetrafenilporfirinato de cobre(II). Este derivado nitrado, após ter sido cristalizado em diclorometano/éter de petróleo, foi obtido com um rendimento de 89% (520 mg). A estrutura do composto foi confirmada por comparação dos respectivos dados analíticos (TLC, UV-vis e MS) com os de uma amostra autêntica.

A remoção do ião cobre deste derivado nitrado ocorreu por dissolução de 375 mg (0,521 mmol) deste composto em diclorometano (102 mL) e ácido sulfúrico concentrado (10,2 mL) sob agitação intensa à temperatura ambiente. A reacção de descomplexação foi seguida por espectrofotometria de UV-vis e por TLC tendo-se dado por terminada ao fim de 10 minutos de reacção. A mistura reaccional foi neutralizada com uma solução saturada de hidrogenocarbonato de sódio, lavada com água destilada e extraída com diclorometano. Após a remoção do solvente a pressão reduzida, o resíduo obtido foi retomado em diclorometano e purificado através de uma coluna de sílica gel. A 2-nitro-5,10,15,20-tetrafenilporfirina pura foi cristalizada em diclorometano/éter de petróleo, e obtida com um rendimento de 65% (223 mg). A

estrutura do composto foi confirmada por comparação dos respectivos dados analíticos com os de uma amostra autêntica.

A complexação deste derivado com o íon níquel ocorreu por dissolução de 180 mg (0,273 mmol) dessa porfirina numa mistura de clorofórmio e metanol (100:40) e adicionou-se acetato de níquel tetra-hidratado em grande excesso (2g, 8,04 mmol; 29,5 equivalentes). A mistura reaccional foi mantida sob agitação e em refluxo durante 24 horas. Tendo-se verificado o consumo da porfirina de partida, os solventes foram evaporados a pressão reduzida. A mistura reaccional foi neutralizada com uma solução aquosa saturada de hidrogenocarbonato de sódio, lavada com água destilada e a fase orgânica extraída com diclorometano. O resíduo obtido após remoção do solvente a pressão reduzida foi dissolvido numa mistura de éter de petróleo e diclorometano (6:4) e foi cromatografado numa coluna de sílica gel. A 2-nitro-5,10,15,20-tetrafenilporfirinatoniquel(II) foi obtida, após cristalização em diclorometano/éter de petróleo, com um rendimento de 69% (134,8 mg).

A redução do grupo nitro ocorreu por dissolução de 60 mg (0,084 mmol) de 2-nitro-5,10,15,20-tetrafenilporfirinato Ni(II) em clorofórmio (7 mL) e com a adição de estanho em pó (1g, 8,43 mmol, 100,4 equivalentes) e ácido clorídrico concentrado (3,55 mL). A reacção foi mantida sob agitação vigorosa, à temperatura ambiente, durante aproximadamente 2 horas.⁶⁶ Findo este tempo, o meio reaccional foi neutralizado com uma solução saturada de hidrogenocarbonato de sódio, extraído com diclorometano e a fase orgânica foi seca através de sulfato de sódio anidro. Depois de se ter procedido à evaporação do solvente, o resíduo obtido foi redissolvido em diclorometano e foi purificado por uma coluna de sílica gel, usando uma mistura de éter de petróleo e diclorometano (1:1) como eluente. A 2-amino-5,10,15,20-tetrafenilporfirinatoniquel(II) (Ni- β -NH₂-TPP), após cristalização em diclorometano/éter de petróleo, foi isolada com um rendimento de 71% (41,0 mg).

- **Síntese da 5,10,15,20-tetraquis(pentafluorofenilo)porfirinatozinco(II) (16)**

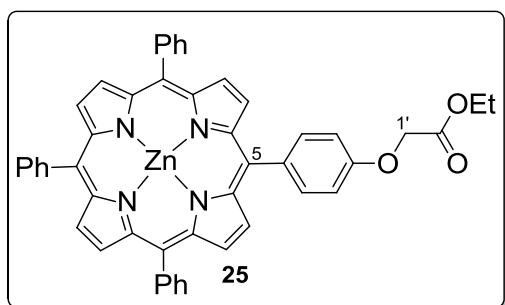
O complexo porfirínico **16** foi sintetizada de acordo com método descrito na literatura, por condensação de pirrol com o pentafluorobenzaldeído numa mistura de ácido acético e nitrobenzeno. A purificação do produto foi realizada por cromatografia

em coluna de sílica usando como eluente uma mistura de hexano/clorofórmio (10%), obtendo-se a 5,10,15,20-tetraquis(pentafluoro)fenilporfirina (**TPP-PF**). O complexo de zinco desta porfirina foi preparado de forma idêntica à descrita para a porfirina **23** obtendo-se o complexo **16** quantitativamente.

2.7.3. Reacção da 5-(4-hidroxifenil)-10,15,20-trifenilporfirinatozinc(II) **23** com EDA

Num balão de duas tubuladuras foi dissolvida o complexo porfirínico **23** (50 mg, 72,0 μ mol) e $\text{Rh}_2(\text{OAc})_4$ (0,1 equiv., 3,2 mg, 7,2 μ mol) em diclorometano seco (6 mL). Esta solução foi aquecida a 40°C sob atmosfera de azoto. A esta mistura foi adicionada gota-a-gota utilizando um adicionador automático, uma solução de EDA (0,72 mmol, 75,7 μ L) em diclorometano seco (5 mL) durante 10 horas. Esta mistura reaccional foi depois mantida em agitação e aquecimento à mesma temperatura durante 8 horas. O solvente foi evaporado a pressão reduzida e o resíduo foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel usando diclorometano como eluente. A primeira fracção foi identificada como sendo o composto **25** (51% de rendimento) e a segunda fracção identificada como sendo o complexo porfirínico de partida **23** (20% de recuperação).

5-[4-(etoxicarbonilmetiloxi)fenil]- 10,15,20-trifenilporfirinatozinc(II) (**25**):



η = 51%. **RMN de ^1H** (300 MHz, CDCl_3): δ 9,001 e 8,998 (AB, J = 4,6 Hz, 4H, H-2,3 e H-7,8), 8,990 (b, 4H, H-12,13 e H-17,18), 8,29–8,25 (m, 6H, H-*o*-Ph-10,15,20), 8,18 (d, J = 8,6 Hz, 2H, H-*o*-Ph-5), 7,83–7,76 (m, 9H, H-*m,p*-Ph-10,15,20), 7,34 (d, J = 8,6 Hz, 2H, H-*m*-Ph-5), 4,97 (s, 2H, CH_2 -1'), 4,46 (quart, J = 7,1 Hz, 2H, OCH_2CH_3), 1,46 (t, J = 7,1 Hz, 3H, OCH_2CH_3). **RMN de ^{13}C** (75 MHz, CDCl_3): δ 169,5 (C=O), 158,0 (C-*p*-Ph-5), 150,7, 150,6, 143,2, 136,6, 135,8 (C-*o*-Ph-5), 134,8 (C-*o*-Ph-10,15,20), 132,4 (β -C), 127,9 e 126,9 (C-*m,p*-Ph-10,15,20), 121,5, 113,2 (C-*m*-Ph-5), 66,2 (CH_2 -1'), 62,0 (OCH_2CH_3), 14,7

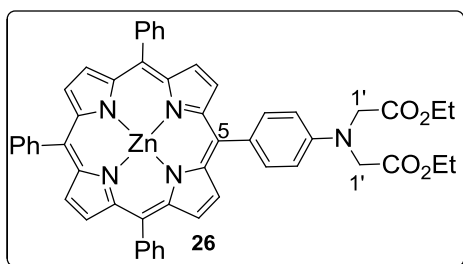
Compostos α -diazocarbonílicos na síntese de novos compostos porfirínicos.
Avaliação biológica de alguns derivados glico-conjugados.

(OCH₂CH₃). **UV-vis (CHCl₃):** λ_{max} (log ϵ) 418 (5,71), 510 (3,63), 546 (4,57), 584 (3,82) nm.
HRMS-ESI: m/z 778,1917. Calcd. para C₄₈H₃₄N₄O₃Zn (M⁺) 778,1922.

2.7.4. Reacção da 5-(4-aminofenil)-10,15,20-trifenilporfirinatozínco(II) (**24**) com EDA

Num balão de duas tubuladuras foi dissolvida o complexo porfirínico **24** (50 mg, 72,0 μmol) e Rh₂(OAc)₄ (0,1 equiv., 3,2 mg, 7,2 μmol) em diclorometano seco (6 mL). Esta solução foi aquecida a 40°C sob atmosfera de azoto. A esta mistura foi adicionada gota-a-gota utilizando um adicionador automático uma solução de EDA (0,72 mmol, 75,7 μL) em diclorometano seco (5 mL) durante 10 horas. Esta mistura reaccional foi depois mantida em agitação e aquecimento à mesma temperatura durante 8 horas. O solvente foi evaporado a pressão reduzida e o resíduo foi fraccionado por cromatografia em coluna de sílica gel usando diclorometano como eluente. Desta coluna foi possível isolar 3 fracções: a primeira constituída por o composto **26**, a segunda pelo o complexo porfirínico **24** que não reagiu (8% de recuperação) e a terceira pela mistura dos compostos **27** e **28**. A primeira e a terceira fracção foram purificadas por TLC preparativa usando uma mistura de hexano e acetato de etilo (4:1) como eluente.

5-{4-[bis(etoxicarbonilmetil)amino]fenil}- 10,15,20-trifenilporfirinatozínco(II) (**26**):

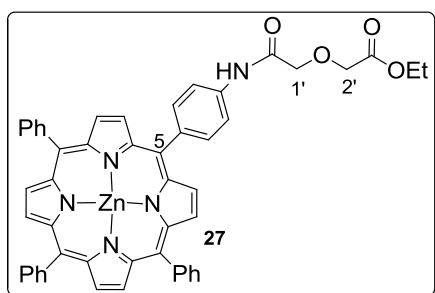


η = 14,3%. **RMN de ¹H** (300 MHz, CDCl₃): δ 9,06 and 8,97 (AB, J = 4,7 Hz, 4H, H-2,3 e H-7,8), 8,93 (br s, 4H, H-12,13 e H-17,18), 8,23–8,21 (m, 6H, H-*o*-Ph-10,15,20), 8,07 (d, J = 8,6 Hz, 2H, H-*o*-Ph-5), 7,77–7,71 (m, 9H, H-*m,p*-Ph-10,15, 20), 6,97 (d, J = 8,6 Hz, 2H, H-*m*-Ph-5), 4,38 (s, 4H, CH₂-1'), 4,33 (quart, J = 7,1 Hz, 4H, OCH₂CH₃), 1,37 (t, J = 7,1 Hz, 6H, OCH₂CH₃). **RMN de ¹³C** (75 MHz, CDCl₃): δ 171,1 (C=O), 150,7, 150,1, 150,0, 147,3 (C-*p*-Ph-5), 142,9, 135,4 (C-*o*-Ph-5), 134,4 (C-*o*-Ph-10,15,20), 132,7, 132,2 e 131,88 e 131,86 e 131,7 (β -C), 127,4 e 126,5 (C-*m,p*-Ph-10,15,20), 121,5, 120,9,

Compostos α -diazocarbonílicos na síntese de novos compostos porfirínicos.
Avaliação biológica de alguns derivados glico-conjugados.

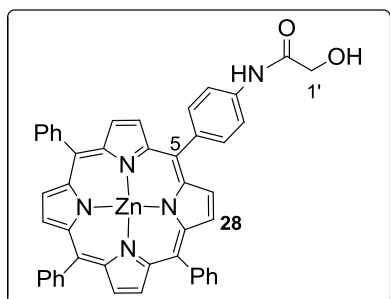
120,7, 110,7 (C-*m*-Ph-5), 61,3 (CH₂-1'), 53,7 (OCH₂CH₃), 14,3 (OCH₂CH₃). **UV-vis (CHCl₃):**
 λ_{\max} (log ϵ) 420 (5,14), 505 (3,39), 548 (3,86), 587 (3,35) nm. **HRMS-ESI:** m/z 863,2445.
Calcd. para C₅₂H₄₁N₅O₄Zn (M⁺) 863,2450.

**5-[4-(2-etoxicarbonilmetiloxi-acetamido)-fenil]-10,15,20-trifenilporfirinatozinco(II)
(27):**



η = 16,2%. **RMN de ¹H** (300 MHz, CDCl₃): δ 9,13 (s, 1H, NH), 9,95–8,93 (m, 8H, β -H), 8,24–8,21 (m, 6H, H-*o*-Ph-10,15,20), 8,13 (d, J = 8,4 Hz, 2H, H-*o*-Ph-5), 7,77–7,72 (m, 9H, H-*m,p*-Ph-10,15,20), 7,69 (d, J = 8,4 Hz, 2H, H-*m*-Ph-5), 4,30 (quart, J = 7,1 Hz, 2H, OCH₂CH₃), 4,16 (s, 2H, CH₂-2'), 3,79 (s, 2H, CH₂-1'), 1,34 (t, J = 7,1 Hz, 3H, OCH₂CH₃). **RMN de ¹³C** (75 MHz, CDCl₃): δ 170,3 (CO₂Et), 167,1 (CONH), 150,2, 150,1, 142,8, 138,9, 136,5, 134,8 (C-*o*-Ph-5), 134,4 (C-*o*-Ph-10,15,20), 132,0 (β -C), 131,9 (β -C), 127,4 e 126,5 (C-*m,p*-Ph-10,15,20), 121,1, 121,0, 120,4, 117,8, 117,7 (C-*m*-Ph-5), 71,7 (CH₂-1'), 69,3 (CH₂-2'), 61,6 (OCH₂), 14,2 (OCH₂CH₃). **UV-vis (CHCl₃):** λ_{\max} (log ϵ) 423 (5,59), 517 (3,47), 552 (4,26), 595 (3,72) nm. **HRMS-ESI:** m/z 835,2131. Calcd. para C₅₀H₃₇N₅O₄Zn (M⁺) 835,2137.

5-[4-(2-hidroxi-acetamido)fenil]-10,15,20-trifenilporfirinatozinco(II) (28):



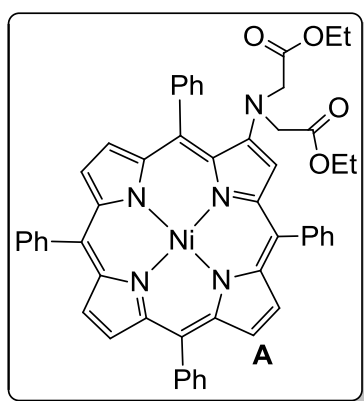
η = 12,4%. **RMN de ¹H** (300 MHz, CDCl₃/MeOD): δ 9,35 (s, 1H, NH), 8,89–8,87 (m, 8H, H-2,3,7,8,12,13,17,18), 8,24–8,19 (m, 6H, H-*o*-Ph-10,15,20), 7,97 (d, J = 7,9 Hz, 2H, H-*o*-Ph-5), 7,79–7,70 (m, 11H, H-*m,p*-Ph-5,10,15,20), 4,30 (s, 2H, CH₂-1'). **RMN de ¹³C** (126 MHz, CDCl₃): δ 167,7 (C=O), 150,3, 150,3, 150,2, 150,1, 142,8, 135,0, 134,4, 131,9, 131,9, 127,4, 127,4, 127,4, 126,5, 121,1, 121,1, 29,7 (CH₂-1'). **UV-vis (CHCl₃):** λ_{\max} (log ϵ) 418 (5,71), 510 (3,46),

Compostos α -diazocarbonílicos na síntese de novos compostos porfirínicos.
Avaliação biológica de alguns derivados glico-conjugados.

546 (3,82), 584 (3,35) nm. **HRMS-ESI:** m/z 749,1764. Calcd. para $C_{46}H_{31}N_5O_2Zn$ (M^+) 749,1769.

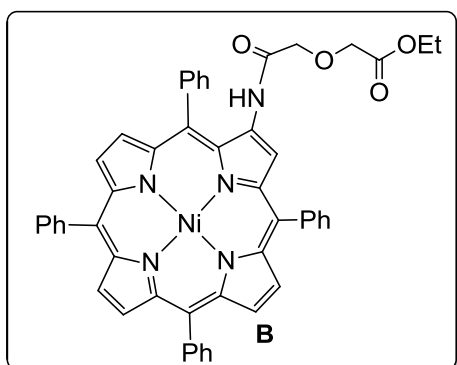
2.7.5. Reacção da 5-(4-aminofenil)-10,15,20-trifenilporpirinatozínco(II) (Ni- β -NH₂-TPP) com EDA

Num balão de duas tubuladuras foram dissolvidos o Ni- β -NH₂-TPP (20 mg, 30,0 μ mol) e Rh₂(OAc)₄ (0,1 equiv., 1,3 mg, 3,0 μ mol) em diclorometano seco (5 mL). Esta solução foi aquecida a 40°C sob atmosfera de azoto. A esta mistura foi adicionada gota-a-gota utilizando um adicionador automático uma solução de EDA (0,30 mmol, 32,5 μ L) em diclorometano seco (5 mL) durante 10 horas. Esta mistura reaccional foi depois mantida em agitação e com aquecimento à mesma temperatura durante 8 horas. O solvente foi evaporado a pressão reduzida e o resíduo foi fraccionado por cromatografia em coluna de sílica gel usando diclorometano como eluente. Desta coluna foi possível isolar 3 fracções: a primeira constituída pelo composto **A**, a segunda pela Ni- β -NH₂-TPP que não reagiu e a terceira pela mistura dos compostos **B** e **C**. A primeira e a terceira fracção foram purificadas por TLC preparativa usando uma mistura de hexano e acetato de etilo (4:1) como eluente.

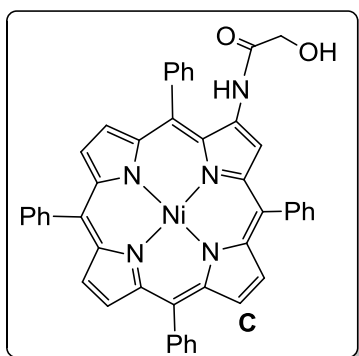


Composto A: **MS-MALDI:** m/z 857,16 Calcd. para $C_{52}H_{41}N_5NiO_4$ (M^+) 857,27.

Compostos α -diazocarbonílicos na síntese de novos compostos porfirínicos.
Avaliação biológica de alguns derivados glico-conjugados.



Composto B: MS-MALDI: m/z 829,29 Calcd. para $C_{50}H_{37}N_5NiO_4$ (M^+) 829,22.

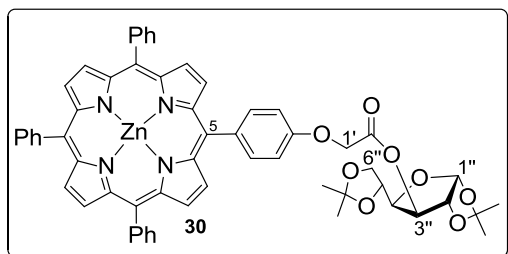


Composto C: MS-MALDI: m/z 743,22 Calcd. para $C_{46}H_{31}N_5NiO_4$ (M^+) 743,18.

2.7.6. Síntese de glicoporfirinas através da reação de inserção de α -diazocetatos glicosídicos. Procedimento geral:

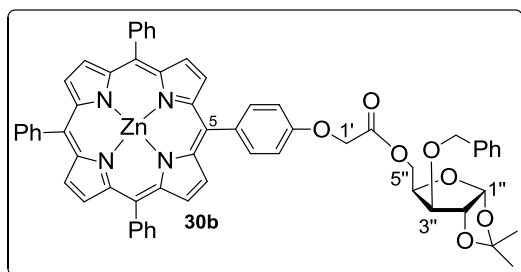
Num balão de duas tubuladuras foi dissolvida o complexo porfirínico **23** (50 mg, 72,0 μ mol) e $Rh_2(OAc)_4$ (0,1 equiv., 3,2 mg, 7,2 μ mol) em diclorometano seco (6 mL). Esta solução foi aquecida a 40°C sob atmosfera de azoto. A esta mistura foi adicionada gota-a-gota cada uma das soluções de α -diazocetatos glicosídicos **29a-d** (10 equiv.) em diclorometano seco (5 mL) utilizando um adicionador automático durante 10 horas. Estas misturas reacionais foram depois mantidas em agitação e aquecimento à mesma temperatura durante 8 horas. O solvente foi evaporado a pressão reduzida e os resíduos foram purificados por cromatografia em coluna de sílica gel usando

diclorometano como eluente. As frações obtidas foram purificadas por TLC preparativo usando como eluente uma mistura de diclorometano e metanol (1%).



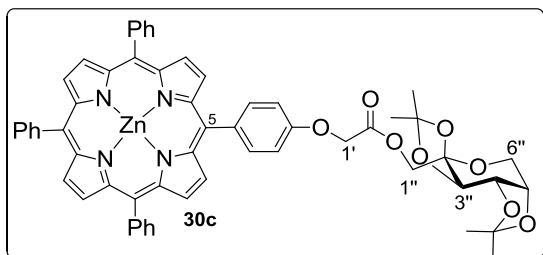
Glicoporfirina 30a: η = 34%. **RMN de ^1H** (300 MHz, CDCl_3) δ 8,99 – 8,83 (m, 8H, β -H), 8,29 – 8,15 (m, 6H, H-*o*-10,15,20), 8,13 (d, J = 8,4 Hz, 2H, H-*o*-5), 7,82 – 7,66 (m, 9H, H-*m,p*-10,15,20), 7,26 (d, J = 8,9 Hz, 2H, H-*m*-5),

5,93 (d, J = 3,7 Hz, 1H, H-1''), 5,51 (d, J = 2,0 Hz, 1H, H-3''), 4,92 (s, 2H, CH_2 -1'), 4,62 (d, J = 3,7 Hz, 1H, H-2''), 4,25 – 4,22 (m, 2H, H-6''), 4,06 – 4,00 (m, 1H, H-5''), 3,98 – 3,92 (m, 1H, H-4''), 1,36 – 1,31 (m, 6H, CH_3), 1,29 – 1,20 (m, 6H, CH_3). **RMN de ^{13}C** (75 MHz, CDCl_3) δ 167,8, 157,3, 150,3, 150,1, 142,7, 139,2, 136,5, 135,3, 134,4, 131,9, 131,8, 127,4, 126,5, 121,1, 120,30, 114,0, 112,7, 112,5, 109,4, 105,1, 83,2, 79,8, 72,4, 67,2, 65,4, 60,3, 33,8, 31,9, 29,7, 29,64, 29,60, 29,4, 29,35, 29,30, 29,1, 29,0, 14,1. **UV-vis (CHCl_3):** λ_{max} , nm (log ϵ): 418 (5,79), 509 (3,64), 546 (4,54), 584 (3,14). **HRMS-ESI:** m/z 992,2758. Calcd. para $\text{C}_{58}\text{H}_{48}\text{N}_4\text{O}_8\text{Zn} [\text{M}]^+$ 992,2764.

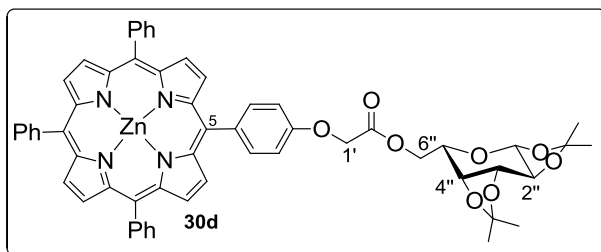


Glicoporfirina 30b: η = 32%. **RMN de ^1H** (300 MHz, CDCl_3) δ 8,98-8,92 (m, 8H, β -H), 8,25 – 8,20 (m, 6H, H-*o*-10,15,20), 8,13 (d, J = 8,6 Hz, 2H, H-*o*-5), 7,79 -7,71 (m, 9H, H-*m,p*-10,15,20), 7,38-7,33 (m, 5H, Ph), 7,26

(d, J = 8,7 Hz, 2H, H-*m*-5), 6,00 (d, J = 3,8 Hz, 1H, H-1''), 4,89 (s, 2H, CH_2 -1'), 4,73 (d, J = 11,9 Hz, 1H, CH_2 -Ph), 4,67 (d, J = 3,8 Hz, 1H, H-2''), 4,63 – 4,48 (m, 4H, CH_2 -Ph+ H-4''+H-5''), 4,04 (d, J = 2,8 Hz, 1H, H-3''), 1,50-1,49 (m, 6H, CH_3). **RMN de ^{13}C** (126 MHz, CDCl_3) δ 168,8, 157,4, 150,4, 150,1, 150,1, 142,8, 137,0, 136,3, 135,4, 134,4, 132,0, 131,9, 129,0, 128,9, 128,6, 128,2, 128,1, 127,8, 127,4, 126,5, 125,2, 125,0, 121,0, 121,0, 120,5, 112,8, 111,9, 105,3, 82,5, 82,0, 81,6, 77,9, 77,5, 71,9, 70,1, 65,5, 63,2, 53,4, 26,8, 26,8, 26,2, 14,2. **UV-vis (CHCl_3):** λ_{max} , nm (log ϵ): 423 (5,76), 513 (3,57), 553 (4,29), 594 (3,81). **HRMS-ESI:** m/z 1001,3758. Calcd. para $\text{C}_{60}\text{H}_{49}\text{N}_4\text{O}_7\text{Zn} [\text{M}+\text{H}]^+$ 1001,2887.



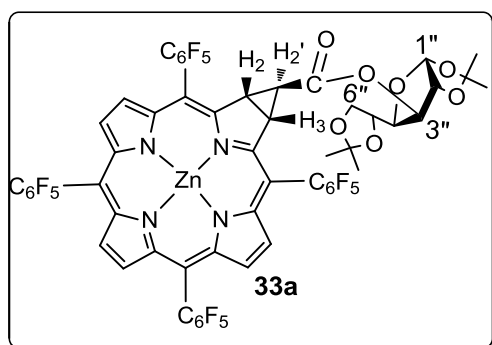
Glicoporfirina 30c: $\eta = 30\%$. **RMN de ^1H** (300 MHz, CDCl_3) δ 9,00-8,91 (m, 8H, β -H), 8,26 – 8,19 (m, 6H, H-*o*-10,15,20), 8,14 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H, H-*o*-5), 7,80-7.69 (m, 9H, H-*m,p*-10,15,20), 7,28 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H, H-*m*-5), 4,98 (s, 2H, H-1'), 4,67 (d, $J = 11,6$ Hz, 1H, H-1'') 4,70-4,64 (m, 1H, H-4''), 4,41 (d, $J = 2,6$ Hz, 1H, H-3''), 4,30- 4,24 (m, 1H, H-5'') 4,29 (d, $J = 11,6$ Hz, 1H, H-2''), 3,95 (dd, $J = 13,0, 1,8$ Hz, 1H, H-6''), 3,80 (d, $J = 13,0$ Hz, 1H, H-6''), 1,59 (s, 3H, CH_3), 1,53 (s, 6H, CH_3), 1,33 (s, 3H, CH_3). **RMN de ^{13}C** (75 MHz, CDCl_3) δ 168,5, 157,4, 150,3, 150,1, 150,1, 142,7, 136,3, 135,4, 134,4, 131,9, 127,4, 126,5, 121,1, 121,0, 112,7, 109,1, 109,0, 101,3, 100,4, 99,6, 70,6, 70,6, 70,0, 66,1, 65,5, 61,3, 26,4, 25,9, 25,2, 24,0, 22,6. **UV-vis (CHCl_3):** λ_{max} , nm (log ϵ): 418 (4,97), 509 (3,04), 546 (3,50), 584 (3,14). **HRMS-ESI:** m/z 992.2758. Calcd. for $\text{C}_{58}\text{H}_{49}\text{N}_4\text{O}_8\text{Zn}$ $[\text{M}]^+$ 992.2764.



Glicoporfirina 30d: $\eta = 35\%$. **RMN de ^1H** (300 MHz, CDCl_3) δ 8,98 – 8,93 (m, 8H, β -H), 8,25-8,19 (m, 6H, H-*o*-10,15,20), 8,13 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H, H-*o*-Ph-5), 7,79 -7,71 (m, 9H, H-*m,p*-10,15,20), 7,29 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H, H-*m*-5), 5,58 (d, $J = 5,0$ Hz, 1H, H-1''), 4,96 (s, 2H, CH_2 -1'), 4,65 (dd, $J = 7,9, 2,6$ Hz, 1H, H-3''), 4,55 (dd, $J = 11,6, 4,5$ Hz, 1H, H-6''), 4,45 (dd, $J = 11,6, 7,9$ Hz, 1H, H-6''), 4,34 (dd, $J = 5,0, 2,6$ Hz, 1H, H-2''), 4,31 (dd, $J = 7,9, 1,9$ Hz, 1H, H-4''), 4,20-4,15 (m, 1H, H-5''), 1,55 (s, 6H, CH_3), 1,49 (s, 3H, CH_3), 1,36 (s, 3H, CH_3). **RMN de ^{13}C** (126 MHz, CDCl_3) δ 169,0, 157,5, 150,4, 150,1, 150,1, 142,1, 136,2, 135,4, 134,4, 131,9, 131,9, 127,4, 126,5, 121,0, 121,0, 120,5, 112,8, 109,7, 108,8, 96,3, 71,0, 70,7, 70,3, 65,9, 65,6, 64,3, 29,6, 26,1, 25,9, 24,8, 24,5, 14,1. **UV-vis (CHCl_3):** λ_{max} , nm (log ϵ) 418 (5,59), 517 (3,47), 552 (4,08), 594 (3,50). **HRMS-ESI:** m/z 992,2758. Calcd. para $\text{C}_{58}\text{H}_{48}\text{N}_4\text{O}_8\text{Zn}$ $[\text{M}]^+$ 992,2764.

2.7.7. Síntese de glicoclorinas através da reacção de ciclopropanação com α -diazooacetatos glicosídicos. Procedimento geral:

Num balão de duas tubuladuras foi dissolvida o complexo porfirínico **16** (50 mg, 48,0 μ mol) e CuCl (0,2 equiv., 1,0 mg, 9,6 μ mol) em diclorometano seco (6 mL). Esta solução foi aquecida a 40°C sob atmosfera de azoto. A esta mistura foi adicionada gota-a-gota cada uma das soluções de α -diazooacetatos glicosilados **29a-d** (10 equiv.) em diclorometano seco (5 mL) utilizando um adicionador automático durante 10 horas. Estas misturas reaccionais foram depois mantidas em agitação e aquecimento à mesma temperatura durante 8 horas. O solvente foi evaporado a pressão reduzida e os resíduos foram purificados por cromatografia em coluna de sílica gel usando diclorometano/hexano (30%) como eluente. As fracções obtidas foram purificadas por TLC preparativa usando como eluente uma mistura de hexano/acetato de etilo (4:1).

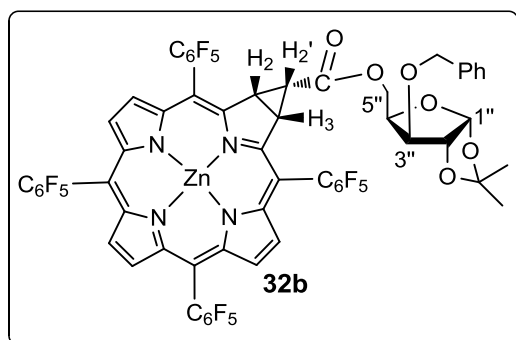


Glicoclorina 33a: η = 9%. RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3): δ 8,61 (2H, m, H-8,17), 8,47 (2H, s, H-12,13), 8,32-8,30 (2H, m, H-7,18), 5,60 (1H, d, J = 2,9 Hz, H-1''), 5,55 (1H, d, J = 4,6 Hz, H-3''), 4,46 (1H, d, J = 2,6 Hz, H-2 ou H-3), 4,37 (1H, d, J = 3,7 Hz, H-2''), 4,33 (1H, d, J = 2,6 Hz, H-2 ou H-3), 3,89-3,77 (2H, m,

H-6''), 3,62-3,61 (1H, m, H-4''), 3,14-3,06 (1H, m, H-5''), 1,37 (3H, s, CH_3), 1,25-1,24 (6H, m, CH_3), 1,15-1,10 (3H, m, CH_3), 1,12 (1H, t, J = 2,6 Hz, H-2'). RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3): δ 172,1 (C=O), 158,3, 153,3, 147,5, 146,9, 143,5, 139,3, 132,9 (C-17 ou C-8), 132,8 (C-8 ou C-17), 129,4 (C-12,13), 128,2 (C-18 ou C-7), 128,12 (C-7 ou C-18), 116,0, 112,5, 108,9, 108,2, 108,13, 104,8 (C-1''), 97,4, 90,0 (C-3''), 82,5, 83,1 (C-2''), 79,2 (C-6''), 71,5 (C-4''), 66,5 (C-5''), 38,2 (C-3 ou C-2), 36,8 (C-2 ou C-3), 31,9, 29,4, 25,6, 26,3 (CH_3), 25,2 (CH_3), 23,6 (CH_3), 23,1 (CH_3), 22,7 (C-2'). RMN de ^{19}F (282 MHz, CDCl_3): δ -186,86 a -186,81 (1F, m, F-Ar-m), -185,35 a -185,19 (4F, m, F-Ar-m), -185,16 a -184,91 (1F, m, F-Ar-m), -184,84 a -184,39 (1F, m, F-Ar-m), -184,10 a -183,94 (1F, m, F-Ar-m), -

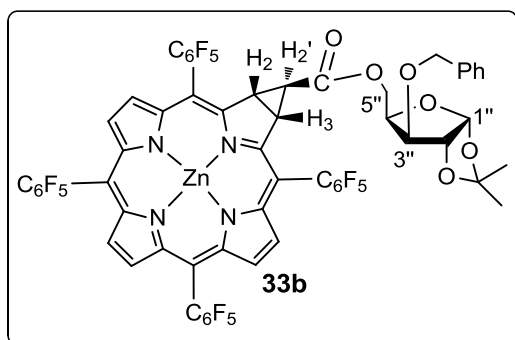
Compostos α -diazocarbonílicos na síntese de novos compostos porfirínicos.
Avaliação biológica de alguns derivados glico-conjugados.

175,72 (2F, t, $J = 19,8$ Hz, F-Ar-p), -175,33 (1F, t, $J = 19,8$ Hz, F-Ar-p), -175,15 (1F, t, $J = 19,8$ Hz, F-Ar-p), -163,06 a -162,76 (2F, m, F-Ar-o), -161,25 a -161,19 (1F, m, F-Ar-o), -160,99 a -160,93 (1F, m, F-Ar-o), -160,82 a -160,64 (3F, m, F-Ar-o), -159,95 a -159,86 (1F, m, F-Ar-o). **UV-vis (CHCl₃):** λ_{\max} , nm (log ϵ) 415 (4,47), 514 (2,84), 573 (2,81), 620 (3,65). **HRMS-ESI:** m/z 1369,0908 Calcd. para C₆₀H₃₅F₂₀N₄O₇Zn [M+H]⁺ 1369,3200.



Glicoclorina 32b: $\eta = 3\%$. **RMN de ¹H** (500 MHz, CDCl₃): δ 8,58-8,57 (2H, m, H-8,17), 8,47 (2H, s, H-12,13), 8,28 (2H, d, $J = 4,6$ Hz, H-7,18), 6,89-6,88 (5H, m, Ph), 5,37 (1H, d, $J = 3,6$ Hz, H-1''), 4,51 (2H, d, $J = 8,2$ Hz, H₂ e H₃), 4,34 (1H, d, $J = 11,9$ Hz, CH₂-Ph), 4,29 (1H, d, $J = 3,6$ Hz, H-2''),

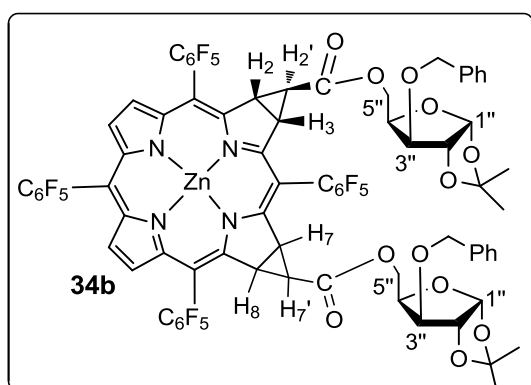
4,10 (1H, d, $J = 11,9$ Hz, CH₂-Ph), 3,75 (1H, dd, $J = 3,6, 7,06$ Hz, H-5''), 3,52 (1H, d, $J = 3,4$ Hz, H-3''), 3,61 (1H, dd, $J = 3,6, 11,9$ Hz, H-5''), 3,82-3,79 (1H, m, H-4''), 2,88 (1H, t, $J = 8,2$ Hz, H-2'), 1,08 (3H, s, CH₃), 1,03 (3H, s, CH₃). **RMN de ¹³C** (75MHz, CDCl₃): δ 167,1 (C=O), 164,1, 163,7, 158,6, 147,4, 144,8 (C-2,3), 138,0, 138,0 (C-Ar), 132,3 (C-Ar), 129,0 (C-8,17), 128,2 (C-12,13), 127,9 (C-7,18), 127,8, 127,3, 104,5, 102,9 (C-1''), 81,4, 81,3 (C-2''), 71,4 (C-5''), 64,9 (CH₂-Ph), 64,0 (C-4''), 26,7 (CH₃), 26,7 (CH₃), 25,6 (C-2'). **RMN de ¹⁹F** (282 MHz, CDCl₃): δ -185,74 a -184,57 (8F, m, F-Ar-m), -176,44 a -176,06 (m, 4F, F-Ar-p), -161,86 a -161,63 (2F, m, F-Ar-o), -161,56 a -161,43 (2F, m, F-Ar-o), -160,99 a -160,70 (2F, m, F-Ar-o), -160,51 a -160,37 (2F, m, F-Ar-o). **UV-vis (CHCl₃):** λ_{\max} , nm (log ϵ): 415 (5,18), 518 (3,45), 584 (3,44), 621 (4,29). **HRMS-ESI:** m/z 1386,0841 Calcd. para C₆₃H₃₄F₂₀N₄O₆Zn [M]⁺ 1386,1450.



Glicoclorina 33b: η = 13%. RMN de ^1H

(500 MHz, CDCl_3): δ 8,61 (2H, d, J = 4,6 Hz, H-8,17), 8,47 (2H, s, H-12,13), 8,32-8,30 (2H, m, H-7,18), 7,27-7,18 (5H, m, Ph), 5,74 (1H, d, J = 3,8 Hz, H-1''), 4,29 (1H, d, J = 3,8 Hz, H-2''), 4,63 (1H, d, J = 11,7 Hz, CH_2 -Ph), 4,53 (1H, d, J = 11,7 Hz, CH_2 -Ph),

4,47-4,41 (4H, m, H-5''+ H-2 e H-3), 4,34-4,29 (1H, m, H-4''), 3,92 (1H, d, J = 3,3 Hz, H-3''), 1,51 (1H, t, J = 2,5 Hz, H-2'), 1,36 (3H, s, CH_3), 1,19 (3H, s, CH_3). RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3): δ 172,5 (C=O), 158,7, 158,4, 153,4, 148,8, 147,7, 147,5, 146,9, 146,7, 145,6, 144,5, 143,6, 140,2, 139,5, 139,3, 139,1, 137,0 (C-8,17), 136,1, 135,9, 135,7, 132,7 (C-12,13), 129,3, 128,5, 128,2 (C-7,18), 127,9 (C-Ph), 127,6, 115,9, 115,7, 111,8 (C-isop.), 108,1, 105,0 (C-1''), 97,4, 81,9 (C-2''), 81,6 (C-3''), 77,8 (C-4''), 71,9 (CH_2 -Ph), 63,2 (C-5''), 37,3 (C-2,3), 26,4 (CH_3), 25,9 (CH_3), 22,9 (C-2'). RMN de ^{19}F (282 MHz, CDCl_3): δ -186,82 a -186,69 (1F, m, F-Ar-m), -185,29 a -185,15 (4F, m, F-Ar-m), -185,09 a -184,99 (1F, m, F-Ar-m), -184,65 a -184,29 (1F, m, F-Ar-m), -184,09 a -183,96 (1F, m, F-Ar-m), -175,85 (2F, t, J = 19,8 Hz, F-Ar-p), -175,39 (1F, t, J = 19,8 Hz, F-Ar-p), -175,18 (1F, t, J = 19,8 Hz, F-Ar-p), -162,06 a -161,98 (2F, m, F-Ar-o), -161,12 a -161,09 (1F, m, F-Ar-o), -161,40 a -161,23 to (3F, m, F-Ar-o), -161,92 a -160,96 (1F, m, F-Ar-o), -160,93 a -160,81 (1F, m, F-Ar-o). UV-vis (CHCl_3): λ_{max} , nm (log ϵ): 414 (5,36), 514 (3,66), 575 (3,63), 621 (4,53). HRMS-ESI: m/z 1386,0922 Calcd. para $\text{C}_{63}\text{H}_{34}\text{F}_{20}\text{N}_4\text{O}_6\text{Zn}$ $[\text{M}]^+$ 1386,1450.

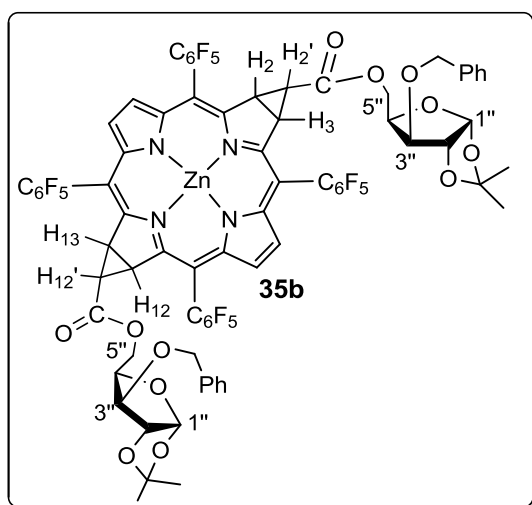


Glico-isobacterioclorina 34b: η = 4%. RMN

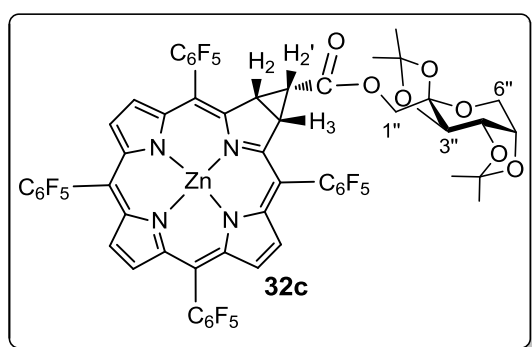
de ^1H (500 MHz, CDCl_3): δ 7,99 (2H, d, J = 4,6 Hz, H-18 ou H-12), 7,96 (2H, d, J = 4,6 Hz, H-18 ou H-12), 7,60-7,57 (4H, m, H-17 ou H-13), 7,33-7,29 (20H, m, Ph), 5,95-5,93

Compostos α -diazocarbonílicos na síntese de novos compostos porfirínicos.
Avaliação biológica de alguns derivados glico-conjugados.

(m, 4H, H-1''), 4,67 (4H, d, $J = 11,8$ Hz, CH_2 -Ph), 4,63-4,61 (4H, m, H-2''), 4,47 (4H, d, $J = 11,8$ Hz, CH_2 -Ph), 4,51-4,45 (4H, m, H-3''), 4,42-4,36 (4H, m, H-4''), 3,98-3,91 (16H, m, H-2, H-3, H-7, H-8, H-5''), 1,50-1,47 (4H, m, H-2'e H-7'), 0,92-0,82 (12H, m, CH_3). **RMN de ^{19}F** (282 MHz, $CDCl_3$): δ -185,45 a -184,80 (6F, m, F-Ar-m), -183,58 a -183,40 (2F, m, F-Ar-m), -176,52 a -176,04 (2F, m, F-Ar-p), -176,06 a -175,85 to (2F, m, F-Ar-p), -161,97 a -161,74 (4F, m, F-Ar-o), -161,25 a -161,13 (4F, m, F-Ar-o). **UV-vis ($CHCl_3$)**: λ_{max} , nm (log ϵ): 410 (3,94), 489 (2,39), 564 (2,98), 605 (3,43). **HRMS-ESI**: m/z 1709,2362. Calcd. para $C_{80}H_{55}F_{20}N_4O_{12}Zn$ $[M+H]^+$ 1709,6898.

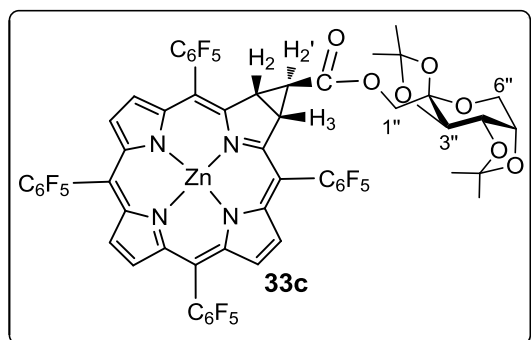


Glicobacterioclorina 35b: $\eta =$ vest. **UV-vis ($CHCl_3$)**: λ_{max} , nm (rel. int.): 368 (51,1 %), 411 (100%), 513 (0,53 %), 554 (10,6 %), 609 (5,5 %), 727 (47,9 %). **HRMS-ESI**: m/z 1709,2283. Calcd. para $C_{80}H_{55}F_{20}N_4O_{12}Zn$ $[M+H]^+$ 1709,6898.



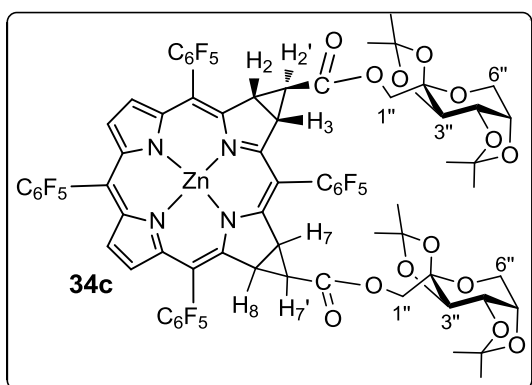
Glicoclorina 32c: $\eta =$ vest. **UV-vis ($CHCl_3$)**: λ_{max} , nm (rel. int.): 418 (100%), 521 (2,2%), 574 (2,6%), 585 (2,8 %), 618 (17,1%). **HRMS-ESI**: m/z 1369,0841. Calcd. para $C_{60}H_{35}F_{20}N_4O_7Zn$ $[M+H]^+$ 1369,1472.

Compostos α -diazocarbonílicos na síntese de novos compostos porfirínicos.
Avaliação biológica de alguns derivados glico-conjugados.

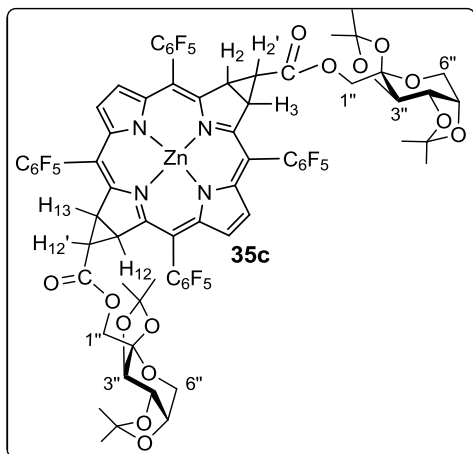


Glicoclorina 33c: $\eta = 7\%$. **RMN de ^1H**
(500 MHz, CDCl_3): δ 8,61 (2H, d, $J = 4,6$
Hz, H-8,17), 8,46 (2H, s, H-12,13), 8,30-
8,33 (2H, m, H-7,18), 4,56 (1H, dd, $J =$
2,5, 8,0 Hz, H-4''), 4,49 (2H, d, $J = 2,8$ Hz,
H-2 e H-3), 4,41 (1H, d, $J = 11,7$ Hz, H-1''),
4,29 (1H, d, $J = 11,7$ Hz, H-1''), 4,23 (1H,

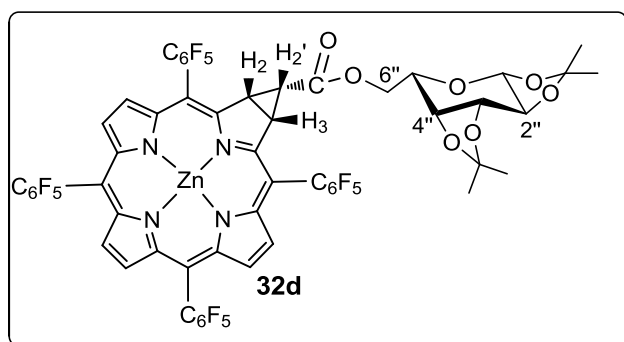
d, $J = 2,5$ Hz, H-3''), 4,09 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz, H-5''), 3,84 (1H, d, $J = 12,5$ Hz, H-6''), 3,63
(1H, d, $J = 12,5$ Hz, H-6''), 1,55 (1H, t, $J = 2,8$ Hz, H-2'), 1,46 (3H, s, CH_3), 1,41 (3H, s,
 CH_3), 1,27 (3H, m, CH_3), 1,16 (3H, s, CH_3). **RMN de ^{13}C** (75MHz, CDCl_3): δ 172,3 (C=O),
158,5, 153,4, 147,5, 146,9, 133,1, 132,8 (C-8,17), 129,7, 129,3 (C-12,13), 128,3, 128,1
(C-7,18), 116,1, 115,8, 109,1, 108,8, 108,1, 101,1, 70,6 (C-5''), 70,4, 70,2 (C-3''), 70,0,
69,9, (C-4''), 66,1 (C-1''), 65,2, 61,2 (C-6''), 37,9 (C-3), 37,0 (C-2), 29,7, 26,5, 26,3 (CH_3),
25,7 (C-2' ou CH_3), 25,5, 24,7 (CH_3), 23,8 (CH_3), 22,9 (CH_3 ou C-2'). **RMN de ^{19}F** (282
MHz, CDCl_3): δ -185,39 a - 185,24 to (6F, m, F-Ar-m), -185,45 a -184,34 (2F, m, F-Ar-m),
-175,83 (2F, t, $J = 19.8$ Hz, F-Ar-p), -175,55 (2F, t, $J = 19.8$ Hz, F-Ar-p), -162,20 a -162,08
(m, 2F, F-Ar-o), -161,17 a -161,09 (m, 2F, F-Ar-o), -161,08 a -160,97 (4F, m, F-Ar-o). **UV-**
vis (CHCl_3): λ_{max} , nm (log ϵ): 414 (4,99), 514 (3,47), 574 (3,44) 620 (4,27). **HRMS-ESI:**
 m/z 1369,0841 Calcd. para $\text{C}_{60}\text{H}_{35}\text{F}_{20}\text{N}_4\text{O}_7\text{Zn}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 1369,1472.



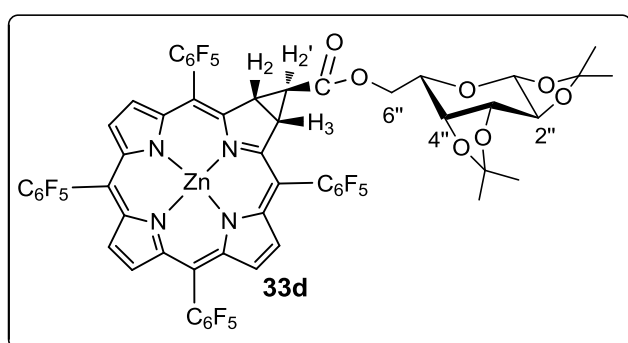
Glico-isobacterioclorina 34c: $\eta =$ vest. **UV-**
vis (CHCl_3): λ_{max} , nm (rel. int.): 417 (100%),
491 (3,9%), 529 (4,4%) 564 (8,8%), 605 (22,6
%). **HRMS-ESI:** m/z 1665,3267 Calcd. for
 $\text{C}_{74}\text{H}_{53}\text{F}_{20}\text{N}_4\text{O}_{14}\text{Zn}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 1665,2525.



Glicobacterioclorina 35c: $\eta =$ vest. **UV-vis** (CHCl_3): λ_{max} , nm (rel. int.): 368 (19,9 %), 416 (100%), 563 (8,1 %), 727 (8,25 %). **HRMS-ESI:** m/z 1665,2674 Calcd. para $\text{C}_{74}\text{H}_{53}\text{F}_{20}\text{N}_4\text{O}_{14}\text{Zn}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 1665,2525.



Glicoclorina 32d: $\eta =$ vest. **UV-vis** (CHCl_3): λ_{max} , nm (rel. int.): 418 (100%), 519 (3,6%), 572 (3,3%), 585 (3,2%), 620 (13,2%). **HRMS-ESI:** m/z 1369,0821 Calcd. para $\text{C}_{60}\text{H}_{35}\text{F}_{20}\text{N}_4\text{O}_7\text{Zn}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 1369,3200.

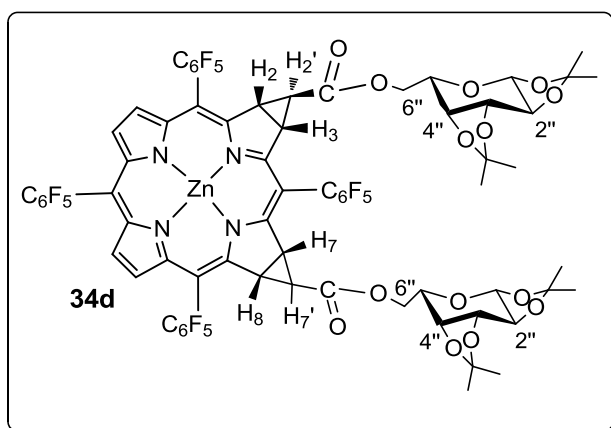


Glicoclorina 33d: $\eta =$ 8%. **RMN de ^1H** (500 MHz, CDCl_3): δ 8,60 (2H, d, $J = 4,6$ Hz, H-8,17), 8,46 (2H, s, H-12,13), 8,30-8,29 (2H, m, H-7,18), 5,45 (1H, d, $J = 5,0$ Hz, H-1''), 4,63 (1H, dd, $J = 2,5, 7,9$ Hz, H-3''), 4,45 (1H, d, $J = 2,6$

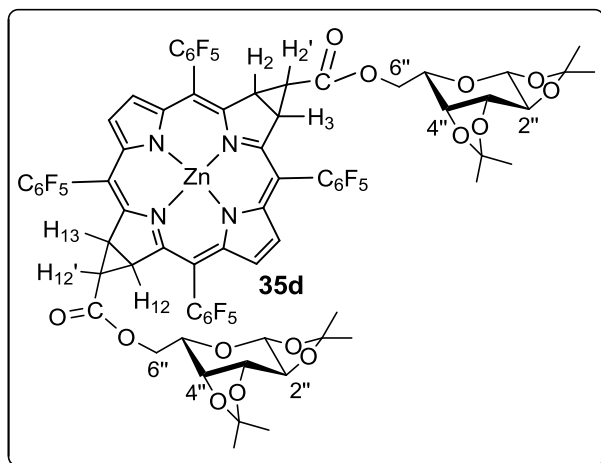
Hz, H-2 ou H-3), 4,41 (1H, d, $J = 2,6$ Hz, H-3 ou H-2), 4,37-4,39 (2H, m, H-6''), 4,32 (1H, dd, $J = 2,5, 5,0$ Hz, H-2''), 4,23 (1H, dd, $J = 1,6, 7,9$ Hz, H-4''), 4,05-4,09 (1H, m, H-5''), 1,54 (1H, t, $J = 2,6$ Hz, H-2'), 1,47 (6H, s, CH_3), 1,39 (6H, s, CH_3). **RMN de ^{13}C** (75 MHz, CDCl_3): δ 172,4 (C=O), 158,8, 153,4, 147,4, 146,9, 132,6 (C-8,17), 129,2 (C-12,13), 128,1 (C-7,18), 116,0, 109,7 (C-isop.), 108,7 (C-isop.), 107,9, 97,3, 96,1, 70,8 (C-4''),

Compostos α -diazocarbonílicos na síntese de novos compostos porfirínicos.
Avaliação biológica de alguns derivados glico-conjugados.

70,6 (C-3''), 70,4 (C-2''), 65,6 (C-5''), 64,4 (C-6''), 37,3 (C-2,3), 36,9 (C-2,3), 25,8 (CH₃), 25,6, 24,6 (CH₃), 24,3 (CH₃), 23,0 (C-2'). **RMN de ¹⁹F** (282,38 MHz, CDCl₃): δ -185,36 a -185,19 (4F, m, F-Ar-m), -184,84 a -184,69 (2F, m, F-Ar-m), -184,66 a -184,53 (2F, m, F-Ar-m), -175,91 a -175,65 (2F, m, F-Ar-p), -175,58 a -175,41 (2F, m, F-Ar-p), -162,07 a -161,99 (1F, m, F-Ar-o), -161,73 a -161,66 (1F, m, F-Ar-o), -161,26 a -160,97 (4F, m, F-Ar-o), -160,84 a -160,77 (2F, m, F-Ar-o). **UV-vis (CHCl₃):** λ_{max} , nm (log ϵ): 415 (5,53), 515 (3,87), 575 (3,85), 621 (4,72). **HRMS-ESI:** m/z 1369,0871 Calcd. para C₆₀H₃₅F₂₀N₄O₇Zn [M+H]⁺ 1369,3200).



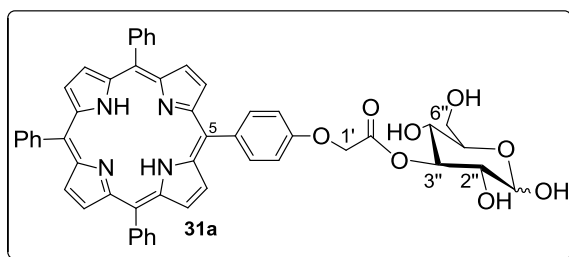
Glico-isobacterioclorina 34d: : η = vest. **UV-vis (CHCl₃):** λ_{max} , nm (rel. int.): 414 (100%), 512 (2,3%), 583 (2,3%), 615 (9,1%). **HRMS-ESI:** m/z 1665,2121 Calcd. para C₇₄H₅₃F₂₀N₄O₁₄Zn [M+H]⁺ 1665,2525.



Glicobacterioclorina 35d: : η = vest. **UV-vis (CHCl₃):** λ_{max} , nm (rel. int.): 365 (51.8 %) 408 (100%), 477 (2.9 %), 511 (4,0 %), 550 (8,5 %), 614 (4,5 %), 728 (45,9 %). **HRMS - ESI:** m/z 1665,3002 Calcd. para C₇₄H₅₃F₂₀N₄O₁₄Zn [M+H]⁺ 1665,2525.

2.7.8. Remoção dos grupos isopropilidenos das unidades glicosídicas e do íão metálico das glicoporfirinas 30a-d e das glicoclorinas 33a-d. Procedimento geral:

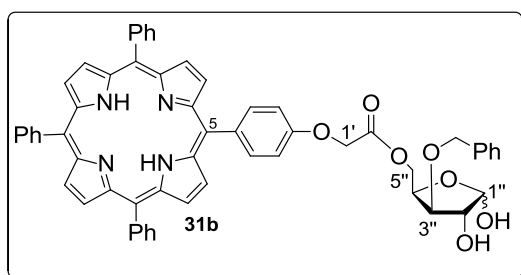
A hidrólise dos grupos isopropilideno das glicoporfirinas **30a-d** e das glicoclorinas **33a-d**, assim como a remoção do íão zinco do interior do macrociclo foi efectuada através da reacção destas porfirinas com uma solução de TFA- água (9:1) (3 mL) à temperatura ambiente e protegida da luz. Findo este tempo, foi adicionado clorofórmio às reacções, seguindo-se a neutralização do ácido foi efectuada com uma solução aquosa de carbonato de sódio. As misturas foram lavadas com água destilada e as fases orgânicas foram extraídas com clorofórmio e as fases orgânicas secas em sulfato de sódio anidro. O solvente foi evaporado sob pressão reduzida e o resíduo foi, posteriormente, purificado por cromatografia em coluna de sílica gel usando como eluente clorofórmio e metanol (5%). Os compostos obtidos foram dissolvidos em clorofórmio e cristalizados em hexano obtendo-se cristais roxos.



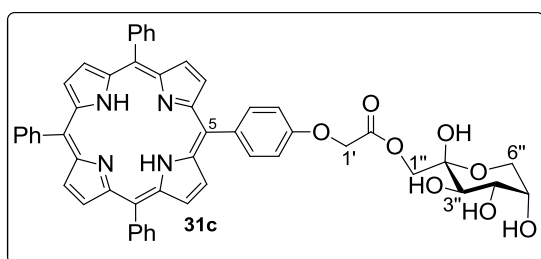
Glicoporfirina 31a: $\eta = 88\%$. RMN de ^1H

(300 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{MeOH}$) δ 8,84 -8,82 (m, 8H, β -H), 8,22 - 8,11 (m, 8H, H- α -5,10,15,20), 7,77 - 7,69 (m, 9H, H- m,p -10,15,20), 7,37 (d, $J = 8,0$ Hz, 2H, H- m -5

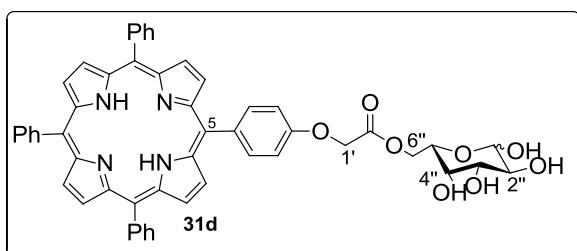
), 7,14-7,17 (m, 1H, H-1''), 6,96 -6,98 (m, 1H, H-3''), 4,77 (s, 2H, CH_2 -1'), 3,77 - 3,76 (m, 1H, H-2''), 3,72-3,66 (s, 2H, H-6''), 3,38-3,43 (m, 2H, H-4'' e H-5''). **UV-vis (DMSO):** λ_{max} , nm (log ϵ) 419 (5,18), 515 (3,94), 551 (3,70), 590 (3,43), 647 (3,43). **HRMS-ESI:** m/z 851,3075. Calcd. for $\text{C}_{52}\text{H}_{43}\text{N}_4\text{O}_8$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 851,3074.



Glicoporfirina 31b: $\eta = 91\%$. RMN ^1H (^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 8,87 – 8,82 (m, 8H, $\beta\text{-H}$), 8.22 – 8.19 (m, 6H, H- σ -10,15,2), 8.16 – 8.07 (m, 2H, H- σ -5), 7,81 – 7,70 (m, 9H, H- m,p -10,15,20), 7,35-7,30 (m, 5H, Ph), 7,27-7,23 (m, 2H, H- m -5), 5,52-5,40 (m, 1H, H-1'), 4,93-4,86 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-1}'$), 4,80-4,79 (m, 1H, $\text{CH}_2\text{-Ph}$), 4,72-4,68 (m, 1H, H-2''), 4,61-4,47 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-Ph}$, H-4'' e H-5''), 4,26 – 4,24 (m, 2H, H-3''), -2,79 (s, 2H, NH). **UV-vis (DMSO):** λ_{max} , nm (log ϵ) 418 (5,61), 515 (4,21), 550 (3,93), 590 (3,60), 646 (3,65). **HRMS-ESI:** m/z 911.3439. Calcd. para $\text{C}_{58}\text{H}_{47}\text{N}_4\text{O}_7$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 911.3419.



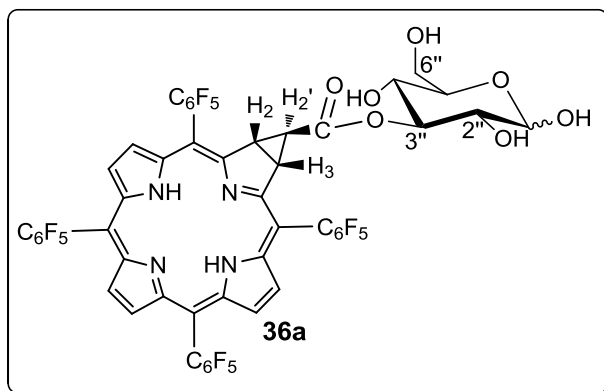
Glicoporfirina 31c: $\eta = 90\%$. RMN de ^1H (300 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{MeOH}$) δ 8,87-8,85 (m, 8H, $\beta\text{-H}$), 8,25-8,18 (m, 6H, H- σ -10,15,20), 8,14-8,12 (m, 2H, H- σ -5), 7,78 – 7,73 (m, 9H, H- m,p -10,15,20)), 7,32 (d, $J = 8,7$ Hz, 2H, H- m -5), 5,04-4,96 (m, 2H, H-1'), 4,74 (s, 2H, H-1''), 4,04-3,39 (m, 1H, H-4''), 3,81-3,80 (m, 1H, H-3''), 3,68-3,66 (m, 1H, H-5''), 3,71-3,66 (m, 1H, H-2''), 3,58 – 3,50 (m, 1H, H-6''), 3,49-3,43 (m, 1H, H-6''), -2,82 (s, 2H, NH). **UV-vis (DMSO):** λ_{max} , nm (log ϵ) 419 (5,01), 515 (3,64), 551 (3,39), 591 (3,14), 647 (3,11). **HRMS-ESI:** m/z 851,3075. Calcd. para $\text{C}_{52}\text{H}_{43}\text{N}_4\text{O}_8$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 851,3074.



Glicoporfirina 31d: $\eta = 92\%$. RMN de ^1H (500 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$) δ 8,95-8,79 (m, 8H, $\beta\text{-H}$), 8,19-8,14 (m, 6H, H- σ -10,15,20), 7,79 (d, 2H, $J = 8,5$ Hz, H- σ -5), 7,32-7,30 (m, 9H, H- m,p -10,15,20), 7,31 (d, 2H, $J = 8,6$ Hz, H- m -5), 5,27-5,21 (m, 1H, H-1''), 5,09 – 4,96 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-1}'$), 4,60 – 4,48 (m, 1H, 1H, H-3''), 3,37-3,36 (m, 4H, H-2'', H-4'' e H-6''), 2,16-2,11 (m, 1H,

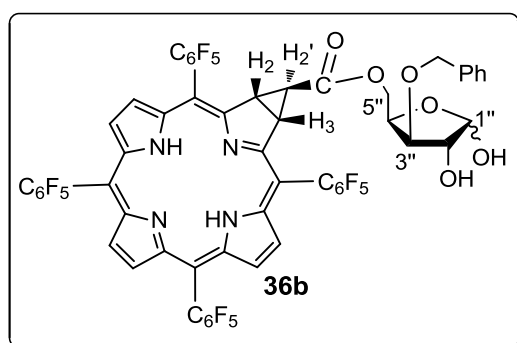
Compostos α -diazocarbonílicos na síntese de novos compostos porfirínicos.
Avaliação biológica de alguns derivados glico-conjugados.

H-5''), -2.82 (s, 2H, NH). **UV-vis (DMSO):** λ_{\max} , nm (log ϵ), 418 (5,47), 515 (4,09), 550 (3,57), 589 (3,57), 645 (3,54). **HRMS-ESI:** m/z 851.3075. Calcd. para $C_{52}H_{43}N_4O_8$ $[M+H]^+$ 851.3074.



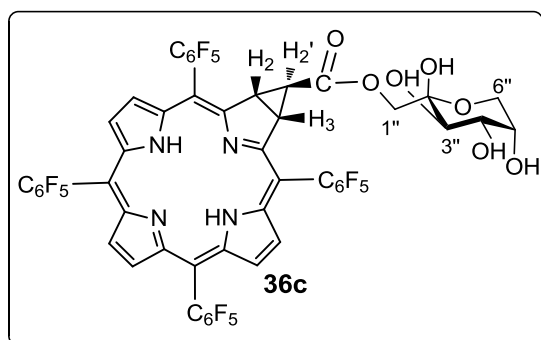
Glicoclorina 36a: $\eta = 80\%$. **RMN de 1H** (500 MHz, $CDCl_3 + MeOD$): δ 8,76-8,75 (2H, m, H-8,17), 8,54-8,51 (4H, m, H-7,8,12,13), 5,37-5,36 (1H, m, H-Glu), 4,51-4,92 (2H, m, H-Glu), 4,13-4,11 (2H, m, H-2,3), 4,01-3,98 (1H, m, H-Glu), 3,95-3,90 (1H, m, H-Glu), 3,78-

3,73 (1H, m, H-Glu), 2,04 (1H, m, H-2'). **UV-vis [DMF/H₂O (9:1)]:** λ_{\max} , nm (log ϵ): 408 (4,96), 506 (3,83), 601 (3,19), 656 (4,18). **HRMS-ESI:** m/z 1195,1242. Calcd. para $C_{52}H_{23}F_{20}N_4O_7$ $[M + H]^+$ 1195,1256.



Glicoclorina 36b: $\eta = 80\%$. **RMN de 1H** (500 MHz, $CDCl_3 + MeOD$): δ 8,76-8,75 (2H, m, H-8,17), 8,69-8,51 (4H, m, H-7,8,12,13), 7,60-7,37 (5H, m, Ph), 4,49-4,02 (7H, m, H-Xyl e H-2,3), 3,92-3,83 (1H, m, H-Xyl), 1,82 (1H, m, H-2'). **UV-vis [DMF/H₂O (9:1)]:** λ_{\max} , nm (log ϵ): 408 (5,26), 506 (4,23), 599 (3,49), 601 (3,66),

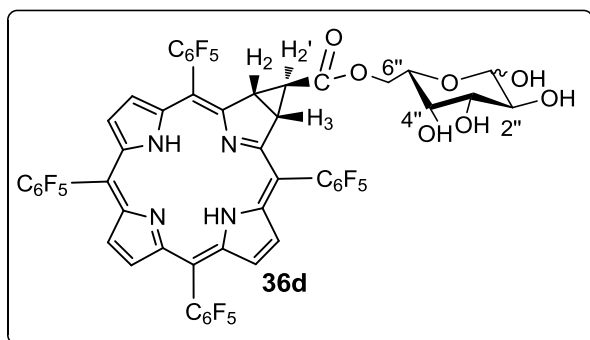
655 (4,55). **HRMS-ESI:** m/z 1255,1606. Calcd. para $C_{58}H_{27}F_{20}N_4O_6$ $[M + H]^+$ 1255,1660.



Glicoclorina 36c: $\eta = 87\%$. **RMN de 1H** (500 MHz, $CDCl_3 + MeOD$): δ 8,76 (2H, d, $J = 4,8$ Hz, H-8,17), 8,51 (4H, s, H-7,8,12,13), 4,53-4,45 (4H, m, H-2,3 and H-1''), 4,07-4,00 (3H, m, H-Fru), 3,83-3,74 (2H, m, H-Fru), 2,34-2,32 (1H, m, H-2'). **UV-vis [DMF/H₂O (9:1)]:** λ_{\max} , nm

Compostos α -diazocarbonílicos na síntese de novos compostos porfirínicos.
Avaliação biológica de alguns derivados glico-conjugados.

(log ϵ): 408 (4,69), 506 (2,86), 601 (2,30), 656 (4,21). **HRMS-ESI:** m/z 1195,1242. Calcd. para $C_{52}H_{23}F_{20}N_4O_7$ $[M + H]^+$ 1195,1256.



Glicoclorina 36d: $\eta = 90\%$. **RMN de 1H** (500 MHz, $CDCl_3 + MeOD$): δ 8,73-8,71 (2H, m, H-8,17), 8,48-8,38 (4H, m, H-7,12,13,18), 6,57-6,56 (1H, m, H-1''), 5,38-5,01 (3H, m, H-2,3 + H-Gal), 4,45-4,27 (1H, m, H-Gal), 3,98-3,87 (2H, m, H-Gal), 3,71-

3,64 (2H, m, H-Gal), 1,43-1,38 (1H, m, H-2'). **UV-vis [DMF/ H_2O (9:1)]:** λ_{max} , nm (log ϵ): 408 (5,26), 506 (4,18), 551 (3,18), 601 (3,60), 656 (4,51). **HRMS-ESI:** m/z 1195,1242. Calcd. para $C_{52}H_{23}F_{20}N_4O_7$ $[M + H]^+$ 1195,1256.

2.7.9. Avaliação da actividade fotodinâmica dos derivados glicoporfirínicos 31a-d e 36a-d em células tumorais

2.7.9.1. Meios, reagentes, solventes e equipamento

O meio de cultura utilizado ao longo dos ensaios biológicos foi o meio completo adquirido na Gibco. Este tem a designação de DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) e foi adquirido estéril em material de plástico descartável. Também o soro fetal bovino (SFB), a tripsina (0,25%)-EDTA(0,02%), os antibióticos (penicilina G-sulfato de estreptomicina, 10.000 unidades/mL-10.000 $\mu g/mL$) e o tampão fosfato-PBS (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline) utilizados ao longo do trabalho realizado foram, também, adquiridos na Gibco.

As linhas celulares utilizadas foram cultivadas em meio DMEM com 10% de SFB e 1% dos antibióticos (penicilina-estreptomicina) em frascos de 25 cm^2 e boca angular (F25). O cultivo destas células realizou-se em monocamada e em condições de esterilidade, com o auxílio de um incubador termostaticado de CO_2 (Heraeus Hera Cell), a uma temperatura de 37°C e com atmosfera de 5% CO_2 . O congelamento das linhas celulares foi realizado em criotubos de 2 mL (Costar).

No caso dos tratamentos fotodinâmicos, os fotossensibilizadores foram incubados com meio DMEM contendo 1% de antibióticos (penicilina-estreptomicina). Durante o período de incubação, as células foram mantidas em condições de esterilidade, no incubador termostatizado de CO₂ (Heraus Hera Cell).

Todo o material que não se encontrava estéril foi esterilizado em autoclave a 180°C durante 15 minutos.

Todo o trabalho envolvendo a manipulação das linhas celulares foi realizado em ambiente estéril no interior de uma câmara de fluxo laminar vertical.

A leitura da absorvência a 542 nm das soluções de DMSO e MTT em placas de 24 poços foram registados num espectrofotómetro modelo Espectra fluor 4 (TECAN).

2.7.9.2. Determinação da produção de oxigénio singuleto (¹O₂).

As soluções stock das glicoporfirinas **31a-d** a 0,1 mM e do 1,3-difenilisobenzofurano (DFiBF) a 10 mM foram preparadas em DMSO. Em células de vidro foram preparadas 2 mL de solução contendo 50 μ M de DFiBF e 0,5 μ M de cada glicoporfirina em DMF/H₂O (9:1). As células foram irradiadas com dose de luz de 25mW/cm² e a comprimentos de onda de 550-800 nm. Durante a irradiação, as soluções permaneceram em agitação magnética à temperatura ambiente. A absorvência foi medida a 415 nm a cada 1 minuto durante 15 minutos. A percentagem de redução deste valor, proporcional à produção de ¹O₂, foi calculada por comparação entre a absorvência inicial da solução e a absorvência registada ao fim de cada minuto de irradiação. Os resultados obtidos foram comparados com os obtidos para a *meso*-tetrafenilporfirina (**TPP**) nas mesmas condições.

O procedimento adoptado para a determinação de oxigénio singuleto das glicoclorinas **36a-d** foi igual ao anteriormente descrito. No entanto, as leituras da absorvência a 415 nm foram realizadas a cada 10 segundos durante 3 minutos e 20 segundos e os resultados obtidos foram comparados com os resultados obtidos com o azul-de-metileno (**MB**) nas mesmas condições.

2.7.9.3. Linhas celulares

Neste trabalho foram utilizadas duas linhas celulares: células HeLa (**H**enriquetta **L**acks) e células HaCaT (**H**uman **a**dult, **C**alcium, **T**emperature). As células HeLa são células epiteliais humanas procedentes de um cancro cervical transformadas por um papilomavírus humano 18 (HPV18), enquanto que as células HaCaT são células não tumorais de queratinócitos humanos.

Para manter a imortalidade destas linhas celulares, stocks de cada linha foram congeladas em DMSO em criotubos de 2mL (Costar) a -80°C . Sempre que necessário, um destes stocks foi descongelado e transferido para um tubo F25 com 5 mL de meio DMEM com 10% de SFB e 1% de antibióticos (penicilina-estreptomicina). Esta cultura das células realizou-se em monocamada e em condições de esterilidade, num incubador termostaticado de CO_2 (Heraus Hera Cell), a uma temperatura de 37°C e atmosfera com 5% de CO_2 . As células em cultura crescem ancoradas à matriz polimérica que faz parte do frasco de cultura.

Sempre que estas culturas apresentavam cerca de 70% de confluência, foi necessário fazer a sua amplificação para diferentes frascos, procedimento designado de passagem da linha celular. Uma vez que as células crescem ligadas à matriz do frasco, foi necessário quebrar estas ligações usando tripsina. Assim, o meio de cultura foi aspirado e foi adicionado 1 mL de tripsina (0,25%)-EDTA(0,02%), seguida de agitação vigorosa. A solução de enzima adicionada foi aspirada, adicionando-se mais 1 mL de tripsina (0,25%)-EDTA(0,02%) repetindo o processo de agitação. Uma vez observado por microscópio que as células se encontravam em suspensão, foram adicionados 3 mL de meio DMEM com 10% de SFB e 1% de antibióticos (penicilina-estreptomicina). Esta suspensão celular foi igualmente distribuída por 4 frascos F25 contendo 4 mL de meio DMEM com 10% de SFB e 1% de antibióticos.

Para os tratamentos fotodinâmicos foi colocado 1 mL de cada suspensão celular confluyente num frasco de plástico estéril de 15 mL onde foram, também, adicionados 13 mL de meio DMEM com 10% de SFB e 1% de antibióticos. Esta nova suspensão foi cultivada em placas de 24 poços. Estas placas foram mantidas em condições de

esterilidade, num incubador termostaticado de CO₂ (Heraus Hera Cell) a 37°C e com uma atmosfera de 5% CO₂ até que apresentassem cerca de 60% de confluência.

Para os ensaios da morfologia celular e localização celular, o procedimento adoptado para o cultivo das linhas celular foi idêntico, no entanto a suspensão celular foi cultivada em placas de 6 poços contento lamelas esterilizadas.

2.7.9.4. Preparação dos complexos lipossomas-fotossensibilizadores

Uma vez que os fotossensibilizadores preparados não são solúveis em água, foi necessário proceder à sua incorporação em lipossomas. Assim, foram preparadas duas soluções stock, uma de fotossensibilizador (0,5 mg de fotossensibilizador em 1 mL de piridina) e outra do lípido dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) (10,5 mg em 1 mL de etanol absoluto). A partir destas preparou-se uma nova solução de fotossensibilizador (0,265 mL) e de DPCC (0,753 mL), que foi adicionada lentamente a 10 mL de PBS a 55°C (temperatura de transição dos lipossomas), sob agitação magnética. Após o arrefecimento, esta solução foi submetida a diálise com PBS a 1% durante 4 horas, em ciclos de 30 minutos (4 ciclos) e 1 hora (2 ciclos). A mistura dialisada foi depois esterilizada, segundo uma filtração com filtro Milipore de 0,22 μ m de diâmetro de poro e armazenada a 4°C e no escuro.⁶⁷

Para os ensaios realizados, as diferentes concentrações de suspensão lipossomas-fotossensibilizador foram obtidas por diluição da solução original com DMEM com antibiótico.

2.7.9.5. Tratamentos Fotodinâmicos

A avaliação do efeito fotodinâmico dos fotossensibilizadores sintetizados nas linhas celulares HeLa e HaCaT foram realizadas em placas de 24 poços onde foram cultivadas cada uma das linhas celulares de acordo com o procedimento descrito no ponto 2.5.9.3. Para este ensaio foram realizados dois controlos: o controlo total, em que se avaliou a viabilidade celular na ausência de fotossensibilizador e o controlo do

Compostos α -diazocarbonílicos na síntese de novos compostos porfirínicos.
Avaliação biológica de alguns derivados glico-conjugados.

efeito da irradiação, em que se estimou a viabilidade celular na ausência de fotossensibilizador, mas na presença de radiação. Assim, as soluções de fotossensibilizador-lipossomas em meio DMEM com antibiótico nas concentrações 10^{-6} M e 10^{-7} M foi incubada nas placas de 24 poços contendo as linhas celulares durante 4 horas em ambiente estéril num incubador termostaticado de CO_2 (Heraus Hera Cell) a 37°C e com uma atmosfera de 5% CO_2 . Findo este período as placas foram irradiadas com luz vermelha ($\lambda = 654 \text{ nm} \pm 20 \text{ nm}$) de $9,15 \text{ mW/cm}^2$ durante 5, 10, 15 e 20 minutos. A fonte de irradiação era constituída por uma matriz de 24×16 LEDs (Kingsbright, modelo L53, SRCE).⁶⁸ Depois da irradiação, o meio de cada poço foi trocado por meio DMEM com soro bovino e antibiótico e mantido em incubação em ambiente estéril durante 24 horas. A viabilidade celular foi estimada usando o método colorimétrico MTT.

Para avaliar a influência do fotossensibilizador sem radiação (controlo escuro), prepararam-se placas com suspensão lipossomas-fotossensibilizadores nas mesmas condições descritas, no entanto, não se procedeu à irradiação. A viabilidade celular foi, também, estimada usando o método colorimétrico MTT.

Para a avaliação da morfologia celular após o tratamento fotodinâmico, as linhas celulares foram semeadas em placas de 6 poços contendo lamelas esterilizadas, de acordo com a metodologia atrás descrita. A irradiação foi realizada nas mesmas condições, no entanto, apenas se usaram os tempos de irradiação 5 e 20 minutos. Depois da irradiação, o meio de cada poço foi trocado por meio DMEM com soro bovino e antibiótico e mantido em incubação em ambiente estéril durante 24 horas. A morfologia celular foi avaliada usando o método do azul de toluidina.

2.7.9.6. Estimativa de viabilidade celular – Teste MTT

Foi preparada uma solução mãe de MTT – PBS (1 mg de MTT em 1 mL PBS 1%). De seguida, e após esterilização da solução mãe, foi preparada uma segunda solução

de 10% MTT-PBS em meio completo. A cada poço da placa de 24 poços foi adicionado um volume de 500 μ L da solução MTT/meio, e a placa foi incubada a 37°C, durante 3-4 horas. Terminado este período de incubação, o meio de cultura foi aspirado e adicionou-se a cada poço da placa P24, 500 μ L DMSO para a dissolução do formazan. O valor da absorvência a 542 nm foi lida, de forma automática num leitor de placas, modelo Spectra fluor 4 (TECAN). As medições de absorção dos controlos totais foram tomadas como 100% de viabilidade celular e a partir dessas estimaram-se as percentagens de viabilidade para o resto dos controlos e para as células submetidas a tratamento completo.⁶⁹

2.7.9.7. Morfologia celular após tratamento fotodinâmico

A avaliação do efeito do tratamento fotodinâmico na morfologia celular nas células usadas foi realizada pelo método do azul de toluidina. Para tal, e depois do tratamento fotodinâmico com o fotossensibilizador **36b**, o meio de cultivo das placas de 6 poços contendo lamelas esterilizadas foi aspirado e as células presentes nas lamelas foram fixadas com metanol absoluto através da adição deste a -20°C e mantido nos poços durante durante 7 min. Após este período de tempo, eliminou-se o metanol e deixaram-se secar as lamelas à temperatura ambiente. As células fixadas nas lamelas foram coradas com uma solução de azul de toluidina em água (10%), durante 5 minutos. Cada lamela, foi em seguida, lavada com água destilada. As lamelas foram montadas usando como meio de montagem o DePEX, após desidratação das lamelas com xileno. Estas preparações foram visualizadas num microscópio de fluorescência em campo claro.⁶⁸

2.7.9.8. Localização celular dos fotossensibilizadores

Para os estudos da localização celular do fotossensibilizador **36d** foi usado o método *in vivo*.⁶⁸ Para tal, as células foram cultivadas em placas de 6 poços contendo lamelas esterilizadas de acordo com o procedimento atrás descrito. A suspensão de lipossomas-fotossensibilizador em meio DMEM contendo antibiótico a 10^{-7} M foi incubada com as células durante 2, 4, 6 e 24 horas. Posteriormente, as lamelas foram

Compostos α -diazocarbonílicos na síntese de novos compostos porfirínicos.
Avaliação biológica de alguns derivados glico-conjugados.

lavadas duas vezes com PBS e montadas com o mesmo tampão em lâminas, sendo examinadas por microscopia de fluorescência.

2.8. Referências Bibliográficas

1. Zollinger, H. In *Diazo Chemistry II- Aliphatic, Inorganic and Organometallic Compounds*, VCH Publishers: New York, **1995**.
2. Ferreira, V. F.; Pereira, L. O. R.; Souza, M. C. B. V.; Cunha, A.C. *Quim. Nova*, **2001**, *24*, 540-553.
3. Moore, J.A.; Reed, D.E. *Org. Synth.*, **1973**, *5*, 351-354.
4. Doyle, M. P. *Chem. Rev.*, **1980**, *86*, 919-939.
5. Cleyden, J.; Greeves, N.; Warren, S.; Wothers, P. In *Organic Chemistry*, 1^a Ed., Oxford University: New York, **2001**.
6. Miler B. In *Advanced Organic Chemistry-Reactions and Mechanisms*, 2^a Ed., Pearson Education, Inc.: New York, **2004**.
7. Tsuji, J. In *Transition Metal Reagents and Catalysts – Innovation in Organic Synthesis*, John Wiley and Sons Inc.: New York, **2000**.
8. Closs, G. L.; Closs L. E. *J. Am. Chem. Soc.*, **1969**, *91*, 4549-4550.
9. Merlic, C. A.; Zechmen, A. L. *Synthesis*, **2003**, *8*, 1137-1156.
10. Davies, H.M.L.; Bruzinski, P. R.; Lake, D. H.; Kong N.; Fall, M. J. *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, *118*, 6897- 6907.
11. Howell, J. A. S. *Dalton Trans.*, **2007**, 1104–1114.
12. Kragballe, K.; Pinnamaneni, G.; Desjarlais, L.; Duell, E.A.; Voorhees, J. J. *J. Invest. Dermatol.*, **1986**, *87*, 494-498.
13. Bachmann, S.; Fielenbach, D.; Jorgensen, K. A. *Org. Biomol. Chem.*, **2004**, *20*, 3044-3049.
14. Davies, H. M. L; Nikolai, J. *Org. Biomol. Chem.*, **2005**, *23*, 4176-4187.
15. Davies, H. M. L.; Beckwith, R. E. J. *Chem. Rev.*, **2003**, *103*, 2861-2904.
16. Nakamura, E.; Yoshikai, N.; Yamanaka, M. *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, *124*, 7181-7192.
17. Doyle, M. P.; Westrum, L. J.; Wolthuis, W. N. E.; See, M. M.; Boone, W. P.; Bagheri, V.; Pearson, M. M. *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, *115*, 958-964.
18. Doyle, M.P.; Duffy, R.; Ratnikov, M.; Zhou, L. *Chem. Rev.*, **2010**, *110*, 704–724.
19. Bonge, H.T.; Hansen, T. *Eur. J. Org. Chem.*, **2010**, 4355-4359.
20. Taber, D. F.; You, K. K., Rheingold, A. L. *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, *118*, 547-556.
21. Doyle, M.P.; McKervey, M.A.; Ye, T. In *Modern Catalytic Methods for Organic Synthesis with Diazo Compounds*, Wiley: New York, **1998**.
22. Miller, D. J.; Moody, C. J. *Tetrahedron*, **1995**, *51*, 10811-10843.
23. Doyle, M.P.; Yan, M. *Tetrahedron Lett.*, **2002**, *43*, 5929-5931.

24. Qu, Z.; Shi, W.; Wang, J. *J. Org. Chem.*, **2004**, *69*, 217-219.
25. Lu, C.; Liu, H.; Chen, Z.; Hu, W.; Mi, A. *Chem. Commun.*, **2005**, *20*, 2624-2626.
26. Liu, Z.; Liu, J. *Cent. Eur. J. Chem.*, **2010**, *8*, 223-228.
27. Zhang, X.; Ma, M.; Wang, J. *Arkivoc*, **2003**, *ii*, 84-91.
28. Alguns exemplos recentes: (a) Maux, P.L. ; Nicolas, I.; Chevance, S.; Simonneaux, G. ; *Tetrahedron*, **2010**, *66*, 4462-4468. (b) Aviv, I.; Gross, Z. *Chem. Commun.*, **2006**, 4477-4479. (c) Chen, Y.; Ruppel, J.V.; Zhang, X.P. *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, *129*, 12074-12075.
29. (a) Nyman, E.S.; Hynninen, P.H. *J. Photochem. Photobiol. B*, **2004**, *73*, 1-28. (b) Chavan, S.A.; Maes, W.; Gevers, L.E.M.; Wahlen, J.; Vankelecom, I.F.J.; Jacobs, P.A.; Dehaen, W.; De Vos, D.E. *Chem. Eur. J.*, **2005**, *11*, 6754-6762.
30. The Porphyrin Handbook - Applications: Past, Present and Future, Kadish, K.M.; Smith, K.M.; Guillard, R. (Eds.) Vol. 6, Academic Press: San Diego, **2000**.
31. Handbook of Porphyrin Science, Kadish, K.M.; Smith, K.M.; Guillard, R. (Eds.) Vols. 1-12, World Scientific Publishing Co: Singapore, **2010**.
32. Gomes, A.T.P.C.; Neves, M.G.P.M.S.; Cavaleiro, J.A.S. *J. Porphyrins Phthalocyanines*, **2011**, *15*, 845-847.
33. Fischer, H.; Medick, H. *Justus Liebigs Ann. Chem.*, **1935**, *517*, 245.
34. Callot, H.J.; Johnson, A.W. *Chem. Commun.*, **1969**, 749-750.
35. (a) Callot, H.J.; *Tetrahedron. Lett.*, **1972**, *11*, 1011-1014. (b) Callot, H.J.; *Bull. Soc. Chim. Fr.*, **1972**, *11*, 4387-4391.
36. Callot, H.J.; Tschamber, T. *Bull. Soc. Chim. Fr.*, **1973**, *5*, 3192-3198.
37. Callot, H.J. *Dalton Trans.*, **2008**, 6346-6357.
38. (a) Jaquinod, L. In *The Porphyrin Handbook*, Kadish, K.M.; Smith, K.M.; Guillard, R. (Eds.), Vol. 1, Academic Press: San Diego, **2000**, pp.201-237. (b) Vicente, M.G.H. In *The Porphyrin Handbook*, Kadish, K.M.; Smith, K.M.; Guillard R. (Eds) Vol. 1, Academic Press: San Diego, **2000**, pp.149-199.
39. Alonso, C.M.A.; Neves, M.G.P.M.S.; Tomé, A.C.; Silva, A.M.S.; Cavaleiro, J.A.S. *Jordan J. Chem.*, **2006**, *1*, 95-107.
40. Gomes, A.T.P.C.; Leão, R.A.C.; Alonso, C.M.A.; Neves, M.G.P.M.S.; Faustino, M.A.F.; Tomé, A.C.; Silva, A.M.S.; Pinheiro, S.; Souza, M.C.B.V.; Ferreira, V.F.; Cavaleiro, J.A.S. *Helv. Chim. Acta*, **2008**, *91*, 2270-2283.
41. Gonsalves, A. M. R.; Varejao, J. M. T. B.; Pereira, M. M. *J. Heterocycl. Chem.*, **1991**, *28*, 635-640.

42. Luguaya, R.; Jaquinod, L.; Fronczek, F.R.; Vicente, M.G.H.; Smith, K.M. *Tetrahedron*, **2004**, *60*, 2757-2763.
43. Candeias, N.R.; Gois, P.M.P.; Afonso, C.A.M. *J. Org. Chem.*, **2006**, *71*, 5489-5497.
44. Zheng, G.; Graham, A.; Shibata, M.; Missert, J.R.; Oseroff, A.R.; Dougherty, T.J.; Pandey, R.K. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 8709-8716.
45. Alguns exemplos: (a) Fujimoto, K.; Miyata, T.; Aoyama, Y. *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, *122*, 3558-3559. (b) Garcia, G.; Naud-Martin, D.; Carrez, D.; Croisy, A.; Maillard, P. *Tetrahedron*, **2011**, *67*, 4924-4932. (c) Zheng, X.; Pandey, R.K. *Anti Canc. Agents Med. Chem.*, **2008**, *8*, 241-268.
46. Silva, F. C.; Ferreira, V. F.; Rianelli, R. S.; Perreira, W. C. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 1165-1168.
47. Ferreira, V.F.; Leão, R.A.C.; Silva, F.C.; Pinheiro, S.; Lhosteb P.; Sinou, D. *Tetrahedron: Asymmetry*, **2007**, *18*, 1217-1223.
48. Oda, K.; Ogura, S.; Osekura, I. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, **2000**, *59*, 20-25.
49. Krasnovsky, A. A. Jr.; Drozdova, N. N.; Ivanov, A. V.; Ambartsumian, R. V. *Biochemistry (Moscow)*, **2003**, *68*, 963-966.
50. (a) Walker, I.; Gorman, S.A.; Cox, R.D.; Vernon, D.I.; Griffiths, J.; Brown, S.B. *Photochem. Photobiol. Sci*, **2004**, *3*, 653-659. (b) Hadjur, C.; Lange, N.; Rebstein, J.; Monnier, P.; Bergh, H.V.D.; Wagnières, G. *Photochem. Photobiol. B: Biol.*, **1998**, *45*, 170-178. (c) Krieg, M. *J. Biochem. Biophys. Methods*, **1993**, *27*, 143-149.
51. DeRosa, M.C.; Crutchley, R. J. *Coord. Chem. Rev.*, **2002**, *233*, 531-571.
52. (a) Moura, N.M.M.; Giuntini, F.; Faustino, M.A.F.; Neves, M.G.P.M.S.; Tomé, A.C.; Silva, A.M.S.; Rakib, E.M.; Hannioui, A.; Abouricha, S.; Röder, B.; Cavaleiro, J.A.S. *Arkivoc*, **2010**, *v*, 24-33. (b) Zenkevich, E.; Sagun, E.; Knyuksho, V.; Shulga, A.; Mironov, A.; Efremova, O.; Bonnett, R.; Songca, S.P.; Kassem, M. *J. Photochem. Photobiol. B*, **1997**, *33*, 171-180.
53. (a) Tang, W.; Xu, H.; Kopelman, R.; Philbert, M.A. *Photochem. Photobiol.*, **2004**, *81*, 242-249.
54. Burdall, S. E.; Hanby, A. M.; Lansdown, M. R. J.; Speirs, V. *Breast Cancer Res.*, **2003**, *5*, 89-95.
55. Capes-Davis, A.; Theodosopoulos, G.; Atkin, I.; Drexler, H. G.; Kohara, A.; MacLeod, R. A. F.; Masters, J. R.; Nakamura, Y.; Reid, Y. A.; Reddel, R. R.; Freshney, R. I. *Int. J. Cancer*, **2010**, *127*, 1-8.
56. Boukamp, P.; Petrussevska, R. T.; Breitkreutz, D.; Hornung, J.; Markham, A.; Fusenig, N. E. *J. Cell Biol.*, **1988**, *106*, 761-771.

57. Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. in *Molecular Biology of the Cell- 5th edition*, Garland Science: New York, **2007**.
58. Lodish, H.; Berk, A.; Matsudaira, P.; Kaiser, C.A.; Krieger, M.; Scott, M.P.; Zipursky, L.; Darnell, J. in *Molecular Cell Biology- 5th edition*, W.H.Freeman and Company: New York, **2004**.
59. Muehlmann, L.A.; Joanitti, G.A.; Silva, J.R.; Longo, J.P.F.; Azevedo, R.B. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **2011**, *44*, 729-737.
60. Mosmann, T. *J. Immunol. Methods*, **1983**, *65*, 55-63.
61. Griegel, S.R.; Ciesiolka, T.; Gabius, H. *J. Anticancer Res.*, **1989**, *9*, 723-730.
62. Vedachalam, S.; Choi, B.; Pasunooti, K.K.; Ching, K.M.; Lee, K.; Yoon, H.S.; Liu, X.W. *Med. Chem. Commun.*, **2011**, *2*, 371-377.
63. Stockert, J. C.; Juarranz, A.; Villanueva, A.; Nonellm, S.; Horobin, R. W.; Soltermann, A. T.; Durantini, E. N.; Rivalona, V.; Colombo, L. L.; Espada, J.; Cañete, M. *Curr. Top. Pharmacol.*, **2004**, *8*, 185-217.
64. Gomes, A.T.P.C.; Leão, R.A.C.; Silva, F.C.; Neves, M.G.P.M.S.; Faustino, M.A.F.; Tomé, A.C.; Silva, A.M.S.; Pinheiro, S.; Souza, M.C.B.V.; Ferreira, V.F.; Cavaleiro, J.A.S. *J. Porphyrins Phthalocyanines*, **2009**, *13*, 248–255.
65. Gomes, A.T.P.C.; Paz, F.A.A.; Neves, M.G.P.M.S.; Tomé, A.C.; Silva, A.M.; Souza, M.C.B.V.; Ferreira, V.F.; Cavaleiro, J.A.S. *Tetrahedron Lett.*, **2011**, *37*, 4741-4744.
66. Hombrecher, H. K.; Gherdan, V. M.; Ohm, S.; Cavaleiro, J. A. S.; Neves, M. G. P. M. S., Condesso, M. F. *Tetrahedron*, **1993**, *49*, 8569-8577.
67. Juarranz, A.; Espada, J.; Stockert, J. C.; Villanueva, A.; Polo, S.; Dominguez, V.; Cañete, M. *Photochem. Photobiol.*, **2001**, *73*, 283-289.
68. Serra, V.V.; Zamarrón, A.; Faustino, M.A.F.; Cruz, M.C.I.; Blázquez, A.; Rodrigues, J.M.M.; Neves, M.G.P.M.S.; Cavaleiro, J.A.S.; Juarranz, A.; Sanz-Rodríguez, F. *Bioorg. Med. Chem.*, **2010**, *18*, 6170–6178.
69. Merlin, J. L.; Azzi, S.; Lignon, D.; Ramacci, C.; Zeghari, N.; Guillemin, F. *Eur. J. Cancer*, **1992**, *28*, 1452-1458.

Capítulo 3

Reacção de Suzuki e macrociclos tetrapirrólicos: síntese de β -arilporfirinas e de derivados quinolona-porfirina com potenciais aplicações em PACT.

3. Reacção de Suzuki e macrociclos tetrapirrólicos: síntese de β -arilporfirinas e de derivados quinolona-porfirina com potenciais aplicações em PACT.

Preâmbulo

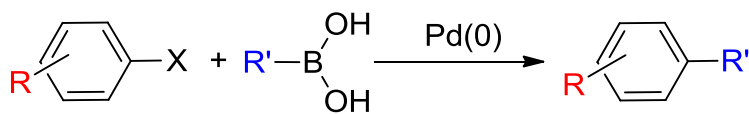
Neste terceiro capítulo da tese será descrito todo o trabalho realizado na síntese de β -arilporfirinas e ainda de sistemas diméricos de porfirinas, macrociclos estes ligados por unidades de oligofenileno, recorrendo à reacção de acoplamento de Suzuki. A versatilidade desta reacção permitiu, ainda, sintetizar novos derivados quinolona-porfirina com potencial aplicações em PACT; os estudos de síntese, caracterização estrutural e avaliação biológica serão apresentados na segunda parte deste capítulo. Assim, antes de mostrar os estudos desenvolvidos através dessa metodologia, serão mostrados os fundamentos teóricos dessa reacção tão versátil e alguns estudos reportados na literatura de funcionalização de macrociclos tetrapirrólicos usando tal metodologia.

3.1. Reacção de Suzuki-Miyaura

Em 1979, Miyaura, Yamada e Suzuki reportaram o estudo que lançou as bases para o que é agora uma das mais importantes e úteis transformações na química orgânica moderna que se centra na construção de novas ligações carbono-carbono.¹ Apesar deste estudo reportar simples reacções de acoplamento entre boronatos de alquilo/arilo e brometos de alquilo/arilo, ao longo dos últimos 25 anos as contribuições de muitos outros grupos de investigação levaram ao aperfeiçoamento de tal metodologia, a qual é conhecida como a reacção de acoplamento de Suzuki-Miyaura, ou simplesmente reacção de Suzuki.²

Em que consiste esta reacção?

A reacção de Suzuki define-se como sendo o acoplamento, catalisado por paládio, de boronatos orgânicos e haletos de alquilo ou arilo (Esquema 3.1).^{2,3,4}



Esquema 3.1.

Apesar de existirem outros métodos eficazes na construção de novas ligações carbono-carbono, como é o caso dos acoplamentos, por exemplo, de Negishi, de Stille, de Kumuda, o acoplamento de Suzuki tornou-se bastante popular por permitir a construção de sistemas bis-arilo. As maiores vantagens desta reacção estão no facto de requerer condições reaccionais suaves e na disponibilidade comercial de diversos ácidos borónicos que são menos tóxicos e poluentes dos que muitos reagentes organometálicos.³

Esta reacção de acoplamento de Suzuki ganhou destaque nos últimos anos devido ao desenvolvimento de condições ideais para se poder realizar a síntese em larga escala e até com uso na indústria farmacêutica e química. Neste contexto, foram sintetizados diversos sistemas bis-arílicos através desse acoplamento, os quais foram considerados para estudos de relação estrutura/actividade (SAR).⁵

A versatilidade desta reacção e a sua importância em química orgânica valeu a Akira Suzuki o Prémio Nobel da Química em 2010, juntamente com Richard F. Heck e Ei-ichi Negishi pelos seus estudos sobre o desenvolvimentos de reacções de acoplamento, catalisadas por paládio, em síntese orgânica.⁶

O mecanismo

O mecanismo desta transformação envolve a adição oxidativa do haleto à espécie de Pd(0) formando a espécie organopaládio(II) **A** (Figura 3.1), o qual, sob acção da base usada, origina o derivado **B**.⁷ O passo seguinte deste ciclo é a transmetalacção com o boronato **C**, formado através da reacção do borano inicial com

base, formando nova espécie de Pd(II) **D**.^{4,5} O último passo deste ciclo envolve a eliminação redutiva formando o produto de acoplamento **E** e regenerando Pd(0).⁷

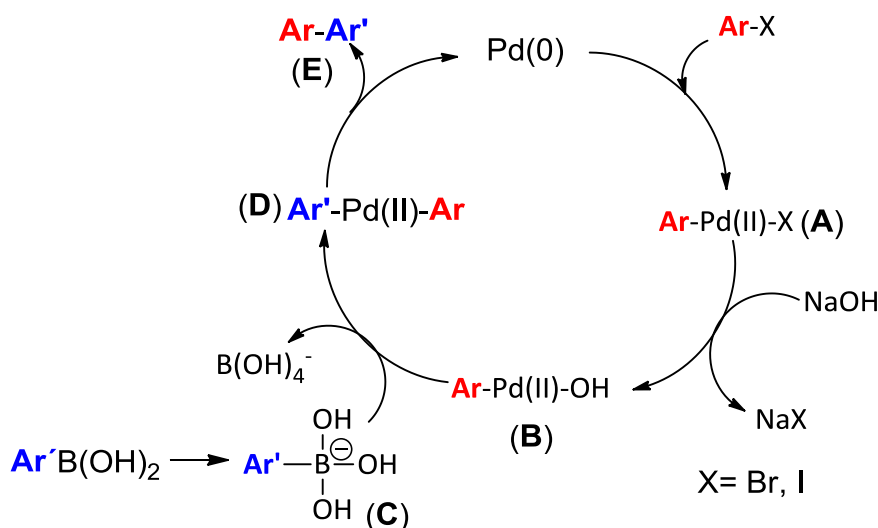
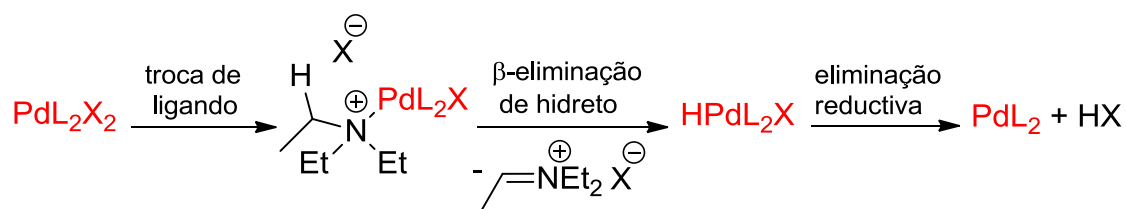


Figura 3.1. Ciclo catalítico da reacção de acoplamento de Suzuki-Miyaura.

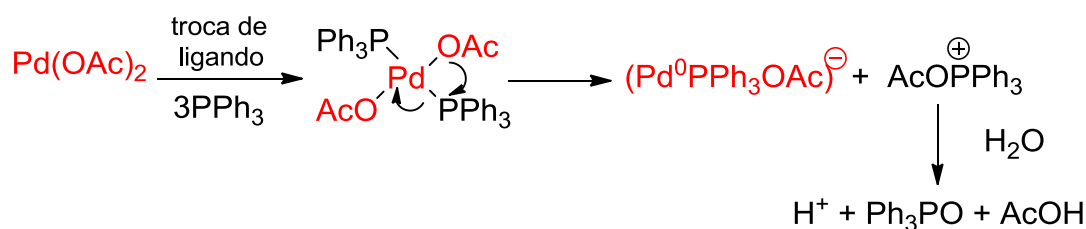
É sabido que a base usada é envolvida na esfera de coordenação do paládio e a formação do complexo Ar-Pd-OH (**B**) acelera o passo da transmetalização. A base mais comum para esta reacção é o Na_2CO_3 , contudo tal base é ineficaz quando se usam substratos impedidos estereamente. Nestes casos, é comum o uso de $\text{Ba}(\text{OH})_2$ ou K_3PO_4 . Podem também ser usados como base o Cs_2CO_3 , K_2CO_3 e NaOH .^{5,7}

Existe uma variedade de catalisadores de paládio (0) ou seus precursores que se podem usar em reacções de Suzuki. Por exemplo, $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ é o mais usado, mas o $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ e o $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ com a adição de fosfinas são também eficientes, uma vez que são estáveis ao ar e se reduzem rapidamente a complexos de Pd(0) com a ajuda das fosfinas.⁵ A formação destas espécies activas de Pd(0) é realizada *in situ* através da adição de aminas, fosfinas, alcenos ou reagentes organometálicos. Na figura 3.2 são apresentados alguns dos mecanismos de formação das espécies de Pd(0) a partir de precursores de Pd(II). No caso em que a redução ocorre na presença de uma amina, a adição de um excesso desta visa neutralizar o HX e também actuar como agente redutor do Pd(II).^{2,3}

Redução com Et₃N



Redução com PPh₃



Redução com reagente organometálico

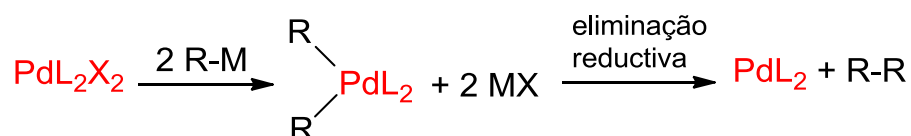


Figura 3.2. Mecanismos de formação das espécies de Pd(0) a partir complexos de Pd(II)

Como Já foi referido, em reacções de Suzuki são geralmente usados haletos de arilo (brometos ou iodetos) para acoplar com boronatos. Como alternativa aos haletos, os triflatos substituídos com grupos sacadores de electrões têm também sido considerados. No entanto, a sua propensão à hidrólise torna a reacção de acoplamento de Suzuki pouco eficiente.⁴

Atendendo à reactividade dos vários haletos no passo da adição oxidativa (I > Br >> Cl) a reacção de Suzuki é particularmente eficiente quando são utilizados brometos e iodetos.⁷ No entanto, esta diferença de reactividade pode ser uma vantagem em síntese orgânica. Por exemplo, podem ser usados substratos com vários grupos funcionais em processos de funcionalização em diferentes etapas consecutivas. Por exemplo, o ácido fenilborónico reage com 4-bromo-clorobenzeno na presença de Pd(PPh₃)₄ exclusivamente na posição bromada, formando 4-clorobifenilo.^{4,5}

Existem, no entanto, alguns desafios a serem ultrapassados na reacção de Suzuki. Nestas reacções podem-se formar alguns produtos indesejáveis, tais como produtos de acoplamento directo e produtos resultantes do acoplamento de fosfina ao grupo arilo. O catalisador mais usado nestas reacções, o $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, promove a formação do derivado em que o grupo fenilo de uma PPh_3 se incorpora no grupo arilo. No entanto, o uso de uma fosfina impedida estereamente, como seja $(o\text{-MeOC}_6\text{H}_4)_3\text{P}$, evita estas reacções paralelas. A formação dos produtos de acoplamento directo pode ser evitada usando sistemas reaccionais livres de oxigénio.³

3.2. Funcionalização de porfirinas através da Reacção de Suzuki

Como já foi referido, a reacção de acoplamento de Suzuki de compostos de organoboro com haletos de arilo na presença de um catalisador de paládio é uma das ferramentas mais versáteis para construir novas ligações carbono-carbono, especialmente para a formação de sistemas assimétricos contendo grupos bis-arilo.^{7,8} Esta metodologia tem vindo a ser extensivamente usada na funcionalização de porfirinas principalmente nas posições *meso*.^{9,10,11} No entanto, estudos envolvendo este tipo de reacção na modificação estrutural de *meso*-tetra-arilporfirinas nas posições β -pirrólicas também têm sido considerados. Devido ao interesse na funcionalização de porfirinas nas suas posições β -pirrólicas dadas as alterações físicas e químicas que tais transformações podem provocar, será feita uma pequena revisão realçando os trabalhos encontrados na literatura usando a versatilidade da reacção de Suzuki na β -funcionalização de macrociclos tetrapirrólicos.

Porfirinas como haletos de arilo em reacções de Suzuki

A possibilidade de usar *meso*-tetra-arilporfirinas como haletos de arilo em reacções de acoplamento de Suzuki foi considerada várias vezes. Por exemplo, Chan *et al.* prepararam mono-, tetra- e octa- β -aril ou β -alquil *meso*-tetra-arilporfirinas **37**, **38** e **39** (Figura 3.3) usando, como material de partida, β -bromo-arilporfirinas adequadas.

Como unidade borónica foram usados diversos ácidos borónicos aromáticos ou alifáticos.^{12,13}

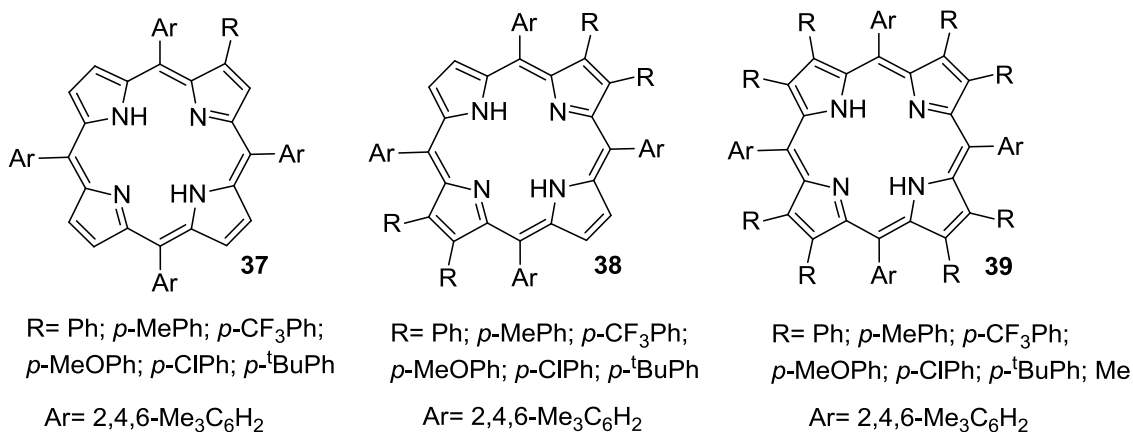
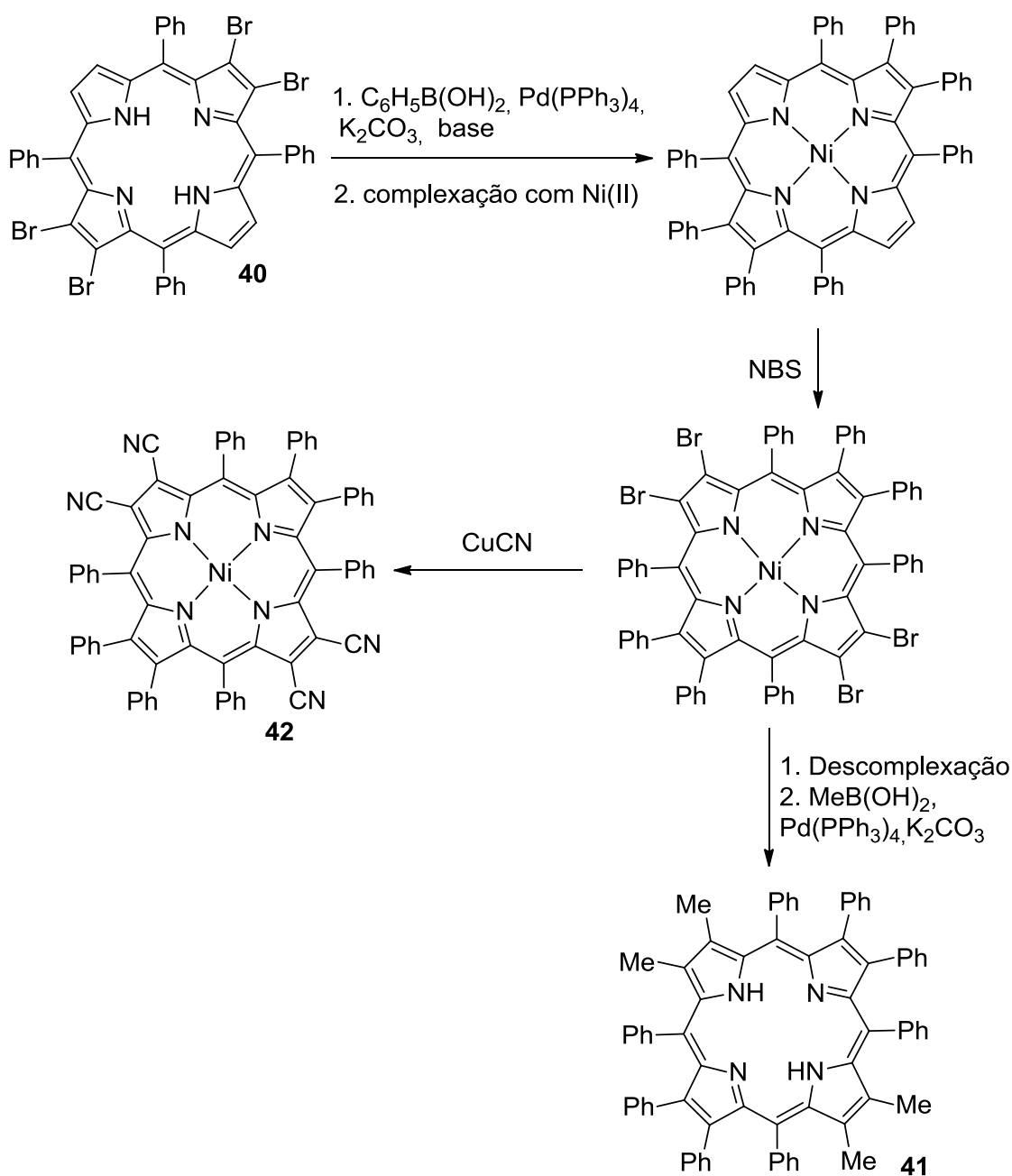


Figura 3.3. Estruturas das mono-, tetra- e octa- β -aril ou β -alquil *meso*-tetra-arilporfirinas **37**, **38** e **39** sintetizadas por Chan.

Em 2000, o mesmo grupo estendeu a metodologia para a funcionalização da 5,10,15,20-tetraquis(trifluorometil)porfirina através da reacção de Suzuki com diversos boranos, originando β -arilporfirinas deficientes em electrões.¹⁴ Este tipo de abordagem foi usada por também por outros grupos para introduzir nas posições β -pirrólicas inúmeros substituintes aromáticos e alifáticos.^{15,16}

Um estudo muito interessante publicado em 2006 envolveu a reacção de Suzuki da 2,3,12,13-tetrabromo-5,10,15,20-tetrafenilporfirina **40** com ácido fenilborónico, seguido de bromação do seu complexo de níquel (Esquema 3.2).¹⁶ A reacção do derivado bromado com CuCN ou uma segunda reacção de Suzuki com ácido metilborónico originou os derivados porfirínicos substituídos com grupos metilo **41** ou ciano **42** (Esquema 3.2).

Reacção de Suzuki e macrociclos tetrapirrólicos: síntese de β -arilporfirinas e de derivados quinolona-porfirina com potenciais aplicações em PACT



Esquema 3.2.

Esta abordagem foi também útil para preparar porfirinas β -substituídas comportando na posição *meso* uma carga positiva.¹⁷ O procedimento para síntese dos derivados catiónicos **43** (Figura 3.4) envolveu a reacção de nitração do derivado tetrabromado **40** seguida de acoplamento de Suzuki com os ácidos borónicos $\text{MeB}(\text{OH})_2$ e $\text{PhB}(\text{OH})_2$. O último passo envolveu a redução do grupo nitro seguido de metilação com iodeto de metilo. Os estudos de intercalação de DNA destes compostos

mostraram que para haver interacção entre o ácido desoxirribonucleico e os derivados porfirínicos é essencial a β -substituição nas porfirinas.¹⁷

Em 2006, He *et al.* reportaram a síntese de derivados octa-substituídos mono e dicatiónicos recorrendo a uma metodologia muito semelhante à anterior.¹⁸ Estudos de intercalação com o DNA mostraram que o derivado dicatiónico **44** apresenta uma elevada capacidade de quebra a cadeia de DNA (Figura 3.4).

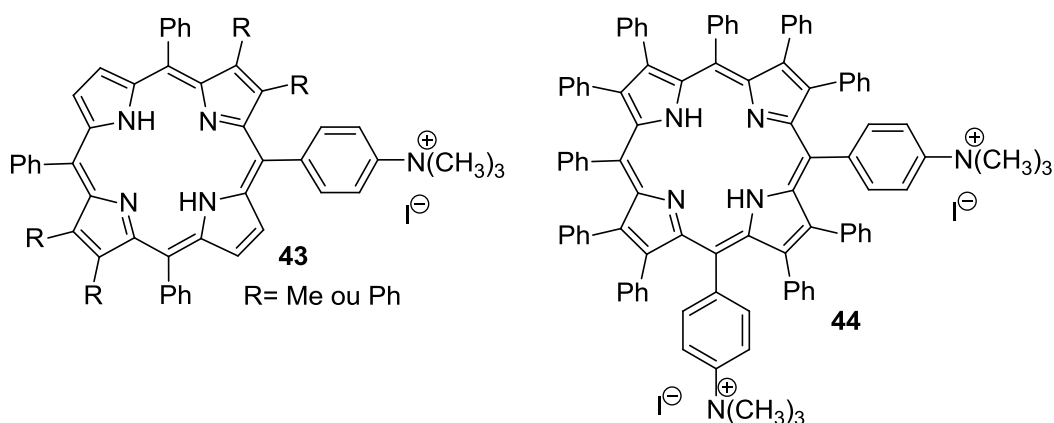


Figura 3.4. Estrutura do derivado catiónico **43** e do derivado dicatiónico **44**.

O mesmo grupo estendeu este estudo para preparar o derivado **45** (Figura 3.5) a partir da *meso*-tetraquis(4-metoxycarbonilfenil)porfirina.¹⁹ Assim, e depois de convenientemente bromada a porfirina de partida, seguiu-se a reacção de acoplamento de Suzuki com PhB(OH)₂ como borano. O derivado **45** foi considerado um potencial agente antitumoral induzindo morte por apoptose. Foi também mostrado que este composto inibe a Topoisomerase I, o que pode justificar a morte celular observada em células tumorais.¹⁹

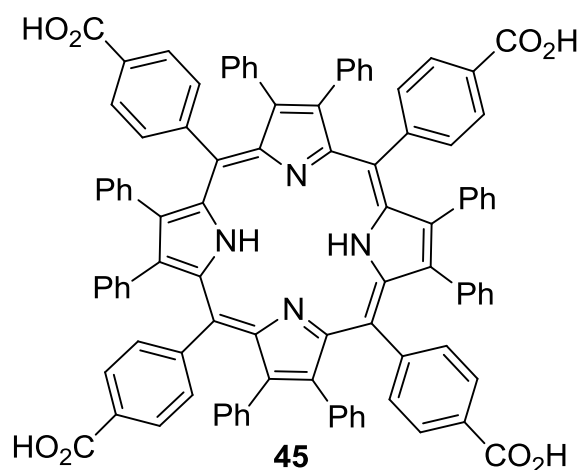
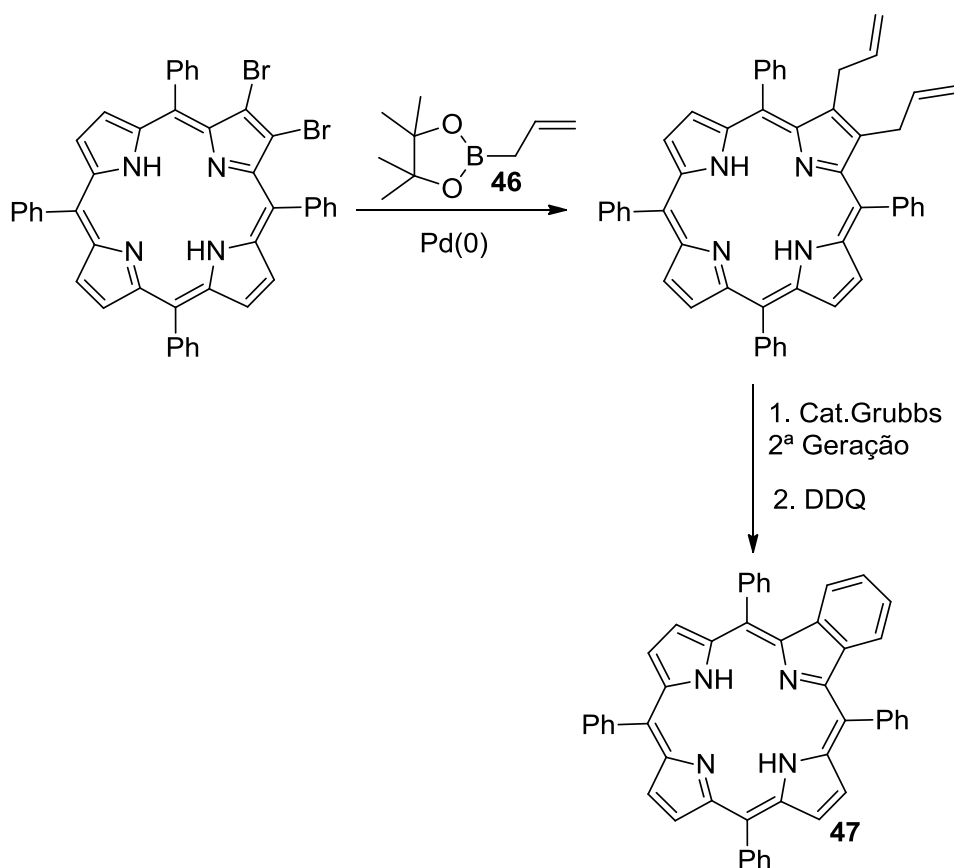


Figura 3.5. Estrutura da β -octafenil-*meso*-tetra(4-carboxi)fenilporfirina **45**.

A versatilidade da reacção de Suzuki foi usada como uma nova rota sintética para síntese de mono-, di- ou tribenzoporfirinas por Smith *et al.*²⁰ Também neste caso os produtos de partida foram porfirinas poli-bromadas nas posições β -pirrólicas (di, tetra e hexa) e as suas reacções de Suzuki com 2-alil-4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolano **46** na presença de um catalisador de paládio, originaram os derivados porfiríricos com grupos alilo. As benzoporfirinas **47-49** foram obtidas com bons rendimentos através da reacção de metátese na presença do catalisador de Grubbs de 2ª geração, seguida de oxidação com DQQ (Esquema 3.3 e Figura 3.6).



Esquema 3.3.

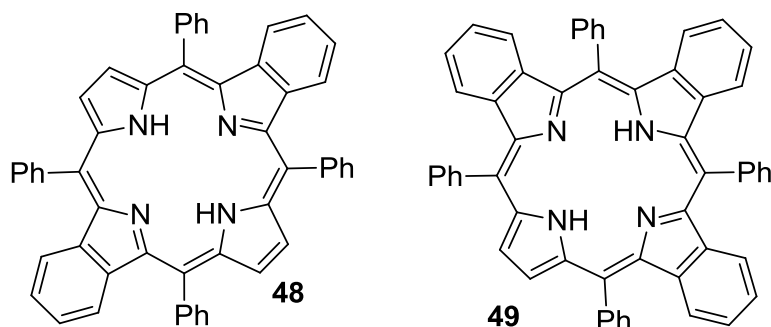
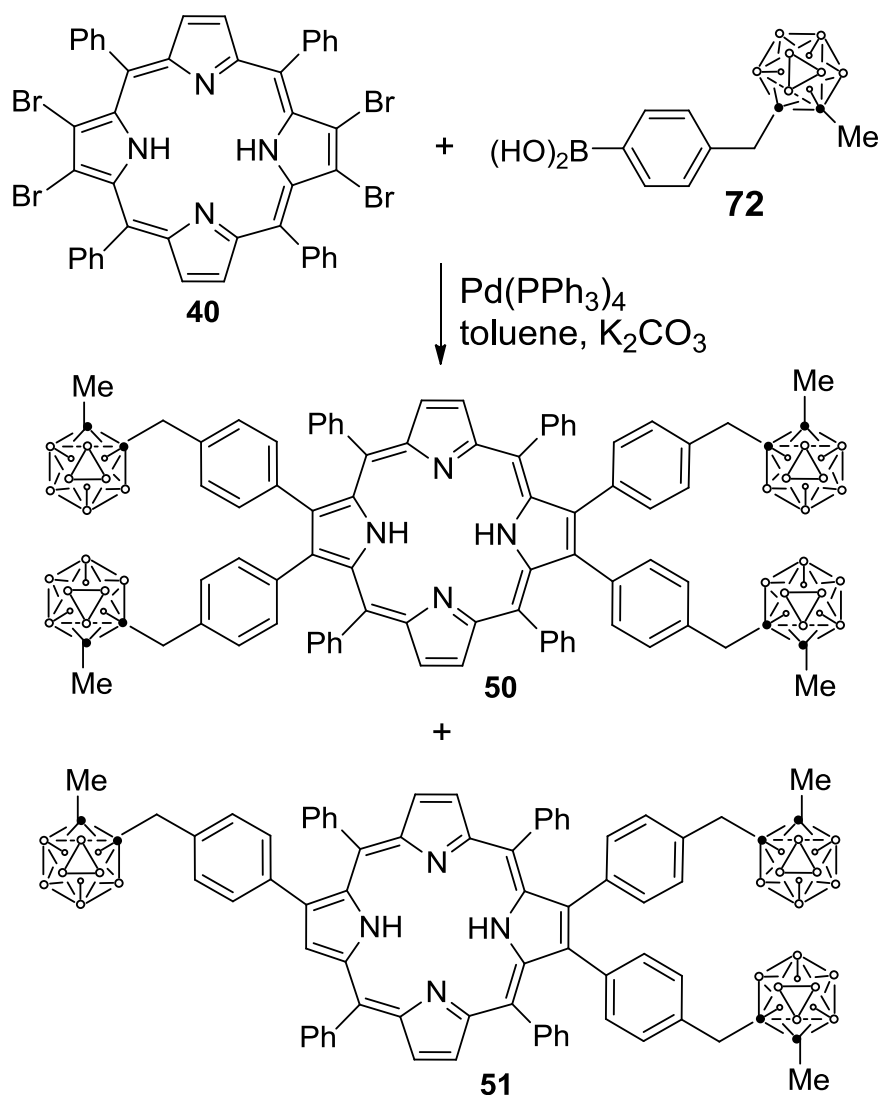


Figura 3.5. Estruturas das benzoporfirinas 48 e 49.

A síntese das carboranilporfirinas 50 e 51 foi reportada por Vicente *et al.* em 2006 através do acoplamento de Suzuki entre a 2,3,12,13-tetrabromo-TPP 40 com os ácidos borónicos na presença de Pd(PPh₃)₄ (Esquema 3.4). Esta estratégia sintética foi estendida ao complexo de níquel da β -octabromo-TPP, originando a β -octacarboranil-

meso-tetrafenilporfirina.²¹ Devido à presença de ligações carbono-carbono estáveis, os autores deste trabalho acreditam que estes derivados podem ser usados em terapia de captura de neutrões pelo boro (BNCT) de tumores.

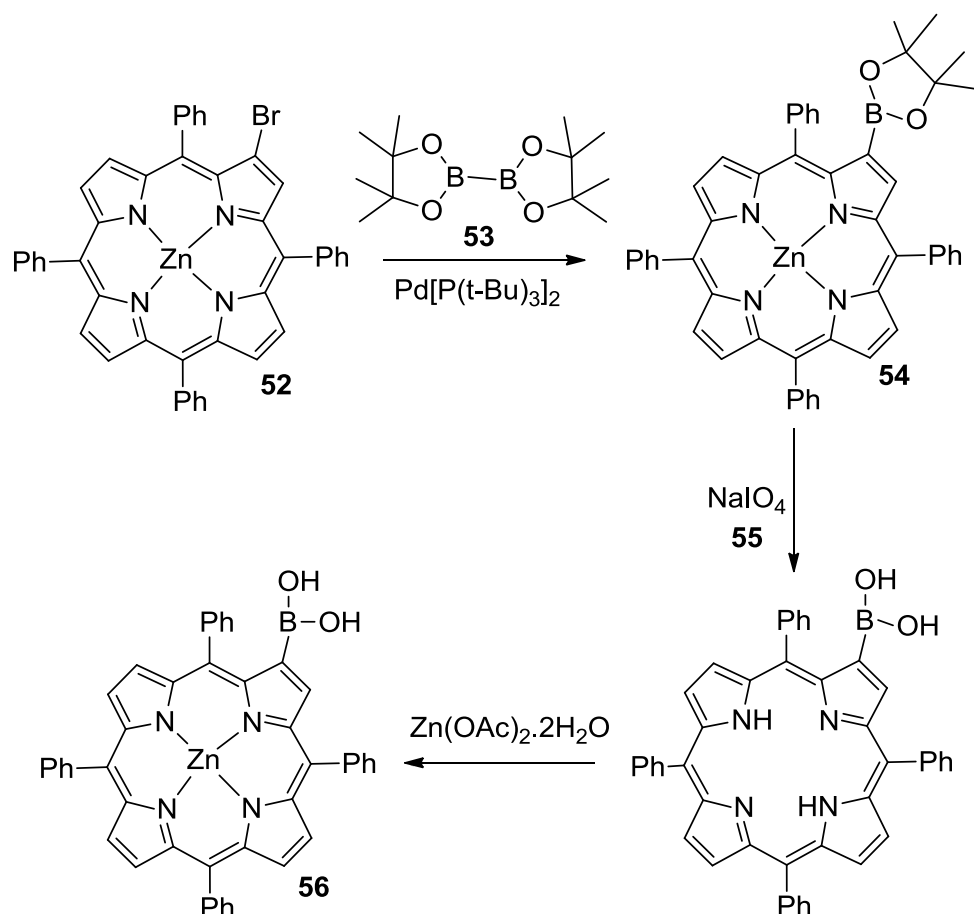


Esquema 3.4.

Porfirinas como boronatos em reacções de Suzuki

A possibilidade de usar o macrociclo porfirínico como componente organoborano já foi também estudada, porém não tão intensivamente como o descrito no ponto anterior.

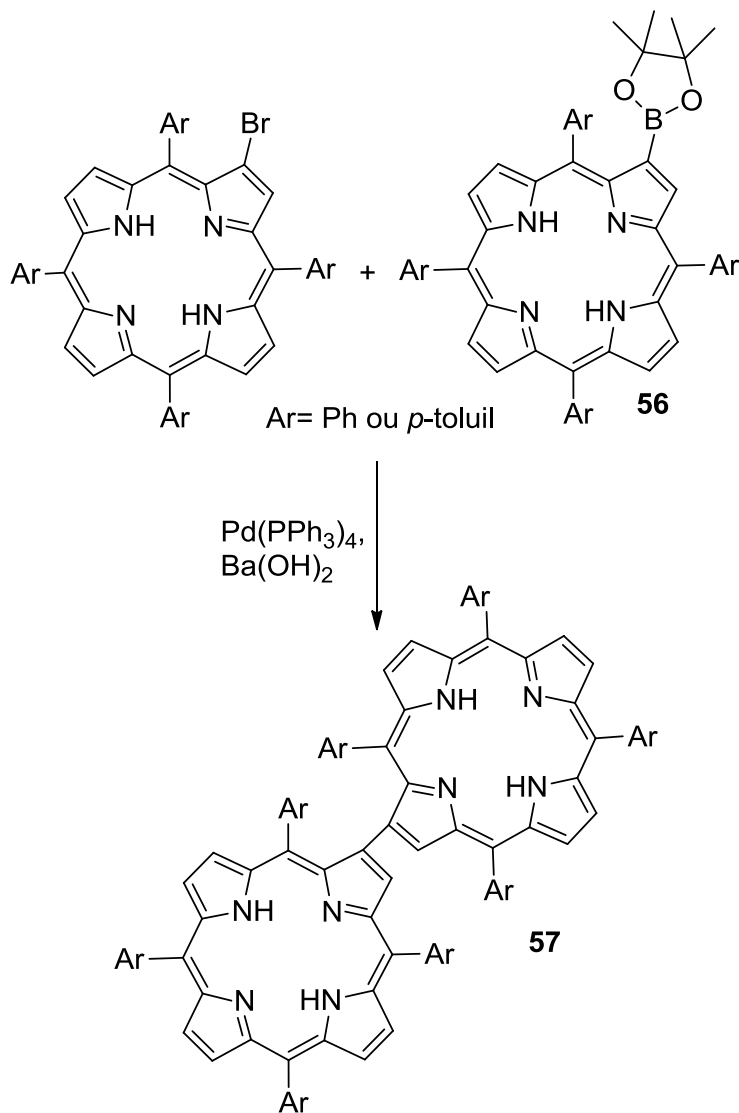
Em 2005, Suslick reportou a síntese de derivados porfirínicos β -borilados (Esquema 3.5) através do acoplamento de Suzuki-Miyaura entre o complexo de zinco da β -bromo-5,10,15,20-tetrafenilporfirina **52** e o borano **53** na presença de $\text{Pd}[\text{P}(\text{t-Bu})_3]_2$.²² A desprotecção com periodato de sódio **55** seguida de metalacção com ião zinco, originou, com bons rendimentos, o composto β -borilado **56**. Este derivado e o derivado *meso*-borilado sintetizado também no decorrer deste trabalho foram testados como potenciais sensores colorimétricos para glucose e frutose. No entanto, não foram detectadas alterações nos seus espectros de visível e fluorescência. Este facto foi justificado pela baixa conjugação electrónica entre o sistema π da porfirina e o substituinte borónico.²²



Esquema 3.5.

As porfirinas β -boriladas **56** foram utilizadas em 2006 por Bringmann *et al.* para preparar os derivados diméricos **57** nos quais os derivados porfirínicos estão directamente ligados pelas posições β -pirrólicas (Esquema 3.6).^{23,24} As reacções de

acoplamento entre β -bromo-porfirinas com derivados porfirínicos β -borilados **56** na presença de $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ e $\text{Ba}(\text{OH})_2$ como base originaram os sistemas diméricos quirais **57** com rendimentos superiores a 50%



Esquema 3.6.

A borilação directa do macrociclo porfirínico através da quebra da ligação C-H catalisada por irídio foi explorada por Osuka *et al.* como um método alternativo ao acoplamento de bromoporfirinas com pinacolborano na presença do catalisador de paládio.²⁵ Os autores mostraram que os catalisadores de irídio são capazes de discriminar posições com diferentes impedimentos estéreos ocorrendo a borilação selectiva nas posições β -pirrólicas.

A construção de sistemas elaborados multiporfirínicos da reacção de Suzuki através desta abordagem deu origem a uma revisão muito interessante.²⁶

3.3. Estudos de funcionalização de porfirinas através da reacção de Suzuki

Sabendo que os estudos envolvendo a reacção de Suzuki na funcionalização de porfirinas nas posições β -pirrólicas podem produzir compostos com características químicas e físicas interessantes, decidiu-se explorar a versatilidade desta reacção para preparar novas *meso*-tetra-arilporfirinas contendo grupos arilo nas posições β -pirrólicas. Propôs-se, também, aplicar a versatilidade desta reacção na síntese de sistemas diméricos de porfirinas ligadas por unidades de oligofenileno.

Para o estudo da síntese de β -arilporfirinas através da reacção de Suzuki, foi necessário seleccionar o reagente porfirínico adequado para estas reacções. Para tal, consideram-se duas possibilidades:

1. Usar-se como material de partida um derivado porfirínico bromado numa das posições β -pirrólicas, o que implicaria recorrer a derivados borilados para o acoplamento.

2. Usar-se como material de partida um porfirina β -borilada, o que implicaria realizar o acoplamento na presença de derivados bromados.

Uma vez que a disponibilidade de reagentes comerciais bromados é muito maior do que a de derivados borilados, decidiu-se optar por usar como material porfirínico de partida uma porfirina β -borilada, nomeadamente o complexo porfirínico **54** descrita em 2005 por Suslick.

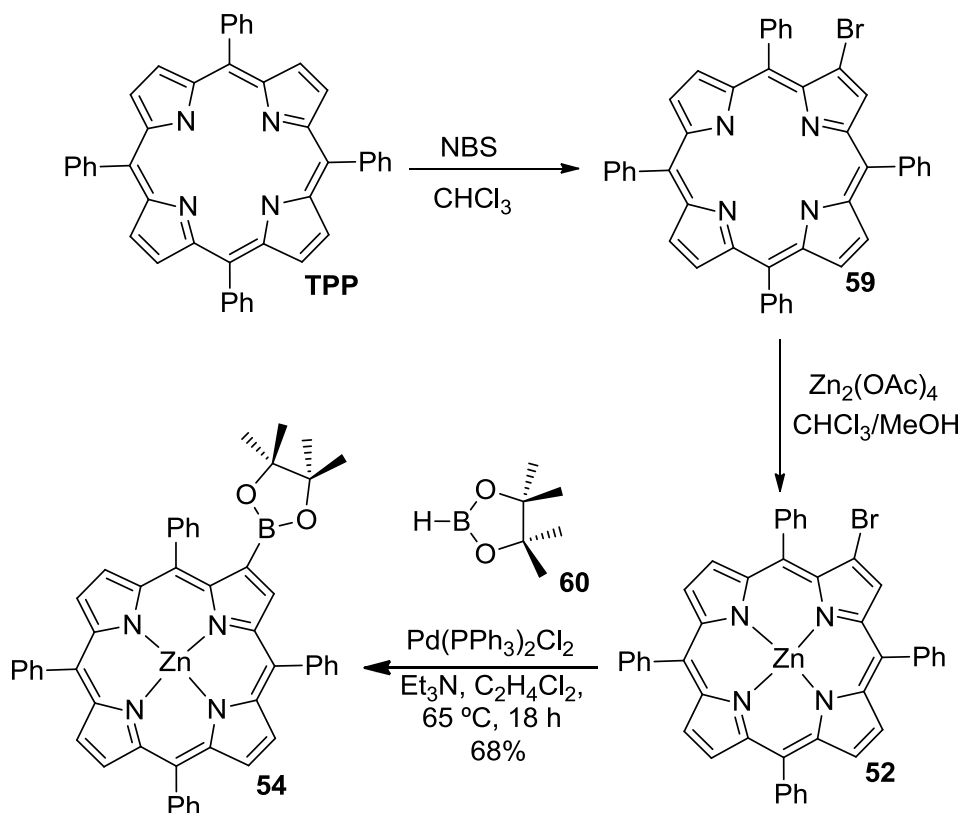
Esta porfirina foi preparada usando um estratégia similar à usada por Suslick (Esquema 3.7). Para tal, foi necessário preparar a 2-bromo-5,10,15,20-tetrafenilporfirinatozinc(II) **52** que foi sintetizada de acordo com o procedimento descrito na literatura.²⁷ Assim, fez-se reagir a *meso*-tetrafenilporfirina (**TPP**) com *N*-bromossuccinimida em clorofórmio a refluxo, durante uma hora, quando se verificou que a **TPP** tinha sido consumida quase na totalidade. A reacção foi terminada lavando

a mistura reaccional com uma solução de hidrogenocarbonato de sódio, seguindo-se a extracção com clorofórmio e secagem em sulfato de sódio anidro da fase orgânica. Depois da purificação da mistura reaccional por cromatografia em coluna de sílica gel usando como eluente uma mistura de tolueno/éter de petróleo (2:1), a 2-bromo-5,10,15,20-tetrafenilporfirina **59** foi obtida com um rendimento de 36%.

Seguiu-se a síntese do complexo de zinco **52** que foi realizada em clorofórmio a refluxo na presença de uma solução metanólica de acetato de zinco (II).²⁸ Depois do término da reacção (ver parte experimental) o complexo de zinco **52** foi obtido quantitativamente. É de referir que a protecção do interior do macrociclo na forma de complexo de zinco antes do acoplamento de Suzuki é fundamental, atendendo que estas reacções ocorrem, geralmente, a temperaturas que rondam os 80°C existindo, assim, a possibilidade do ião paládio complexar com a porfirina de partida deixando de actuar como catalisador.

Para preparar o complexo porfirínico β -borilado **54** recorreu-se à reacção de Suzuki do complexo **52** com o 4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolano (pinacol borano **60**) na presença de Pd(PPh₃)₂Cl₂ como catalisador, em alternativa aos reagentes usados por Suslick.¹² Esta reacção de acoplamento foi realizada em tubo de Schlenk de 50 mL em vez do balão tradicional e em atmosfera de argón, de modo a minimizar a presença de oxigénio e evitar reacções paralelas já referidas. Assim, o complexo **52** e o Pd(PPh₃)₂Cl₂ seleccionados, depois de colocados no tubo de Schlenk, foram dissolvidos em 1,2-dicloroetano seco e em trietilamina. Seguiu-se a adição do pinacol borano **60**. Antes de selar o tubo, este foi sujeito a um processo de desgasificação ligando-o a uma bomba de vácuo e sonificado em ultra-sons durante 2 minutos (ver parte experimental). A mistura reaccional foi mantida em agitação a 65°C durante a noite (Esquema 3.7). Findo este tempo, o controlo da reacção por TLC mostrou que existia pouca porfirina de partida, observando-se a formação de um composto mais polar maioritário. Assim, optou-se por terminar a reacção, lavando-a com uma solução aquosa de NaCl. A fase orgânica foi extraída com clorofórmio, lavada com água destilada e seca em sulfato de sódio anidro e o solvente foi removido a pressão reduzida. O resíduo obtido foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel usando clorofórmio como eluente.

O derivado β -borilado **54** foi cristalizado em clorofórmio/hexano e obtido com 68% de rendimento.



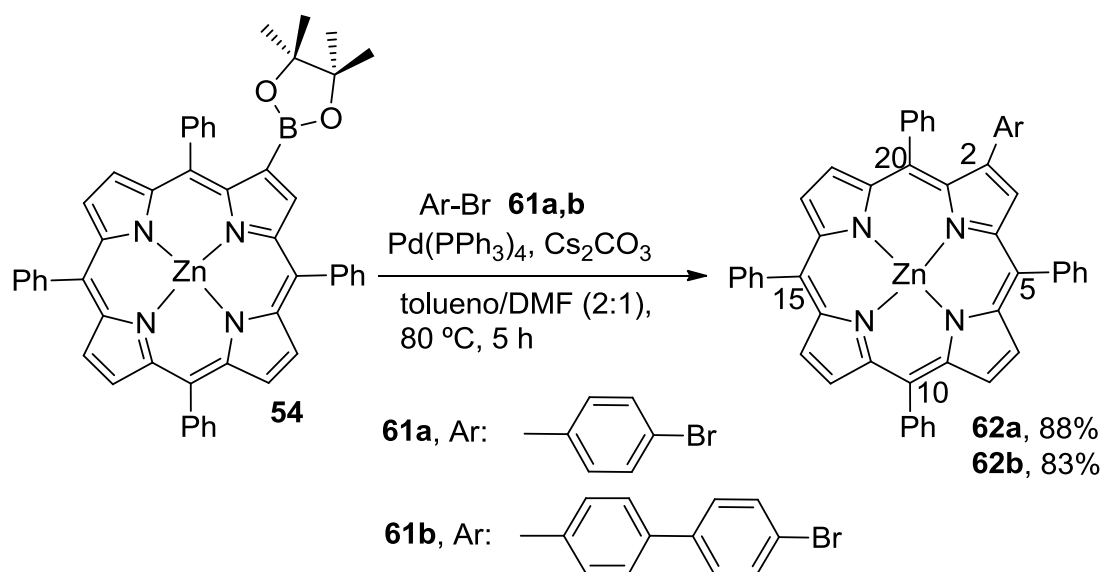
Esquema 3.7.

O espectro de RMN de ^1H mostrou ser igual ao reportado por Suslick¹² e o seu espectro de massa em HRMS-ESI confirmou a sua fórmula molecular.

3.3.1. Síntese de complexos β -arilporfirínicos através da reacção de Suzuki

A síntese das novas *meso*-tetra-arilporfirinas contendo grupos arilo nas posições β -pirrólicas envolveu a reacção de acoplamento de Suzuki entre o complexo porfirínico β -borilado **54** e os derivados halogenados seleccionados: 1,4-dibromobenzeno **61a** e 4,4'-dibromo-1,1'-bifenilo **61b**. Esta escolha teve em conta o facto de estes haletos de arilo serem não só comercializados, mas também por serem bifuncionais, apresentando um segundo átomo de bromo que, após o primeiro acoplamento, pode permitir novas derivatizações.

As reacções de Suzuki entre o complexo porfirínico β -borilado **54** e estes brometos de arilo foram realizadas em condições um pouco diferentes da referida anteriormente, pois considerou-se que este acoplamento deveria ser mais difícil do que o da síntese da porfirina β -borilada **54**, atendendo ao tipo de substrato. Assim, optou-se por usar um sistema de solventes que permitisse aumentar a temperatura de reacção, neste caso uma mistura de tolueno e DMF. Como base escolheu-se o Cs_2CO_3 , totalmente solúvel em tolueno e também considerado eficaz em reacções de Suzuki. O catalisador de paládio escolhido foi o $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$. Este catalisador tem sido reportado como o mais eficiente na reacção de acoplamento entre boronatos de arilo e halogenatos de arilo.^{17,19,29} Também neste caso, as reacções foram realizadas num tubo de Schlenk convenientemente selado. Assim, o complexo porfirínico β -borilado **54**, os brometos de arilo **61a** e **61b**, o Cs_2CO_3 e o catalisador de paládio foram colocados num tubo de Schlenk. De seguida, estes sólidos foram dissolvidos numa mistura de tolueno e DMF e o tubo foi selado tal como anteriormente descrito. Estas reacções foram mantidas sob agitação a 80°C durante 5 horas. Findo este tempo, verificou-se o consumo total do complexo porfirínico β -borilado **54** e a formação de um composto menos polar. As reacções foram, então, terminadas lavando a mistura com uma solução aquosa de NaCl. As fases orgânicas das reacções foram extraídas com clorofórmio, lavadas com água destilada e secas em sulfato de sódio anidro. Após a remoção do solvente a pressão reduzida, os resíduos foram purificados por TLC preparativa, tendo-se obtido os complexos β -arilporfirínicos **62a** e **62b** com rendimentos superiores a 80% (Esquema 3.8).

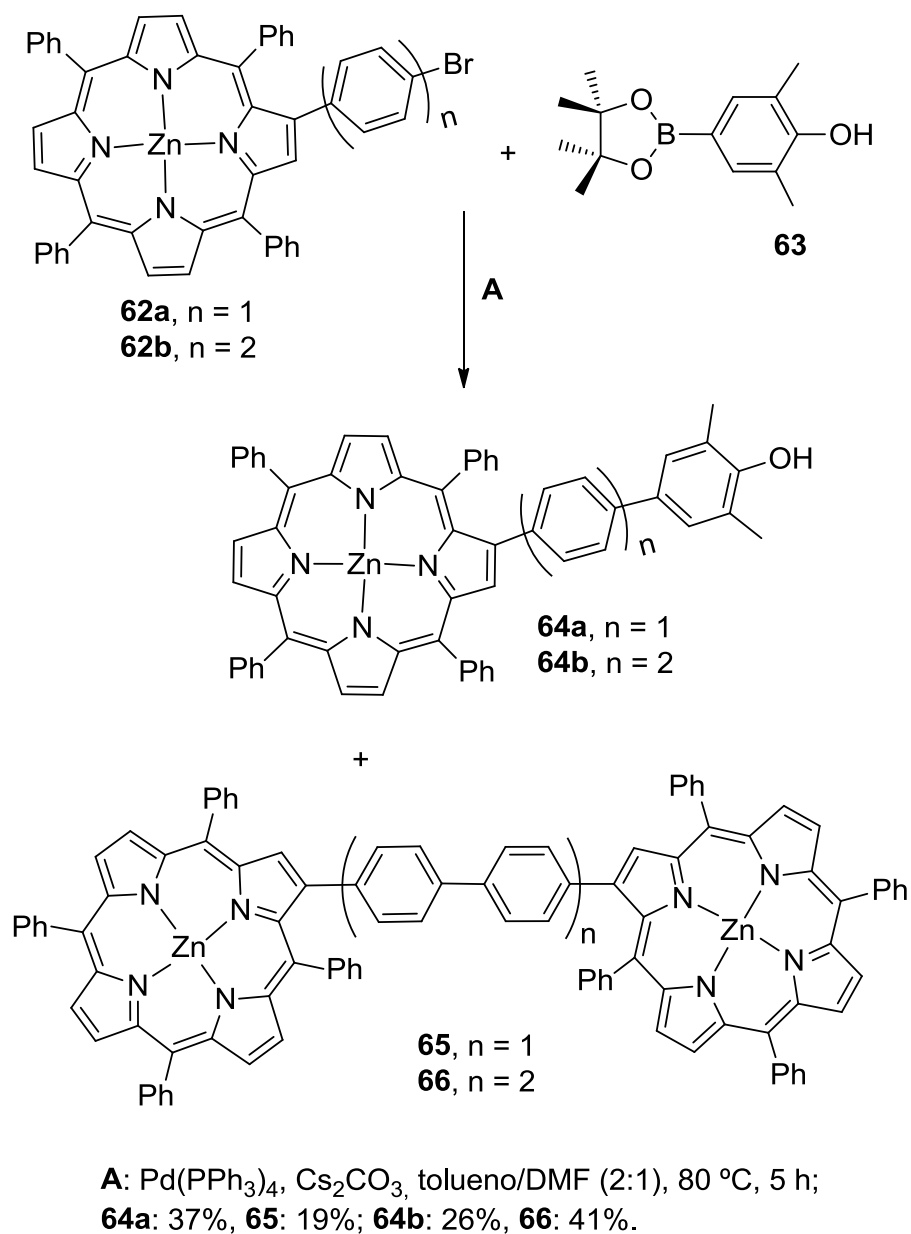


Esquema 3.8.

Uma vez que os resultados destas reacções foram bastantes encorajadores, decidiu-se usar os complexos bromo-arilporfirínicos **62** como brometos de arilo na reacção de Suzuki com o borano **63** (Esquema 3.9). Estas reacções foram realizadas nas mesmas condições das anteriores. Decorridas as 5 horas de reacção, o TLC da mistura reaccional mostrou que todo o material de partida tinha sido consumido originando dois novos compostos. A reacção com o complexo **62a** originou o produto esperado de acoplamento cruzado de Suzuki, o derivado **64a** com um rendimento de 37%, assim como o dímero **65** com um rendimento de 26%. Da mesma forma, o complexo porfirínico **62b** reagiu com o borano **63** originando o produto esperado de acoplamento cruzado de Suzuki **64b** acompanhado pelo dímero **66**, com rendimentos de 26 e 41%, respectivamente.

Apesar de não esperados, a formação dos dímeros **65** e **66** pode ser justificada pelo acoplamento directo entre os complexos bromo-arilporfirínicos **62**.³⁰

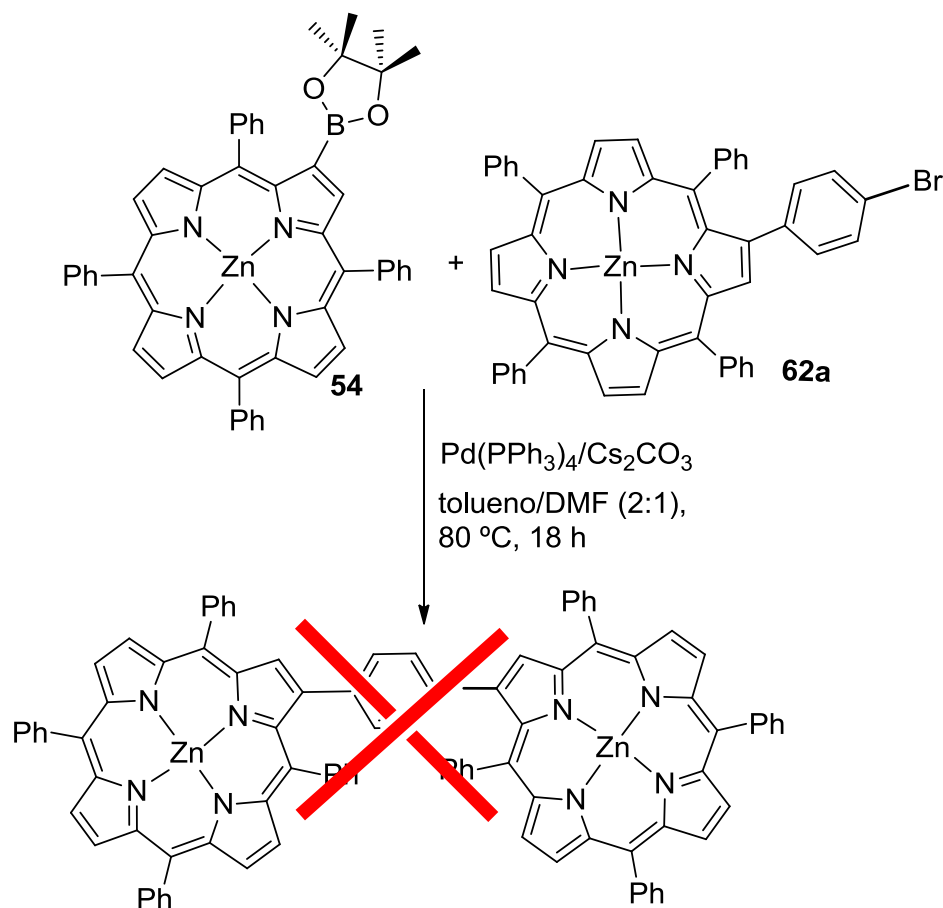
Reacção de Suzuki e macrociclos tetrapirrólicos: síntese de β -arilporfirinas e de derivados quinolona-porfirina com potenciais aplicações em PACT



Esquema 3.9.

A formação dos sistemas diméricos **65** e **66** permitiu estender este estudo à reacção de Suzuki entre os derivados **62a** e **62b** com o complexo porfirínico β -borilado **54** para a síntese de compostos diméricos unidos por unidades de oligofenileno (Esquemas 3.10 e 3.11). As reacções foram realizadas exactamente nas mesmas condições descritas anteriormente.

Assim, a reacção de acoplamento entre o complexo porfirínico β -borilado **54** com o complexo **62a** não teve lugar (Esquema 3.10). Este facto pode ser devido ao elevado efeito de conjugação existente entre o fenilo da posição β -pirrólica e o macrociclo porfirínico e ao impedimento estérico aquando da formação da segunda espécie de organopaládio durante o ciclo catalítico (Figura 3.6). A proximidade dos dois grupos volumosos deverá impedir o passo da eliminação redutiva.



Esquema 3.10.

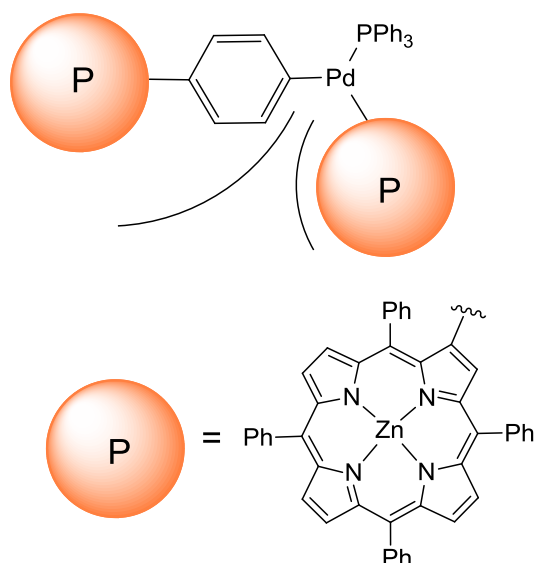
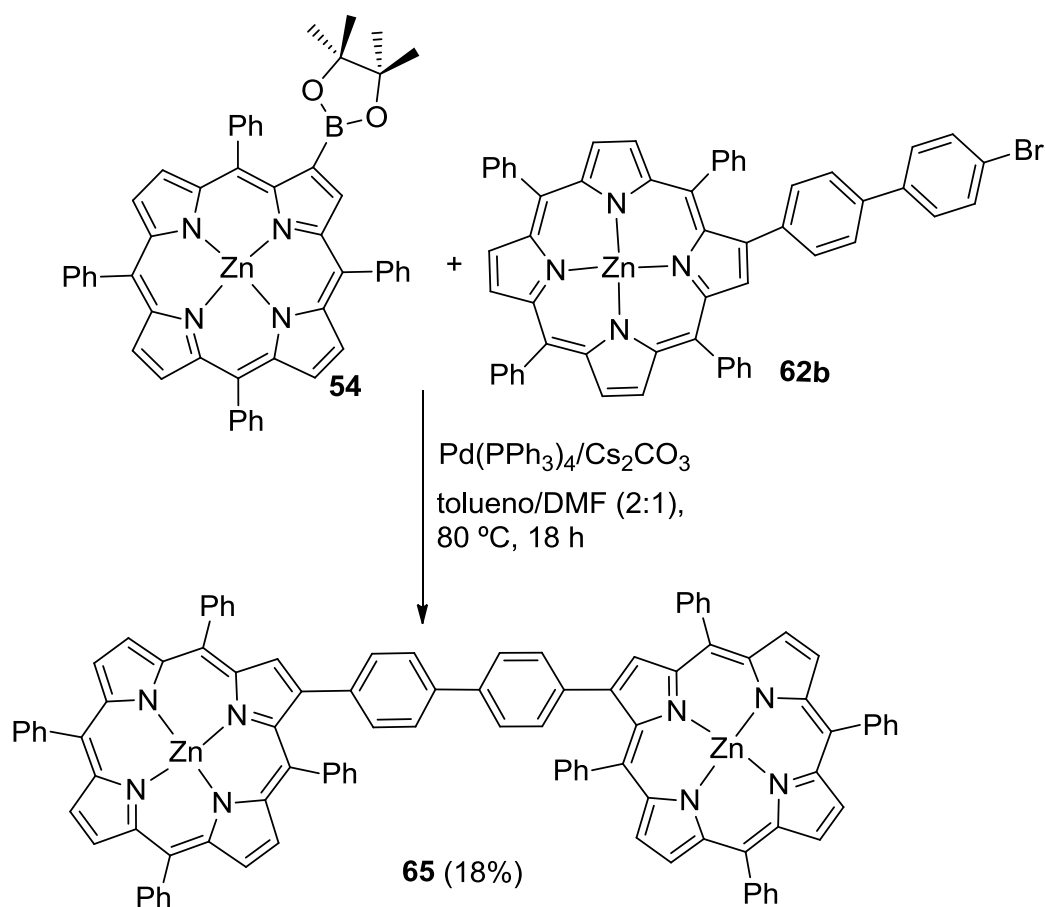


Figura 3.6. Representação esquemática do intermediário de organopaládio que se deverá formar durante a reacção de Suzuki-Miyaura entre os complexos porfirínicos **54** e **62a**.

No que diz respeito à reacção de Suzuki entre o complexo **62b** e o complexo porfirínico β -borilado **54**, foi possível obter o β,β -dímero de porfirina **65** com 18% de rendimento (Esquema 3.11). No entanto, verificou-se que a maior parte do complexo **62b** foi recuperada da mistura reaccional. Esta baixa reactividade pode ser devida aos mesmos efeitos de conjugação e de impedimento estéreo reportados para a reacção anterior, no entanto menos significativos.



Esquema 3.11.

3.3.2. Caracterização espectroscópica dos derivados **62a,b**, **64a,b**, **65** e **66**.

A estrutura de cada um dos compostos sintetizados foi confirmada por espectroscopia de RMN de ^1H e ^{13}C e as suas fórmulas moleculares foram comprovadas por espectrometria de massa por ionização em electrospray de alta resolução (HRMS-ESI). Para a identificação inequívoca da ressonância de alguns prótons foi necessária a obtenção dos espectros de RMN 2D (COSY, HMBC e HSQC).

No espectro RMN de ^1H do complexo arilporfirínico **62a** é possível observar a δ mais altos os sinais correspondentes à ressonância dos prótons β -pirrólicos. Estes surgem na forma de dois dupletos a 8,80 e 8,87 ppm ($J = 4,7$ Hz) referentes à ressonância dos prótons H-12 e H-13, um singuleto a 8,86 ppm referente à ressonância do próton H-3 e ainda um multipletto a 8,97-8,92 ppm correspondente à ressonância dos 4 prótons β -

pirrólicos restantes (H-7,8,17,18). Os sinais correspondentes à ressonância dos protões *orto* dos grupos fenilo das posições *meso* 5,10 e 15 (H-*o*-Ph-5,10,15) surgem como um multiplete entre 8,23 e 8,20 ppm, enquanto que a dos protões *meta* e *para* destes mesmos grupos (H-*m,p*-5,10,15) surgem no multiplete a 7,77-7,71 ppm. A identificação inequívoca dos sinais correspondente à ressonância dos protões *orto*, *meta* e *para* do fenilo da posição 20 do macrociclo porfirínico (H-*o,m,p*-Ph-20) assim como a dos protões H-a e H-b do anel de 4-bromofenilo da posição β -pirrólica só foi possível com a ajuda do espectro de COSY que é apresentado na figura 3.7. Neste podemos observar que o sinal na forma de multiplete a 7,86-7,84 ppm, referente à ressonância de 2 protões, acopla com o sinal na forma de multiplete a 7,28-7,25 ppm referente à ressonância de 2 protões. Por outro lado, este sinal acopla com o sinal na forma de multiplete a 7,40-7,38 ppm referente à ressonância de 1 protão. Assim atribuímos a estes sinais a ressonância dos protões *orto*, *meta* e *para* do grupo fenilo da posição *meso* 20, respectivamente. Da mesma forma, conseguimos observar o acoplamento do sinal na forma de duplete a 7,20 ppm ($J = 8,4$ Hz) e o duplete a 7,25 ppm ($J = 8,4$ Hz). Estes sinais são correspondentes à ressonância dos protões H-a e H-b. Devido à sua proximidade com o núcleo porfirínico e sinal a 7,25 ppm é referente à ressonância de H-a, enquanto que o sinal a 7,20 ppm é atribuído à ressonância do protão H-b. No espectro de massa de alta resolução é possível identificar o ião a m/z 831,1121 correspondente ao pico $[M+H]^+$ e que permite confirmar a formula molecular do composto **62a**.

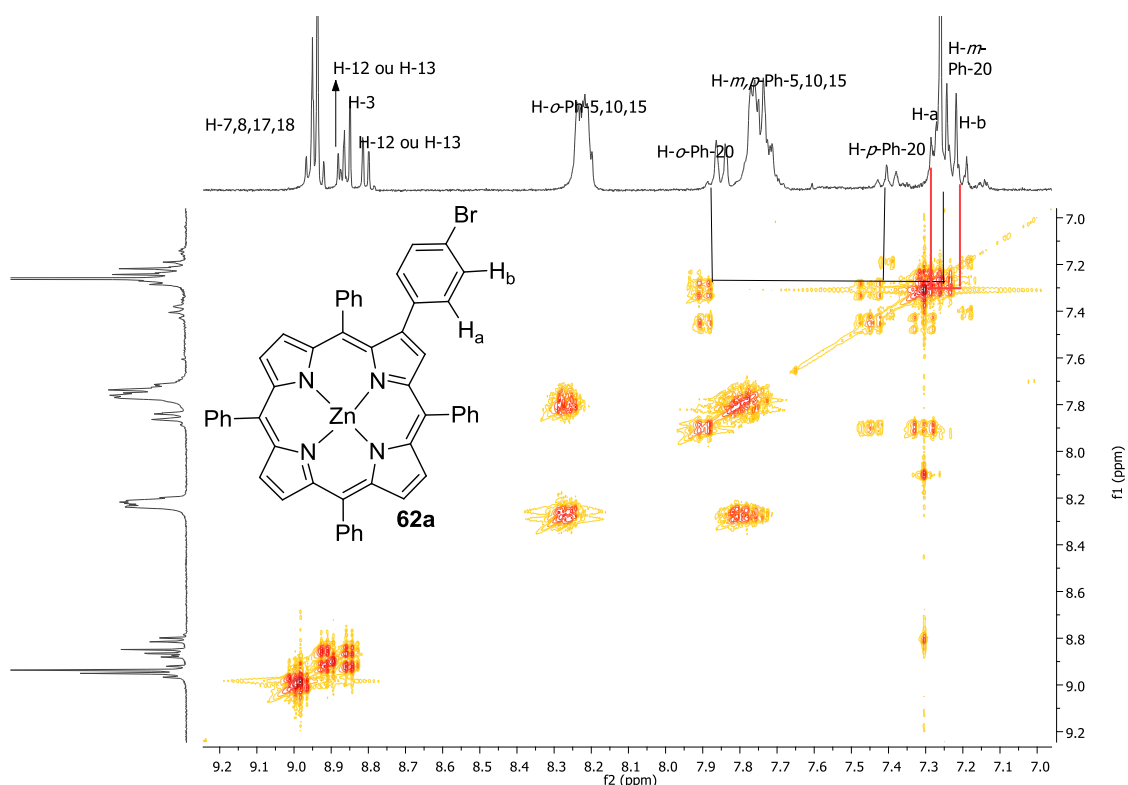


Figura 3.7. Espectro de COSY do complexo **62a**.

O espectro de RMN de ^1H do complexo bromo-arilporfirínico **62b** (Figura 3.8) mostra um perfil muito semelhante ao observado para o composto **62a**, principalmente no que diz respeito aos sinais da ressonância dos prótons β -pirrólicos e prótons dos grupos fenilo das posições *meso*. A maior diferença entre estes espectros reside nos sinais devido à ressonância dos prótons do grupo bifenilo ligado às posições β -pirrólicas da porfirina. Tal como no caso anterior, a aquisição dos espectros de RMN de 2D foram imprescindíveis para a atribuição inequívoca da ressonância dos prótons H-a, H-b, H-c e H-d (correlações mostradas na figura 3.8). Através do espectro de COSY é possível verificar que o sinal que surge como um duplete a 7,64 ppm ($J = 8,2$ Hz) acopla com o sinal na forma de duplete a 7,49 ppm ($J = 8,2$ Hz) e que os sinais na forma de multipletos a 7,42-7,40 e 7,57-7,55 ppm também acoplam entre si. No entanto, só com a ajuda do espectro de HMBC foi possível distinguir inequivocamente estes sinais (Figura 3.8). Neste espectro é possível observar que o multiplete correspondente à ressonância dos prótons β -pirrólicos e onde se encontra H-3, se correlaciona com o carbono a 132,0 ppm, que em HSQC se correlaciona com o sinal a 7,57-7,55 ppm.

Desta forma, este multipletto é devido à ressonância do protão H-a e logo, o sinal a 7,42-7,40 ppm é referente a H-b. No espectro de HMBQ foi também, possível identificar a correlação existente entre o carbono C-b com o sinal na forma de dupletto a 7,49 ppm, que foi atribuído, sem qualquer dúvida, à ressonância do protão H-c. Por exclusão, o sinal na forma de dupletto a 7,64 ppm é referente à ressonância de H-d. Também neste caso, a espectrometria de massa de alta resolução permitiu confirmar a fórmula molecular deste composto através da presença do ião a m/z 907,4881 correspondente ao pico $[M+H]^+$.

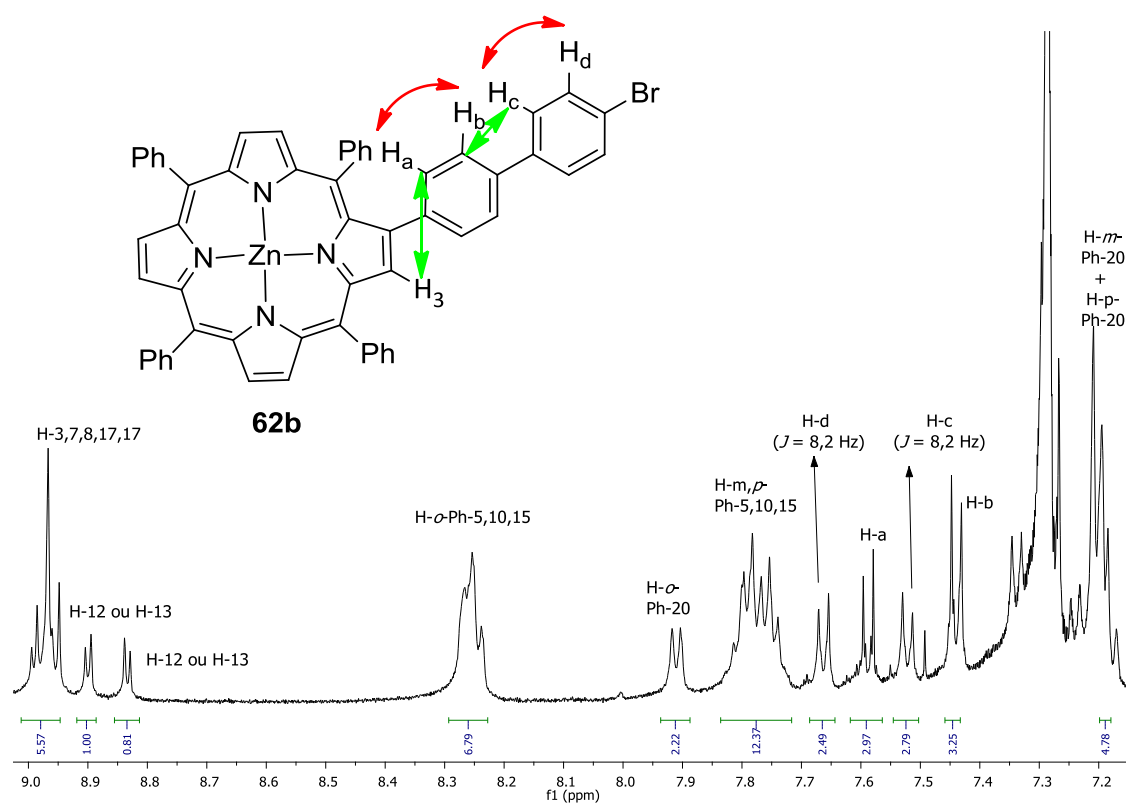


Figura 3.8. Espectro de RMN de ^1H do derivado **62b** e correlações observadas nos espectro de COSY (a vermelho) e de HMBC (a verde).

Os espectros de RMN de ^1H dos derivados **64a** e **64b** apresentam um perfil análogo ao observado para derivados **62a** e **62b**, no que diz respeito às multiplicidades e desvios químicos para os sinais referentes à ressonância dos protões β -pirrólicos e dos grupos fenilo das posições *meso*. As ressonâncias dos protões OH surgem como singletos a 4,51 ppm para **64a** e 4,47 ppm para **64b** e os sinais correspondentes aos grupos metilo surgem como singletos a 2,35 ppm para **64a** e 2,31 ppm para **64b**

(Figura 3.9). A ressonância dos prótons OH desaparece quando é adicionada água deuterada (D_2O). Por fim a ressonância do próton H-c no derivado **64a** surge no multiplete a 7,38-7,13 ppm onde também se encontra a ressonância dos prótons H-*m,p*-Ph-20 e dos prótons H-a e H-c. No caso do derivado **64b** o sinal referente à ressonância do próton H-e surge na forma de um singuleto a 7,33 ppm. Os espectros de massa de alta resolução dos derivados **64a** e **64b** permitem, igualmente, confirmar a fórmula molecular destes compostos, sendo possível observar a presença do ião a *m/z* a 872,4881 correspondente a $[M+H]^+$ do composto **64a** e a *m/z* 948,27275 correspondente a $[M+H]^+$ do composto **64b**.

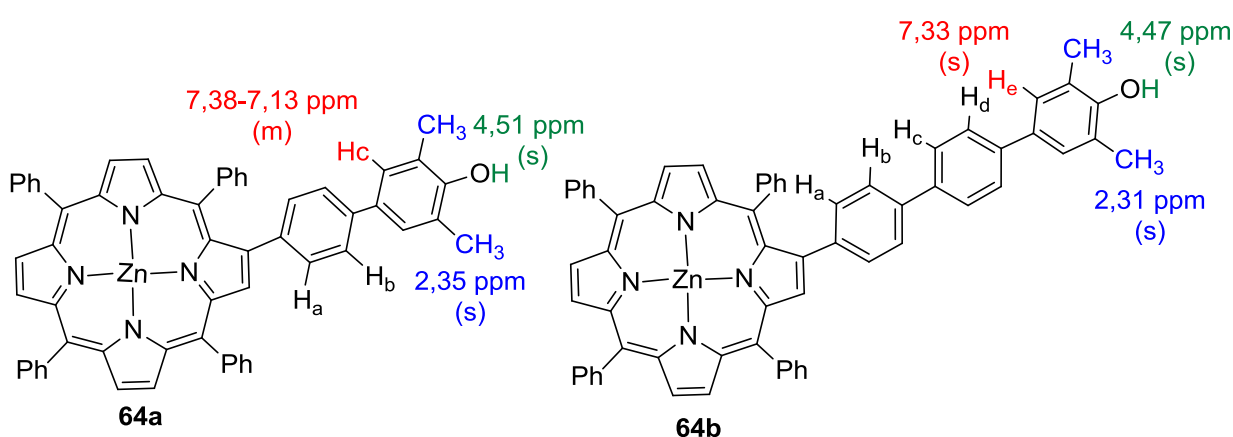


Figura 3.9. Estruturas dos complexos porfirínicos **64a** e **64b**.

No espectros de RMN de ¹H dos dímeros **65** e **66** é possível observar a presença de duas moléculas altamente simétricas. À semelhança dos compostos anteriores, a identificação inequívoca de alguns sinais foi realizada com a ajuda dos espectros de COSY, HSQC e HMBC.

No espectro de RMN de ¹H do dímero **65** (Figura 3.10), os sinais relacionados com a ressonâncias dos prótons β -pirrólicos e dos prótons dos grupo fenilos das posições *meso* surgem com multiplicidades e desvios químicos semelhantes aos observados no espectro de RMN de ¹H do seu precursor, o conjugado **62a**. A ressonância dos prótons H-b surge no multiplete a 7,39-7,38 ppm, onde também se encontra a ressonância dos prótons H-*m*-Ph-20. Já a ressonância dos prótons H-a surge como um duplete a 7,46

Reacção de Suzuki e macrociclos tetrapirrólicos: síntese de β -arilporfirinas e de derivados quinolona-porfirina com potenciais aplicações em PACT

ppm ($J = 8,0$ Hz). O espectro de massa em ESI confirma a fórmula molecular do dímero **65** uma vez que foi observado o íão a m/z 1503,37302 correspondente a $[M+H]^+$.

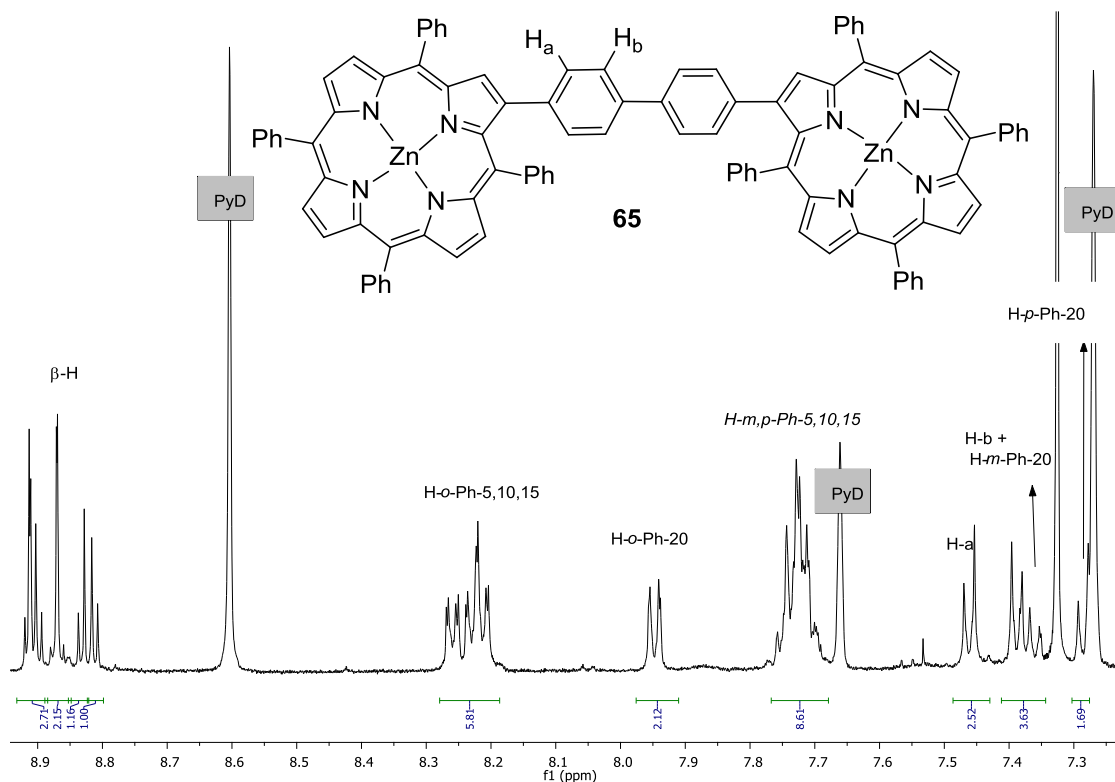


Figura 3.10. Espectro de RMN de ^1H do dímero **65** em CDCl_3/PyD .

Também para o caso do dímero **66** (Figura 3.11), o espectro de RMN de ^1H mostra idêntica multiplicidade e desvios químicos dos sinais referentes à ressonância dos prótons β -pirrólicos e dos prótons dos grupos fenilo das posições *meso*. A ressonância dos prótons H-a e H-b surge como dois multipletos a 7,53-7,52 ppm e 7,43-7,38 ppm, respectivamente. Os sinais relacionados com as ressonâncias dos prótons H-c e H-d surgem como um multipletos a 7,69-7,68 ppm. O espectro de massa em ESI mostra o íão a m/z 1656,4458 referente a $[M+H]^+$, o que confirma a sua fórmula molecular.

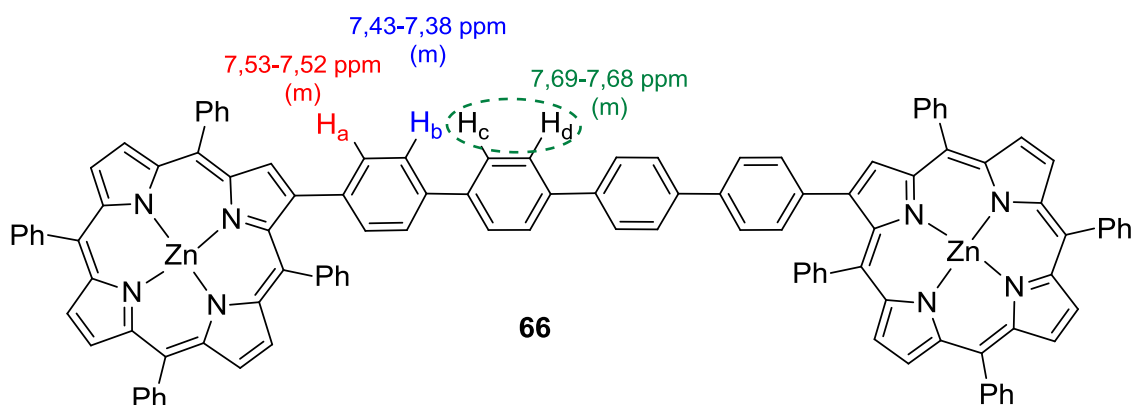


Figura 3.10. Estruturas do dímero 66.

3.3.3. Síntese de novos derivados quinolona-porfirina com potenciais aplicações em PACT.

Como já foi referido, as porfirinas e seus análogos para além das funções vitais que desempenham na natureza, têm atraído a atenção de muitos grupos de investigação devido às suas potenciais aplicações.³¹ De facto, as aplicações mais importantes de macrociclos tetrapirrólicos são, sem dúvida, a PDT e a PACT. Nestas, a combinação de um fotossensibilizador, oxigénio e luz é capaz de produzir agentes citotóxicos como o oxigénio singuleto (1O_2) e outras espécies reactivas de oxigénio, espécies essas que são capazes de destruir as células onde são geradas, quer sejam células tumorais ou células microbianas.³² A eficácia destas terapias depende não só da eficiência de gerar 1O_2 por parte fotossensibilizador, mas também da disponibilidade de fontes de luz, e ainda das propriedades de acumulação do fotossensibilizador nas células.³³

Nestes últimos anos, vários grupos têm estado envolvidos no desenvolvimento de novos métodos para a modificação de macrociclos porfirínicos com o objectivo de obter compostos com propriedades fotofísicas e fotoquímicas adequadas para serem usadas como fotossensibilizadores em PDT e PACT, contribuindo, assim, para uma optimização destas terapias.^{34,35}

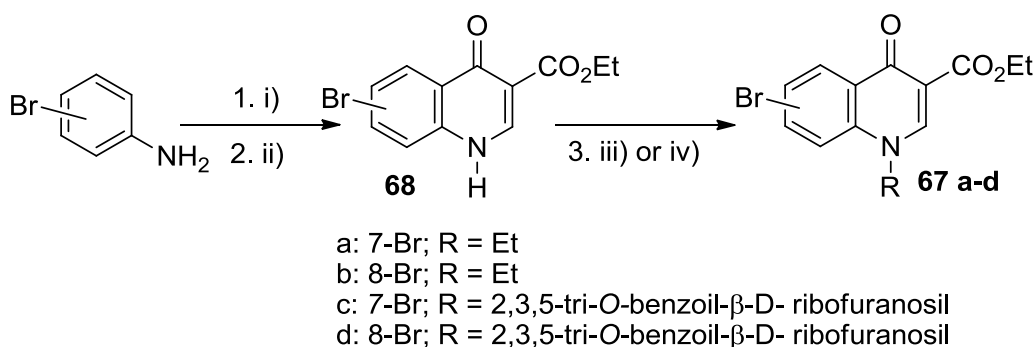
Tal como foi referido no capítulo anterior, a síntese de moléculas com funções duais tem sido uma das estratégias que tem atraído alguma atenção com o objectivo de obter melhores resultados nestas terapias. Tais moléculas podem ser obtidas

através do acoplamento de entidades com actividades farmacológicas bem conhecidas. Neste contexto, porfirinas ligadas a moléculas biologicamente activas podem ser uma excelente abordagem para o desenvolvimento de novos fotossensibilizadores.³⁵ Um bom exemplo desta abordagem é a síntese de conjugados quinolona-porfirina, uma vez que as quinolonas podem actuar como agentes antimicrobianos^{36,37} e agentes antitumorais.^{38,39} Assim, a conjugação da actividade biológica das quinolonas aliada ao efeito terapêutico já conhecido das porfirinas leva a acreditar que estes conjugados podem apresentar actividades biológicas interessantes. Embora esta hipótese pareça extremamente interessante, na literatura existem apenas dois exemplos sobre a funcionalização de porfirinas com este tipo de moléculas,^{40,41} não se conhecendo ainda as propriedades relacionadas com possíveis aplicações em PDT e PDT.

3.3.3.1. Reacção de Suzuki entre o complexo porfirínico β -borilado **54** e as bromoquinolonas **67a-d**

A síntese dos novos conjugados quinolona-porfirina envolveu a reacção de Suzuki entre o complexo porfirínico β -borilado **54** e as bromoquinolin-4-onas **67a-d**. Estas quinolonas foram cedidas ao abrigo da colaboração com o Grupo de Química Orgânica da Universidade Federal Fluminense, sob orientação do Prof. Dr. Vítor Francisco Ferreira e foram convenientemente preparadas de acordo com a estratégia sintética exposta no esquema 3.12. Assim, a reacção entre bromo-anilinas com etoximetilenomalonato de etilo seguida de ciclização origina os correspondentes derivados **68**.⁴² O tratamento destes derivados com brometo de etilo na presença de carbonato de potássio em DMF promove a formação dos derivados *N*-protegidos **67a** e **67b**. A síntese dos derivados de ribonucleosídeo protegidos **67c** e **67d** requereu a silição prévia das bromoquinolonas **68** seguida de condensação com 1-*O*-acetil-2,3,5-tri-*O*-benzoil- β -D-ribofuranose em acetonitrilo usando trifluorometanossulfonato de trimetilsililo (TMSOTf) como catalisador.⁴²

Reacção de Suzuki e macrociclos tetrapirrólicos: síntese de β -arilporfirinas e de derivados quinolona-porfirina com potenciais aplicações em PACT

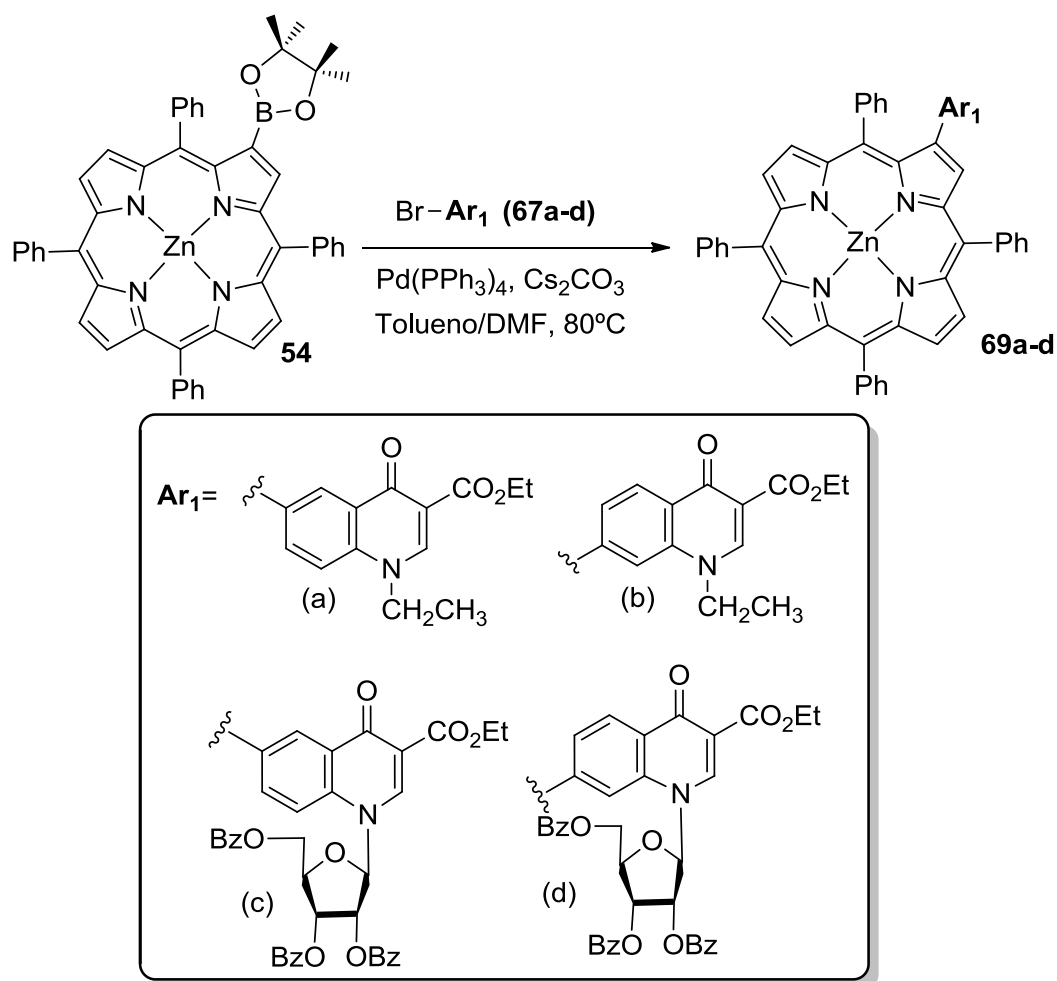


i) etoximetilenomalonato de etilo; ii) Ciclização; iii) $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{Br}$, K_2CO_3 , DMF;
iv) a) BSTFA/TMCS, CH_3CN , 60-70 $^\circ\text{C}$; b) 1-O-acetil-2,3,5-tri-O-benzoil- β -D-ribofuranose/TMSOTf; c) $\text{NaHCO}_3/\text{H}_2\text{O}$

Esquema 3.12.

A reacção de acoplamento de Suzuki entre o complexo porfirínico β -borilado **54** e as bromoquinolonas **67a-d** foram realizadas em condições experimentais análogas às usadas para a síntese dos complexos β -arilporfirínicos **62a,b** (Esquema 3.13). Assim, as reacções foram realizadas num tubo de Schlenk numa mistura de tolueno/DMF usando $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ como catalisador e Cs_2CO_3 como base. Depois de desgaseificado o solvente, a mistura reaccional foi mantida a 80 $^\circ\text{C}$ durante 15 horas. Findo este tempo, as misturas reaccionais foram lavadas com uma solução aquosa de cloreto de sódio. As fases orgânicas de cada reacção foram lavadas com água e secas em sulfato de sódio anidro. Depois da concentração do solvente a pressão reduzida, as misturas reaccionais foram purificadas por cromatografia em coluna, permitindo isolar os derivados quinolona-porfirina **69a-d** com rendimentos moderados a excelentes (Tabela 3.1).

Reacção de Suzuki e macrociclos tetrapirrólicos: síntese de β -arilporfirinas e de derivados quinolona-porfirina com potenciais aplicações em PACT



Esquema 3.13. Síntese dos conjugados quinolona-porfirina **69a-d**.

Tabela 3.1. Resultados obtidos na reacção de Suzuki do complexo porfirínico β -borilado **54** com as bromo-quinolonas **67a-d**.

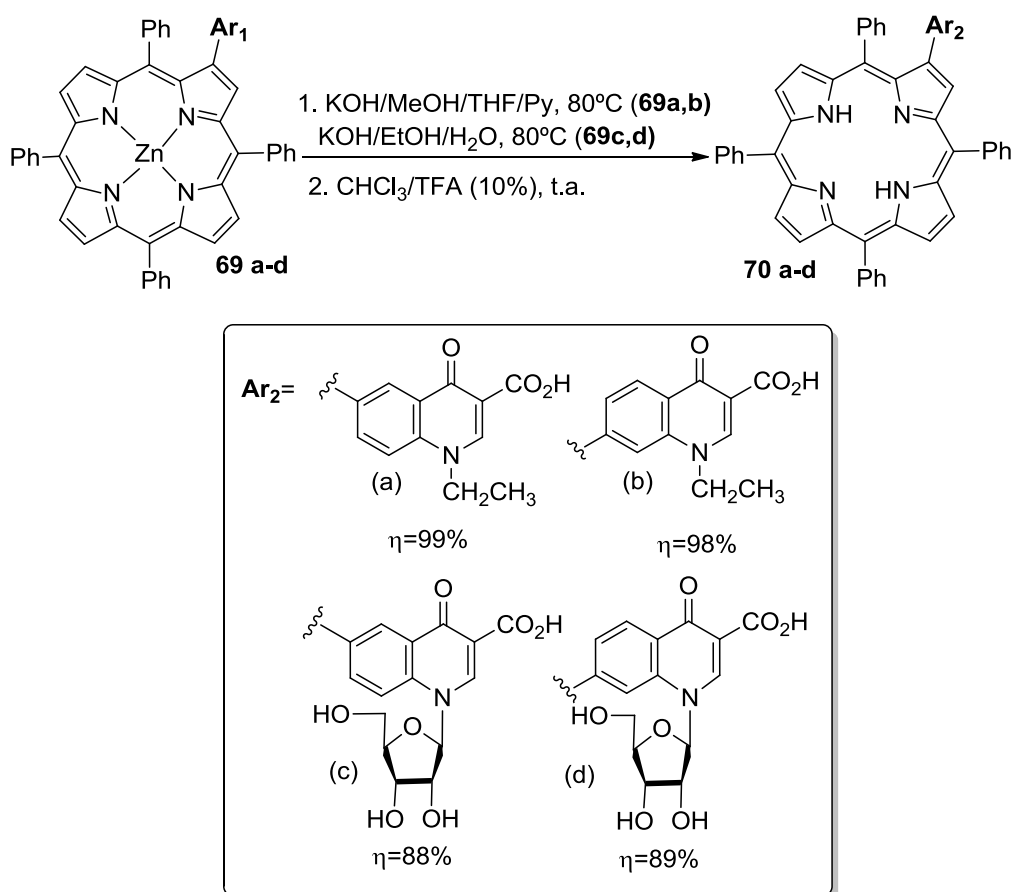
Br-quinolin-4-ona	Rendimento de 69 (%)
67a	89
67b	82
67c	51
67d	50

Através dos resultados obtidos é possível afirmar que as bromoquinolonas **67a** e **67b** são mais reactivas que as bromoquinolonas **67c** e **67d**, permitindo a obtenção dos correspondentes derivados quinolona-porfirina **69a** e **69b** com 89 e 82% de rendimento, respectivamente. Os derivados quinolona-porfirina **69c** e **69d** foram

Reacção de Suzuki e macrociclos tetrapirrólicos: síntese de β -arilporfirinas e de derivados quinolona-porfirina com potenciais aplicações em PACT

isolados com rendimentos similares (~50%) e nos dois casos foi possível recuperar cerca de 50% do complexo porfirínico β -borilado **54** de partida. Procurou-se melhorar os rendimentos destes compostos prolongando os tempos de reacção e usando mais equivalentes das bromoquinolonas **67c** e **67d**, no entanto estas tentativas não foram bem sucedidas.

Com o objectivo de melhorar a solubilidade destes derivados em meios fisiológicos e ainda a sua estabilidade procedeu-se à hidrólise do éster da quinolona e à remoção do ião metálico no interior do macrociclo. No caso dos derivados **69c** e **69d** também se realizou desprotecção da unidade glicosídica (Esquema 3.14).



Esquema 3.14.

A hidrólise dos grupos éster dos conjugados quinolona-porfirina **69a** e **69b** foi realizada através da reacção destes compostos com uma solução metanólica de hidróxido de potássio em THF e piridina a 80°C durante 1 hora. A hidrólise simultânea dos grupos protectores das unidades de ribose e dos grupos éster dos derivados **69c** e **69d** requereu condições um pouco mais severas. Esta foi conseguida através da reacção destes conjugados com uma solução etanólica de hidróxido de sódio a 80°C durante 24 horas. As misturas reaccionais foram depois neutralizadas com soluções aquosas de ácido cítrico e as fases orgânicas extraídas com diclorometano e secas em sulfato de sódio anidro. Os resíduos obtidos sem purificação prévia, foram dissolvidos em clorofórmio e tratados com 10% de ácido trifluoroacético para a remoção do ião zinco no interior do macrociclo porfirínico. As misturas reaccionais foram seguidamente neutralizadas com soluções aquosas de carbonato de sódio, seguindo-se a extracção das fases orgânicas com clorofórmio. Estas foram posteriormente lavadas com água destilada e secas em sulfato de sódio anidro. Os derivados **70a** e **70b** foram obtidos por cristalização directa da mistura reaccional em clorofórmio/hexano com rendimentos de 99% e 98%, respectivamente. Os resíduos obtidos da desprotecção e descomplexação dos conjugados **69c** e **69d** foram purificados por TLC preparativas usando como eluentes misturas de CHCl₃/MeOH (1%). Os compostos maioritários obtidos depois desta purificação com rendimentos de 88% e 89%, foram identificados como sendo os conjugados quinolona-porfirina **70c** e **70d**.

3.3.3.2. Caracterização estrutural dos conjugados quinolona-porfirina 69a-d e 70a-d

As estruturas dos novos derivados quinolona-porfirina **69a-d** e **70a-d** foram confirmadas por espectroscopia de RMN (¹H e ¹³C) e as suas fórmulas moleculares por HRMS-ESI. Para a identificação inequívoca da ressonância de alguns protões e carbonos foi necessário recorrer a espectroscopia de RMN de 2D (COSY, HMBC e HSQC).

No que diz respeito aos espectros de HRMS-ESI dos derivados, **69a** e **69b** é possível encontrar picos idênticos a m/z 920,25791, correspondentes aos iões [M+H]⁺

o que confirma para cada caso o produto de acoplamento de Suzuki entre o complexo porfirínico β -borilado **54** e as bromoquinolonas **67a** e **67b**.

Uma vez que os conjugados **69a** e **69b** são isómeros, os seus espectros de RMN de ^1H são muito semelhantes, diferindo apenas na ressonância dos prótons H-5', H-6', H-7' e H-8' da unidade de quinolona .

Na figura 3.12 é mostrado, como exemplo, o espectro de RMN de ^1H do derivado **69a**. Assim, é possível identificar dois sistemas AB relacionados com a ressonância de 4 prótons β -pirrólicos: um a 8,95 e 8,93 ppm ($J= 4,7$ Hz) correspondente ao par H-7,8 e o outro a 8,85 e 8,76 ppm ($J= 4,7$ Hz) correspondente a H-17,18. Os dois singuletos que surgem a 8,93 e 8,91 ppm são devidos à ressonância dos prótons H-12,13 e H-3, respectivamente. A ressonância dos prótons dos grupos fenilo das posições *meso*- 5,10, 15 surge como dois multipletos: um a 8,23-8,21 ppm devido aos prótons *orto* e o outro a 7,78-7,72 ppm devido aos prótons *meta* e *para*. A ressonância dos prótons *orto* do grupo fenilo mais próximo da unidade de quinolona (posição *meso* 20) surge como um sinal largo a 8,02-7,86 ppm enquanto que a ressonância dos prótons *meta* e *para* deste anel surge como multipletos a 7,49-7,48 ppm e 7,11-7,09 ppm, respectivamente.

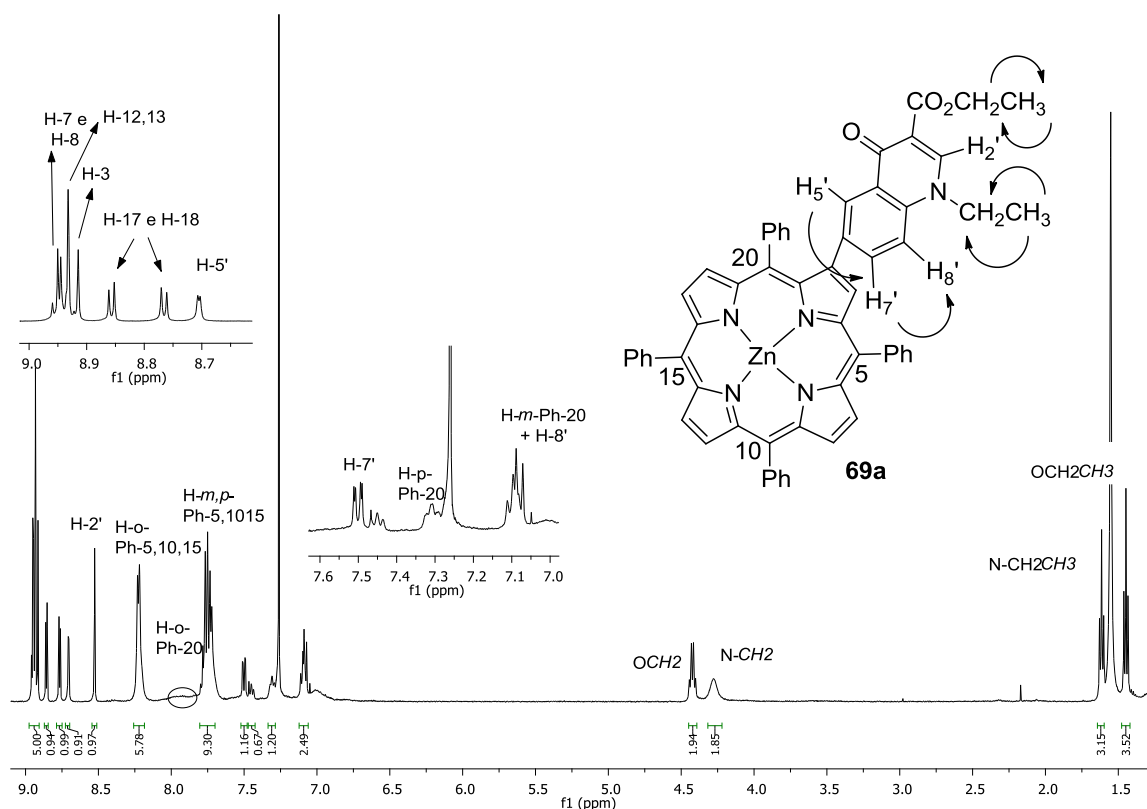


Figura 3.12. RMN de ^1H do conjugado quinolona-porfirina **69a** e as principais correlações no seu espectro de COSY.

Na figura 3.12 estão representadas, também, as principais correlações observadas no espectro de COSY do derivado **69a** que permitiram a identificação inequívoca da ressonância dos prótons da unidade de quinolona. Assim, o sinal devido à ressonância do próton H-5' surge como um duplete a 8,70 ppm ($J = 2,1$ Hz) e correlaciona-se com o sinal que surge como um duplo duplete ($J = 2,1$ e 8,6 Hz) a 7,50 ppm que é atribuído à ressonância do próton H-7'. Este próton H-7' correlaciona-se, também, com H-8' que surge como um duplete a 7,08 ppm ($J = 8,6$ Hz). O sinal que surge na forma de singuleto a 8,52 ppm é devido à ressonância do próton H-2'. É possível também referir que o sinal na forma de tripleto a 1,61 ppm ($J = 7,1$ Hz) se correlaciona com o sinal largo a 4,28 ppm e o sinal na forma de tripleto que surge a 1,44 ppm ($J = 7,1$ Hz) se correlaciona com o sinal na forma de quarteto a 4,42 ppm. Numa primeira análise e considerando o efeito protector do átomo de azoto quando

comparado com o átomo de oxigénio, o sinal largo pode ser atribuído à ressonância dos prótons CH_2 do grupo $\text{N-CH}_2\text{CH}_3$. Consequentemente, o sinal sob a forma de quarteto a 4,42 ppm pode ser atribuído aos prótons CH_2 do grupo $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$.

O assinalamento inequívoco da ressonância de cada grupo carbonílico foi feito através da análise dos respectivos espectros de HMBC. A figura 3.13 mostra as correlações que permitiram identificar os grupos carbonílicos da unidade de quinolona do derivado **69a**.

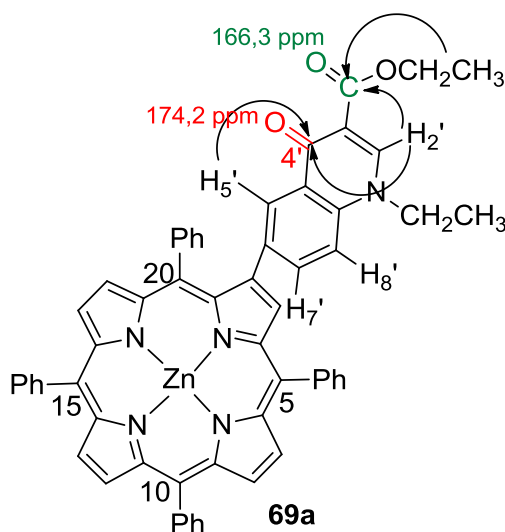


Figura 3.13. Correlações mais importantes observadas no espectro de HMBC do derivado **69a**.

Assim, verifica-se que a ressonância do próton H-2' se correlaciona com os dois carbonos carbonílicos a 166,3 e 174,2 ppm. No entanto, a ressonância do próton H-5' correlaciona-se apenas com o sinal a 174,2 ppm, que é atribuído a carbono carbonílico C-4' da unidade de quinolona. Por exclusão, o sinal a 166,3 ppm é devido à ressonância do carbono carbonílico do grupo éster. Uma outra correlação importante observada neste espectro e que confirma a atribuição do sinal a 4,42 ppm à ressonância dos prótons CH_2 do grupo $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ é a que ocorre entre este sinal e o carbono carbonílico do grupo éster. Esta correlação confirma, também, a atribuição do sinal a 4,28 ppm à ressonância dos prótons CH_2 do grupo $\text{N-CH}_2\text{CH}_3$.

O espectro de RMN de ^1H do conjugado **69b** possui um perfil muito similar ao observado para o do derivado **69a**, sendo a sua principal diferença na ressonância dos

sinais de H-5', H-6' e H-8' da unidade de quinolona (Figura 3.14). Também neste caso, a análise do espectro de COSY permitiu-nos identificar todos os protões da unidade de quinolona. Assim, o sinal na forma de duplete a 7,57 ppm ($J = 8,1$ Hz) está relacionado com a ressonância do protão H-6' que se correlaciona com o sinal que é devido à ressonância do protão H-5', que surge no multiplete a 8,24-8,21 ppm devido à ressonância dos protões H-*o*-Ph-5,10,15. O sinal na forma de singuleto a 7,29 ppm é devido à ressonância do protão H-8'. Tal como no caso do derivado **69a**, a ressonância do protão H-2' surge como um singuleto 8,48 ppm.

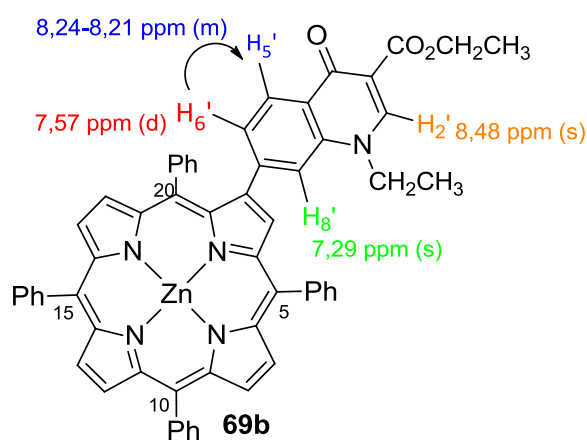


Figura 3.14. Estrutura do derivado quinolona-porfirina **69b**.

Quanto aos derivados **69c** e **69d**, os seus espectros de HRMS-ESI mostram o mesmo pico a m/z 1336,34697 correspondente ao pico do ião $[M+H]^+$, confirmando assim as suas fórmulas moleculares.

Os dados fornecidos pela espectroscopia de RMN destes derivados são muito similares, podendo ser também encontradas algumas semelhanças com as características espectroscópicas dos derivados quinolona-porfirina **69a** e **69b**, principalmente no que diz respeito aos desvios químicos e multiplicidades dos protões β -pirrólicos, protões fenílicos das posições *meso* e dos protões da unidade de quinolona. A figura 3.15 mostra como exemplo, o espectro de RMN de 1H do derivado **69c**.

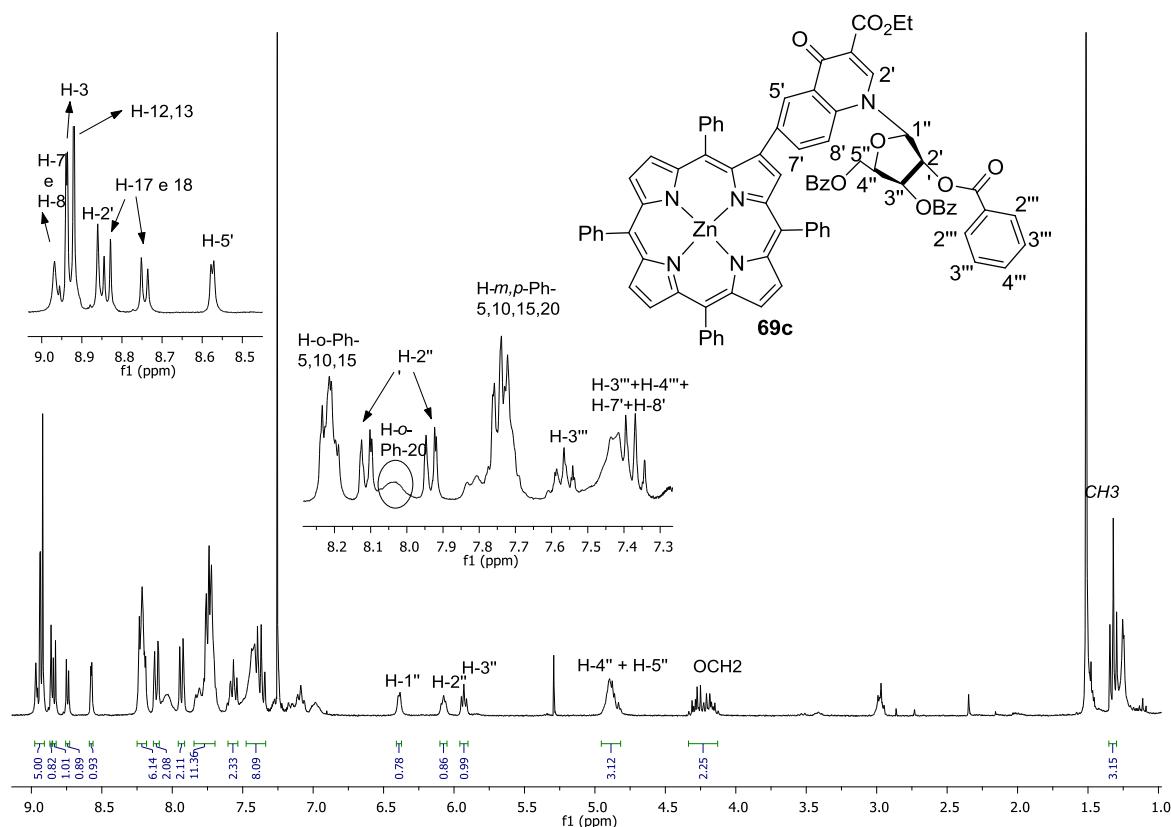


Figura 3.15. RMN de ^1H do conjugado quinolona-porfirina **69c**.

Devido às semelhanças estruturais com o derivado **69a**, é fácil identificar no espectro de RMN de ^1H do conjugado **69c** os prótons β -pirrólicos e os prótons dos grupos fenilos das posições *meso*, assim como, os prótons da unidade de quinolona. Neste caso, o espectro de COSY foi essencial para a identificação inequívoca da ressonância de todos os prótons da unidade sacarídica. Desta forma foi possível identificar a ressonância de todos os prótons da ribose na zona alifática do espectro de RMN de ^1H . O sinal que surge na forma de duplete a 6,39 ppm ($J = 5,1$ Hz) foi identificado como sendo devido a H-1'' e podemos observar a sua correlação no espectro de COSY com o sinal na forma de tripleto a 6,07 ppm ($J = 5,1$ Hz), que é devido à ressonância de H-2''. Por outro lado, este próton correlaciona-se com o sinal na forma de tripleto a 5,99 ppm ($J = 5,1$ Hz) que é devido à ressonância do próton H-3''. Por último, a ressonância de H-3'' correlaciona-se com o sinal, na forma de multiplete, a 4,96-4,79 ppm, que é devido à ressonância de H-4'' e H-5''.

A ressonância dos prótons dos grupos benzoílo surge na região aromática do espectro de RMN de ^1H . Assim, a ressonância dos prótons H-2''' surge na forma de dois duplos dupletos a 8,11 e 7,97 ppm ($J = 1,4$ e $7,8$ Hz). A correlação destes sinais com o triplo triplete a 7,56 ppm ($J = 1,3, 1,2$ e $6,1$ Hz) permitiu identificar este sinal como sendo devido aos prótons H-3'''. Por fim, a correlação deste sinal e o multiplete a 7,43-7,34 ppm permitiu identificar os restantes quatro prótons H-3''' e três prótons H-4'''. A ressonância dos prótons H-7' e H-8' da unidade de quinolona estão presentes, também, neste multiplete.

A presença da unidade de ribonucleosídeo dos conjugados **69c** e **69d** foi também confirmada pela ressonância de cinco carbonos carbonílicos e sete carbonos alifáticos nos seus espectros de RMN de ^{13}C . O assinalamento inequívoco de cada carbono foi realizado através da análise dos espectros de HMBC. Por exemplo, para o conjugado **69c** a ressonância do carbono carbonílico C-4' surge a 174,3 ppm, a do grupo éster a 166,0 ppm e a dos carbonos carbonílicos do grupos benzoílo a 165,1, 165,0 e 164,6 ppm. Na região alifática do espectro de carbono podemos encontrar a ressonância dos carbonos C-1'', C-2'', C-3'', C-4'' e C-5'' a 60,8, 62,8, 63,2, 70,4 e 70,5 ppm, respectivamente.

É importante referir que os estudos efectuados por HMBC permitiram confirmar a estrutura do composto **69c**, uma vez que é possível observar as correlações existentes entre todas as subunidades da molécula (Figura 3.16). Então, a ressonância do próton H-1'' da unidade de ribose correlaciona-se com o C-2' da quinolona a 131,9 ppm. O próton H-2'' da ribose mostra correlação com o carbono carbonílico do grupo benzoílo a 165,1 ppm. Por fim, a ressonância do H-5' da quinolona correlaciona-se com a do C-2 da unidade de porfirina que surge a 135,5 ppm.

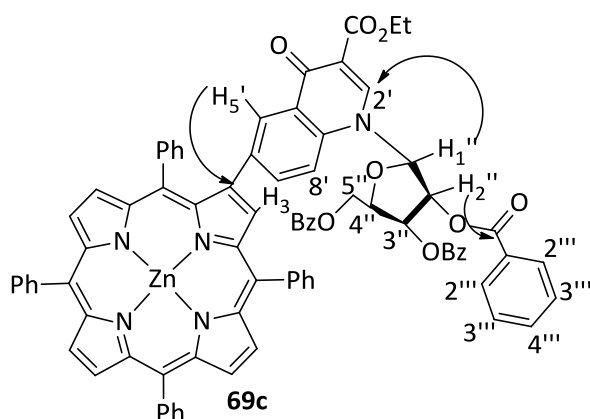


Figura 3.16. Correlações importantes observadas do espectro de HMBC do conjugado **69c**.

O espectro de RMN de ^1H do conjugado **69d** apresenta um perfil análogo ao observado para o seu isómero **69c** estando a identificação dos sinais compilada na parte experimental.

Os espectros de RMN de ^1H dos compostos desprotegidos e decomplexados **70a-d** mostram, também, perfis muito semelhantes aos dos seus precursores, aparecendo os sinais das unidades porfirina, de quinolona e de ribose com desvios químicos e multiplicidades semelhantes aos observados para os derivados **69a-d**. A desprotecção destes conjugados foi confirmada devido à ausência dos sinais relacionados com a ressonância dos prótons do grupo etilo do grupo éster da quinolona, e para o caso dos derivados de ribonucleosídeo **70c** e **70d**, devido, também, à ausência dos sinais relacionados com a ressonância dos prótons dos grupos benzoílo. A descomplexação destes compostos foi confirmada pelo aparecimento dos sinais a desvio químicos muito baixos ($\sim -2,50$ ppm) relacionados com a ressonância dos prótons NH do interior do macrociclo porfirínico.

Os espectros de HRMS-ESI dos isómeros **70a** e **70b** mostram o mesmo pico de ião molecular a m/z 830,31257 correspondendo ao ião $[\text{M}+\text{H}]^+$ enquanto que nos espectros dos derivados **70c** e **70d** o pico de ião molecular surge a m/z 934,32353 correspondendo a $[\text{M}+\text{H}]^+$. Estes valores confirmam as suas fórmulas moleculares.

3.3.4. Caracterização dos conjugados quinolona-porfirina 69a-d e 70a-d por Espectrometria de Massa

Nos últimos anos a espectrometria de massa (MS) tem vindo a ser considerada uma técnica analítica imprescindível e amplamente usada na identificação e caracterização de amostras de diversas naturezas. Esta técnica permite o reconhecimento de compostos desconhecidos, através da razão massa/carga das suas moléculas ionizadas. No entanto, existem outras aplicações desta técnica como é o caso da determinação da estrutura de compostos e o estudo da química dos seus iões em fase gasosa, que tornaram a MS uma das técnicas mais usadas na caracterização de compostos químicos, especialmente na caracterização estrutural de biomoléculas.

Nos últimos anos temos vindo a assistir a um desenvolvimento no uso da MS para a identificação de macrociclos tetrapirrólicos, tendo vindo a fornecer informação estrutural muito importante acerca destes compostos. Os iões produto obtidos por espectrometria de massa Tandem (MS/MS) de macrociclos tetrapirrólicos permitem identificar as características estruturais dos substituintes periféricos.^{43,44,45} Estas vantagens são ainda maiores quando é necessária a avaliação das alterações estruturais do macrociclo que ocorrem no metabolismo celular em testes *in vivo*.⁴⁶ Na realidade, a MS é considerada uma técnica importante para detectar, elucidar estruturalmente e monitorizar quantitativamente os produtos de metabolismo de uma droga de um forma mais rápida e fácil.⁴⁷

Com isto, decidiu-se estudar o comportamento dos conjugados quinolona-porfirina **69a-d** e **70a-d** por MS Tandem de ionização por electrospray (ESI-MS/MS) com o objectivo de estudar o comportamento destes derivados em fase gasosa por espectroscopia de massa MS/MS.

3.3.4.1. Espectrometria de massa por electrospray (ESI-MS)

Na ionização por electrospray a solução de analito passa através de um capilar de electrospray onde é aplicada uma elevada diferença de potencial geralmente de 2,5-4 kV. Quando a amostra atinge a ponta do capilar e assumindo um potencial positivo, os iões positivos em solução acumular-se-ão à superfície, provocando uma

deformação na gota emergente (cone de Taylor) (Figura 3.17). Esta força provoca a pulverização da amostra formando gotas de analito carregadas com a mesma carga da agulha de pulverização. Estas gotas são, naturalmente, repelidas da agulha para o eléctrodo (cone). À medida que as gotas fazem este trajecto ocorre a evaporação do solvente, provocando a diminuição do tamanho da gota até ao ponto em que a tensão superficial não consegue sustentar a carga. Este ponto é designado de limite de Rayleigh. Atingido este ponto a gota multicarregada rebenta num processo denominado de explosão Coulombica, produzindo gotas mais pequenas que podem repetir este processo. Estas moléculas de analito carregadas (não são apenas iões) podem ter uma carga ou ser multicarregadas. Este é um método de ionização muito suave onde o analito, após ionização, possui pouca energia residual. Esta geração de moléculas multicarregadas permite a análise de moléculas com elevado peso molecular como proteínas, uma vez que o espectrómetro mede a razão massa/carga e não a massa *per si*. A maior desvantagem desta técnica é que provoca pouca fragmentação. No entanto, esta desvantagem pode ser ultrapassada através do uso de técnicas de espectrometria de massa tandem como MS/MS ou MSⁿ.

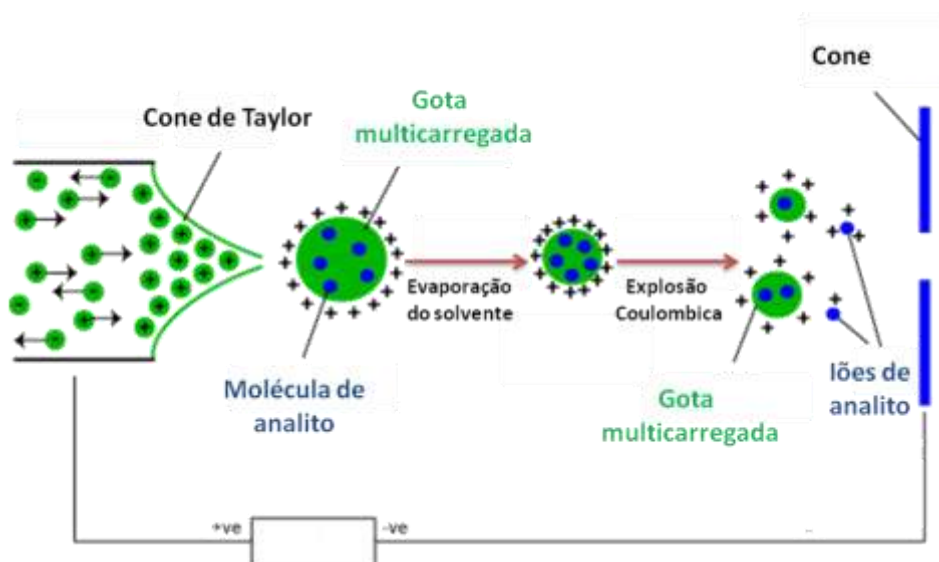


Figura 3.17. Representação do processo de ionização por electrospray.

3.3.4.2. Caracterização dos conjugados quinolona-porfirina 69a-d

Os espectros de ESI-MS dos conjugados quinolona-porfirina **69a-d** foram obtidos em modo positivo, mostrando o correspondente pico do ião molecular $[M+H]^+$. A fragmentação destes iões foi induzida por colisão com argon, produzindo os respectivos espectros de ESI-MS/MS.

Depois da análise dos espectros de MS/MS dos derivados **69a** e **69b** foi possível verificar que estas moléculas sofrem as mesmas vias de fragmentação (Tabela 3.2), onde a perda de $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ (-46Da) do grupo carboxilato de etilo corresponde ao ião produto mais abundante [100% de abundância relativa (AR)]. Foi possível também observar a perda combinada de $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ com o grupo R (-74Da, CH_2CH_2) (Figura 3.18 e Figura 13.9).

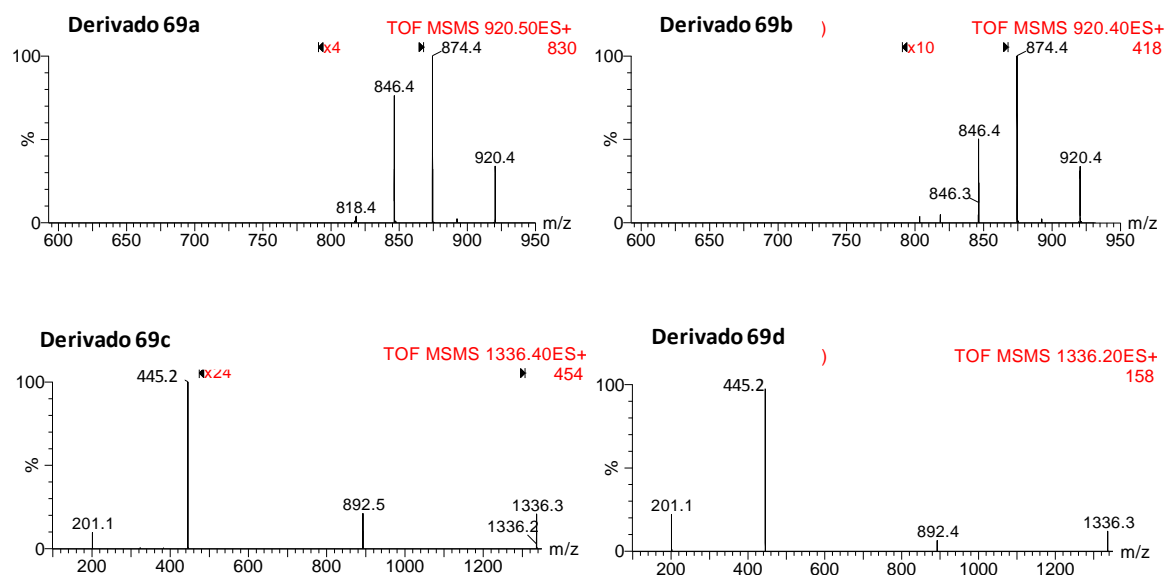


Figura 3.18. Espectros de ESI-MS/MS dos derivados **69a-d**.

Tabela 3.2. Principais iões fragmento observados nos espectros de ESI-MS/MS dos iões $[M+H]^+$ dos derivados quinolona-porfirina **69a-d**, com indicação das suas abundâncias relativas (AR%).

	Derivado			
	69a	69b	69c	69d
$[M+H]^+$	920,5	920,5	1336,3	1336,3
$-\text{CH}_2\text{CH}_2$	892,4 (<5)	892,4 (<5)	-	-
$-\text{HOCH}_2\text{CH}_3$	874,4 (100)	874,4 (100)	-	-
$-\text{R}$ and $-\text{HOCH}_2\text{CH}_3$	846,4 (20)	846,2 (<5)	-	-
$-\text{CH}_2\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$ e $-\text{R}$	818,4 (<5)	-	-	-
$-\text{R}$	*	*	892,4 (10)	892,5 (<5)
$-\text{C}_{56}\text{H}_{37}\text{N}_5\text{O}_3\text{Zn}$	-	-	445,2 (100)	445,2 (100)

*no caso destes derivados $-\text{R} = -\text{CH}_2\text{CH}_2$ ($m/z = 892.4$).

Reacção de Suzuki e macrociclos tetrapirrólicos: síntese de β -arilporfirinas e de derivados quinolona-porfirina com potenciais aplicações em PACT

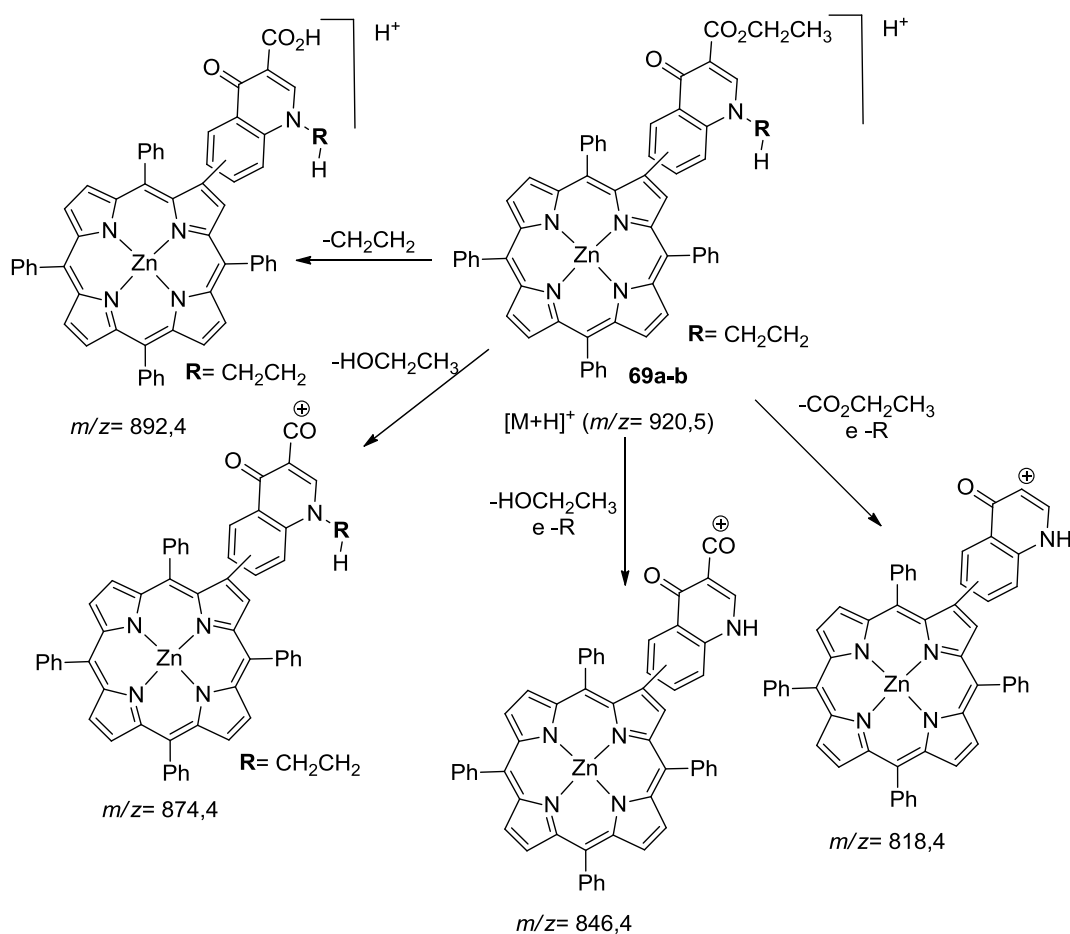


Figura 3.19. Estruturas propostas para os iões moleculares $[\text{M} + \text{H}]^+$ e vias de fragmentação dos derivados **69a** e **69b**.

No caso dos derivados **69c** e **69d** é importante referir que as vias de fragmentação observadas em ESI-MS/MS são muito idênticas e este facto confirma que as suas estruturas são muito semelhantes. A maior via de fragmentação é devida à perda das subunidades de quinolona-porfirina ($- 890$ Da, perda de $\text{C}_{56}\text{H}_{37}\text{N}_5\text{O}_3\text{Zn}$) com a formação do ião produto mais abundante a m/z 445,2 (Tabela 3.2). Esta via de fragmentação resulta da quebra da ligação N-R em que a carga fica retida na unidade de ribose (Figura 3.20). Por outro lado, é possível também observar a perda do grupo R [a unidade de ribose ($- 444$ Da, $\text{C}_{26}\text{H}_{20}\text{O}_7$)], que também resulta da quebra da ligação N-R, mas, neste caso, a carga fica retida na unidade de porfirina. É de destacar que nestes compostos não se observa a perda de partes do grupo carboxilato de etilo, o que sugere que a ligação N-C (N-ribose) dos derivados **69c** e **69d** é mais lábil do que a ligação N-C (N- CH_2CH_3) dos derivados **69a** e **69b**.

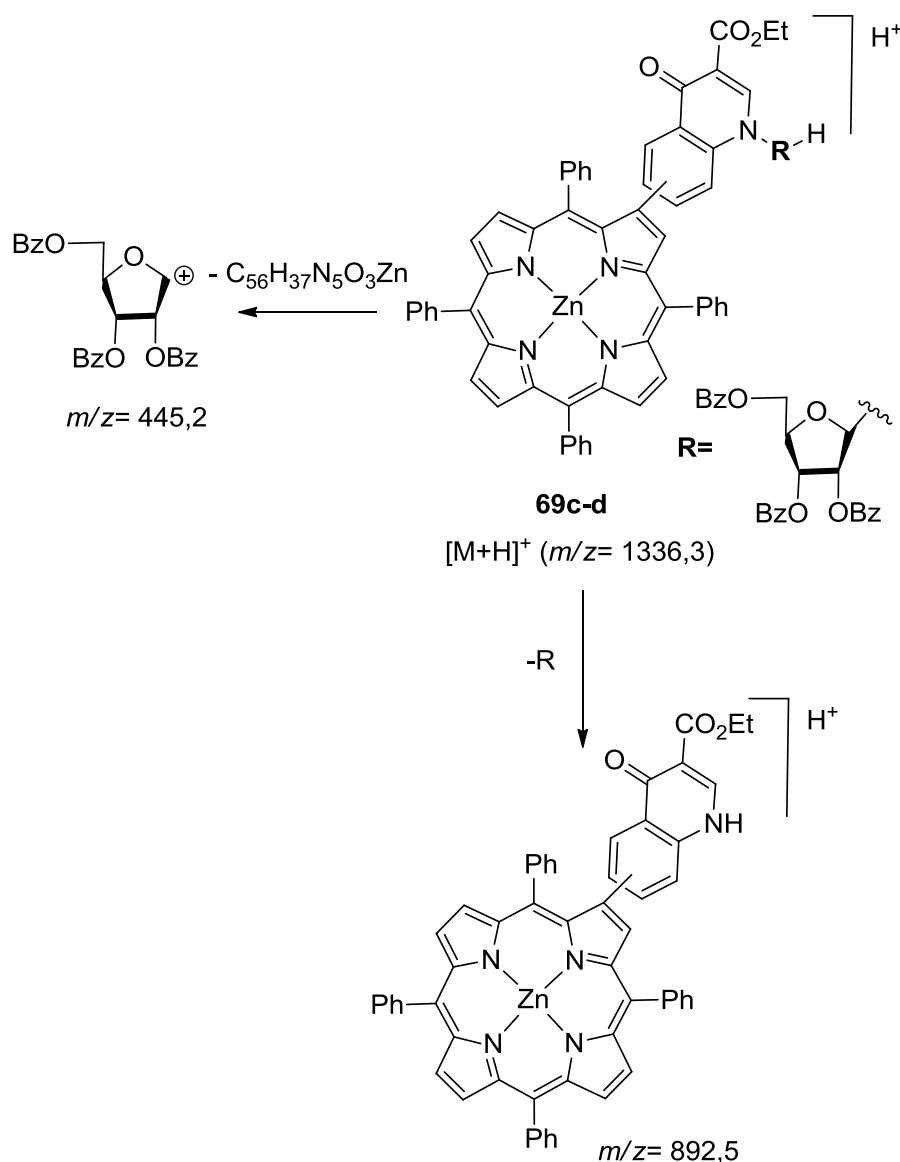


Figura 3.20. Estruturas propostas para os iões moleculares $[\text{M}+\text{H}]^+$ e vias de fragmentação dos derivados **69c** e **69d**.

Apesar da semelhança das vias de fragmentação entre cada par dos isómeros **69a/69b** e **69c/69d**, com este estudo foi possível distinguir cada forma isomérica devido às diferenças de AR de determinados iões fragmento. Por exemplo, os isómeros **69a/69b** sofrem a mesma via de fragmentação que resulta na perda do grupo R e de HOCH_2CH_3 , no entanto estes iões fragmento surgem com diferentes AR. Este valor é maior para o caso do derivado **69a** (em que a unidade de porfirina está ligada à unidade de quinolona pela posição C-6 da quinolona), como podemos observar na tabela 3.2. O mesmo acontece para os derivados **69c** e **69d** no que diz respeito à via

de fragmentação que resulta na perda do grupo R. Como podemos observar, o valor de AR correspondente a esta via de fragmentação para o derivado **69c** é maior do que para o derivado **69d**.

Para além de ser possível distinguir as formas isoméricas, é também possível observar que existe um padrão na AR das vias de fragmentação entre os isómeros. Na realidade, os derivados em que a unidade de porfirina está ligada à unidade de quinolona pela posição C-6 da quinolona (**69a** e **69c**) sofrem a perda do grupo R mais facilmente do que os derivados que possuem a unidade de porfirina ligada à unidade de quinolona pela posição C-7 da quinolona (**69b** e **69d**).

3.3.4.3. Caracterização dos conjugados quinolona-porfirina 70a-d

Os espectros de ESI-MS dos conjugados quinolona-porfirina **70a-d**, à semelhança dos seus precursores **69a-d**, foram obtidos em modo positivo, mostrando o correspondente pico do ião molecular $[M+H]^+$. A fragmentação destes iões foi induzida por colisão com árgon, produzindo os respectivos espectros de ESI-MS/MS

A análise dos espectros de ESI-MS/MS destes derivados (Figura 3.21 e Tabela 3.3) foi feita de forma semelhante à realizada para os conjugados quinolona-porfirina **69a-d**.

Reacção de Suzuki e macrociclos tetrapirrólicos: síntese de β -arilporfirinas e de derivados quinolona-porfirina com potenciais aplicações em PACT

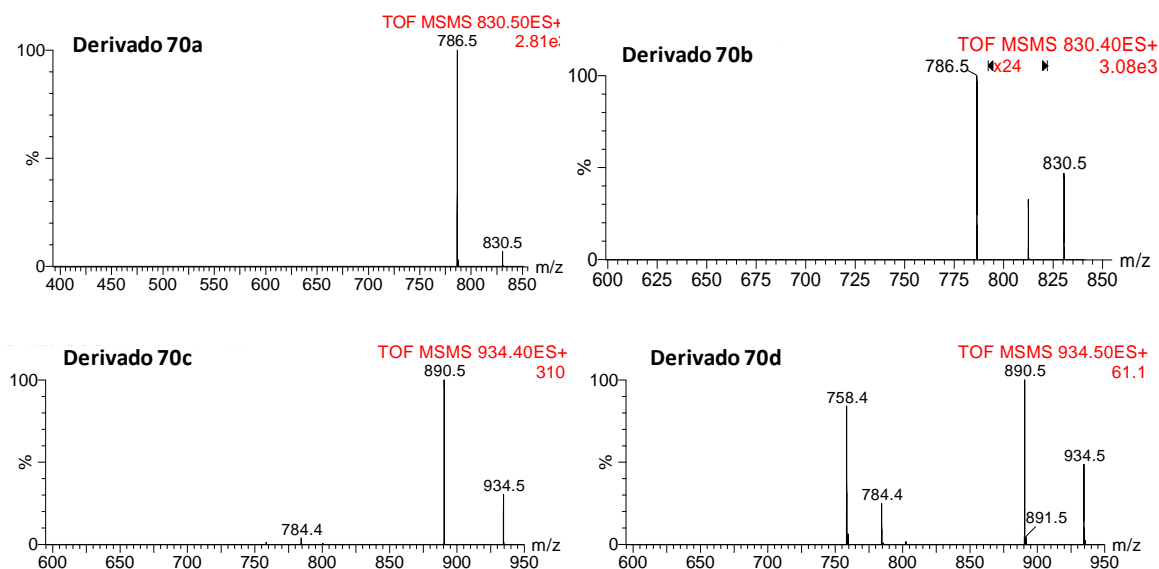


Figura 3.21. Espectros de ESI-MS/MS dos derivados **70a-d**.

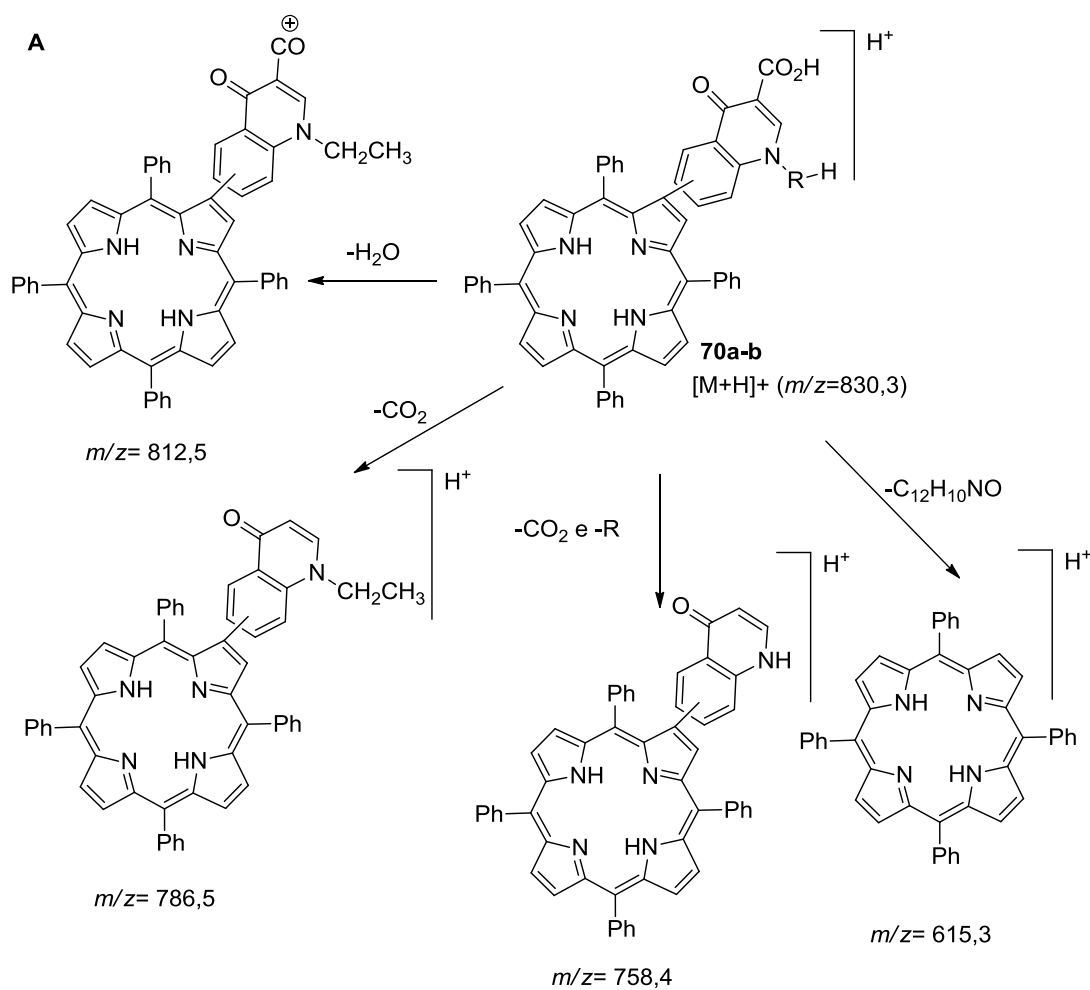
Através da tabela 3.3 podemos observar que para todos estes derivados a via de fragmentação mais abundante está relacionada com a perda de CO_2 (-44 Da) da unidade de quinolona. Isto pode ser devido à fácil descarboxilação ocorrendo com a migração de hidrogénio para o fragmento (Figura 3.22A e B). Esta via de fragmentação é típica da presença de grupos carboxilo, como foi observado para derivados porfirínicos substituídos com aminoácidos.⁴⁴

Nos derivados **70c** e **70d** é possível também observar a perda do grupo R combinada com a perda de H_2O (- 150 Da) (Figura 3.22 B). Mais uma vez, as vias de fragmentação semelhantes entre os derivados **70a-70b** e **70c-70d** confirmam que as suas estruturas são muito parecidas. No entanto, podemos afirmar que os derivados **70c** e **70d** são compostos distintos, uma vez que a perda combinada de CO_2 e do grupo R apenas ocorre para o conjugado **70d**, o faz deste pico a fragmentação característica deste composto.

Tabela 3.3. Principais iões fragmento observados nos espectros de ESI-MS/MS dos iões $[M+H]^+$ dos derivados quinolona-porfirina **70a-d**, com indicação das suas abundâncias relativas (AR%).

	Derivado			
	70a	70b	70c	70d
$[M+H]^+$	830,3	830,3	934,3	934,3
- H ₂ O	-	812,5 (<5)	-	-
-CO ₂	786,5 (100)	786,2(100)	890,5 (100)	890,5(100)
- CO ₂ e -R	758,4 (<5)	-	-	758,5 (70)
-C ₁₂ H ₁₀ NO ₃ (quinolona)	615,3 (<5)	-	-	-
-H ₂ O e R	-	-	784,4 (5)	784,4 (20)

Reacção de Suzuki e macrociclos tetrapirrólicos: síntese de β -arilporfirinas e de derivados quinolona-porfirina com potenciais aplicações em PACT



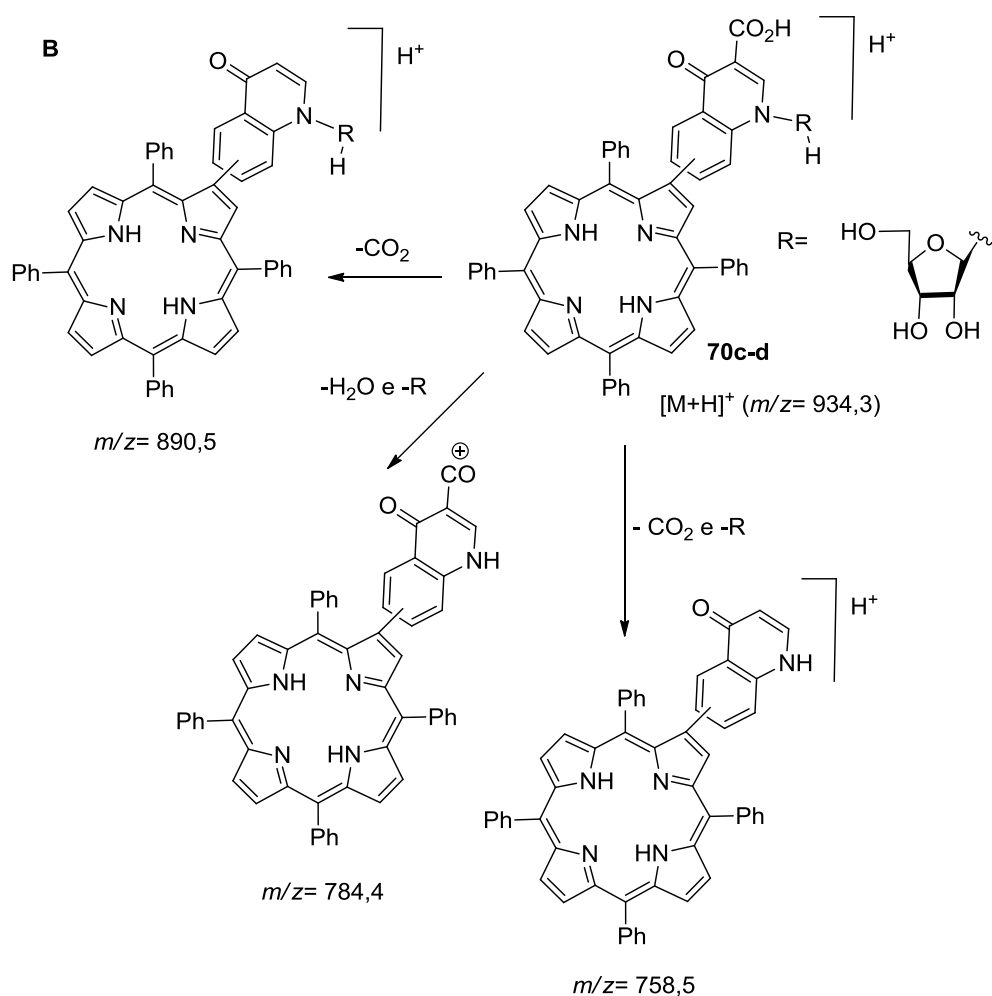


Figura 3.22. Estruturas propostas para os iões moleculares $[M+H]^+$ e vias de fragmentação dos derivados 70a-b (A) e 70c-d (B).

3.4. Avaliação da actividade fotodinâmica dos derivados quinolona-porfirina 70a-d em *Leishmania Braziliensis*

A Leishmaniose

A Leishmaniose é uma parasitose causada por diferentes espécies do género *Leishmania* que afecta cerca de 12 milhões de pessoas em todo o mundo, em que 90% dos casos reportados são do Afeganistão, Paquistão, Irão, Iraque, Síria, Arábia Saudita, Índia, Etiópia, Brasil, Bolívia, Colômbia, Equador, Peru e Venezuela.^{48,49} Os parasitas são transmitidos pela picada de insectos denominados flebotómíneos a animais susceptíveis de sofrer esta infecção ou para o homem. São conhecidas cerca de 21

espécies deste parasita que são responsáveis por três tipos de manifestações clínicas diferentes:⁴⁹

1. Manifestação cutânea, onde as lesões são restritas ao sitio de inoculação do mosquito;
2. Manifestação mucocutânea, que afecta os tecidos mucosos;
3. Manifestação visceral, afecta vários órgãos vitais, como fígado, o baço e a medula óssea. Esta é fatal se não for tratada.

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (WHO), ocorrem cerca de 70.000 mortes por ano devido a esta enfermidade. No Brasil, a *Leishmania Amazonensis* e a *Leishmania Brasiliensis* são as espécies responsáveis pela manifestação cutânea desta doença.⁵⁰ O tratamento desta doença está limitado ao uso de derivados do antimónio pentavalente, à amfotericina B e à paromomicina que causam diversos efeitos secundários. Outros problemas associados a estes tratamentos são os procedimentos complexos e o seu elevado custo, tornando-os inacessíveis para as populações desfavorecidas.⁴⁸ Para além disso, o limitado número de tipos de medicamentos criou resistência a estas drogas; na realidade, 60% dos casos de Leishmaniose mostrou resistência aos primeiros tratamentos usados com estas drogas.⁵¹

Felizmente, a descoberta de novos fármacos e novas terapias para o tratamento da Leishmaniose é ainda uma área de investigação. Existem já alguns casos reportados na literatura do uso da PACT para o tratamento da Leishmaniose cutânea usando o azul-de-metileno, o ácido aminolevulínico e naftoporfirinas como fotossensibilizadores.^{52,53,54,55} Em todos os casos foi demonstrada a eficiência desta terapia na fotoinactivação do parasita responsável pela Leishmaniose cutânea.

Tendo em conta estes estudos, decidiu-se avaliar a eficiência fotodinâmica dos derivados quinolona-porfirina **70a-d**, na inactivação do parasita *Leishmania Braziliensis* que é responsável pelo aparecimento de Leishmaniose cutânea no Brasil.

3.4.1. Estudos de geração de oxigénio singuleto dos derivados quinolona-porfirina **70a-d**.

Como foi referido no capítulo anterior, a actividade fotodinâmica de um fotossensibilizador está fortemente relacionada com a produção de oxigénio singuleto ($^1\text{O}_2$). Os fotossensibilizadores que formam $^1\text{O}_2$ são importantes para induzirem processos que são responsáveis pela destruição de tecidos “doentes”.

Pensando que os derivados quinolona-porfirina podem exibir actividades biológicas interessantes, decidiu-se avaliar as propriedades fotossensibilizadoras dos conjugados **70a-d**.

Assim, a capacidade de gerar $^1\text{O}_2$ foi qualitativamente avaliada através da monitorização da fotodecomposição de um agente supressor de $^1\text{O}_2$, o DFiBF seguindo o procedimento já descrito no capítulo anterior. Assim, a solução dos derivados quinolona-porfirina **70a-d** e DFiBF (com uma concentração 100 vezes maior do que a do fotossensibilizador) em DMF/H₂O (9:1) foi irradiada com luz de comprimento de onda entre 550-800 nm e com uma dose de luz de 25 mW/cm².

Os resultados obtidos foram organizados na forma de gráfico onde a percentagem de decaimento da absorvência de DPiBF a 415 nm foi apresentada em função do tempo de irradiação (Figura 3.23). Assim, quanto mais pronunciada for a curva, maior é a taxa de produção de $^1\text{O}_2$. Como fotossensibilizador de referência foi usada a *meso*-tetrafenilporfirina (**TPP**), um fotossensibilizador conhecido por gerar oxigénio singuleto eficientemente.⁵⁶

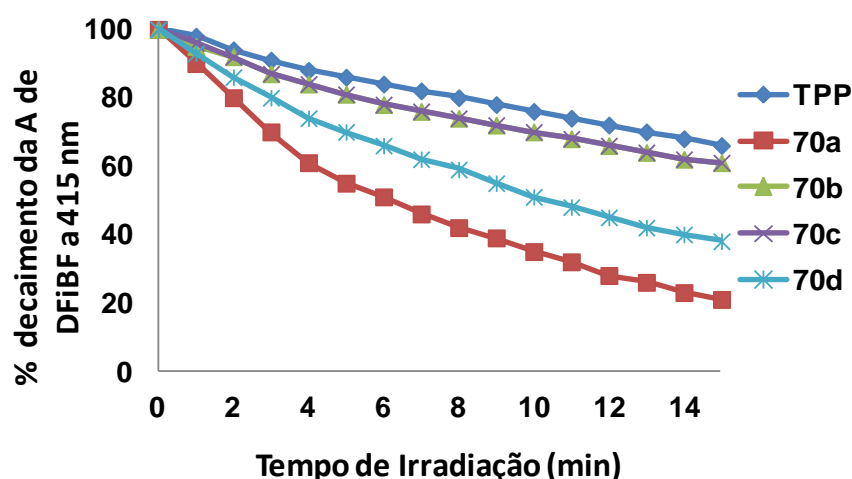


Figura 3.23. Fotodecomposição do DPiBF pelo $^1\text{O}_2$ gerado por **TPP**, **70a**, **70b**, **70c** e **70d** depois da irradiação com luz de comprimento de onda entre 550 – 800 nm ($25 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$).

Como é possível observar através do gráfico da figura 3.23, todos os derivados quinolona-porfirina **70a-d** demonstraram ser geradores de $^1\text{O}_2$, uma vez que se observa para todos os casos uma fotodegradação significativa do DFIBF. É possível também observar que todos os compostos testados são melhores geradores de $^1\text{O}_2$ do que a **TPP** usada como referência. É ainda possível enfatizar os derivados **70a** e **70d** como sendo os melhores geradores de $^1\text{O}_2$.

3.4.2. Estudos *in vitro* da actividade fotodinâmica antimicrobiana dos derivados quinolona-porfirina 70a-d

Os ensaios biológicos dos derivados quinolona-porfirina **70a-d** foram realizados no Laboratório de Parasitologia e Biotecnologia da Universidade do Vale do Paraíba, Brasil pela Doutora Josane Mittmann. Nestes testes preliminares, pretendeu-se avaliar a actividade fotodinâmica destes derivados porfirínicos na sobrevivência do parasita *Leishmania Braziliensis*. Para estimar a viabilidade celular deste parasita após tratamento fotodinâmico foi usado o método do MTT, também usado para estimar a viabilidade relativa das células HeLa e HaCaT depois do tratamento fotodinâmico com as glico-clorinas **36a-d**. Assim, as células de *Leishmania Braziliensis* foram incubadas com os fotossensibilizadores **70a-c** dissolvidos numa solução de PBS/DMSO (10%) 1

hora a 26°C. Depois deste período de incubação, as células foram irradiadas durante 81 segundos com um laser com uma dose de luz de 10 J/cm⁻² e comprimento de onda de 640 nm. Para cada fotossensibilizador foram testadas duas concentrações: 5 μ M e 10 μ M. Findo este processo, o PBS foi trocado por meio de cultura e as células mantidas em encubação durante 18 horas. Foi então adicionado 500 μ L de solução MTT/meio de cultura e procedeu-se a nova incubação desta vez, durante 3-4 horas. Findo este tempo, o meio de cultura foi substituído por DMSO para a dissolução dos cristais de formazano formados e foi lida a absorvância a 542 nm. As medições de absorvância dos controlos totais (células que não foram submetidas à presença de composto e radiação) foram tomadas como 100% de viabilidade celular e a partir dessas estimaram-se as percentagens de viabilidade para as células submetidas a tratamento completo. Os resultados obtidos são apresentados na tabela 3.4. O derivado quinolona-porfirina **70d** não foi testado por não ser solúvel no solvente usado.

Como é possível observar através da tabela 3.4, a aplicação dos três fotossensibilizadores à mesma concentração em amostras de *Leishmania Braziliensis*, irradiadas durante 81 segundos com um laser com uma dose de luz de 10 J/cm⁻² e comprimento de onda de 640 nm, provoca efeitos diferentes na viabilidade destes parasitas. Por exemplo, para a concentração mais baixa de fotossensibilizador (5 μ M) é possível observar que os compostos **70a** e **70c** foram os mais eficientes provocando entre 20-30% de morte de celular. Para esta concentração, o derivado **70b** mostrou não ter actividade fotodinâmica sobre este parasita. No caso da concentração mais elevada (10 μ M), podemos observar o derivado quinolona porfirina **70c** apresenta uma sobrevivência celular de 72, 5%, tendo sido aquele que produziu maior morte celular do parasita usado.

Tabela 3.4. Sobrevivência celular de *Leishmania Braziliensis* depois do tratamento fotodinâmico com os derivados quinolona-porfirina **70a**, **70b** e **70c** a duas concentrações diferentes.

Composto	Concentração (μ M)	Sobrevivência celular (%)
70a	5	68,31 \pm 4,92
	10	94,98 \pm 4,66
70b	5	100,58 \pm 0,25
	10	79,48 \pm 8,28
70c	5	79,85 \pm 5,69
	10	72,52 \pm 5,69

Um dos mais importantes requisitos para um fotossensibilizador ser aplicado em terapia fotodinâmica é não apresentar toxicidade na ausência de luz. Para avaliar este parâmetro, os compostos **70a**, **70b** e **70c** foram incubados a várias concentrações com o parasita *Leishmania Braziliensis* no escuro durante 1 hora. Findo este período, foi realizado o ensaio do MTT tal como descrito anteriormente para estimar a viabilidade celular. Os resultados obtidos mostram que nenhum dos fotossensibilizadores testados tem actividade fotodinâmica sob o parasita *Leishmania Braziliensis* na ausência de luz.

Como já foi referido, estes testes são preliminares, ainda havendo muitos ajustes e estudos para fazer, como é o caso do aumento do tempo de irradiação. De qualquer forma, ficou demonstrado que estes compostos têm actividade anti *Leishmania Braziliensis* e que têm uma enorme potencialidade como fotossensibilizadores no tratamento da Leishmaniose.

3.5. Conclusão

Nesta parte do trabalho foi demonstrada a versatilidade da reacção de Suzuki na construção de novos derivados porfirínicos.

Numa primeira parte, esta metodologia permitiu realizar a síntese de complexos β -aril-*meso*-tetrafenilporfirínicos **62a** e **62b**, através da reacção de Suzuki entre o complexo porfirínico β -borilado **54** e dois brometos de fenilo **61a** e **61b**, com bons rendimentos. Foi, também, mostrado que esta reacção é uma ferramenta eficiente para preparar novos compostos porfirínicos diméricos ligados por unidades de oligofenileno. Estes compostos possuem características estruturais ideais para poderem ser aplicadas em diversas áreas¹⁸, como é o caso da transferência de energia^{19, 20}, catálise²¹ e PDT.

Na segunda parte deste trabalho foi demonstrado que o complexo porfirínico β -borilado **54** reage com várias bromo-quinolonas por reacção de Suzuki formando novos conjugados quinolona-porfirina **69a-d** com rendimentos elevados. Foram, também, sintetizados os derivados **70a-d**, com excelentes rendimentos, através da hidrólise alcalina dos compostos **69a-d**, seguida de descomplexação.

O estudo por MS-ESI Tandem (MS/MS) mostrou que os derivados **69a-d** e **70a-d** possuem vias de fragmentação interessantes, permitindo identificar as suas características estruturais. Neste estudo foi possível verificar que os isómeros **69a-b** e **69c-d**, assim como as suas formas desprotegidas **70a-b** e **70c-d**, sofrem as mesmas vias de fragmentação, confirmando as suas estruturas análogas. Foi possível também distinguir os derivados em que a unidade de porfirina está ligada à quinolona através da posição C-6 da quinolona (**69a** e **69c**) e os derivados em que a unidade de porfirina está ligada à quinolona através da posição C-7 da quinolona (**69b** e **69d**), através das AR de certas fragmentações. Este estudo forneceu informação importante sobre as vias de fragmentação dos derivados sintetizados que podem ser úteis no estudo da avaliação das alterações estruturais do macrociclo que ocorrem no metabolismo celular em testes *in vivo*.

Os estudos de geração de $^1\text{O}_2$ mostraram que as porfirinas β -substituídas com unidades de quinolona **70a-d** são melhores geradoras de $^1\text{O}_2$ do que a **TPP** e que a sua

eficiência em gerar esta espécie é afectada pela posição da ligação entre a porfirina e a quinolona assim como o *N*-substituente da quinolona.

Os derivados quinolona-porfirina **70a-c** foram testados como agentes fotossensibilizadores no tratamento fotodinâmico da Leishmaniose, causado pelo parasita *Leishmania Braziliensis*. Estes estudos preliminares mostram que estes compostos têm capacidade para fotoinactivar este parasita e que o derivado **70c** é o que provoca maior morte celular a uma concentração de 10 μ M com irradiação durante 81 segundos com um laser com potência de 10 J/cm⁻² e comprimento de onda de 640 nm.

É ainda importante de referir que parte do trabalho desenvolvido neste capítulo originou duas publicações em revistas científicas.^{57,58}

3.6. Parte experimental

3.6.1. Reagentes, solventes e equipamento

Os reagentes comerciais utilizados neste trabalho não sofreram qualquer purificação prévia à sua utilização.

Os solventes utilizados nas diferentes etapas de síntese e cristalização eram analiticamente puros ou, quando necessário, eram previamente secos. Os solventes utilizados para a purificação das misturas reaccionais foram destilados e passados por uma coluna de alumina neutra activada.

O dicloroetano usado como solvente nas reacções foi previamente seco em hidreto de sódio a refluxo. Após 60 minutos a refluxo, o solvente foi recolhido, tendo-se despezado os primeiros 20 mL. O tolueno usado como solvente nas reacções foi previamente seco em fio de sódio. A DMF usada como solvente nas reacções foi seca e armazenada em peneiros moleculares previamente activados.

As reacções foram seguidas por TLC, utilizando folhas plásticas revestidas por sílica gel 60 F₂₅₀. Depois da eluição, as placas foram observadas à luz ultravioleta a 254 e/ou a 366 nm.

As purificações das misturas reaccionais foram realizadas por coluna com sílica gel 60 de 0,063-0,200 nm, da Merck, ou por cromatografia de camada fina preparativa. As placas de cromatografia utilizadas eram de vidro (20x20 cm), previamente revestidas com uma camada de sílica gel 60 Merck, com uma espessura de 0,75 mm e posteriormente activadas na estufa a 100°C durante 10 h.

Os espectros de visível foram registados num espectrofotómetro UV-2501PC Shimadzu em células de vidro de percurso óptico de 1 cm.

Os espectros de RMN de ¹H e ¹³C foram registados num aparelho Bruker Avance 300 a 300,13, e 75,47 MHz, respectivamente ou num aparelho Avance 500 a 500,13 e 125,77 MHz para ¹H e ¹³C, respectivamente. O solvente utilizado para a aquisição dos espectros foi o clorofórmio deuterado e TMS como referência. Os assinalamentos inequívocos das ressonâncias dos protões e carbonos foram efectuados com recurso às

técnicas bidimensionais de HSQC e HMBC e em alguns casos também à técnica de COSY e NOESY.

Os espectros de massa por ionização em electrospray em modo positivo de alta resolução (HRMS-ESI) foram efectuados na Universidade de Vigo, num espectrómetro VG Autospec M usando CHCl_3 como solvente e álcool 3-nitrobenzílico (NBA) como matriz.

O estudo de fragmentação dos derivados de quinolona-porfirina em ESI-MS/MS foi realizado num espectrómetro Q-TOF 2 (Micromass, Manchester, UK). As amostras foram preparadas diluindo 1 μL de solução de porfirina em clorofórmio (10^{-5} M) em 200 μL de metanol. O gás nebulizador usado foi o azoto enquanto que o gás de colisão usado foi o árgon. As amostras foram introduzidas com um fluxo de 10 μL /min e a voltagem do capilar foi de 3000 V. Os espectros de massa foram adquiridos com uma voltagem de cone de 30 V. Os espectros de iões-produto foram adquiridos seleccionando o ião precursor com o quadrupólo e energias de colisão entre 25 a 40eV.

3.6.2. Síntese das porfirinas de partida

A síntese das porfirinas usadas como material de partida nas reacções descritas neste capítulo foi realizada de acordo com procedimentos experimentais bem conhecidos e reportados na literatura. No entanto, para que a parte experimental deste documento fique completa, permitindo a reprodutibilidade da mesma, a síntese destes derivados porfirínicos será descrita pormenorizadamente.

- ***Síntese da 2-bromo-5,10,15,20-tetrafenilporfirinatozinco(II) (52)***

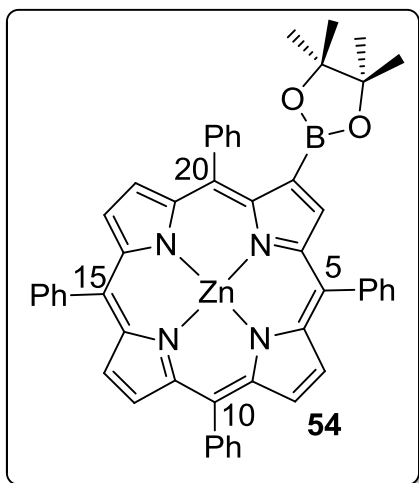
Uma mistura de **TPP** (200 mg, 0,33 mmol) e N-bromossuccinimida (102 mg, 0,58 mmol) em clorofórmio (60 mL) foi agitada e mantida sobre refluxo durante uma hora.²⁷ Findo este tempo a mistura reaccional foi lavada com uma solução de hidrogenocarbonato de sódio e a fase orgânica extraída com clorofórmio e seco em sulfato de sódio anidro. A mistura reaccional for purificada por cromatografia em coluna de sílica gel usando como eluente uma mistura de tolueno/éter de petróleo

(2:1). A 2-bromo-5,10,15,20-tetrafenilporfirina **59** foi obtida com um rendimento de 36% (80,3 mg), após cristalização em diclorometano/metanol. Para a preparação do complexo de zinco desta porfirina colocaram-se 80 mg (0,115 mmol) desta num balão de 100 mL e dissolveram-se em 30 mL de clorofórmio. O acetato de zinco (40,5 mg, 0,185 mmol) foi dissolvido em metanol (1 mL) e adicionado à solução de porfirina. A mistura foi mantida em agitação a 60°C durante cerca de 30 minutos. Findo este tempo, a mistura reaccional foi evaporada até à secura. O resíduo foi retomado em clorofórmio e lavado com água destilada de modo a remover o excesso de acetato de zinco. Em seguida a fase orgânica foi seca através de sulfato de sódio anidro e evaporada à secura. Após remoção do solvente a pressão reduzida, o resíduo foi deixado a cristalizar em clorofórmio/metanol, obtendo-se o complexo de zinco porfirínico **52** quantitativamente.

• **Síntese da 2-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-5,10,15,20-tetrafenilporfirinatozínco(II) (54)**

Num tubo de Schlenk de 50 mL foram colocados o complexo porfirínico **52** (37,6 mg, 49,7 μ mol) e o Pd(PPh₃)₂Cl₂ (8,92 mg, 12,7 μ mol) tendo sido dissolvidos em dicloroetano seco e 0,17 mL de trietilamina. De seguida foi adicionado 4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolano (0,3 mL, 2079 μ mol). A selagem do tubo de Schlenk foi feita por desgasificação em ultrasons a pressão reduzida com a ajuda de uma bomba de vácuo. Este processo deverá durar cerca de 1 minuto. A reacção foi mantida em agitação a 65°C durante 18 horas. Findo este tempo, a mistura reaccional foi lavada com uma solução aquosa de NaCl e a fase orgânica extraída com clorofórmio, lavada com água destilada e seca em sulfato de sódio anidro. O solvente foi evaporado a pressão reduzida e o resíduo obtido foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel usando clorofórmio como eluente. O derivado boronado **54** foi cristalizado em clorofórmio/hexano e obtido com 68% de rendimento.

2-(4,4,5,5,-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-5,10,15,20-tetrafenilporfirinatozinco(II) (54).

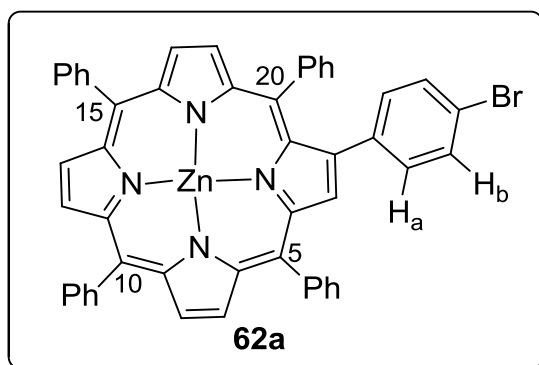


RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 9,26 (s, 1H, H-3), 8,92-8,91(m, 4H, H-7,8,17,18), 8,85 e 8,72 (AB, J = 4.7 Hz, 2H, H-12,13), 8,25-8,19 (m, 8H, H-*o*-Ph-5,10,15,20), 7,78-7,76 (m, 12H, H-*m,p*-Ph-5,10,15,20), 1,25 (s, 12H, CH₃). **UV-vis (CHCl₃):** λ_{\max} (log ϵ) 422 (5,78), 475 (3,40), 512 (3,50), 550 (4,28), 588 (3,52) nm. **HRMS-ESI:** m/z 802,2405. Calcd. para C₅₀H₃₉BN₄O₂Zn (M⁺) 802,2458.

3.6.3. Reacções de acoplamento de Suzuki entre o complexo porfirínico 54 e os brometos de arilo 61a,b. Procedimento geral:

Num tubo de Schlenk de 25 mL foi colocada o complexo porfirínico **54** (47,3 μ mol), cada um dos brometos de arilo **61a** e **61b** (144 μ mol), Cs₂CO₃ (42 mg, 128,9 μ mol), Pd(PPh₃)₄ (25 mg, 21,6 μ mol). Estes sólidos foram dissolvidos em DMF (1 mL) e tolueno (2 mL). O solvente foi desgaseificado em ultrasons e sob pressão reduzida durante 1 minuto. A reacção foi mantida em agitação a 80°C durante 18h. Findo este tempo, cada uma das reacções foi lavada com uma solução aquosa de NaCl e a fase orgânica extraída com clorofórmio, lavada com água destilada, seca em sulfato de sódio anidro e o solvente foi evaporado a pressão reduzida. Os resíduos obtidos foram purificados por cromatografia em coluna de sílica gel usando tolueno como eluente. As primeiras fracções obtidas de cada coluna foram identificadas como sendo os complexos β -arilporfirínicos **62a,b**.

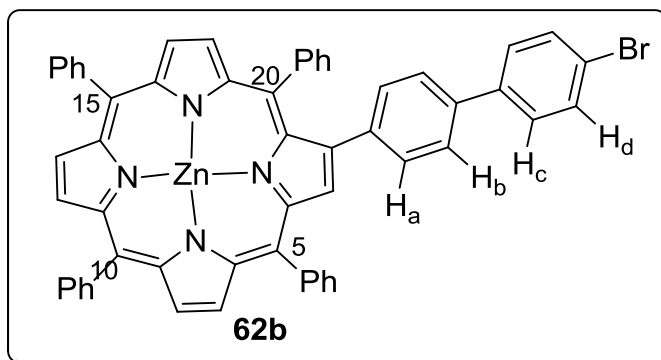
2-(4-bromofenil)-5,10,15,20-tetrafenilporfirinatozínco(II) (62a).



η = 88%. **RMN de ^1H** (300 MHz, CDCl_3): δ 8,97-8,92 (m, 4 H, H-7,8,17,18), 8,87 (d, J = 4,7 Hz, 1 H, H-13 ou H-12), 8,86 (s, 1 H, H-3), 8,80 (d, J = 4,7 Hz, 1 H, H-12 ou H-13), 8,23-8,20 (m, 6 H, H-*o*-Ph-5,10,15), 7,86-7,84 (m, 2H, H-*o*-Ph-20), 7,77-7,71 (m, 9 H, H-*m,p*-Ph-5,10,15), 7,40-7,38 (m, 1 H, H-*p*-

Ph-20), 7,25 (d, J = 8,4 Hz, 2H, H_a), 7,28-7,25 (m, 2H, H-*m*-Ph-20), 7,20 (d, J = 8,4 Hz, 2H, H_b). **RMN ^{13}C** (75,5 MHz, CDCl_3): δ 151,2, 150,3, 150,2, 147,7, 146,3, 142,8, 142,6, 141,3, 138,2, 135,6, 135,1 (C-3), 134,4, 134,3, 132,7, 132,2, 132,1, 132,0, 131,8, 131,5, 130,2, 127,5, 127,1, 126,6, 126,5, 126,0, 121,6, 119,8. **UV-vis (CDCl_3)**: λ_{max} ($\log \epsilon$) = 422 (5,72), 511 (3,52), 549 (4,32), 586 (3,49) nm. **HRMS (ESI)** m/z 831,1121. Calcd. para $\text{C}_{50}\text{H}_{32}\text{BrN}_4\text{Zn}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 831,1096.

2-(4'-bromo-1,1'-bifenil-4-il)-5,10,15,20-tetrafenilporfirinatozínco(II) (62b).



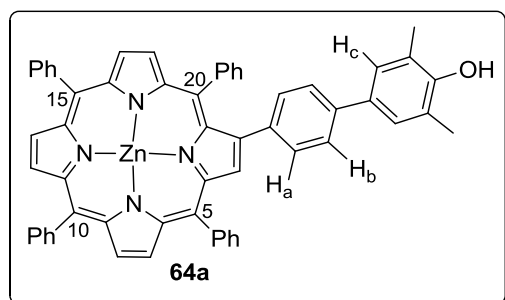
η = 83%. **RMN de ^1H** (500 MHz, CDCl_3): δ 8,97-8,94 (m, 5H, H-3,7,8,17,18), 8,87 (d, J = 4,6 Hz, 1H, H-13 ou H-12), 8,81 (d, J = 4,6 Hz, 1H, H-12 ou H-13), 8,24-8,21 (m, 6H, H-*o*-Ph-5,10,15), 7,88 (d, 2H, J = 7,5 Hz, H-*o*-Ph-20), 7,77-

7,71 (m, 9H, H-*m,p*-Ph-5,10,15), 7,64 (d, J = 8,2 Hz, 2H, H_d), 7,57-7,55 (m, 2H, H_a), 7,49 (d, J = 8,2 Hz, 2H, H_c), 7,20-7,22 (m, 2H, H-*m*-Ph-20), 7,42-7,40 (m, 2H, H_b), 7,16-7,14 (m, 1H, H-*p*-Ph-20). **RMN de ^{13}C** (75,5 MHz, CDCl_3): δ 150,3, 147,0, 141,4, 137,9, 136,4, 135,8, 135,5, 134,4, 132,2, 132,0, 131,9, 130,7, 130,5, 129,0, 128,6, 128,5, 128,2, 127,5, 126,6, 125,9, 125,7, 125,3, 121,9. **UV-vis (CHCl_3)**: λ_{max} ($\log \epsilon$) = 422 (5,61), 511 (3,42), 549 (4,24), 586 (3,36) nm. **HRMS (ESI)**: m/z 907,1401. Calcd. para $\text{C}_{56}\text{H}_{36}\text{BrN}_4\text{Zn}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 907,1409.

3.6.4. Reacções de acoplamento de Suzuki entre os complexos β -bromofenilporfirínicos **62a,b** e o 2,6-dimetil-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-fenol (**63**). Procedimento geral:

Num tubo de Schlenk de 25 mL foi colocado o 2,6-dimetil-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-fenol **63** (47,3 μmol), o complexos β -bromofenilporfirínico **62a** ou **62b** (144 μmol), Cs_2CO_3 (42 mg, 128,9 μmol), $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (25 mg, 21,6 μmol). Estes sólidos foram dissolvidos em DMF (1 mL) e tolueno (2 mL). O solvente foi degaseificado em ultrasons e sob pressão reduzida durante 1 minuto. As reacções foram mantidas em agitação a 80°C durante 18h. Findo este tempo, cada reacção foi lavada com uma solução aquosa de NaCl e as fases orgânicas extraídas com clorofórmio, lavadas com água destilada, secas em sulfato de sódio anidro e o solvente evaporado a pressão reduzida. Os resíduos obtidos foram purificados por cromatografia em coluna de sílica gel usando tolueno como eluente. A primeira fracção obtida de cada coluna foi identificada como sendo os derivados **64a** e **64b**. A segunda fracção obtida, usando como eluente tolueno/clorofórmio (1:1), foi identificada como sendo os dímeros **65** e **66**, respectivamente.

(4'-Hidroxi-3',5'-dimetil-1,1'-bifenil-4-il)-5,10,15,20-tetrafenilporfirinatozínco(II) (**64a**).

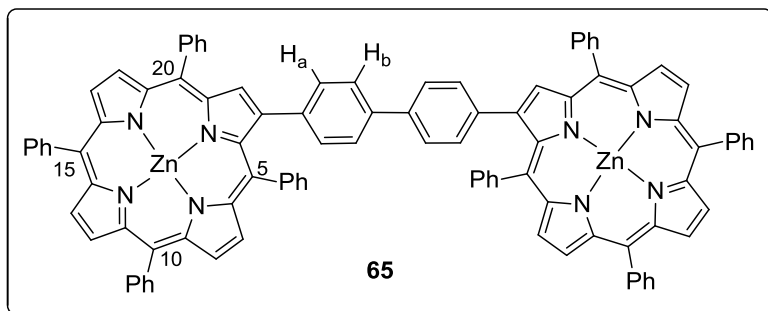


$\eta = 37\%$. **RMN de ^1H** (300 MHz, CDCl_3): δ 8,97-8,92 (m, 5H, H-3,7,8,17,18), 8,87 (d, $J = 4,6$ Hz, 1H, H-13 ou H-12), 8,81 (d, $J = 4,6$ Hz, 1H, H-12 ou H-13), 8,25-8,23 (m, 6H, H-*o*-Ph-5,10,15), 7,90-7,87 (m, 2H, H-*o*-Ph-20), 7,77-7,71 (m, 9H, H-*m,p*-Ph-5,10,15), 7,38-7,13 (m, 9H, H-*a*, H-*b*, H-*c*, H-*m,p*-Ph-20), 4,51 (s, 1H, OH), 2,35 (s, 6H, CH_3). **RMN de ^{13}C** (75.5 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{PyD}$): δ 152,9, 150,0, 147,4, 146,5, 146,4, 143,3, 143,2, 143,1, 141,7, 137,7, 137,6, 134,2, 132,36, 132,0, 131,4, 131,3, 131,1, 130,7, 130,1, 127,9, 126,8, 126,7, 126,2, 125,9, 125,6, 125,1, 124,7, 121,6, 120,5, 120,0, 119,7, 16,8 (CH_3). **UV-vis**

Reacção de Suzuki e macrociclos tetrapirrólicos: síntese de β -arilporfirinas e de derivados quinolona-porfirina com potenciais aplicações em PACT

(CHCl₃): λ_{\max} (log ϵ) = 425 (5,09), 552 (3,80), 593 (3,13), 652 (2,15) nm. HRMS (ESI): m/z 872,4881. Calcd. para C₅₈H₄₀N₄OZn [M]⁺ 872,24936.

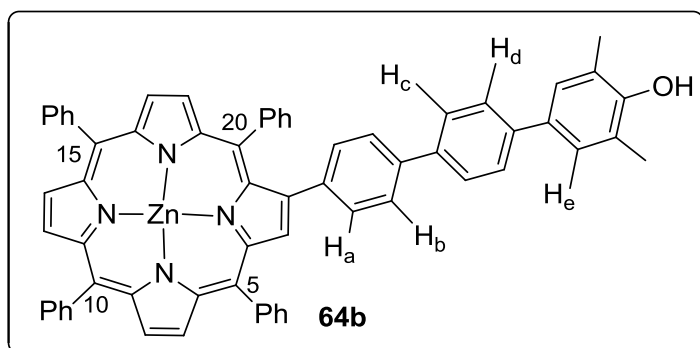
2,2'-(1,1'-bifenil-4,4'-di-il)-bis(5,10,15,20-tetrafenilporfirinatozinco(II)) (65).



η = 19%. RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 8,91-8,90 (m, 6H, H- β), 8,89-8,87 (m, 4H, H- β), 8,83 (d, J = 4,6 Hz, 2H, H-13 ou H-12), 8,81 (d, J = 4,6 Hz, 2H, H-

12 ou H-13), 8,87-8,82 (m, 12H, H-*o*-Ph-5,10,15), 7,95-7,94 (m, 4H, H-*o*-Ph-20), 7,74-7,70 (m, 18H, H-*m,p*-Ph-5,10,15), 7,46 (d, J = 8,0 Hz, 4H, H_a), 7,39-7,36 (m, 8H, H_b e H-*m*-Ph-20), 7,29-7,28 (m, 1H, H-*p*-Ph-20). RMN de ¹³C (75.5 MHz, CDCl₃): δ = 150,9, 150,1, 150,0, 149,9, 149,8, 148,0, 147,6, 145,4, 146,5, 143,5, 143,3, 142,0, 138,7, 137,4, 135,8, 135,5, 134,7, 134,4, 134,3, 132,8, 131,6, 131,4, 130,4, 126,9, 130,4, 126,9, 125,6, 125,58, 120,7, 120,2, 119,9. UV-vis (CHCl₃): λ_{\max} (log ϵ) = 425 (5,07), 551 (3,81), 587 (3,16), 632 (2,89) nm. HRMS (ESI): m/z 1503,3730. Calcd. para C₁₀₀H₆₃₆N₈Zn₂ [M+H]⁺ 1503,3753.

2-(4''-Hidroxi-3'',5''-dimetil-1,1':4',1''-terfenil-4-il)-5,10,15,20-tetrafenilporfirinatozinco(II) (64b).



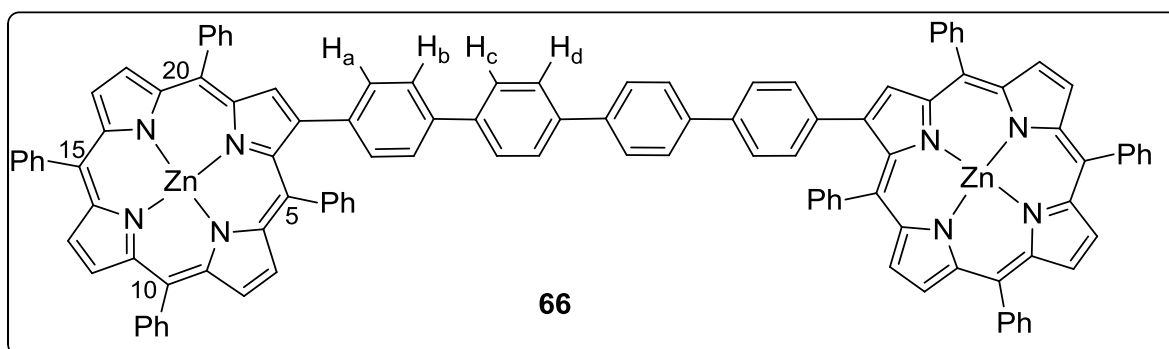
η = 26%. RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 8,97-8,95 (m, 5H, H-3,7,8,17,18), 8,87 (d, J = 4,6 Hz, 1H, H-12 ou H-13), 8,82 (d, J = 4,6 Hz, 1H, H-12 ou H-13), 8,215-8,21 (m, 6H, H-*o*-Ph-5,10,15), 7,90-7,89 (m,

2H, H-*o*-Ph-20), 7,77-7,71 (m, 10H, H-*m,p*-Ph-5,10,15), 7,43-7,38 (m, 8H, H_{a,b,c,d}), 7,33 (s, 2H, H_e), 7,32-7,30 (m, 2H, H-*m*-Ph-20), 7,24-7,22 (m, 1H, H-*p*-Ph-20), 4,47 (s, 1H, OH), 2,32 (s, 6H, CH₃). RMN de ¹³C (75.47 MHz, CDCl₃): δ 153,2, 150,1, 142,9, 142,7,

Reacção de Suzuki e macrociclos tetrapirrólicos: síntese de β -arilporfirinas e de derivados quinolona-porfirina com potenciais aplicações em PACT

135,7, 134,4, 134,3, 132,7, 131,9, 131,4, 130,6, 128,7, 128,6, 127,5, 127,3, 127,2, 127,1, 126,8, 126,7, 126,5, 125,9, 125,8, 123,6, 123,1, 120,9, 81,4, 78,3, 34,8, 29,7, 16,1 (CH₃). **UV-vis (CHCl₃):** λ_{\max} (log ϵ) = 422 (5,73), 508 (3,52), 550 (4,34), 586 (2,60) nm. **HRMS (ESI):** m/z 948,27976. Calcd. para C₆₄H₄₄N₄OZn [M]⁺ 948,28066.

2,2'-(1,1':4',1'':4'',1''':4''''-quaterfenil-4,4''''-di-il)-bis(5,10,15,20-tetrafenilporfirinatozínco(II)) (66).

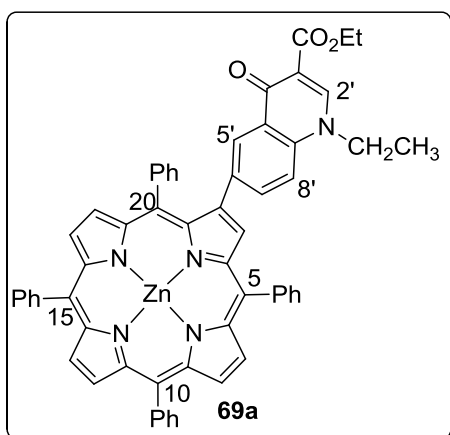


η =14%. **RMN de ¹H** (500 MHz, CDCl₃): δ 8,97-8,94 (m, 5H, H-3,7,8,17,18), 8,89 (d, J = 4,6 Hz, 2H, H-12 ou H-13), 8,82 (d, J = 4,6 Hz, 2H, H-12 ou H-13), 8,25-8,21 (m, 12H, H-*o*-Ph-5,10,15), 7,90-7,89 (m, 4H, H-*o*-Ph-20), 7,78-7,77 (m, 18H, H-*m,p*-Ph-5,10,15), 7,69-7,68 (m, 8H, H_{*a,b*}), 7,53-7,52 (m, 4H, H_{*a*}), 7,43-7,38 (m, 4H, H_{*b*}), 7,31-7,30 (m, 2H, H-*p*-Ph-20), 7,30-7,21 (m, 4H, H-*m*-Ph-20). **RMN de ¹³C** (75,5 MHz, CDCl₃): δ 120,1, 120,6, 120,9, 121,5, 122,4, 122,9, 123,2, 123,3, 125,3, 125,8, 125,9, 126,4, 126,5, 126,6, 126,7, 126,8, 127,1, 127,2, 127,3, 127,4, 127,5, 128,2, 128,6, 129,0, 130,6, 131,4, 131,9, 132,0, 132,1, 132,2, 132,7, 134,3, 134,4, 135,7, 137,7, 138,6, 139,6, 139,8, 141,0, 141,4, 142,7, 142,7. **UV-vis (CHCl₃/MeOH (1%)):** λ_{\max} (log ϵ) = 423 (5,33), 508 (3,40), 550 (4,02), 586 (3,31) nm. **HRMS (ESI):** m/z 1656,44582. Calcd. para C₁₁₂H₇₂N₈Zn₂ [M+2H]⁺ 1656,44629.

3.6.5. Reacções de acoplamento de Suzuki entre o complexo porfirínico β -borilado **54** e as bromo-quinolonas **67a-d**. Procedimento geral:

Num tubo de Schlenk de 25 mL foi colocada o complexo porfirínico β -borilado **54** (10,0 mg, 12,4 μ mol), cada uma das bromo-quinolonas **67a-d** (33,5 μ mol), Cs_2CO_3 (6,5 mg, 19,9 μ mol), $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (11,0 mg, 9.6 μ mol). Estes sólidos foram dissolvidos em DMF (0,5 mL) e tolueno (1 mL). O solvente foi desgaseificado em ultrasons e sob pressão reduzida durante 1 minuto. Cada uma das misturas reaccionais foram mantida em agitação a 80°C durante 18h. Findo este tempo, cada uma das reacções foi lavada com uma solução aquosa de NaCl e as fases orgânicas extraídas com clorofórmio, lavadas com água destilada, secas em sulfato de sódio anidro e o solvente evaporado a pressão reduzida. Os resíduos obtidos foram purificados por cromatografia em coluna de sílica gel usando uma mistura de tolueno/acetato de etilo como eluente. A primeira fracção obtida em cada caso foi identificada como sendo o derivado quinolona-porfirina **69a-d**, respectivamente e a segunda fracção obtida como sendo o complexo **54** que não reagiu.

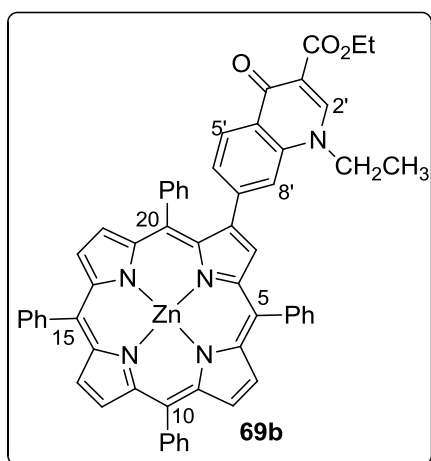
2-(3-etoxicarbonil-1-etil-4-oxo-1,4-di-hidroquinolin-6-il)-5,10,15,20-tetrafenilporfirinatozínco(II) (**69a**).



η =89%. RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 8,95 e 8,93 (AB, 2H, $J = 4,7$ Hz, H-7,8), 8,93 (s, 2H, H-12,13), 8,91 (s, 1H, H-3), 8,85 e 8,76 (AB, 2H, $J = 4,7$ Hz, H-17,18), 8,70 (d, 1H, $J = 2,1$ Hz, H-5'), 8,52 (s, 1H, H-2'), 8,26 – 8,17 (m, 6H, H-*o*-Ph-5,10,15), 8,02 – 7,86 (br s, 2H, H-*o*-Ph-20), 7,81 – 7,69 (m, 9H, H-*m,p*-Ph-5,10,15), 7,50 (dd, 1H, $J = 2,1$ e 8,6 Hz, H-7'), 7,11-7,06 (m, 2H, H-*m*-Ph-20), 7,49-7,48 (m, 1H, H-*p*-Ph-20), 7,08 (d, 1H, $J = 8,6$ Hz, H-8'), 4,42 (q, 2H, $J = 7,2$ Hz, $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 4,28-4,27 (m, 2H, NCH_2CH_3), 1,61 (t, 3H, J

= 7,2 Hz, NCH_2CH_3), 1,45 (t, 3H, $J = 7,2$ Hz, $CO_2CH_2CH_3$). **RMN de ^{13}C** (75,5 MHz, $CDCl_3$) δ 174,2 (C-4'), 166,3 ($CO_2CH_2CH_3$), 151,0, 150,5, 150,4, 150,3, 150,2, 148,3 (C-2'), 147,6, 145,2, 142,8, 142,7, 141,4, 137,0, 136,3, 135,7, 134,8 (C-7'), 134,4, 134,3, 132,5, 132,2, 132,1, 132,0, 131,5, 131,4, 128,6, 128,3 (C-5'), 128,3, 128,2, 127,5, 127,4, 126,6, 126,5, 126,5, 121,8, 121,7, 121,4, 121,0, 120,8, 114,3 (C-8'), 110,9, 60,9 (NCH_2CH_3), 48,9 ($CO_2CH_2CH_3$), 14,7 (NCH_2CH_3), 14,5 ($CO_2CH_2CH_3$). **UV-vis ($CHCl_3$):** λ_{max} ($\log \epsilon$) = 423 (5,47), 511 (3,37), 550 (4,10), 587 (3,32) nm; **HRMS-ESI:** m/z 920,25736. Calcd. para $C_{58}H_{42}N_5O_3Zn$ $[M+H]^+$ 920,25791.

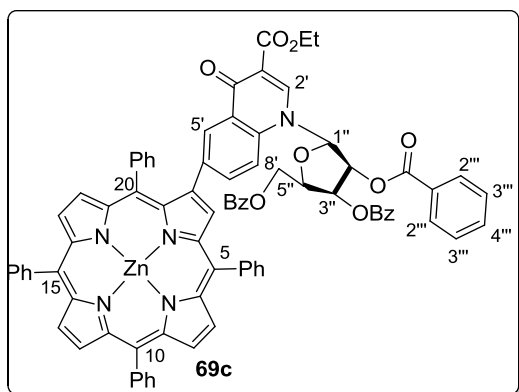
2-(3-etoxicarbonil-1-etil-4-oxo-1,4-di-hidroquinolin-7-il)-5,10,15,20-tetrafenilporfirinatozinco(II) (69b).



$\eta=82\%$. **RMN de 1H** (500 MHz, $CDCl_3$) δ 8,96 e 8,93 (AB, 2H, $J = 4,6$ Hz, H-7,8), 8,94-8,93 (m, 3H, H-3,12,13), 8,87 8,78 (AB, 2H, $J = 4,6$ Hz, H-17,18), 8,48 (s, 1H, H-2'), 8,24-8,20 (m, 7H, H-*o*-Ph-5,10,15 e H-5'), 7,91-7,84 (b, 2H, H-*o*-Ph-20), 7,77-7,74 (m, 9H, H-*m,p*-Ph-5,10,15), 7,57 (d, 1H, $J = 8,7$ Hz, H-6'), 7,29 (s, 1H, H-8'), 7,17 – 6,94 (m, 3H, H-*m,p*-Ph-20), 4,41 (q, 2H, 7,2 Hz, $CO_2CH_2CH_3$), 4,26 – 4,05 (m, 2H, NCH_2CH_3), 1,45

(t, 3H, $J = 7,1$ Hz, NCH_2CH_3), 1,40 (t, 3H, $J = 7,1$ Hz, $CO_2CH_2CH_3$). **RMN de ^{13}C** (75 MHz, $CDCl_3$) δ 174,3 (C-4'), 166,3 ($CO_2CH_2CH_3$), 151,0, 150,7, 150,6, 150,5, 150,4, 150,3, 150,2, 148,4 (C-2'), 147,2, 145,1, 142,6, 142,5, 141,3, 137,4, 135,2, 134,4, 134,3, 132,6, 132,3, 132,2, 132,1, 131,7, 127,6, 127,6, 127,5, 127,2, 126,8, 126,6, 122,1, 121,7, 121,6, 121,2, 120,9, 117,2, 110,7, 60,9 (NCH_2CH_3), 48,4 ($CO_2CH_2CH_3$), 14,6 (NCH_2CH_3), 14,4 ($CO_2CH_2CH_3$). **UV-vis ($CHCl_3$):** λ_{max} ($\log \epsilon$) = 423 (5,34), 558 (4,14), 598 (3,10), 667 (3,07) nm; **HRMS-ESI:** m/z 920,25586. Calcd. para $C_{58}H_{42}N_5O_3Zn$ $[M+H]^+$ 920,25791.

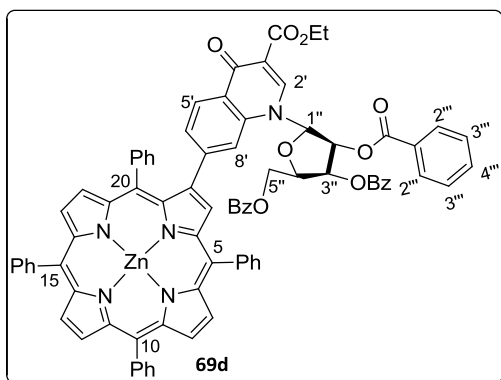
2-[3-etoxicarbonil-1-(2,3,5-tri-*O*-benzoil- β -D-ribofuranose-1-il)-4-oxo-1,4-dihidroquinolin-6-il]-5,10,15,20-tetrafenilporfirinatozínco(II) (69c).



η = 51% ; **RMN de ^1H** (300 MHz, CDCl_3) δ 8,94 e 8,83 (AB, 2H, $J = 4,6$ Hz, H-7,8), 8,96 (s, 1H, H-3) 8,92 (s, 2H, H-12,13), 8,86 (s, 1H, H-2'), 8,84 e 8,74 (AB, 2H, $J = 4,7$ Hz, H-17,18), 8,57 (d, 1H, $J = 2,0$ Hz, H-5'), 8,26 – 8,16 (m, 6H, H-*o*-Ph-5,10,15), 8,11 (dd, 2H, $J = 1,4$ Hz, $J = 7,8$ Hz, H-2'''), 7,99-8,03 (b, 2H, H-*o*-Ph-20), 7,97 (dd, 2H, $J = 7,8$ Hz, $J = 1,4$

Hz, H-2'''), 7,77-7,74 (m, 12H, H-*m,p*-Ph-5,10,15,20), 7,56 (tt, 2H, $J = 1,2$ Hz, $J = 1,4$ Hz, $J = 6,1$ Hz, H-3'''), 7,43-7,34 (m, 9H, 4H-3''', 3H-4''', H-7' e H-8'), 6,39 (d, 1H, $J = 5,1$ Hz, H-1''), 6,07 (t, 1H, $J = 5,1$ Hz, H-2''), 5,93 (t, 1H, $J = 5,1$ Hz, H-3''), 4,96 – 4,79 (m, 3H, H-4''+H-5''), 4,33 – 4,14 (m, 1H, $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1,32 (t, 1H, $J = 7.1$ Hz, $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$). **RMN de ^{13}C** (75 MHz, CDCl_3) δ 174,3 (C-4'), 166,0 ($\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 165,1 (C=O Bz), 165,0 (C=O Bz), 164,6 (C=O Bz), 150,9, 150,5, 150,4, 150,3, 150,3, 150,2, 147,5 (C-2'), 146,1, 142,6, 141,1, 135,7, 135,5 (C-2), 134,4 (C-7'), 134,1, 133,8, 133,6, 132,6, 132,1, 132,1, 131,9 (C-2'), 131,5, 129,9, 129,8, 129,7, 129,2, 128,9 (C-5'), 128,7, 128,6, 128,5, 128,4, 128,3, 128,1, 127,5, 127,4, 126,9, 126,5, 121,9, 121,4, 121,0, 120,8, 113,5 (C-8'), 91,2 (H-1''), 80,3 (H-4'' ou H-5''), 70,5, 70,4, 63,2 (H-4'' ou H-5''), 62,83, 60,89, 29,68, 29,5 ($\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 14,29 ($\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$). **UV-vis (CHCl_3):** λ_{max} ($\log \epsilon$) = 428 (5,35), 558 (4,25), 598 (3,81), 673 (2,89) nm. **HRMS-ESI:** m/z 1336,34516. Calcd. para $\text{C}_{82}\text{H}_{58}\text{N}_5\text{O}_{10}\text{Zn}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 1336,34697.

2-[3-etoxicarbonil-1-(2,3,5-tri-*O*-benzoil- β -D-ribofuranose-1-il)-4-oxo-1,4-dihidroquinolin-7-il]-5,10,15,20-tetrafenilporfirinatozinco(II) (69d).



η = 50%. **RMN de ^1H** (300 MHz, DMSO- d_6) : 8,92 (s, 1H, H-2'), 8,97-8,96 (m, 4H, β -H), 8,69 (d, 1H, J = 4,6 Hz, H-17 ou H-18), 8,63-8,58 (m, 2H, β -H), 7,97-7,94 (m, 2H, H-2'''), 8,23-8,17 (m, 8H, H-*o*-Ph-5,10,15), 7,81-7,79 (m, 9H, H-*m,p*-Ph-5,10,15,20), 7,72-7,70 (m, 2H, H-2'''), 7,64-7,55 (m, 9H, 4H-3''', 3H-4''', H-5' e H-8'), 7,11-7,06 (m, 2H, H-*m*-Ph-20), 7,42-7,34 (m, 2H, H3'''), 6,97-6,92 (m, 1H, H-*p*-Ph-20), 6,11-7,71 (m, 2H, H-2'''), 6,54-6,49 (m, 1H, H-1''), 6,20-6,06 (m, 1H, H-2''), 5,84-5,93 (m, 1H, H-3''), 5,01 – 4,97 (m, 1H, H-4''), 4,82- 4,79 (m, 3H, H-5''), 4,19 – 4,05 (m, 2H, $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1,22 (t, 3H, J = 7,0 Hz, $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$). **RMN de ^{13}C** (75,5 MHz, CDCl_3): 172,5 (C-4'), 165,5 ($\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 164,6 (C=O Bz), 164,2 (C=O Bz), 163,5 (C=O Bz), 149,5, 146,4 (C-2'), 142,9, 142,5, 139,3, 134,1, 133,6, 131,6, 129,5, 129,3, 128,9, 128,7, 128,5, 128,1, 127,5, 126,7, 126,5, 120,1, 119,2, 111,5, 88,7, 80,8, 75,1, 70,6, 64,0, 59,8, 13,9 ($\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$). **UV-vis (CHCl_3):** λ_{max} (log ϵ) = 429 (5,37), 559 (4,07), 600 (3,63), 666 (3,18) nm. **HRMS-ESI:** m/z 1336,34679. Calcd. para $\text{C}_{82}\text{H}_{58}\text{N}_5\text{O}_{10}\text{Zn}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 1336,34697.

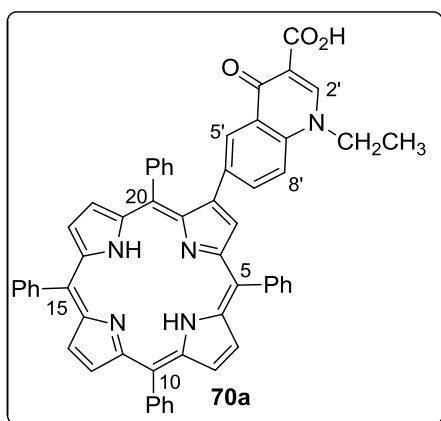
3.6.6. Desprotecção e descomplexação dos derivados quinolona-porfirina 69a e 69b.

Procedimento geral:

Cada um dos derivados quinolona-porfirina **69a** ou **69b** (7,5 μmol) foi dissolvido numa solução metanólica de hidróxido de potássio (1,78 M, 2,5 mL) em THF/Py (0,5 mL/50 μL). Cada solução foi mantida em agitação a 80°C durante 1 hora num tubo selado. Findo este tempo, cada uma das soluções foi neutralizada com uma solução aquosa de ácido cítrico. As fases orgânicas foram extraídas com clorofórmio, lavadas com água e secas em sulfato de sódio anidro. O solvente foi evaporado à secura a

pressão reduzida. Num balão de 25 mL, os resíduos obtidos foram dissolvidos em clorofórmio (1mL) e em seguida foi adicionado 10% de TFA. Estas misturas foram mantidas em agitação à temperatura ambiente durante 2 minutos. Foram adicionados água e clorofórmio e as misturas foram neutralizadas com uma solução aquosa de carbonato de sódio. As fases orgânicas foram extraídas com clorofórmio, lavadas com água e secas em sulfato de sódio anidro. O solvente foi evaporado a pressão reduzida e os resíduos foram cristalizados em clorofórmio/hexano, obtendo-se, para cada caso, os novos derivados quinolona-porfirina **70a,b**.

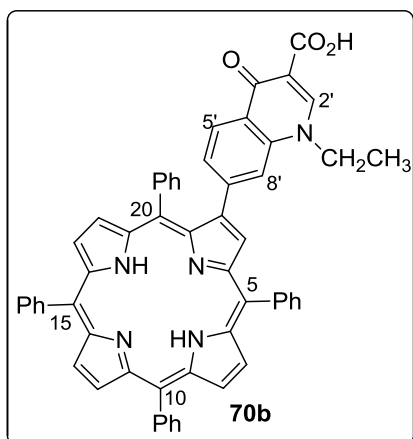
2-(3-carboxi-1-etil-4-oxo-1,4-di-hidroquinolin-6-il)-5,10,15,20-tetrafenilporfirina (70a).



$\eta = 99\%$. **RMN de ^1H** (300MHz, CDCl_3) : δ 15,14 (s, 1H, CO_2H), 8,87 e 8,84 (AB, 2H, $J = 4,7\text{Hz}$, H-7,8), 8,83 (s, 1H, H-3), 8,82 (s, 2H, 12,13), 8,80 (s, 1H, H-2'), 8,78 e 8,69 (AB, 2H, $J = 4,8\text{ Hz}$, H-17,18), 8,67 (d, $J = 2,0\text{ Hz}$, H-5'), 8,25-8,20 (m, 6H, H-*o*-Ph-5,10,15), 7,94-7,92 (m, 2H, H-*o*-Ph-20), 7,78-7,69 (m, 9H, H-*m,p*-Ph-5,10,15), 7,55 – 7,54 (m, 1H, H-7'), 7,21 (d, 1H, $J = 8,8\text{ Hz}$, H-8'),

7,10-7,06 (m, 3H, H-*m,p*-Ph-20), 4,37-4,35 (m, 2H, NCH_2CH_3), 1,63 (t, 3H, $J = 7,1\text{ Hz}$, NCH_2CH_3), -2,62 (s, 2H, NH). **UV-vis (DMF/ H_2O (9:1))**: λ_{max} ($\log \epsilon$) = 421 (5,07), 519 (5,06), 553 (3,86), 595 (3,74), 651(3,61) nm. HRMS-ESI: m/z 830,30966. Calcd. para $\text{C}_{56}\text{H}_{40}\text{N}_5\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 830,31257.

2-(3-carboxi-1-etil-4-oxo-1,4-di-hidroquinolin-7-il)-5,10,15,20-tetrafenilporfirina (70b).



$\eta = 98\%$. **RMN de ^1H** (300.13 MHz, CDCl_3) : δ 15,15 (s, 1H, CO_2H), 8,90 e 8,87 (AB, 2H, $J = 4,7\text{Hz}$, H-7,8), 8,83 – 8,82 (m, 3H, H-3,12,13), 8,76 (s, 1H, H-2'), 8,81 e 8,73 (d, 2H, $J = 4,9\text{ Hz}$, H-17,18), 8,34 (d, 1H, $J = 8,2\text{ Hz}$, H-6'), 8,26-8,20 (m, 6H, H-*o*-Ph-

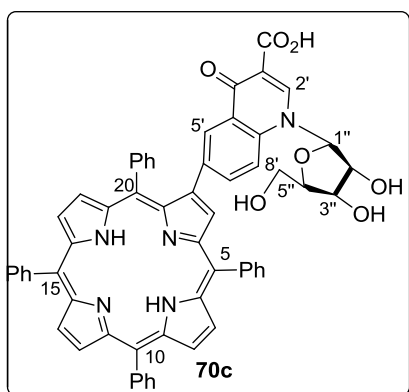
5,10,15), 7,93-7,92 (m, 2H, H-*o*-Ph-20), 7,82-7,71 (m, 9H, H-*m,p*-Ph-5,10,15), 7,40 (s, 1H, H-8'), 7,16-7,07 (m, 3H, H-*m,p*-Ph-20), 4,27-4,24 (m, 2H, NCH₂CH₃), 1,44 (t, 3H, *J* = 7,1 Hz, NCH₂CH₃), -2,63 (s, 2H, NH). **UV-vis (DMF/H₂O (9:1))**: λ_{max} (log ϵ) = 421 (5,26), 517 (3,96), 553 (3,60), 593 (3,47), 649 (3,40) nm. **HRMS-ESI**: *m/z* 830,30948. Calcd. para C₅₆H₄₀N₅O₃ [M+H]⁺ 830,31257.

3.6.7. Desprotecção e descomplexação dos derivados quinolona-porfirina 69c e 69d.

Procedimento geral:

Cada um dos derivados quinolona-porfirina **69c** ou **69d** (7,5 μmol) foi dissolvido numa de solução etanólica de hidróxido de potássio (2,97 M, 3 mL). Cada solução foi mantida em agitação a 80°C durante 24 horas num tubo selado. Findo este tempo, cada uma das soluções foi neutralizada com uma solução aquosa de ácido cítrico. As fases orgânicas foram extraídas com clorofórmio, lavadas com água e secas em sulfato de sódio anidro. O solvente foi evaporado à securo a pressão reduzida. Num balão de 25 mL, os resíduos obtidos foram dissolvidos em clorofórmio (1mL) e em seguida foi adicionado 10% de TFA. Estas misturas foram mantidas em agitação à temperatura ambiente durante 2 minutos. Foram adicionados água e clorofórmio e a mistura foi neutralizada com uma solução aquosa de carbonato de sódio. As fases orgânicas foram extraídas com clorofórmio, lavadas com água e secas em sulfato de sódio anidro. O solvente foi evaporado a pressão reduzida e os resíduos foram purificados por TLC preparativo usando como elunete uma mistura de clorofórmio/metanol (1%). Para cada um dos casos, as fracções maioritárias foram cristalizadas em clorofórmio/hexano, obtendo-se, tendo sido obtidos os novos derivados quinolona-porfirina **70c,d**.

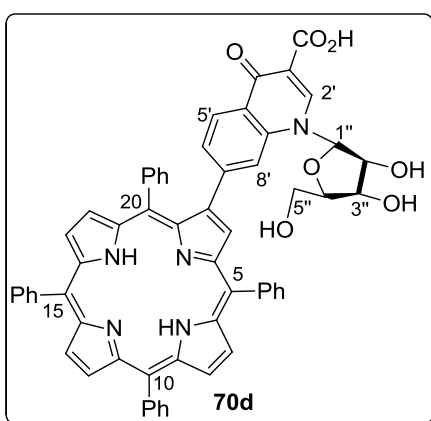
2-[3-carboxi-1-(β -D-ribofuranose-1-il)-4-oxo-1,4-di-hidroquinolin-6-il]-5,10,15,20-tetrafenilporfirina (70c).



η = 88%. RMN de ^1H (300.13 MHz, DMSO d_6) : δ 15,19 (s, 1H, CO_2H), 9,59 (s, 1H, H-2'), 8,87 – 8,70 (m, 7H, β -H), 8,35-8,33 (m, 1H, H-5'), 8,32-8,23 (m, 6H, H-*o*-Ph-5,10,15), 7,98-7,87 (b, 2H, H-*o*-Ph-20), 7,86-7,83 (m, 12H, H-*m,p*-Ph-5,10,15,20), 6,58-6,56 (m, 1H, H-1''), 6,20-6,18 (m, 1H, H-2''), 5,37-5,31 (m, 1H, H-3''), 4,23-4,21 (m, 2H, H-5''), 4,15 -

4,10 (m, 1H, H-4''), - 2,76 (s, 2H, NH) ppm. UV-vis (DMF/ H_2O (9:1): λ_{max} (log ϵ) = 421 (4,47), 517 (3,29), 552 (2,94), 593 (2,81), 648 (2,72) nm. HRMS-ESI: m/z 934,31919. Calcd. para $\text{C}_{59}\text{H}_{44}\text{N}_5\text{O}_7$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 934,32353.

2-[3-carboxi-1-(β -D-ribofuranose-1-il)-4-oxo-1,4-di-hidroquinolin-7-il]-5,10,15,20-tetrafenilporfirina (70d).



η = 89%. RMN de ^1H (300 MHz, DMSO) δ 9,06 (s, 1H, H-2'), 8,98 – 8,42 (m, 7H, β -H), 8,24-8,20 (m, 8H, H-*o*-Ph-5,10,15,20), 7,84-7,79 (m, 12H, H-*m,p*-Ph-5,10,15,20), 7,60 – 7,39 (m, 2H H-5' e H-8'), 7,22 – 6,94 (m, 1H, H-1''), 6,95 – 6,75 (m, 1H, H-2''), 6,58-6,50 (m, 1H, H-3''), 6,50 (m, 1H, H-4''), 6,04-6,00 (m, 2H, H-5''), -2,62 (s, 2H, NH). UV-vis (DMF/ H_2O (9:1): λ_{max} (log ϵ) = 427 (4,86), 517

(3,48), 560 (3,45), 600 (3,23), 647 (3,06) nm. HRMS-ESI: m/z 934,32060. Calcd. para $\text{C}_{59}\text{H}_{44}\text{N}_5\text{O}_7$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 934,32353.

3.6.8. Determinação da produção de oxigénio singuleto ($^1\text{O}_2$).

As soluções stock das quinolona-porfirinas **70a-d** (0,1 mM) e do 1,3-difenilisobenzofurano (DFiBF) (10 mM) foram preparadas em DMSO. Em células de vidro preparam-se 2 mL de solução contendo 50 μM de DFiBF e 0,5 μM de cada derivado quinolona-porfirina em DMF/H₂O (9:1). As células foram irradiadas com luz de 25mW/cm² e a comprimentos de onda de 550-800 nm. Durante a irradiação, as soluções permaneceram em agitação magnética à temperatura ambiente. A absorvência foi medida a 415 nm a cada 1 minuto durante 15 minutos. A percentagem de redução deste valor, proporcional à produção de $^1\text{O}_2$, foi calculada por comparação entre a absorvência inicial da solução e a absorvência registada ao fim de cada minuto de irradiação. Os resultados obtidos foram comparados com os obtidos para a *meso*-tetrafenilporfirina (**TPP**) nas mesmas condições.

3.7. Referências Bibliográficas

1. Miyaura, N.; Yamada, K.; Suzuki, A. *Tetrahedron Lett.*, **1979**, *36*, 3437-3440.
2. (a) Suzuki, A. In *Metal-Catalyzed Cross-Coupling Reactions*, Diederich, F., Stang, P. J., (Eds.) Wiley-VCH: Weinheim, Germany, **1998**, Cap. 2. (b) Suzuki, A. *J. Organomet. Chem.*, **1999**, *576*, 147-168. (c) Miyaura, N. *Top. Curr. Chem.*, **2002**, *219*, 11-59. (d) Hassan, J.; Sevignon, M.; Gozzi, C.; Schulz, E.; Lemaire, M. *Chem. Rev.*, **2002**, *102*, 1359-1470. (e) Bellina, F.; Carpita, A.; Rossi, R. *Synthesis*, **2004**, *15*, 2419-2440.
3. Carey, F.A.; Sundberg, R.J. In *Advanced Organic Chemistry Part B: Reaction Mechanisms*, Springer: New York, **2007**.
4. Kotha, S.; Lahiri, K.; Kashinath, D. *Tetrahedron*, **2002**, *58*, 9633-9695.
5. Ganesan, A. *Drug Discov. Today*, **2001**, *6*, 238-241.
6. http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2010/suzuki.html
7. Miyaura, N.; Suzuki, A. *Chem. Rev.*, **1995**, *95*, 2457-2483.
8. (a) Alonso, F.; Beletskaya, I. P.; Yus, M. *Tetrahedron*, **2008**, *64*, 3047-3101. (b) Braga, A. A. C.; Morgon, N. H.; Ujaque, G.; Lledós, A.; Maseras, F. *J. Organometallic Chem.*, **2006**, *691*, 4459-4466. (c) Sicre, C.; Braga, A. A. C.; Maseras, F.; Cid, M. M. *Tetrahedron*, **2008**, *64*, 7437-7443. (e) Lié gault, B.; Renaud, J.-Luc; Bruneau, C. *Chem. Soc. Rev.*, **2008**, *37*, 290. (d) Kotha, S.; Lahiri, K.; Kashinath, D. *Tetrahedron*, **2002**, *58*, 9633-9695.
9. Atefi, F., Arnold, D. P. *J. Porphyrins Phthalocyanines*, **2008**, *12*, 801-831.
10. Hasobe, T.; Imahori, H.; Ohkubo, K.; Yamada, H.; Sato, T.; Nishimura, Y.; Yamazaki, I.; Fukuzumi, S. *J. Porphyrins Phthalocyanines*, **2003**, *7*, 296-312.
11. Zhou, X.; Chan, K. S. *J. Org. Chem.*, **1998**, *63*, 99-104.
12. Chan, K.S. ; Zhou, X. ; Au, M.T. ; Tam, C.Y. *Tetrahedron*, **1995**, *51*, 3129-3136.
13. Zhou, X.; Tse, M.K.; Wan, T.S.M.; Chan K.S. *J. Org. Chem.*, **1996**, *61*, 3590-3593.
14. Tse, M.K.; Zhou, Z., Mak, T.C.W.; Chan, K.S. *Tetrahedron*, **2000**, *56*, 777-7783.
15. Medforth, C. J.; Haddad, R. E.; Muzzi, C. M.; Dooley, N. R.; Jaquinod, L.; Shyr, D. C.; Nurco, D. J.; Olmstead, M. M.; Smith, K. M.; Ma, J. G.; Shelnut, J. A. *Inorg. Chem.*, **2003**, *42*, 2227-2241.
16. Bhyrappa, P.; Sankar, M.; Varghese, B. *Inorg. Chem.*, **2006**, *45*, 4136-4149.
17. Chen, B.; Qin, W.; Wang, P.; Tian, T.; Ma, H.; Cao, X.; Wu, X.; Zhou, X.; Zhang, X. L.; Liu, F.; Zheng, F.; Li, X. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2003**, *13*, 3731-3733.

18. Chen, B.; Wu, S.; Li, A.; Liang, F.; Zhou, X.; Cao, X.; He, Z. *Tetrahedron*, **2006**, *62*, 5487-5497.
19. Zhai, B.; Shuai, L.; Yang, L.; Weng, X.; Wu, L.; Wang, S.; Tian, T.; Wu, X.; Zhou, X.; Zheng, C. *Bioconjugate Chem.*, **2008**, *19*, 1535-1542.
20. Jiao, L.; Hao, E.; Fronczek, F. R.; Vicente, M. G. H.; Smith, K. M. *Chem. Commun.*, **2006**, 3900-3902.
21. Hao, E.; Fronczek, F. R.; Vicente, M. H. *Chem. Commun.*, **2006**, 4900-4902.
22. Zhang, C.; Suslick, K. S. *J. Porphyrins Phthalocyanines*, **2005**, *9*, 659-666.
23. Bringmann, G.; Rudenauer, S.; Götz, D. C. G.; Gulder, T. A. M.; Reichert, M. *Org. Lett.*, **2006**, *8*, 4743-4746.
24. Bringmann, G.; Götz, D. C. G.; Gulder, T. A. M.; Gehrke, T. H.; Bruhn, T.; Kupfer, T.; Radacki, K.; Braunschweig, H.; Heckmann, A.; Lambert, C. *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, *130*, 17812-17825.
25. Hata, H.; Shinokubo, H.; Osuka, A. *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*, 8264- 8265.
26. Shinokubo, H.; Osuka, A. *Chem. Commun.*, **2009**, 1011- 1021.
27. (a) Callot, H. J. *Tetrahedron Lett.* , **1973**, *14*, 498-499. (b) Callot, H. J. *Bull. Soc. Chim. Fr.*, **1974**, 1492-1496.
28. (a) Buchler, J.W. *The Porphyrins*; Dolphin, D. (Ed.), Academic Press: New York, **1978**, volume 1, pp. 389-483. (b) Buchler, J.W. *Porphyrins and Metalloporphyrins*; Smith, K. Ed.; Elsevier: Amsterdam, **1975**.
29. Tse, M.K.; Zhou, Z.Y.; Mak, T.C.W.; Chan, K.S. *Tetrahedron*, **2000**, *56*, 777-7783;
30. Kotha, S.; Behera, M. *Indian J. Chem.*, **2006**, *45*, 2684.
31. Cavaleiro, J. A. S.; Tomé, A. C.; Neves, M. G. P. M. S. In *Handbook of Porphyrin Science*; Vol. 2; Kadish, K.; Smith, K. M.; Guillard, R., (Eds.) World Scientific Publishing Company: Singapore, **2010**.
32. Kormeili, T.; Yamauchi, P.S.; Lowe, N.J. *Brit. J. Dermatol.*, **2004**, *150*, 1061-1069.
33. Obata, M.; Hirohara, S.; Sharyo, K.; Alitomo, H.; Kajiwara, K.; Ogata, S.; Tanihara, M.; Ohtsuki, C.; Yano, S. *Biochim. Biophys. Acta*, **2007**, *1770*, 1204-1211.
34. (a) Cavaleiro, J.A.S.; Tomé, J.P.C.; Faustino, M.A.F, *Topics in Heterocycl. Chem.*, **2007**, *7*, 179-248; (b) X. Xeng, R. Q. Pandey. *Anti Canc. Agents Med. Chem.*, **2008**, *8*, 241-268.
35. (a) Srivastava, B. K.; Solanki, M.; Mishra, B.; Soni, R.; Jayadev, S.; Valani, D.; Jain, M.; Patel, P. R. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2007**, *17*, 1924-1929. (b) Pandey, R.K.; Zheng, G. In *The Porphyrin Handbook Applications: Past, Present and Future*, vol. 6. Academic Press: San Diego, **2000**, Cap. 43.
36. Oliphant, C; Green, G. *Am. Fam. Physician.*, **2002**, *65*, 445-464

37. Mugnaini, C.; Pasquini S.; Corellil, F. *Curr. Med. Chem.*, **2009**, *16*, 1756-1746.
38. Gasparotto,V.; Castagliuolo, I.; Ferlin, M. G. *J. Med. Chem.*, **2007**, *50*, 5509-5513.
39. Xia, Y.; Yang, Z.; Xia, P.; Bastow, K. F.; Tachibana, Y.; Kuo, S.; Hamel, E.; Hackl, T.; Lee, K. J. *Med. Chem.*, **1998**, *41*, 1155-1162.
- 40 Santos, F. C. ; Cunha, A. C. ; de Souza, M. C. B. V. ; Tomé, A. C. ; Neves, M. G. P. M. S. ; Ferreira, V. F. ; Cavaleiro, J. A. S. *Tetrahedron Lett.*, **2008**, *49*, 7268-7270.
41. Silva, A.M.G.; Castro, B.; Rangel, M.; Silva, A.M.S.; Brandão, P.; Felix, V.; Cavaleiro, J. A. S. *Synlett*, **2009**, *6*, 1009-1013.
42. Canuto, C.B.V.S.; Gomes, C. R. B.; Marques, I. P.; Faro, L. V.; Santos, F.C.; Frugulhetti, I. C. P. P., Souza, T. M. L.; Cunha, A. C.; Romeiro, J. A.; Ferreira, V.F.; de Souza, M. C. B. V. *Lett. Drug Design Discovery*, **2007**, *4*, 404-409.
43. Silva, E.M.P., Domingues, P.; Tomé, J.P.C., Faustino, M.A.F, Neves, M. G. P. M. S.; Tomé, A. C.; Dazzone, D.; Silva, A. M. S.; Cavaleiro, J. A. S., Correia, A.J.F., Domingues, M.R.M. *Eur. J. Mass. Spectrom.*, **2005**, *14*, 49-59.
44. Serra, V.V., Domingues, M.R.M., Faustino, M.A.F; Domingues, P.; Tomé, J.P.C.; Neves, M. G. P. M. S.; Tomé, A. C.; Cavaleiro, J. A. S., Correia, A.J.F. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2005**, *19*, 1-12.
45. Domingues, M.R.M.; Domingues, P.; Neves, M. G. P. M. S.; Tomé, A. C.; Cavaleiro, J. A. S. *J. Porphyrins Phthalocyanines*, **2009**, *13*, 525-527.
46. Quirke, J.M.E. in *The Handbook of Porphyrins*, Kadish, K.; Smith, K. M.; Guillard, R., Eds, Academic Press :San Diego, Vol.7, **2000**.
47. Prakash, C. ; Shaffer, C.L. ; Nedderman, A. *Mass Spectrom. Rev.*, **2007**, *26*, 340-369.
48. Silva, S.T.M.; Silva, T.L.A.O.; Urbina, J.A.; Souza, W.; Rodrigues, J.C.F. *Mol. Biol. Int.*, **2011**, in press.
49. Astelbauer F.; Walochnik, J. *Int. J. of Antimicro. Ag.*, **2001**, *38*, 118– 124.
50. Malik, S.; Kumar, S.; Choudhary, A.; Kumar, A.; Singh, A.; Avasthi, G. *J. Chem. Pharm. Res.*, **2010**, *2*, 70-91.
51. Seifert, K. *Open Med. Chem. J.*, **2011**, *5*, 31-39.
52. Gardlo, K.; Horska, Z.; Enk, C.D.; Rauch, L.; Megahed, M. ; Ruzicka, T. ; Fritsch, C. *J. Am. Acad. Dermatol.* **2003**, *48*, 893-896.
53. Gardner, D.M.; Taylor, V.M.; Cedeno,D.L.; Padhee, S.; Robledo, S.M.; Jones, M.A.; Lash, T.D. ; Velez, I.D. *Photochem. Photobiol.*, **2010**, *86*, 645–652.
54. Baptista,M.S.; Wainwright, M. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **2011**, *4*, 1-10.

55. Peloi, L.S.; Biondo, C.E.G.; Kimura, E.; Politi, M.J.; Lonardoni, M.V.C.; Aristide, S.M.A.; Dorea, R.C.C.; Hioka, N.; Silveira, T.G.V. *Exp. Parasitol.*, **2011**, *128*, 353–356.
56. (a) Moura, N.M.M. ; Giuntini, F. ; Faustino, M.A.F. ; Neves, M.G.P.M.S. ; Tomé, A.C. ; Silva, A.M.S. ; Rakib, E.M. ; Hannioui, A. ; Abouricha, S. ; Röder, B. ; Cavaleiro, J.A.S. *Arkivoc*, **2010** , v, 24-33. (b) Zenkevich, E.; Sagun, E.; Knyukshto, V. ; Shulga, A. ; Mironov, A. ; Efremova, O. ; Bonnett, R. ; Songca, S.P. ; Kassem, M. *J. Photochem. Photobiol. B*, **1997**, *33*, 171-180.
57. Cunha, A.C.; Gomes, A.T.P.C.; Ferreira, V.F.; de Souza, M.C.B.V.; Neves, M.G.P.M.S.; Tomé, A. C.; Silva, A.M S.; Cavaleiro, J.A.S. *Synthesis*, **2010**, 510-514.
58. Gomes, A.T.P.C.; Cunha, A.C.; Domingues, M.R.M.; Neves, M.G.P.M.S.; Tomé, A. C.; Silva, A. M. S.; Santos, F.C.; de Souza, M.C.B.V; Ferreira, V.F.; Cavaleiro, J. A. S. *Tetrahedron*, **2011**, *67*, 7336-7342.

Capítulo 4

Síntese de porfirinas β -substituídas com grupos triazolilo por reacção de metátese

4. Síntese de porfirinas β -substituídas com grupos triazolilo por reacção de metátese

Preâmbulo

Neste quarto capítulo da presente dissertação será apresentado todo o trabalho desenvolvido para sintetizar *meso*-tetra-arilporfirinas β -substituídas com grupos triazolilo recorrendo à reacção de metátese. Devido ao interesse desta reacção nos estudos apresentados, será realizada uma breve introdução sobre este tipo de transformação mostrando a sua importância, modo de actuação e versatilidade. Serão, também, mostrados alguns estudos reportados na literatura sobre a funcionalização de macrociclos tetrapirrólicos usando essa metodologia de síntese.

4.1. Reacção de metátese

Das diversas reacções catalisadas por metais de transição responsáveis por formar novas ligações carbono-carbono que existem, a reacção de metátese tornou-se uma das mais conhecidas nos últimos anos. Este facto deve-se à variedade de transformações que são possíveis realizar com os catalisadores existentes e disponíveis comercialmente.^{1,2} Na realidade, a reacção de metátese representa uma das mais valiosas e atractivas ferramentas na indústria dos polímeros e na síntese orgânica para a formação de novas ligações carbono-carbono.¹

Mas como é que esta reacção pode ser descrita?

A palavra metátese deriva da combinação das palavras gregas *meta* (troca) *tithemi* (lugar) cujo significado gramatical é a transposição de fonemas ou sílabas de um lugar para outro, gerando uma outra palavra com um significado distinto (ex: casa – saca).³ Em Química esta palavra refere-se à troca de grupos entre duas moléculas. Quando nos referimos à Química de alcenos e alcinos, metátese significa redistribuição do esqueleto carbonado em que as ligações duplas ou triplas são rearranjadas na presença de um complexo metálico, tal como ilustra a figura 4.1 para o caso de um sistema de duplas ligações.^{1,3}

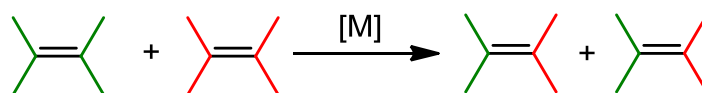
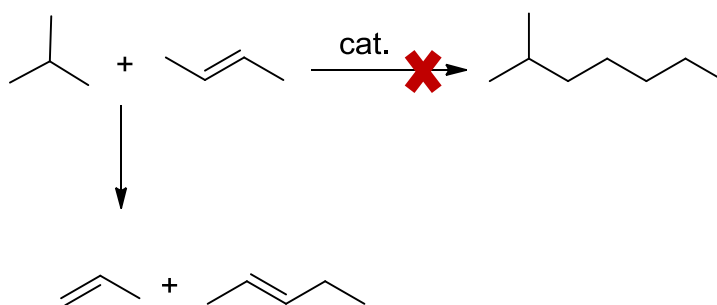


Figura 4.1. Esquema geral da reacção de metátese entre dois alcenos.

A descoberta

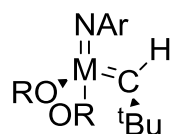
A reacção de metátese foi descoberta nos anos 50 na indústria petroquímica no Departamento de Petroquímica da DuPont.⁴ Foi observado que a passagem de propeno por um catalisador de molibdénio-alumínio resultava numa mistura de gases composta por etileno e 1-buteno. Resultado semelhante foi observado por pesquisadores da Standard Oil Co. em 1960.⁴ Nesta época foram publicadas uma série de patentes considerando estes novos processos, no entanto o mecanismo envolvido neste tipo de transformação nunca foi elucidado. Em 1964, investigadores da Phillips Petroleum Company verificaram que a reacção entre *iso*-butano e 2-buteno na presença de hexacarbonilmolibdénio suportado em alumina fornecia 2-penteno e propeno, ao contrário do *iso*-octano esperado (esquema 4.1). Esta reacção recebeu o nome de “desproporcionação de alcenos”.⁵ É curioso que o termo “metátese de alcenos” foi introduzido pela primeira vez em 1967 por Nissim Calderon, cerca de 10 anos mais tarde da sua descoberta, depois de um estudo sistemático com compostos insaturados.⁶



Esquema 4.1.

Um dos cientistas que se esforçou mais em compreender o mecanismo da reacção de metátese foi o francês Yves Chauvin. Em 1971 este cientista publicou a primeira proposta para o mecanismo de metátese de alcenos e que ainda hoje é aceite

como o mecanismo geral para este tipo de transformação.⁷ Desde então, muitos cientistas trabalharam nesta reacção e previram que esta seria uma excelente ferramenta para ser explorada em síntese orgânica. No entanto, a sua aplicação foi prejudicada devido à sensibilidade ao ar e à humidade dos primeiros catalisadores utilizados. Richard Schrock intensificou os esforços para encontrar complexos metálicos mais estáveis, tornando conhecidos os catalisadores de Schrock, que são complexos de molibdénio e tungsténio, cuja fórmula geral é apresentada na figura 4.2.^{8,9}



M = metal (Mo ou W)

Figura 4.2. Fórmula geral dos catalisadores de Schrock.

Robert Grubbs foi, também, um pioneiro na descoberta de novos catalisadores que aumentaram a eficiência da reacção de metátese.¹⁰ Em 1992, Grubbs publicou que o complexo metálico de ruténio, **71** (Figura 4.3) era um catalisador activo na polimerização de norbornenos e estável na presença de solventes próticos. Algumas modificações neste primeiro catalisador de ruténio permitiram obter novos complexos ainda mais eficientes, mais estáveis e tolerantes a outros grupos funcionais. Por exemplo, a troca dos grupos fenilo pelo grupo ciclo-hexilo origina o complexo **72** que é eficaz na reacção de metátese com alcenos acíclicos, sendo conhecido como o catalisador de Grubbs de 1ª geração. Em 1999, foi reportado um catalisador mais reactivo do que o de 1ª geração sendo capaz de induzir a formação de ciclo-alcenos tetra-substituídos. Este catalisador de Grubbs de 2ª geração deriva do primeiro por substituição das fosfinas por um ligante *N*-heterocíclico (composto **73**, Figura 4.3).^{3,4,9,10}

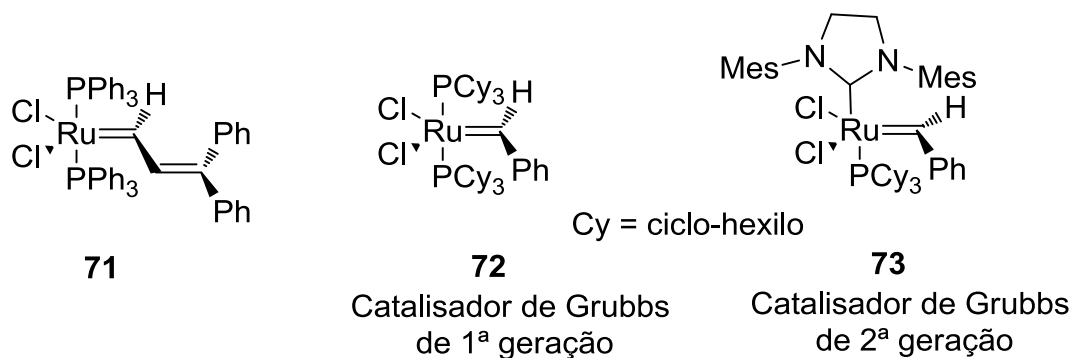


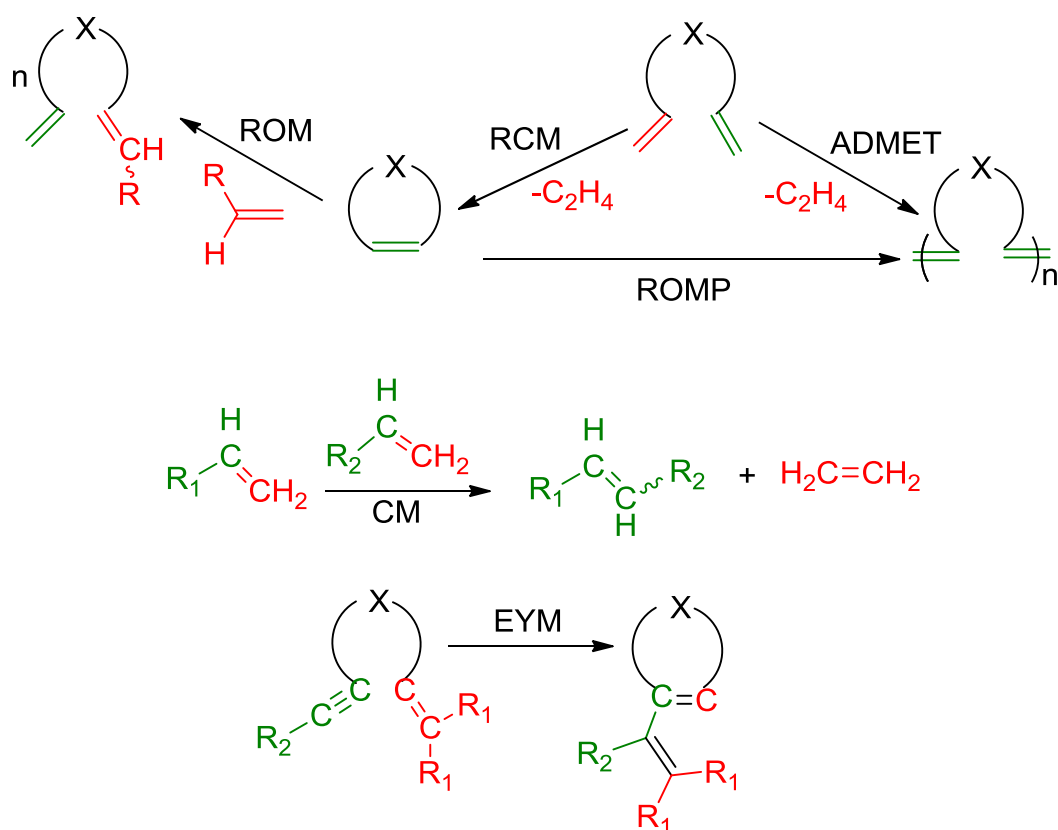
Figura 4.3. Catalisadores de Grubbs.

Devido aos seus contributos pelo “desenvolvimento do método de metátese em Química Orgânica” a Real Academia Sueca de Ciências concedeu o Prémio Nobel da Química de 2005 a Yves Chauvin, Richard Schrock e Robert Grubbs.¹¹

A versatilidade

A melhoria na eficiência desta reacção, encontrada nas últimas duas décadas, fez com que este processo seja mundialmente conhecido pelos químicos constituindo uma das reacções mais valiosas da Química Orgânica, sendo amplamente usada na indústria, especialmente no desenvolvimento de novos fármacos ou materiais plásticos.¹² A popularidade deste processo é, também, devido aos diferentes tipos de transformações que é possível realizar com o mesmo complexo metálico e que dependem dos substratos e das condições reaccionais.^{2,9,1} Assim, a reacção de metátese pode ser classificada em 6 tipos a seguir referidos e esquematizados no esquema 4.2:

- Metátese por polimerização com abertura de anel (*ROMP-ring-opening metathesis polymerization*);
- Metátese por ciclização (*RCM-ring-closing metathesis*);
- Metátese por polimerização em dienos acíclicos (*ADMET- acyclic diene metathesis polymerization*);
- Metátese por abertura do anel (*ROM-ring-opening metathesis*);
- Metátese cruzada (*CM- cross-metathesis*);
- Metátese alceno/alcino (*EYM-enyne metathesis*).



Esquema 4.2.

O mecanismo

O mecanismo da reacção de metátese foi alvo de vários estudos durante muitos anos e desempenhou um papel importantíssimo para o desenvolvimento e aperfeiçoamento do processo.^{1,2,13} Os primeiros mecanismos propostos sugeriam a formação de um intermediário ciclobutano coordenado com o átomo metálico central (M), tal como é mostrado na figura 4.5.^{14,15}

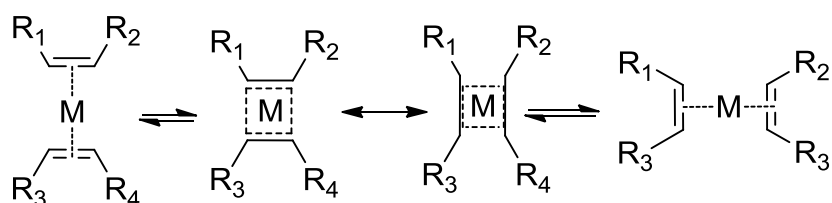


Figura 4.5. Formação de um intermediário ciclobutano coordenado com o átomo metálico central (M).

Como já foi referido, em 1971 Yves Chauvin sugeriu um mecanismo para este processo que ainda hoje é aceite como o mecanismo geral (Figura 4.6).⁷

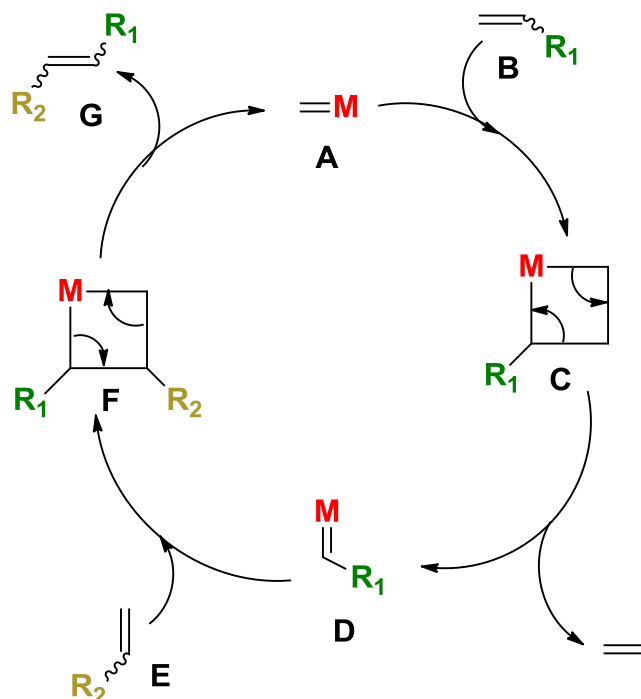


Figura 4.6. Mecanismo da Reacção de Metátese.

Com base em todos os estudos até hoje realizados, foi possível construir um ciclo catalítico que explica a reacção de metátese entre dois alcenos, quer do tipo cruzado quer para ciclização (Figura 4.6). Assim, o primeiro passo deste ciclo envolve a reacção de cicloadição [2+2] entre o alceno **B** e o complexo metal-carbeno **A** originando o metalociclobutano **C**. Esta espécie sofre uma cicloreversão que poderá originar os reagentes iniciais ou outro complexo metal-carbeno **D** e libertando um novo alceno (eteno, no caso desta figura). Esta espécie **D** pode sofrer nova cicloadição [2+2] com o alceno **E**, gerando nova espécie metalociclobutano **F**, que sofrendo cicloreversão origina o complexo metal-carbeno **A** e o novo alceno **G**. Este novo alceno **G** deverá possuir uma configuração *trans*, uma vez que é o produto termodinamicamente mais favorecido, no entanto, em muitos casos são obtidas misturas dos isómeros *cis* e *trans*. Isto ocorrerá se a diferença de energia entre estes isómeros for pequena.

É sabido que as interacções com as orbitais-*d* do catalisador metálico diminuem a energia de activação para que a reacção ocorra rapidamente e a temperaturas baixas.

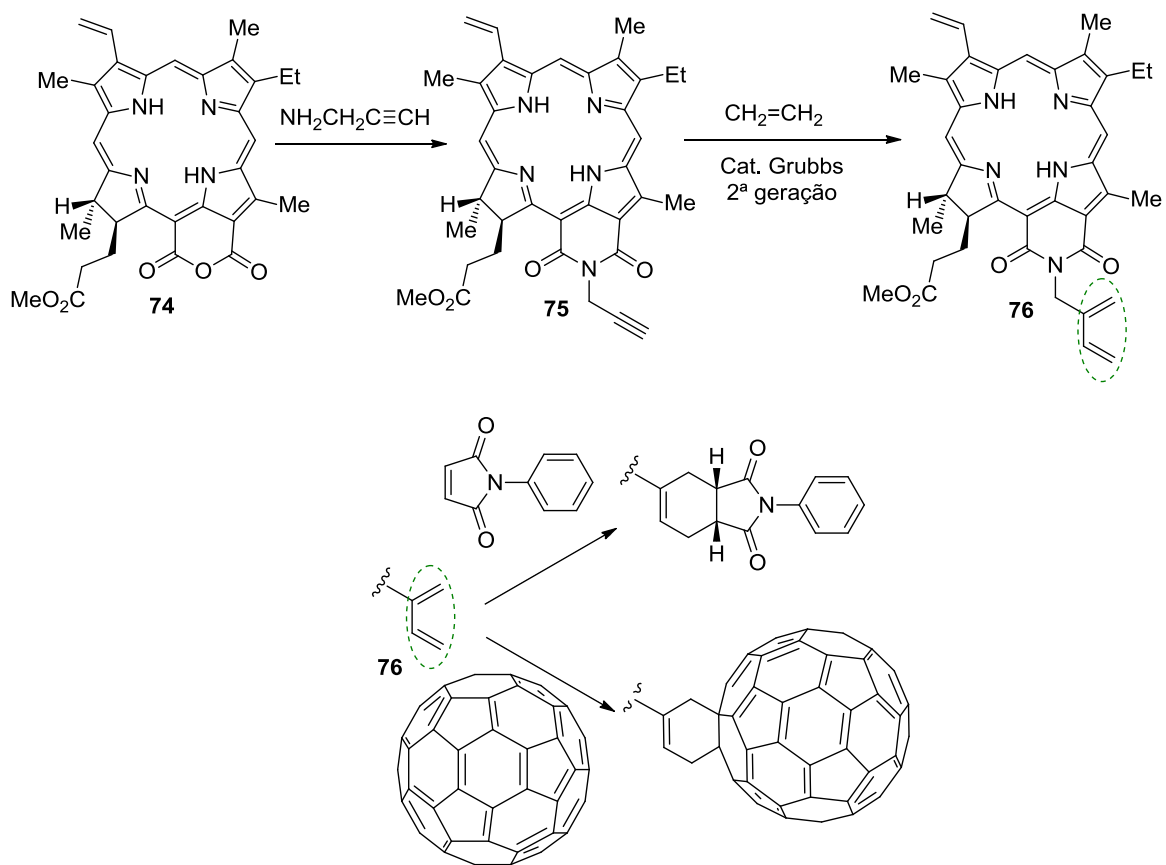
4.2. Funcionalização de porfirinas através da reacção de metátese

Como já foi referido nos capítulos anteriores, a procura de novos macrociclos tetrapirrólicos com características apropriadas para a sua aplicação nas diversas áreas em que esses compostos já provaram a sua eficiência, tornou-se o objectivo de muitos grupos de investigação. De facto, a modificação química de macrociclos porfirínicos naturais ou sintéticos tem sido, ao longo destes anos, uma área de enorme interesse para estes grupos. A reacção de metátese não passou despercebida à comunidade de “químicos porfirínicos”, e tem sido considerada uma ferramenta a explorar para obter novos derivados.

Apesar da reacção de metátese ser conhecida desde os anos 50, o uso de tal processo para a funcionalização de porfirinas iniciou-se nos anos 90. Desde então, várias têm sido as publicações relacionadas com a derivatização de macrociclos tetrapirrólicos através da reacção de metátese. Estes relatos dizem respeito tanto à funcionalização de posições *meso* como à de posições β -pirrólicas. Uma vez que a β -funcionalização de porfirinas merece considerável atenção devido às alterações físicas e químicas que pode provocar nestes compostos (referidas nos capítulos anteriores) será feita a revisão dos trabalhos encontrados na literatura usando a reacção de metátese na β -funcionalização de macrociclos tetrapirrólicos. No entanto, é de salientar que o uso desta metodologia na funcionalização de porfirinas nas posições *meso* originou trabalhos importantíssimos que abrangeram a construção de sistemas supramoleculares¹⁶ e também a síntese de porfirinas ligadas a moléculas biologicamente activas.¹⁷

O primeiro exemplo publicado na funcionalização das posições β -pirrólicas de macrociclos porfirínicos usando a reacção de metátese data de 1999.¹⁸ Neste trabalho, Pandey e seus colaboradores utilizaram um derivado da clorofila, a clorina **74** que na reacção com a propargilamina origina o derivado **75** (Esquema 4.3). Seguiu-se a reacção de metátese alcino/alcino entre este composto e o eteno na presença do

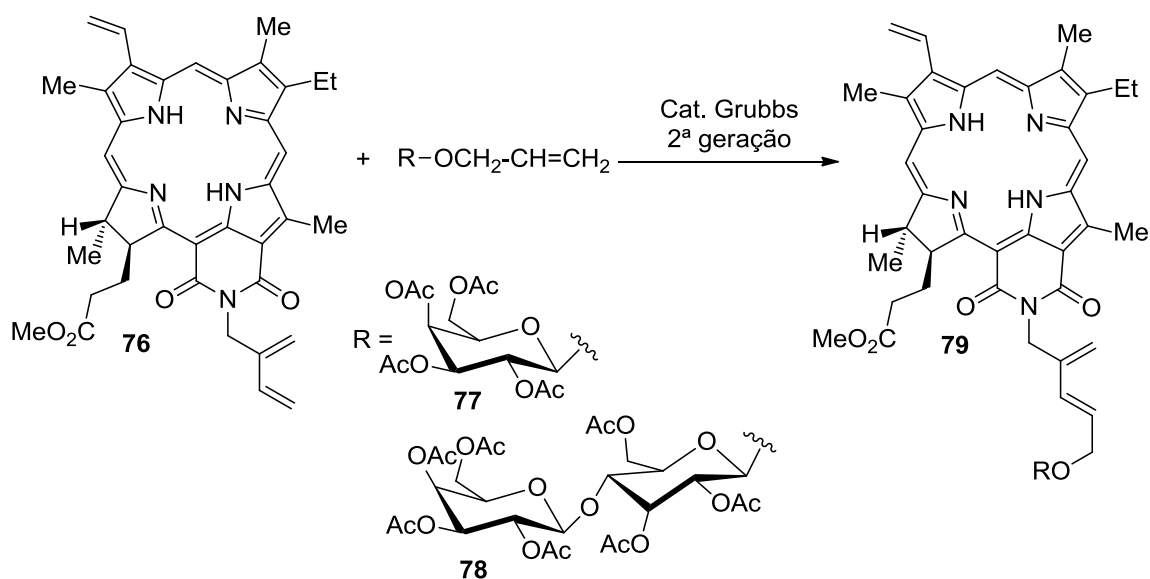
catalisador de Grubbs de 2ª geração que permitiu obter a clorina **76**. A reactividade desta clorina diénica foi estudada na presença da *N*-fenilmaleimida e do fulereno (C_{60}) tendo sido isolados os aductos esperados (Esquema 4.3). Este processo foi considerado importante para a preparação de novos modelos fotossintéticos e fotossensibilizadores promissores. Apesar deste trabalho não envolver a funcionalização de porfirinas nas posições β -pirrólicas, o composto usado para estas reacções é uma clorina, clorina **74**, que apresenta elevada absorção de luz a comprimentos de onda maiores que 600 nm, um dos requisitos para um bom fotossensibilizador ser usado em PDT.¹⁹



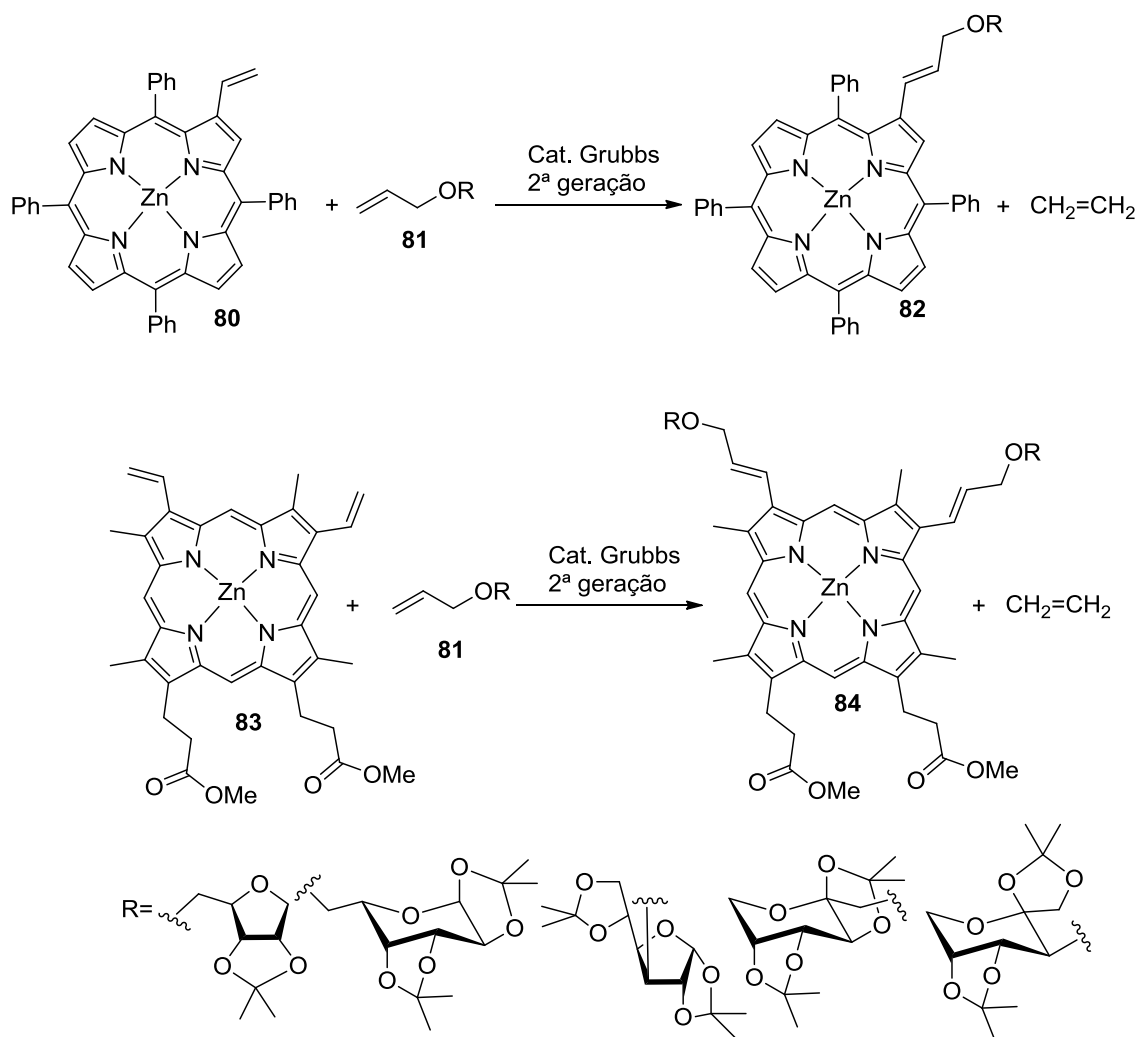
Esquema 4.3.

Em 2001, este mesmo grupo de investigação reportou a síntese dos conjugados de purpurinimida com resíduos de hidratos de carbono recorrendo à reacção de metátese entre a mesma clorina **76** e derivados alílicos de galactose **77** e de lactose **78** na presença do catalisador de Grubbs de 2ª geração (Esquema 4.4).²⁰ Os conjugados

79, obtidos em bons rendimentos, foram sujeitos a avaliação biológica e mostraram ser fotossensibilizadores bastante promissores para PDT de células tumorais.

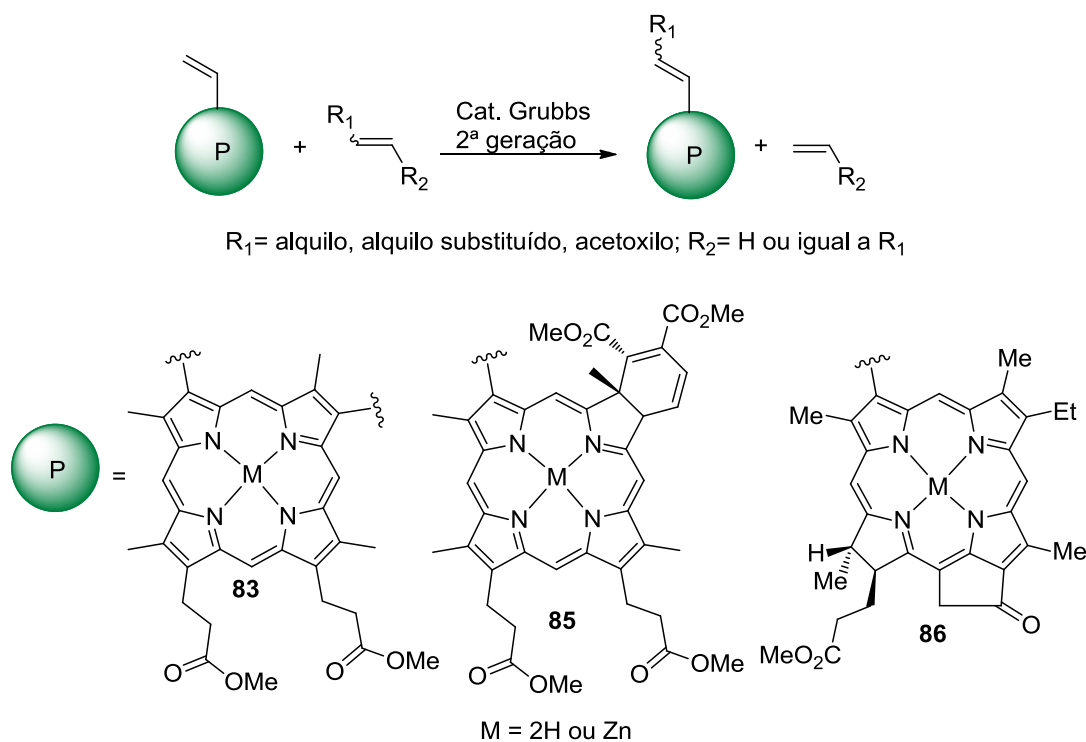


Já em 2008, Cavaleiro e seus colaboradores utilizaram, também, a reacção de metátese cruzada para a síntese de novos de conjugados glicoporfirínicos (Esquema 4.5).²¹ A estratégia envolveu a reacção entre 2-vinil-5,10,15,20-tetrafenilporfirinatozínco(II) **80** e diversos hidratos de carbono com grupos alilo **81** na presença do catalisador de Grubbs de 2ª geração, tendo sido obtidos os isómeros *E* dos derivados glicoporfirínicos **82** (M= Zn) em excelentes rendimentos (Esquema 4.5). Quando este estudo foi estendido ao complexo de zinco do éster dimetilíco da protoporfirina IX **83** foram isolados os derivados dissustituídos **84** com unidades de hidratos de carbono com bons rendimentos (Esquema 4.5).



Esquema 4.5.

Dolphin e seus colaboradores²² reportaram também o uso da reacção de metátese cruzada na modificação dos derivados porfirínicos **83**, **85** e **86** contendo grupos vinilo nas posições β (Esquema 4.6). Neste trabalho, a reacção de metátese cruzada foi realizada com diversos alcenos substituídos na presença do catalisador de Grubbs de 2ª geração. Os autores verificaram que a influência do processo depende do alceno e que as formas livres ($M=2H$) das clorinas **85** e **86** são mais reactivas do que a forma livre da porfirina **82** ($M=2H$). No entanto, quando os correspondentes complexos de zinco são usados a reactividade é semelhante.



Esquema 4.6.

Em 2008,²³ o mesmo grupo de investigação apresentou um estudo de optimização da reacção de metátese cruzada dos derivados porfirínicos **83**, **85** e **86** com os alcenos anteriormente estudados e onde foi, também, considerado o mecanismo destas reacções. Neste estudo ficou demonstrado que todos os produtos da reacção de metátese são obtidos com elevada estereosselectividade *E* devido ao maior impedimento estéreo do intermediário porfirínico que conduz a esse isómero, quando comparado com o que conduz ao isómero *Z* (Figura 4.6).

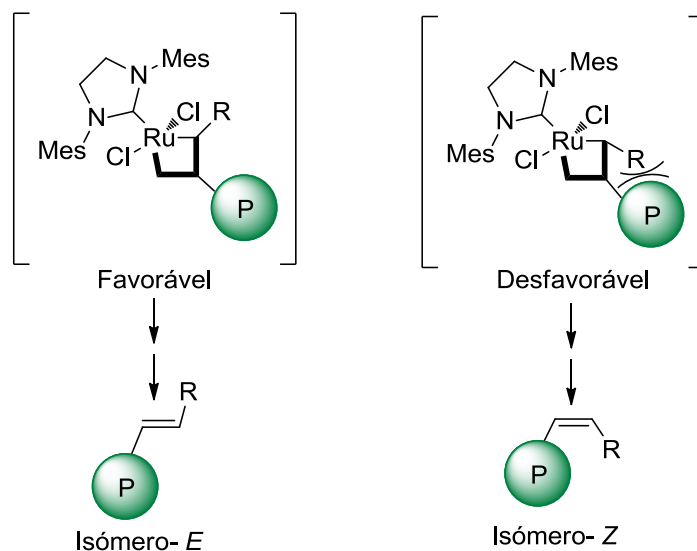
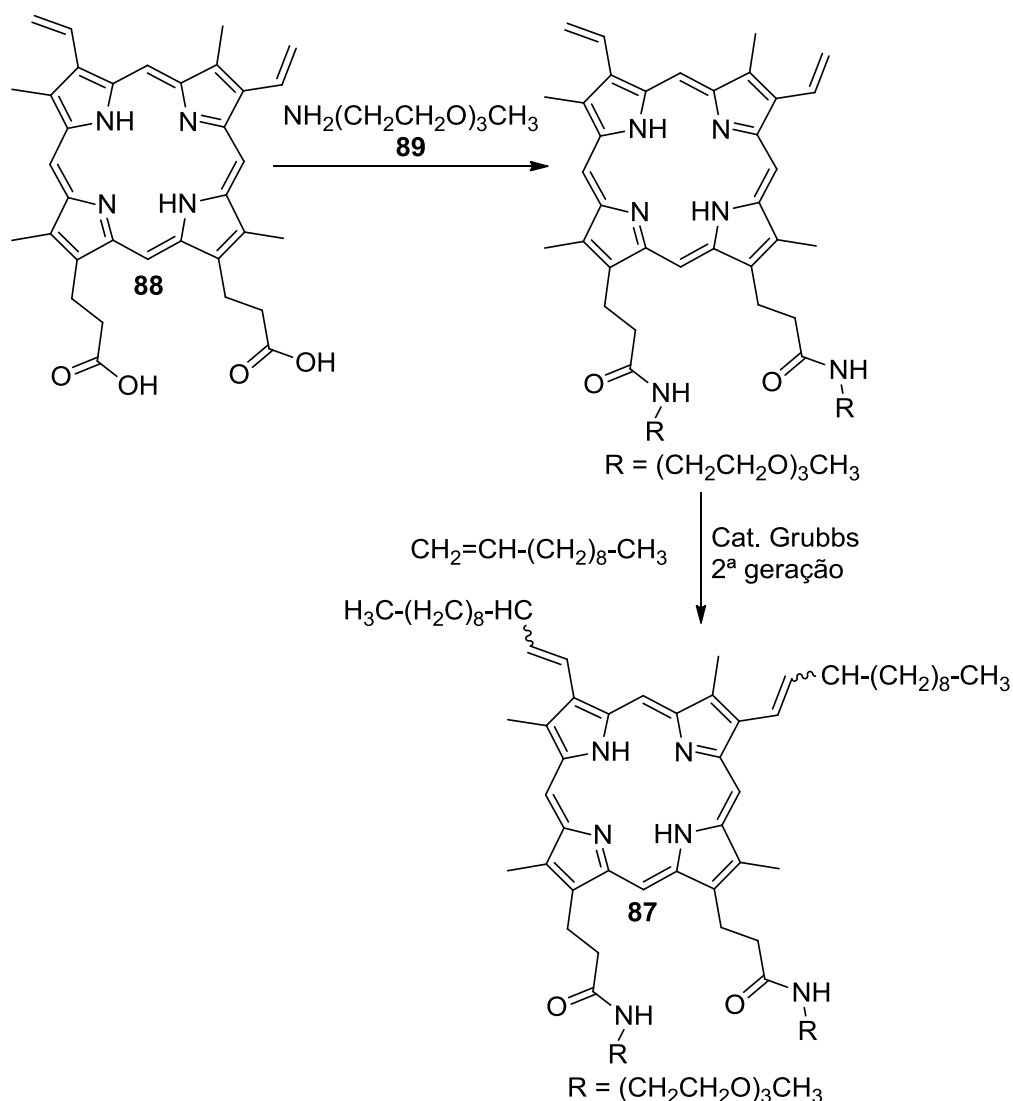


Figura 4.6. Efeitos estéreos na formação do intermediário porfirínico da reacção de metátese.

Como também já foi referido no capítulo anterior (Esquema 3.3 e Figura 3.5), Smith e seus colaboradores recorreu à reacção de metátese de ciclização para preparar mono-, di- e tri-benzoporfirinas a partir de derivados porfirínicos com grupos alilo.²⁴ Estes derivados alílicos foram preparados através da reacção de Suzuki.

O estudo mais recente sobre a β -funcionalização de porfirinas através da reacção de metátese foi publicado em 2011 por Nalage e seus colaboradores.²⁵ Neste trabalho foi sintetizado o derivado anfifílico **87** da protoporfirina IX contendo grupos hidrofóbicos e hidrofílicos (Esquema 4.7). A parte hidrofílica foi introduzida através da reacção entre a protoporfirina IX **88** e a amina **89**, enquanto a parte hidrofóbica foi introduzida recorrendo à reacção de metátese cruzada entre os grupos vinilo das posições β com 1-undeceno, na presença do catalisador de Grubbs de 2ª geração. Foi estudada, ainda, a capacidade de gerar agregados deste composto, tendo-se mostrado que esta é dependente da sua concentração e da natureza do solvente.



Esquema 4.7.

4.3. Estudos de funcionalização de *meso*-tetra-arilporfirinas com grupos triazolilo através da reacção de metátese

Nos últimos anos vários grupos têm desenvolvido novos métodos para modificar macrociclos porfíricos com o objectivo de obter compostos com propriedades químicas e físicas adequadas para a sua potencial aplicação em PDT e com elevada especificidade para células tumorais.^{26,27} Como já foi referido em capítulos anteriores, a síntese de moléculas com dualidade de funções pode ser uma boa estratégia para a descoberta de novos fotossensibilizadores. Estas moléculas podem ser obtidas através do acoplamento de entidades com actividade

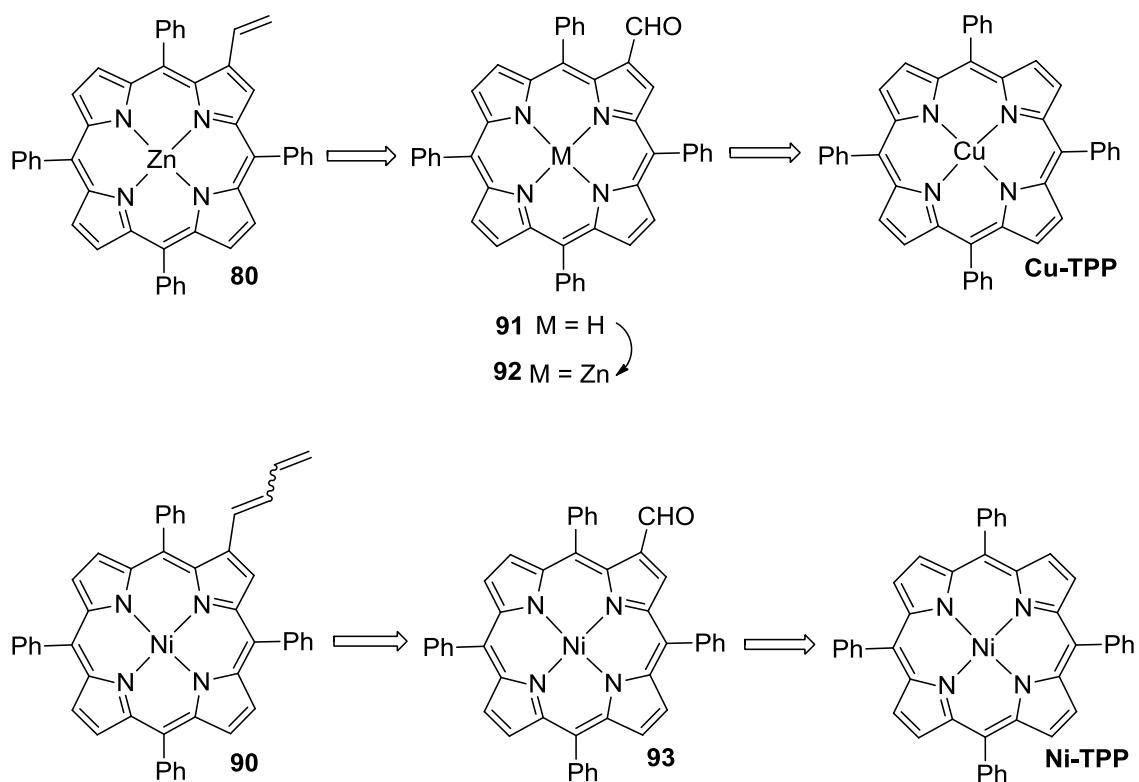
farmacológica conhecida; este foi um dos motivos que levou à síntese dos derivados glicoporfirínicos, glicoclorínicos e de conjugados quinolona-porfirina descritos anteriormente. Nesta parte do trabalho foi estudada a síntese de conjugados triazol-porfirina uma vez que alguns triazóis demonstraram já a sua potencialidade, não só como agentes antimicrobianos mas, também, como agentes antitumorais.^{28,29,30} Neste contexto, a conjugação da actividade biológica de triazóis com o efeito terapêutico das porfirinas leva a acreditar que estes conjugados possam exhibir actividades biológicas interessantes para poderem ser aplicados como fotossensibilizadores em PDT.

Na realidade, esta abordagem de ligar covalentemente porfirinas e triazóis foi já descrita na literatura, embora na grande maioria dos casos essa funcionalização tenha sido realizada nas posições *meso* dos macrociclos porfirínicos recorrendo à metodologia conhecida como “click-chemistry”.³¹ No entanto, é de enfatizar as excelentes aplicações dos compostos sintetizados que foram referidos como agentes intercalantes de DNA, na coordenação com metais e aniões, na transferência de energia e ainda como sistemas biomiméticos naturais.³¹

Neste capítulo pretende-se mostrar o primeiro exemplo da β -funcionalização de porfirinas através da reacção de metátese cruzada entre porfirinas com grupos alcenilo nas posições β e 4-vinil-1,2,3-triazóis *N*-substituídos.

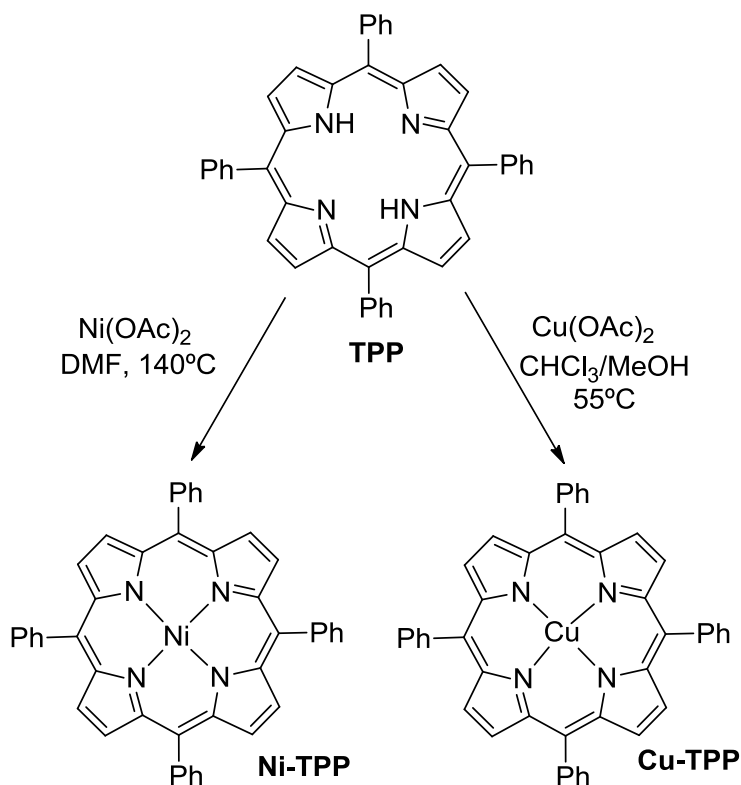
Síntese dos precursores envolvidos na reacção de metátese

Como unidades porfirínicas com grupos alcenilo nas posições β -pirrólicas foram seleccionados os complexos 2-vinil-5,10,15,20-tetrafenilporfirinatozinco(II) **80** e 2-butadienil-5,10,15,20-tetrafenilporfirinatoniquel(II) **90**, cujas estruturas e possível retróssíntese são apresentados no esquema 4.8.



Esquema 4.8.

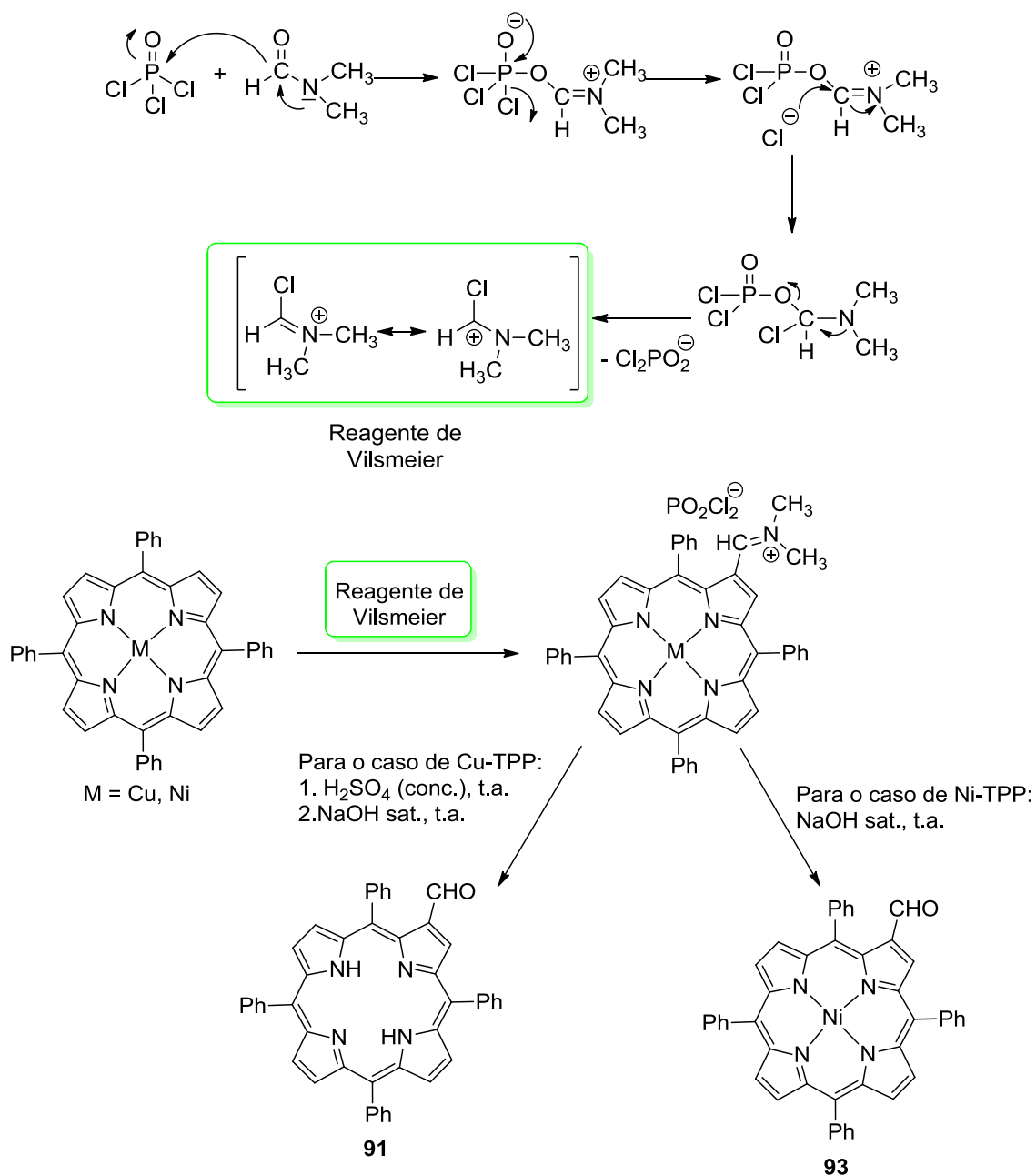
Como é possível observar, para a síntese destes dois derivados foi necessário preparar os complexos de zinco e de níquel β -formilados da 5,10,15,20-tetrafenilporfirina (TPP) **92** e **93**, respectivamente. O primeiro passo envolveu a síntese dos complexos metálicos **Cu-TPP** e **Ni-TPP** que foi realizada na presença dos sais adequados de acordo com literatura (Esquema 4.9).³² Estes complexos foram obtidos quantitativamente e o seu uso evita a protonação no interior do macrociclo durante o processo seguinte que envolve a reacção de formilação de Vilsmeier-Haack.



Esquema 4.9.

De facto, o método de Vilsmeier-Haack seleccionado para a introdução do grupo formilo nestes complexos é considerado o mais adequado para formular macrociclos tetrapirrólicos.³³ Esta reacção envolve a formação de um ião imínio clorado, designado por reagente de Vilsmeier, que reage com o macrociclo aromático, seguindo-se a hidrólise alcalina para gerar o grupo formilo (Esquema 4.10).³⁴

Assim, os complexos **Cu-TPP** e **Ni-TPP** foram dissolvidos em dicloroetano e o reagente de Vilsmeier foi preparado *in situ* através da adição simultânea de POCl₃ e DMF à porfirina em solução. Esta mistura foi mantida sob refluxo e agitação durante 18 horas.³⁵ Findo este tempo, e para o caso do **Cu-TPP** procedeu-se à descomplexação do macrociclo através da adição de ácido sulfúrico concentrado tendo-se mantido a mistura reaccional sob agitação à temperatura ambiente durante 10 minutos (Esquema 4.10). Em ambos os casos, seguiu-se a hidrólise do sal de imínio formado através da adição de uma solução de hidróxido de sódio saturada à mistura reaccional, que foi mantida em agitação à temperatura ambiente durante 1 hora.

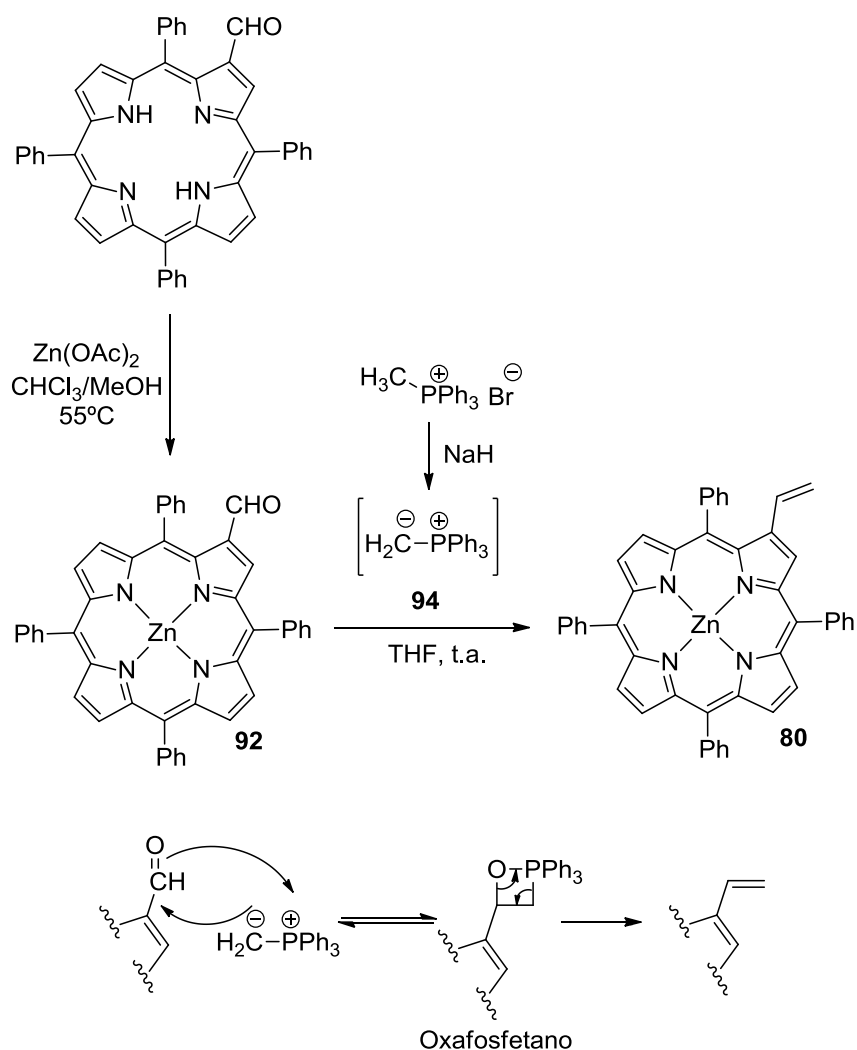


Esquema 4.10.

O isolamento dos compostos formados nestas reacções envolveu a extracção da fase orgânica com clorofórmio seguida da lavagem com água destilada. A fase orgânica foi então seca através de sulfato de sódio anidro e o solvente foi evaporado a pressão reduzida. O resíduo obtido foi purificado através de cromatografia em coluna de sílica gel usando como eluente uma mistura de clorofórmio e hexano (2:1). A primeira fracção recolhida desta coluna foi identificada como sendo a **TPP** ou a **Ni-TPP**

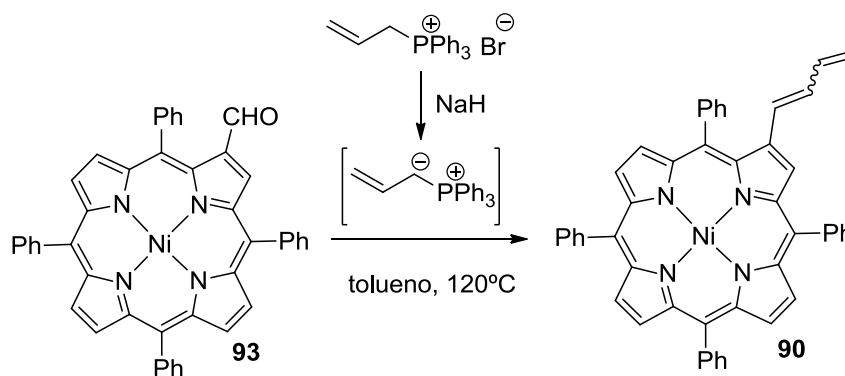
que não reagiu. Da segunda fracção foram obtidos os derivados mono-formilados **91** ou **93** que são obtidos em rendimentos de cerca de 60%.

Para a síntese do complexo 2-vinil-5,10,15,20-tetrafenilporfirinatozínco(II) **80** foi necessário complexar a porfirina β -formilada **91** com o ião zinco. Esta complexação foi realizada de acordo com a literatura e seguindo a metodologia já descrita no esquema 4.9. A formação do derivado porfirínico **80** foi efectuada através da reacção Wittig do complexo de zinco **92** obtido com o ileto **94** gerado *in situ* por reacção do brometo de trifenilmetilfosfónio com hidreto de sódio em THF à temperatura ambiente (Esquema 4.11).³⁶ Após o término da reacção através da destruição do hidreto de sódio e do ileto em excesso por adição de água, a fase orgânica foi extraída com clorofórmio seguindo-se a sua purificação por cromatografia em coluna de sílica gel usando como eluente tolueno. A cristalização da fracção principal em diclorometano/hexano permitiu obter 2-vinil-5,10,15,20-tetrafenilporfirinatozínco(II) **80** com cerca de 80% de rendimento. No esquema 4.11 também está apresentado o mecanismo da reacção de Wittig que envolve uma reacção de cicloadição [2+2] do ileto de fósforo ao grupo carbonílico da porfirina, seguindo-se a cicloreversão [2+2] do oxafosfetano formado originando o óxido de trifenilfosfina e o complexo porfirínico vinilo desejado **80**.³⁷



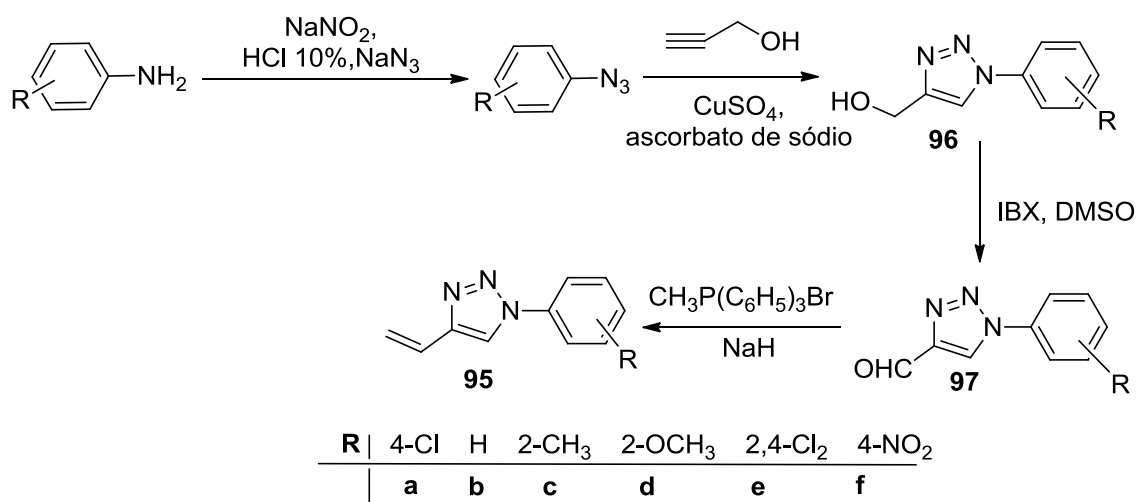
Esquema 4.11.

O complexo 2-butadienil-5,10,15,20-tetrafenilporfirinatóniquel(II) **90** foi também preparado através de uma reacção de Wittig, mas o processo envolveu a porfirina formilada **93** e o ileto alílico gerado *in situ* a partir da reacção do brometo de aliltrifenilfosfónio com hidreto de sódio e foi realizado em tolueno a refluxo (Esquema 4.12).³⁸ Depois de terminar a reacção da forma usual, a mistura reaccional foi purificada por cromatografia em coluna de sílica gel, utilizando como eluente tolueno. A cristalização da fracção principal em diclorometano/éter de petróleo permitiu obter o complexo **90**, numa mistura de isómeros *cis/trans* numa proporção de 1:1,5, com um rendimento de 74%.



Esquema 4.12.

Os 4-vinil-1,2,3-triazóis *N*-substituídos **95** foram cedidos ao abrigo da colaboração com o Grupo de Química Orgânica da Universidade Federal Fluminense, sob orientação do Prof. Dr. Vítor Francisco Ferreira. Estes foram convenientemente preparados de acordo com a estratégia apresentada no esquema 4.13.³⁹ Esta envolveu a síntese de azidas por diazotização de anilinas adequadas com nitrito de sódio na presença de azida de sódio. Seguiu-se a reacção com o álcool propargílico na presença de Cu(I) de onde foram isolados os 1,2,3-triazóis **96**. Estes foram, posteriormente oxidados aos correspondentes aldeídos **97** usando IBX em DMSO. A reacção de Wittig foi, também neste caso, usada para preparar os 4-vinil-1,2,3-triazóis **95** partir da reacção dos aldeídos **97** com o brometo de trifetilfosfónio.



Esquema 4.13.

Estes 4-vinil-1,2,3-triazóis *N*-substituídos foram, muito recentemente, estudados como agentes antimicrobianos e mostraram uma forte actividade na inibição da *Mycobacterium tuberculosis*, a bactéria responsável pela tuberculose.³⁹

4.3.1. Reacção de metátese cruzada entre o 2-vinil-5,10,15,20-tetrafenilporfirinato-zinco(II) **80 e os 4-vinil-1,2,3-triazóis **95a-f****

Para a reacção de metátese cruzada entre os derivados porfirínicos com grupos alcenilo nas posições β -pirrólicas foi necessário encontrar as melhores condições reaccionais. Para isso, vários factores tiveram de ser considerados. De facto, e como já foi referido, um dos maiores problemas da reacção de metátese prende-se com a sensibilidade dos catalisadores à humidade e ao oxigénio, sendo este último um ligante competitivo dos catalisadores de Grubbs. Por norma, o procedimento experimental destas reacções é bastante simples utilizando-se solventes como o diclorometano, tolueno, benzeno e THF, de preferência secos e/ou desgaseificados. Com isto, era necessário escolher o melhor solvente e a melhor montagem reaccional para evitar a perda de eficiência do catalisador.^{2,4} Por outro lado, a concentração dos substratos é, também, um factor importante para o sucesso de uma reacção de metátese cruzada. Sabe-se que as concentrações de substrato mais favoráveis para a reacção de metátese cruzada são em torno de 10^{-2} M de modo a evitar a homodimerização dos substratos.^{2,4} Um outro factor de extrema importância é o da compatibilidade dos reagentes e do catalisador. Vários estudos demonstram que existe uma incompatibilidade de alcenos conjugados deficientes em electrões com o catalisador de Grubbs de 1ª geração. Assim, considerando as características dos 4-viniltriazóis **95** a usar, optou-se por utilizar o catalisador de Grubbs de 2ª geração, uma vez que é o mais fácil de manusear, não sendo tão sensível à humidade nem ao oxigénio. Para além disso, este catalisador parece ser o que melhor se compatibiliza com os substratos seleccionados.

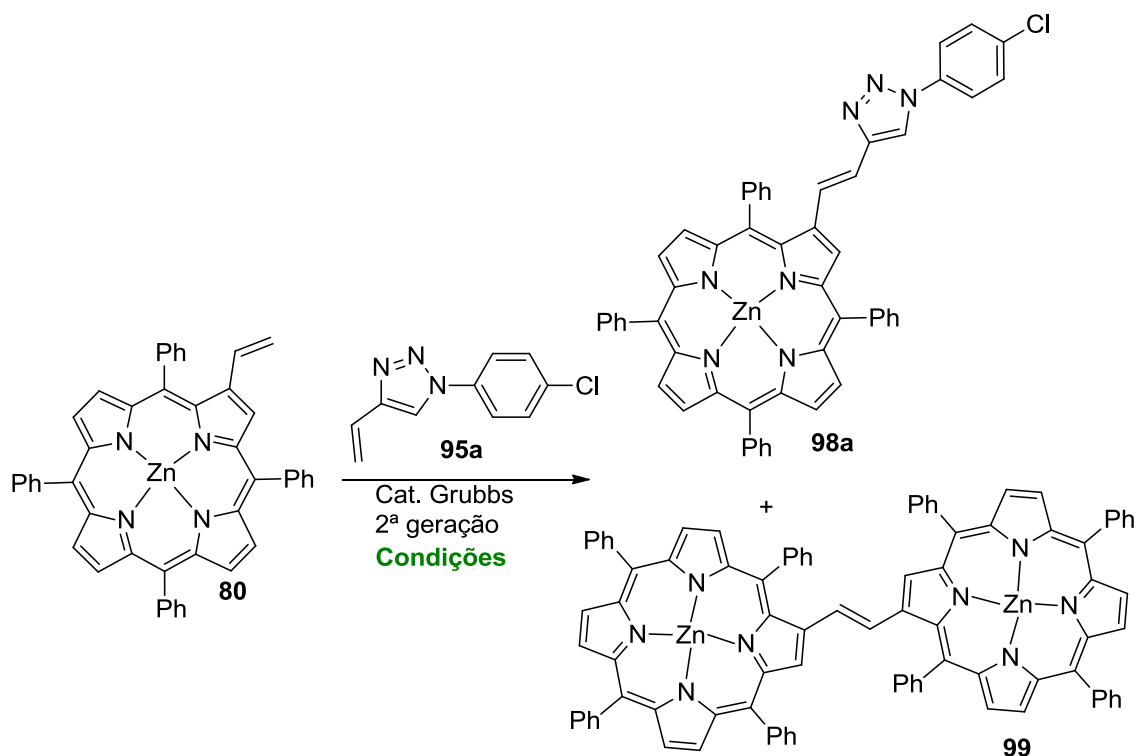
Para o estudo das condições reaccionais da reacção de metátese cruzada com 2-vinil-5,10,15,20-tetrafenilporfirinatozinco(II) **80**, foi escolhido o 4-vinil-1,2,3-triazol **95a**.

Nas primeiras experiências realizadas foram utilizadas as condições reaccionais descritas no trabalho do grupo previamente publicado que envolveu a reacção de metátese entre o complexo **80** e hidratos de carbono com grupos alilo.²¹ Assim, o diclorometano foi o solvente seleccionado. Este foi seco, por destilação na presença de hidreto de cálcio e antes de ser adicionado ao balão da reacção foi desgaseificado num aparelho de ultra-sons sob atmosfera de azoto. Assim, o composto **80** e o 4-vinil-1,2,3-triazol **95a**, em quantidades equimolares e o catalisador de Grubbs de 2ª geração (0,25 equivalentes) foram colocados num balão de duas tubuladuras por onde foi passada numa corrente de azoto. De seguida, estes sólidos foram dissolvidos em 3 mL de diclorometano e a reacção foi mantida em agitação, sob refluxo e atmosfera de azoto (entrada 1, Tabela 4.1). A mistura reaccional foi controlada por TLC várias vezes e observou-se que após 28 horas a reacção não evoluía, encontrando-se grande parte do complexo de partida **80** por consumir. De qualquer forma, observou-se a existência de duas manchas mais polares do que o composto de partida, uma delas em quantidades vestigiais, que foram identificadas como sendo o produto da metátese cruzada, o derivado triazol-porfirina **98a** e o homodímero porfirínico **99** (Esquema 4.14). Foi ainda possível verificar por TLC com indicador que ainda existia triazol **95a** por reagir (cerca de 40%). Assim, decidiu-se terminar a reacção evaporando o solvente da mistura reaccional e purificando-a por cromatografia em coluna de sílica gel usando a mistura de solventes clorofórmio/hexano (2:1) como eluente. A primeira fracção recolhida foi identificada como sendo a porfirina **80** que não reagiu, tendo sido recuperada 83% da porfirina inicialmente pesada. A segunda fracção, constituída pelo conjugado triazol-porfirina **98a** e o homodímero porfirínico **99**, foi novamente purificada por TLC preparativo usando como eluente uma mistura de hexano/ acetato de etilo (4:1). O primeiro derivado foi isolado com um rendimento de 12% de rendimento e o homodímero **99** apenas em quantidades vestigiais.

Tendo em conta o baixo rendimento obtido para o conjugado triazol-porfirina **98a**, procurou-se, mantendo as condições reaccionais, forçar a reacção adicionando mais catalisador e mais triazol **95a** à mistura reaccional ao fim de 14 horas de reacção

Síntese de porfirinas β -substituídas com grupos triazolilo através da reacção de metátese

(entrada 2, Tabela 1). Nestas condições, recuperou-se 79% do complexo **80** e verificou-se que o rendimento do conjugado triazol-porfirina **98a** diminuiu para 9% enquanto que o rendimento do homodímero porfirínico **99** aumentou para 9%.



Esquema 4.14.

Tabela 4.1. Condições reaccionais e resultados obtidos na reacção do complexo β -vinil-porfirínico **80** com o 4-vinil-1,2,3-triazol **95a**

Entrada	Condições	% de 80 (recuperado)	η (%) 98a	η (%) 99[†]
1	0,25 equiv. Grubbs; 1 equiv. 95 ; 3mL CH ₂ Cl ₂ ; 40°C; 28h; Atm. N ₂	83	12	Vest.
2	(0,25 equiv. Grubbs)x2*; (1 equiv. 95)x2*; 3mL CH ₂ Cl ₂ ; 40°C; 28h; Atm. N ₂	79	9	9
3	(0,25 equiv. Grubbs)x2*; (1 equiv. 96)x2*; 3mL C ₂ H ₄ Cl ₂ ; 80°C; 28h; Atm. N ₂	94	1	Vest.
4	0,25 equiv. Grubbs; 1 equiv. 95 ; 3 mL CH ₂ Cl ₂ ; 40°C; 59h; Atm. Ar	91	6	Vest.
5	(0,25 equiv. Grubbs)x2*; (1 equiv. 95)x2*; 3 mL tolueno; 120°C; 53h; Atm. Ar	90	6	Vest.
6	(0,25 equiv. Grubbs)x2*; (1 equiv. 95)x2*; 3mL tolueno em tubo de Schlenk (desgasificação sob vácuo e US); 80°C; 28h	78	19	8
7	(0,25 equiv. Grubbs)x2*; (1 equiv. 95)x2*; 3 mL C ₂ H ₄ Cl ₂ em tubo de Schlenk (desgasificação sob vácuo e US); 80°C; 28h	78	13	Vest.
8	0,25 equiv. Grubbs; 1 equiv. 95 ; 3 mL THF em tubo de Schlenk (desgasificação sob vácuo e US); 65°C; 18h.	78	25	-

*Segunda adição às 14h de reacção.

† Caracterizado por HRMS-ESI e UV-Vis.

Também se verificou que utilizando como solvente o 1,2-dicloroetano seco e desgasificado e aumentando a temperatura da reacção para 80°C (entrada 3, Tabela 4.1) não ocorreu uma melhoria do processo. Nestas condições a porfirina de partida foi

recolhida quase na totalidade, tendo sido possível isolar apenas com 1% de rendimento o produto da metátese cruzada **98a**.

Suspeitando que o catalisador poderia estar a ser desactivado pelo oxigénio existente na rede de fornecimento de azoto, decidiu-se realizar o acoplamento do complexo **80** e do triazol **95a** de acordo com as condições descritas para a entrada 2 da tabela 4.1, porém substituindo a atmosfera da reacção para árgon (entrada 4, tabela 4.1). Também neste caso, os rendimentos ficaram muito desviados do esperado, recuperando-se praticamente toda a porfirina de partida **80** e isolando-se o produto pretendido **98a** com um rendimento de 6%.

Mantendo a atmosfera de árgon, a reacção realizada usando como solvente tolueno seco em fio de sódio a refluxo com duas adições de catalisador e de triazol **95a** (entrada 5, Tabela 4.1) em nada beneficiou o processo. Neste caso foi possível recuperar 90% de porfirina de partida **80** e apenas 6% do derivado triazol-porfirina **98a** desejado.

Suspeitando que, mesmo em atmosfera de árgon, o catalisador estaria a ser inactivado pela presença de oxigénio, decidiu-se realizar a reacção em tubo de Schlenk desgaseificando o solvente sob vácuo e ultra-sons. Assim, os substratos e o catalisador foram introduzidos num tubo de Schlenk e de seguida foram dissolvidos em tolueno seco em fio de sódio (entrada 6, Tabela 4.1). O solvente foi desgaseificado por ligação do tubo de Schlenk a sistema de vácuo e ainda sob acção de ultra-sons; após 2 minutos o tubo foi fechado (ver parte experimental). O tubo selado com a mistura reaccional foi mantido sob agitação e aquecimento a 80°C durante 14 horas. Findo este tempo, verificou-se a formação do conjugado **98a** no entanto ainda permanecia muito complexo de partida **80** por reagir. Foram, então, adicionados mais 1 equivalente do triazol **95a** e 0,25 equivalentes do catalisador de Grubbs de 2ª geração e o tubo de Schlenk foi novamente sujeito ao processo de desgasificação e colocado em aquecimento e agitação durante mais 14 horas. Nestas condições a percentagem do conjugado triazol-porfirina **98a** aumentou para 19%, tendo sido recuperada 78% do complexo de partida **80**. O homodímero **99** foi recolhido em 8% de rendimento.

Na tentativa de melhorar o rendimento do produto da reacção de metátese cruzada **98a**, usaram-se exactamente as mesmas condições descritas para a entrada 6

da Tabela 4.1, no entanto alterou-se o solvente para 1,2-dicloroetano seco (entrada 7, Tabela 4.1). Os resultados obtidos não foram melhores do que os anteriores, uma vez que se recuperaram 78% do complexo β -vinil-porfirínico de partida **80** e o conjugado triazol-porfirina **98a** foi obtido em 13% de rendimento.

Optou-se, então, por utilizar o THF seco em fio de sódio como solvente da reacção usando o tubo de Schlenk e o processo de desgasificação anteriormente descrito (entrada 8, Tabela 4.1). A reacção de 1 equivalente de cada substrato e 0,25 equivalente de catalisador de Grubbs de 2ª geração em THF a 65°C durante 18 horas permitiu isolar o derivado triazol-porfirina **98a** com um rendimento de 25%, não se verificando a formação do homodímero **99**. Foi ainda possível recuperar 78% do complexo de partida **80**.

Apesar do uso do tubo de Schlenk permitir uma maior conversão do complexo de partida **80** e ser mais eficaz para a produção do composto esperado de metátese cruzada **98a**, os rendimentos obtidos não dignificam este processo, ficando muito abaixo dos rendimentos reportados na literatura para este tipo de reacção. Suspeitou-se que algo estaria a tornar o catalisador inactivo, no entanto, desta vez, não seria apenas a presença de oxigénio, uma vez que esse problema havia sido ultrapassado através do uso do tubo de Schlenk.

Alguns exemplos na literatura mostram que a presença de alguns grupos funcionais nos materiais de partida, como por exemplo grupos éster, cetona, éter e aminas, podem originar quelatos com o átomo de Ru do catalisador de Grubbs, transformando-o numa espécie inactiva, diminuindo, assim, os rendimentos dos produtos resultantes da reacção de metátese.^{1,40} Em 1997, Langemann e seus colaboradores mostraram que a presença de ácidos de Lewis pode inverter este processo, através da complexação desses ácidos com grupos funcionais presentes nos substratos, competindo assim com o catalisador. Para poderem ser usados como aditivos nestas reacções, estes ácidos de Lewis têm de ser compatíveis com os catalisadores de metátese, não provocando reacções paralelas e a sua constante de coordenação com o substrato deve ser baixa para que este possa estar disponível para a reacção de metátese. Um ácido de Lewis que preenche estes requisitos é o *iso*-propóxido de titânio ($\text{Ti}(\text{O}^i\text{Pr})_4$), o qual já foi usado como aditivo em reacções de metátese em que um dos substratos possuía um grupo éster.⁴⁰

Apesar de nenhum dos substratos usados possuir um destes grupos funcionais, considerou-se que os átomos de azoto dos 4-vinil-1,2,3-triazol poderiam estar a coordenar com o átomo de Ru do catalisador de Grubbs de 2ª geração, “envenenando-o” e tornando-o, por isso, inactivo. Assim, a influência do uso de $Ti(O^iPr)_4$ na reacção de metátese entre o complexo **80** e o 4-vinil-1,2,3-triazol **95a** foi estudada. Procurou-se verificar se a formação do complexo $Ti(O^iPr)_4$ - 4-vinil-1,2,3-triazol **95a** poderia ser confirmada por RMN de 1H adquirindo o espectro antes e depois da adição de 3 equivalentes de $Ti(O^iPr)_4$, na esperança de observar alguma alteração no espectro indicativa desta complexação (Figura 4.7). Assim, no espectro de RMN de 1H do 4-vinil-1,2,3-triazol **95a** (Figura 4.7 A) é possível observar um sinal a 7,93 ppm referente à ressonância do protão H-5 do anel triazólico. Os sinais na forma de multiplete a 7,63-7,48 e 7,72 -7,67 ppm são referentes à ressonância dos protões H-2' e H-3' do anel de fenilo, respectivamente. Podemos ainda observar a ressonância dos protões do grupo vinilo na forma de duplos dupletos a 6,79 ppm ($J = 17,8$ e $11,2$ Hz), 6,02 ppm ($J = 17,8$ e $1,2$ Hz) e 5,44 ppm ($J = 11,2$ e $1,2$ Hz) referentes à ressonância dos protões H- α , H- α_2 e H- α_1 , respectivamente.³⁹

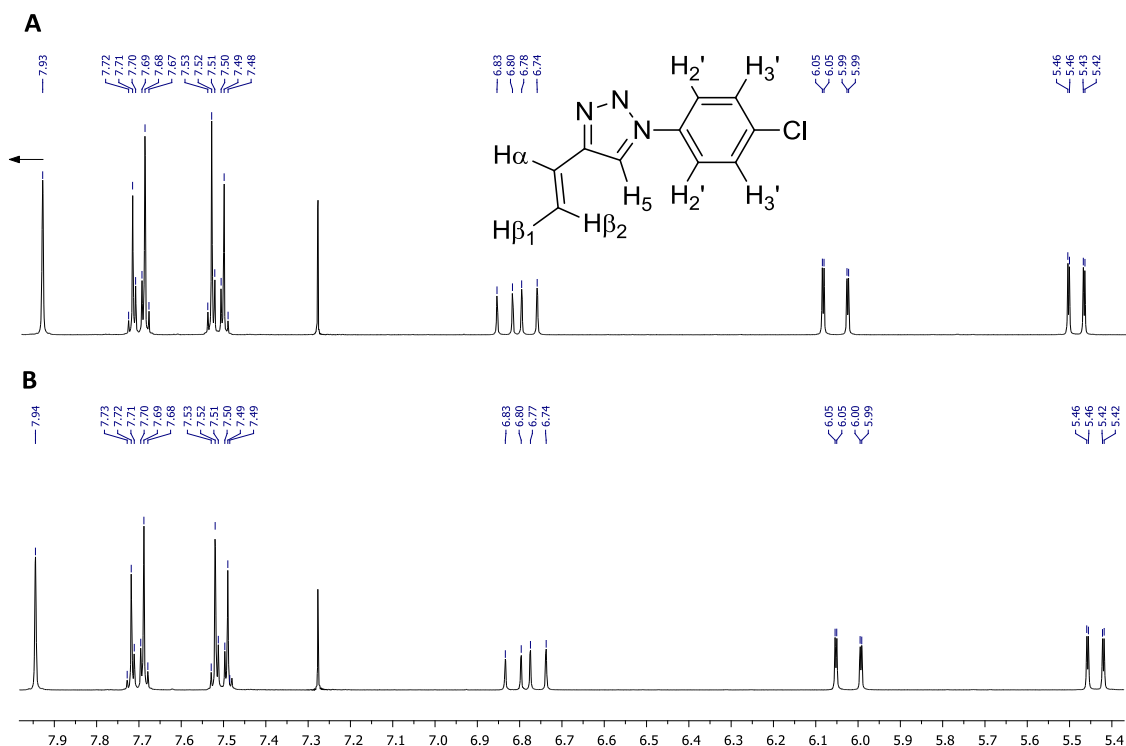


Figura 4.7. Espectro de RMN de ^1H em CDCl_3 do 4-vinil-1,2,3-triazol **95a** (A) e do 4-vinil-1,2,3-triazol **95a** com 3 equivalentes de $\text{Ti}(\text{O}^i\text{Pr})_4$ (B).

No espectro de RMN de ^1H do 4-vinil-1,2,3-triazol **95a** e 3 equivalentes de $\text{Ti}(\text{O}^i\text{Pr})_4$ (Figura 4.7 B) podemos observar que o espectro se mantém quase inalterado, com os sinais referentes à ressonância dos protões do grupo vinilo a surgirem com iguais desvios químicos e o mesmo desdobramento. No entanto, observa-se que os sinais referentes à ressonância do protão H-5 e dos protões do grupo fenilo *p*-substituído com um átomo de cloro sofreram um ligeiro desvio de deslocamento químico para valores mais altos. Este facto pode ser indicativo de complexação entre este triazol e o $\text{Ti}(\text{O}^i\text{Pr})_4$. Neste espectro é ainda possível verificar a presença de um sinal na forma de multiplete a 4,31-4,55 ppm referente à ressonância dos protões dos grupo *iso*-propóxido do $\text{Ti}(\text{O}^i\text{Pr})_4$ (não mostrado).

Decidiu-se, então, encontrar as melhores condições reaccionais para a reacção do complexo **80** e o 4-vinil-1,2,3-triazol **95a** na presença de catalisador de Grubbs de 2ª geração e $\text{Ti}(\text{O}^i\text{Pr})_4$ (tabela 4.2). Os estudos realizados foram iniciados com as condições descritas na tabela 4.1, usando o sistema convencional de balão de 2 tubuladuras em atmosfera de argón. No entanto, antes da adição da porfirina, o vinil-

triazol **95a** e o $\text{Ti}(\text{O}^i\text{Pr})_4$ foram dissolvido no solvente seleccionado e permaneceram em agitação e aquecimento durante 1 hora.

Na experiência realizada em diclorometano e onde apenas foi adicionado 1 equivalente de $\text{Ti}(\text{O}^i\text{Pr})_4$ (entrada 1, Tabela 4.2), verificou-se que ao fim de 48 horas de reacção praticamente toda o complexo porfirínico de partida **80** continuava por reagir. Nestas condições o rendimento do derivado triazol-porfirina **98a** obtido foi de apenas 4 %, enquanto que o homodímero porfirínico **99** foi obtido em 5% de rendimento.

Também não se observou uma melhoria significativa no processo quando, utilizando as mesmas condições anteriores, se adicionou ao fim de 14 horas de reacção mais 1 equivalente de $\text{Ti}(\text{O}^i\text{Pr})_4$ e de triazol e 0,25 equivalente de catalisador (entrada 2, Tabela 4.2).

Assumindo que o sistema reaccional não está livre de oxigénio, o que poderia diminuir a eficiência do catalisador, decidiu-se realizar a reacção em tubo de Schlenk, uma vez que permite efectuar a reacção sob vácuo. Assim, na reacção do triazol **95a** e da porfirina **80** na presença de $\text{Ti}(\text{O}^i\text{Pr})_4$ e 0,25 equivalentes de catalisador de Grubbs de 2ª geração, em dicloroetano a refluxo em tubo de Schlenk (entrada 3, Tabela 4.2), permitiu isolar 7% do derivado triazol-porfirina **98a** recuperando-se 93% o complexo porfirínico **80** de partida.

Mesmo quando, nas mesmas condições anteriores, se adicionaram 3 equivalentes de $\text{Ti}(\text{O}^i\text{Pr})_4$ (entrada 4, Tabela 4.2) o processo não foi eficiente, sendo os resultados obtidos praticamente iguais aos alcançados anteriormente .

Optou-se por mudar o solvente da reacção para THF (entrada 5, Tabela 4.2) e realizar a reacção nas mesmas condições descritas para a entrada 4 da tabela 4.2, no entanto, usando como temperatura de reacção 65°C. À semelhança do observado no estudo das condições reaccionais sem o uso de $\text{Ti}(\text{O}^i\text{Pr})_4$, este solvente foi aquele que permitiu obter maiores conversões do complexo β -vinil-porfirínico **80** e maiores rendimentos do produto de metátese cruzada, o derivado **98a**, foi obtido com um rendimento de 11%, no entanto, este valor é cerca de metade dos 25% observado anteriormente.

Na experiência realizada em que o $\text{Ti}(\text{O}^i\text{Pr})_4$ foi usado como solvente da reacção (entrada 6, Tabela 4.2), verificou-se que não ocorreu reacção, recuperando-se a porfirina de partida quase na totalidade.

Tabela 4.2. Condições reaccionais e resultados obtidos na reacção do complexo β -vinil-porfirínico **80** com o 4-vinil-1,2,3-triazol **95a** na presença de $\text{Ti}(\text{O}^i\text{Pr})_4$

Entrada	Condições	% de 80 (recuperado)	η (%) 98a	η (%) 99
1	0,25 equiv. Grubbs; 1 equiv. 95 ; 1 equiv. $\text{Ti}(\text{O}^i\text{Pr})_4$ 3mL CH_2Cl_2 ; 40°C; 48h; Atm. Ar	96	4	5
2	(0,25 equiv. Grubbs)*2; (1 equiv. 95)*2; (1 equiv. $\text{Ti}(\text{O}^i\text{Pr})_4$)*2; 3mL CH_2Cl_2 ; 40°C; 48h; Atm. Ar	97	7	Vest.
3	0,25 equiv. Grubbs; 1 equiv. 95 ; 1 equiv. $\text{Ti}(\text{O}^i\text{Pr})_4$; 3 mL $\text{C}_2\text{H}_4\text{Cl}_2$ em tubo de Schlenk (desgasificação sob vácuo e US); 80°C; 28h	93	7	Vest.
4	0,25 equiv. Grubbs; 1 equiv. 95 ; 3 equiv. $\text{Ti}(\text{O}^i\text{Pr})_4$; 3 mL $\text{C}_2\text{H}_4\text{Cl}_2$ em tubo de Schlenk (desgasificação sob vácuo e US); 80°C; 48h	93	6	Vest.
5	0,25 equiv. Grubbs; 1 equiv. 95 ; 3 equiv. $\text{Ti}(\text{O}^i\text{Pr})_4$; 3 mL THF em tubo de Schlenk (desgasificação sob vácuo e US); 80°C; 18h.	87	11	-
6	0,25 equiv. Grubbs; 1 equiv. 95 ; 3 mL $\text{Ti}(\text{O}^i\text{Pr})_4$; 40°C; 48h.	99	-	-

*Segunda adição às 14h de reacção.

Estes resultados mostram que a falta de eficiência desta reacção não é devida ao envenenamento do catalisador. De facto, com a presença do aditivo na reacção de metátese cruzada entre o complexo **80** e o 4-vinil-1,2,3-triazol **95a** não se verifica o aumento do rendimento do produto de metátese. Pelo contrário, observou-se inclusive, uma decréscimo do rendimento deste produto, que pode ser atribuído à dificuldade no processo de purificação devido à presença do $\text{Ti}(\text{O}^i\text{Pr})_4$.

Numa última tentativa de aumentar os rendimentos da reacção de metátese entre o complexo **80** e o 4-vinil-1,2,3-triazol **95a**, optou-se por recorrer à irradiação com microondas. O uso da irradiação de microondas em síntese orgânica tornou-se bastante usual. É reconhecido que a activação por esta radiação ocorre a nível molecular, e por isso as reacções assistidas por radiação com microondas são mais rápidas do que com os métodos convencionais. A síntese e a funcionalização de macrociclos tetrapirrólicos usando a radiação de microondas têm vindo a ser amplamente explorada por diversos grupos de investigação, nomeadamente pelo nosso.⁴¹

O uso da radiação com microondas em reacções de metátese já foi, também, explorado, permitindo obter produtos com bons rendimentos e boas selectividades.^{4,42} Assim, a reacção de metátese entre o complexo **80** e o 4-vinil-1,2,3-triazol **95a** foi realizada num aparelho de microondas multimodo e o solvente escolhido para esta reacção foi o 1,2-dicloroetano. Ensaíram-se quatro potências: 200, 300, 400 e 500 W (Tabela 4.3) e uma temperatura máxima de 120°C. O complexo porfirínico β -vinilado **80** e o 4-vinil-1,2,3-triazol **95a** em quantidades equimolares e o catalisador de Grubbs de 2ª geração (0,25 equivalentes) foram colocados no vaso da reacção e dissolvidos em 1,2-dicloroetano. Estas reacções foram realizadas em vaso fechado em ciclos de 10 minutos.

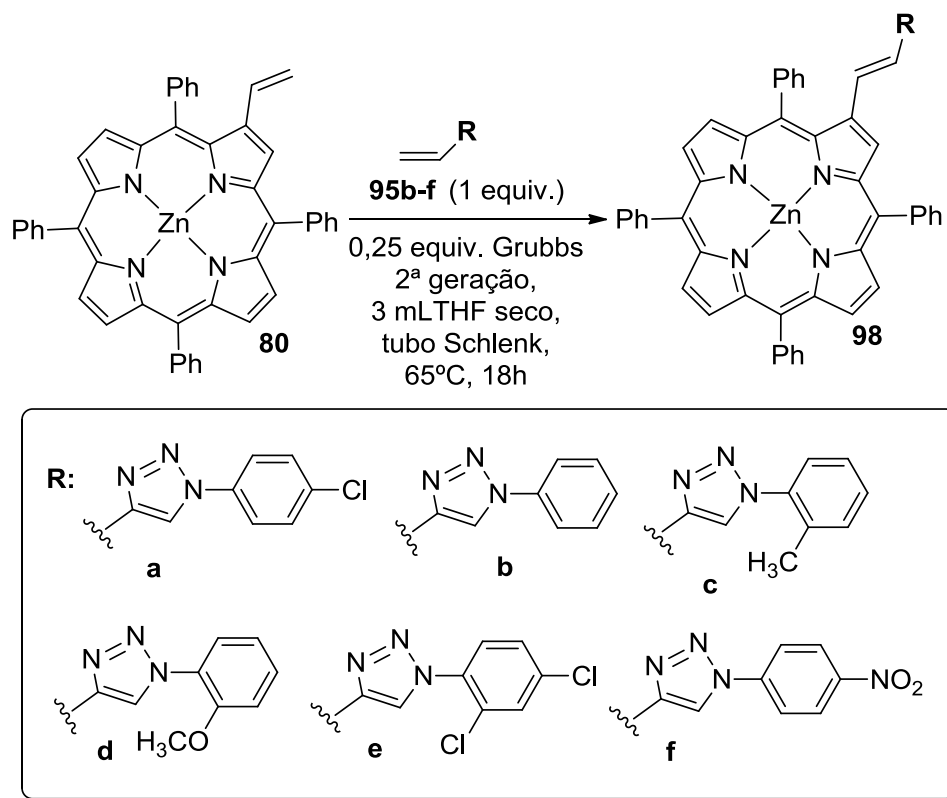
Tabela 4.3. Condições reaccionais e resultados obtidos na reacção do complexo β -vinil-porfirínico **80** com o 4-vinil-1,2,3-triazol **95a** usando a radiação por microondas

Entrada	Condições	% de 80 (recuperado)	η (%) 99a
1	0,25 equiv. Grubbs; 1 equiv. 95 ; 3mL C ₂ H ₄ Cl ₂ ; 120°C; 200 W , 10 min.	99	-
2	0,25 equiv. Grubbs; 1 equiv. 95 ; 3mL C ₂ H ₄ Cl ₂ ; 120°C; 300 W , 10 min.	99	-
3	0,25 equiv. Grubbs; 1 equiv. 95 ; 3mL C ₂ H ₄ Cl ₂ ; 120°C; 400 W , 10 min.	99	-
4	0,25 equiv. Grubbs; 1 equiv. 95 ; 3mL C ₂ H ₄ Cl ₂ ; 120°C; 500 W , 10 min.	99	Vest.
5	0,25 equiv. Grubbs; 1 equiv. 95 ; 3mL C ₂ H ₄ Cl ₂ ; 120°C; 500 W , 30 min.	80	5
6	0,25 equiv. Grubbs; 1 equiv. 95 ; 3mL C ₂ H ₄ Cl ₂ ; 120°C; 500 W , 1h.	78	15

Como é possível observar através dos resultados apresentados na tabela 4.3 o uso de radiação microondas não foi muito eficaz na reacção de metátese cruzada entre o complexo porfirínico β -vinilado **80** e o 4-vinil-1,2,3-triazol **95a**. O uso das potências de 200, 300 e 400 W durante 10 minutos não permitiu obter o produto de metátese cruzada (entradas 1, 2 e 3). Apenas quando foi usada a potência de 500 W durante 10 minutos de irradiação foi possível verificar por TLC a presença do conjugado triazol-porfirina **98a** (entrada 4). Por isso aumentou-se o tempo de irradiação para 30 minutos, mantendo a temperatura nos 120°C e a potência nos 500 W (entrada 5). Nestas condições foi possível isolar 5% do conjugado triazol-porfirina **98a** e recuperar cerca de 80% de porfirina β -vinilada **80** que não reagiu.

Aumentando o tempo de irradiação para 1 hora, foi possível isolar com um rendimento de 15% o conjugado triazol-porfirina **98a** e recuperar 78% da porfirina **80** (entrada 6). É importante referir que nestas reacções se observa, em TLC, a presença de componentes muito escuros na base, muito provavelmente devido à decomposição do material porfirínico inicial. Mesmo assim, o rendimento do produto de metátese cruzada é inferior ao obtido anteriormente (Tabela 4.1 entrada 8). Poder-se-ia aumentar o tempo de irradiação desta reacção, porém reacções em microondas com mais do 1h de irradiação não são viáveis, não havendo, por isso, qualquer tipo de vantagem face ao método convencional.

Apesar do rendimento da reacção de metátese cruzada entre o complexo **80** e o 4-vinil-1,2,3-triazol **95a** não ter atingido valores elevados, decidiu-se verificar se o substituinte do grupo fenilo do triazol teria algum efeito na eficiência deste processo. Assim, usaram-se as melhores condições encontradas para esta reacção (tabela 4.1, entrada 8) para preparar outros derivados triazol-porfirina a partir dos 4-vinil-1,2,3-triazóis **95b-f** (Esquema 4.15). Assim, as reacções de metátese cruzada entre o complexo **80** e os 4-vinil-1,2,3-triazol **95b-f** foram realizadas num tubo de Schlenk em THF a 65°C. Os resultados obtidos estão apresentados na tabela 4.4, onde também foi incluído valor do rendimento anteriormente obtido para o triazol **95a** para fins comparativos.



Esquema 4.15.

Tabela 4.4. Resultados obtidos na reacção do complexo β -vinil-porfirínico **80** com os 4-vinil-1,2,3-triazóis **95a-f**

Entrada	4-vinil-1,2,3-triazol 95	% de 80 (recuperado)	η (%) 98
1	a	78	25
2	b	86	13
3	c	82	19
4	d	74	26
5	e	91	1
6	f	99	-

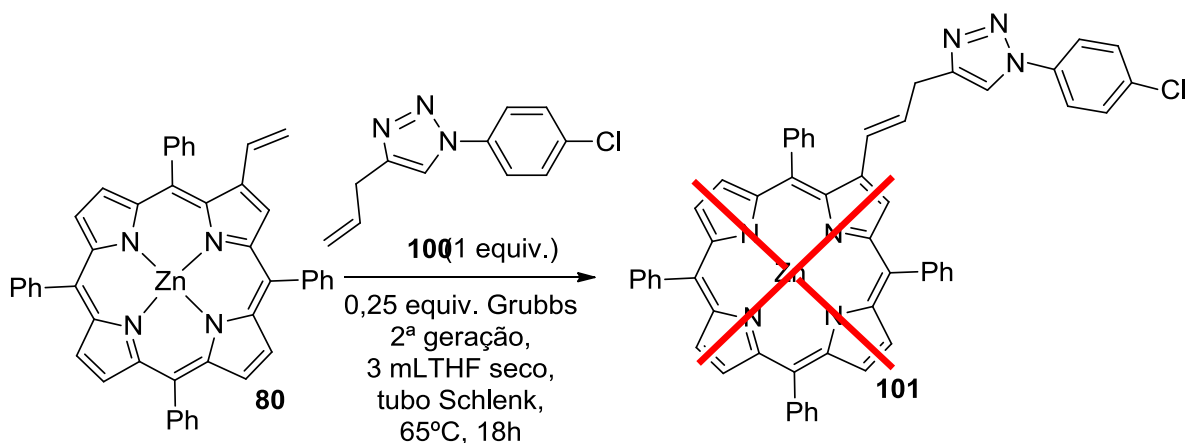
Como é possível verificar, a eficiência de reacções de metátese cruzada entre o complexo porfirínico β -vinilado **80** e os 4-vinil-1,2,3-triazóis **95b-f** é dependente do tipo de substituinte presente no anel de arilo ligado ao átomo de azoto do triazol. De facto, nas condições seleccionadas, os melhores rendimentos obtidos para os produtos de metátese cruzada foram obtidos para os 4-vinil-1,2,3-triazol **95a** e **95d**, tendo sido possível isolar os conjugados triazol-porfirina **98a** e **98d** com rendimentos de 25 e 26% (entradas 1 e 4). Os resultados mostram ainda que a presença de um grupo NO_2 e dois átomos de cloro no anel de arilo ligado o átomo de azoto do triazol é responsável por uma diminuição da eficiência do processo. Esta ideia é confirmada com os resultados obtidos para os 4-vinil-1,2,3-triazóis **95e** e **95f** (entradas 5 e 6, respectivamente). Nestas reacções o conjugado triazol-porfirina **98e** formou-se em apenas 1% de rendimento e no caso do 4-vinil-1,2,3-triazol **95f** não ocorreu qualquer reacção, recuperando-se praticamente toda o complexo **80**.

Intrigados com a falta de eficiência destas reacções, suspeitou-se que a falta de reactividade estava relacionada com a conjugação presente entre o grupo vinilo e as respectivas entidades (o macrociclo porfirínico e o anel de triazol). Na realidade, este problema foi identificado por Dolphin que referiu que os efeitos de ressonância podem reduzir drasticamente a reactividade.²² Uma outra referência a este problema data de 2002 em que Iyoda e seus colaboradores mostraram que a síntese de homodímeros de heterociclos aromáticos vinilados, como o tiofeno e o furano, através da reacção de metátese cruzada não é possível.⁴³ Mais ainda, os mesmos autores mostraram que a reacção de metátese destes heterociclos com o 1-octeno ocorre com baixa selectividade devido à baixa reactividade do carbeno aromático que se forma durante o ciclo catalítico.⁴³

Com base nos resultados anteriores, considerou-se a possibilidade de realizar a reacção de metátese em que um dos compostos não tivesse o grupo vinilo conjugado com o anel aromático, esperando-se assim, conseguir rendimentos mais promissores para os conjugados triazol-porfirina.

Assim, realizou-se a reacção de metátese entre o complexo **80** com o 4-alil-1,2,3-triazol **100** (Esquema 4.16). Este triazol foi sintetizado de forma análoga aos 4-vinil-1,2,3-triazóis **95a-f**, no entanto o álcool propargílico foi substituído pelo 3-butinol. A reacção de metátese foi realizada exactamente nas mesmas condições descritas para

a síntese dos conjugados triazol-porfirina **98a-e**, assim como todo o processo purificação da mistura reaccional. Findo este processo foi possível obter um composto de cor verde com um rendimento de 23%. Seria de esperar que o produto obtido desta reacção de metátese fosse o conjugado triazol-porfirina **101**, no entanto, os seus espectros de RMN de ^1H e de massa em MALDI mostram que o derivado obtido é o conjugado triazol-porfirina **98a** (a caracterização de todos os derivados triazol-porfirina será discutida no ponto 4.3.1.1).



Esquema 4.16.

A formação do derivado **98a** ao invés do derivado **101** pode ser justificada pela isomerização do grupo alilo do 1,2,3-triazol *N*-substituído **100** formando o 1-*p*-clorofenil-4-propen-1-il-1,2,3-triazol. Esta isomerização pode ser compreendida através da formação de complexos contendo grupos hidretos de ruténio.^{44a} Tais complexos têm sido invocados nos casos de isomerização em metátese de olefinas. Como exemplo deverá ser referida a espécie **102** indicada na figura 4.8, espécie essa que foi obtida a partir de catalisadores com grupos metilideno.^{44b} A reacção de metátese deste triazol com o complexo **80** na presença do catalisador de Grubbs de 2^a geração origina o derivado triazol-porfirina **98a** e 1-propeno.

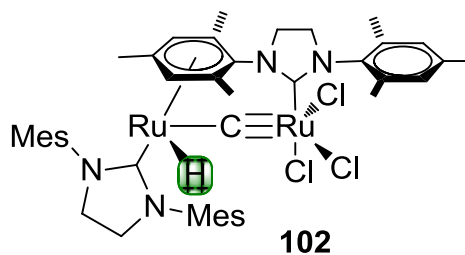
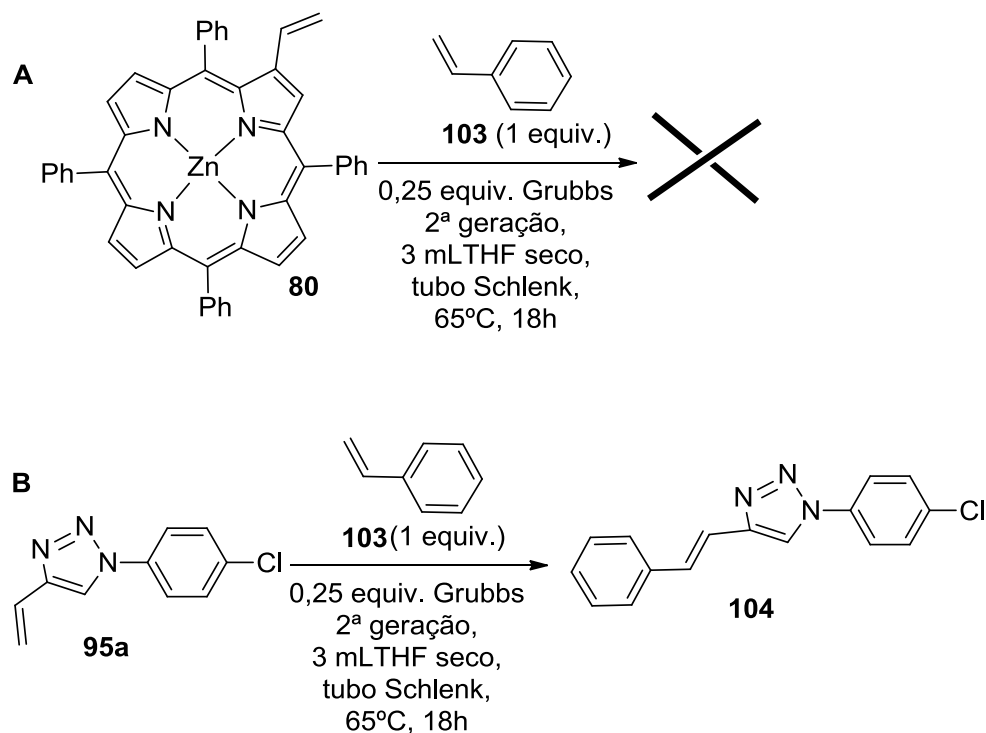


Figura 4.8.

Este facto justifica, também, o rendimento muito semelhante ao obtido aquando da reacção de metátese cruzada do complexo **80** e o 4-vinil-1,2,3-triazol **95a** nas mesmas condições reaccionais, uma vez que, na realidade a reacção ocorreu entre as espécies em que o grupo vinilo está conjugado com o núcleo porfirínico e com o núcleo triazólico, respectivamente. Assim, desta forma, não foi possível provar que o problema desta reacção reside na conjugação destas espécies.

Para verificar se a hipótese da dificuldade na reacção entre o complexo **80** e os 4-vinil-triazóis **95a-f** estaria relacionada com a aromaticidade destas duas componentes, decidiu-se testar a reacção com uma outra espécie aromática. Assim, foi realizada a reacção de metátese cruzada entre o complexo **80** e o estireno **103** (Esquema 4.17 A) e ainda, numa outra experiência, a reacção de metátese cruzada entre o 4-vini-1,2,3-triazol **95a** e o mesmo estireno (Esquema 4.17 B), exactamente nas mesmas condições descritas para a síntese dos conjugados triazol-porfirina **98a-e**.



Esquema 4.17.

Nestas reacções foi possível verificar que, enquanto o complexo **80** não reage com o estireno **103**, recuperando-se praticamente todo o estireno **103** e toda o complexo **80**, a reacção de metátese entre o 4-vinil-1,2,3-triazol **95a** e o estireno **103** gera o heterodímero **104** com 26% de rendimento. A estrutura deste derivado foi confirmada por RMN de ^1H e por espectrometria de massa. Na figura 4.9 é apresentado o espectro de RMN de ^1H do derivado **104**, onde é possível observar a presença de um singuleto a 7,99 ppm referente à ressonância do protão H-5 do triazol. A 7,72 ppm surge um duplete ($J = 8,9$ Hz) que foi identificado como sendo devido à ressonância dos protões *orto* da unidade de fenilo do estireno. A 7,56-7,49 ppm é possível observar um multiplete referente à ressonância de dois protões *meta* desta unidade de fenilo e ainda de dois protões *orto* do grupo arilo do triazol. É ainda possível observar o multiplete a 7,42-7,29 ppm referente à ressonância dos protões *meta* do grupo arilo do triazol e do protão *para* da unidade de fenilo do estireno. Por fim, é possível identificar dois sinais na forma de dupletos a 7,31 e 7,14 ppm ($J = 16,5$ Hz) referentes à ressonância dos protões H-2 e H-3, respectivamente. O valor da

constante de acoplamento entre estes protões confirma a configuração *trans* deste sistema vinílico.

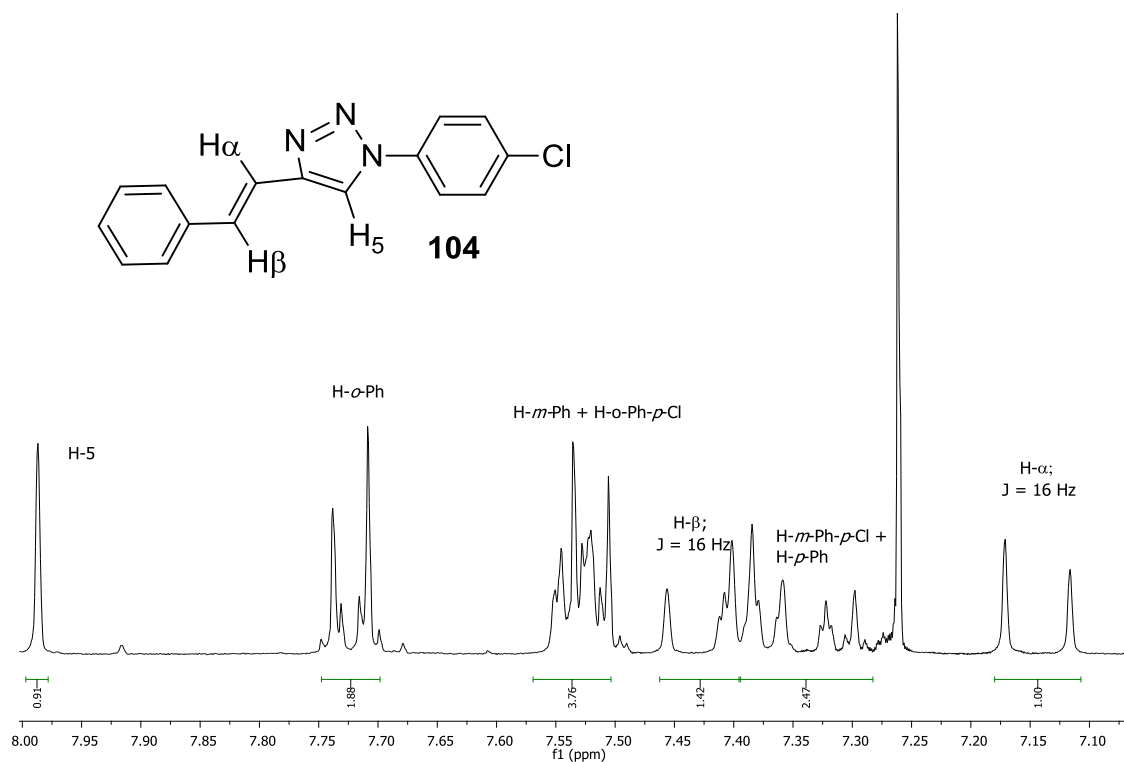


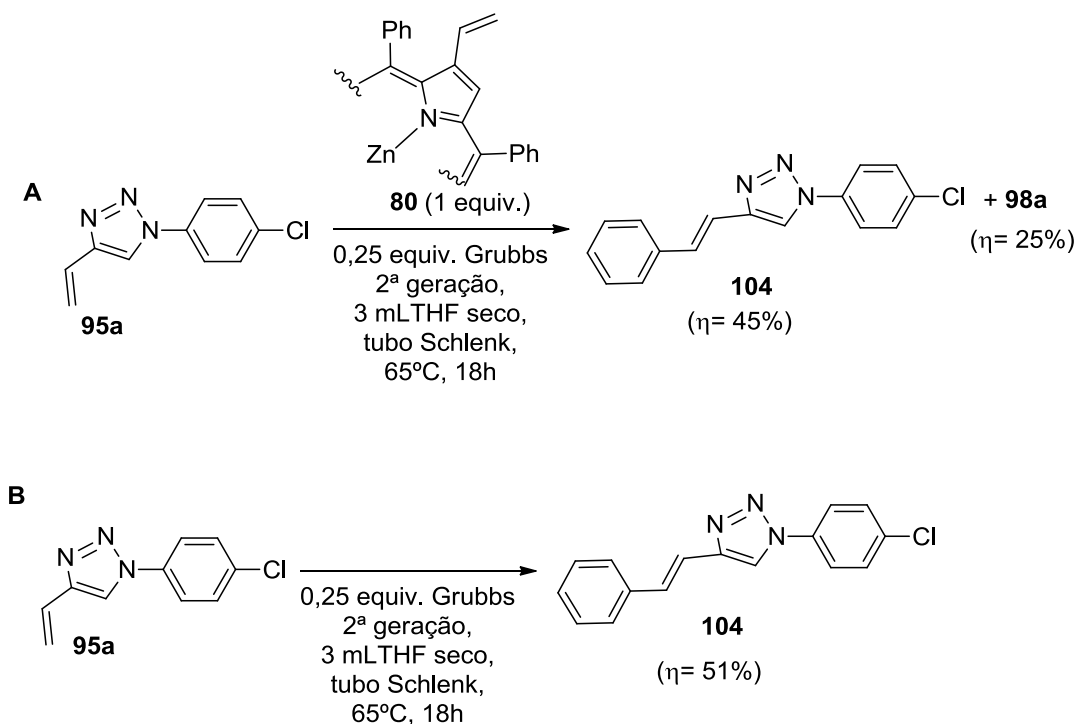
Figura 4.9. Espectro de RMN de ^1H do derivado **104**.

Com este teste percebe-se que a conjugação do grupo vinilo com o núcleo porfirínico e com o núcleo triazólico é um dos problemas na reacção de metátese cruzada entre as espécies aromáticas **80** e **95**. No entanto, tendo em conta os resultados obtidos com o estireno, verifica-se que os 4-vinil-triazóis **95a-e** são mais reactivos do que o estireno **104**.

Decidiu-se olhar, novamente, para a reacção do complexo **80** com o 4-vinil-1,2,3-triazol **95a**, mas desta vez, prestando mais atenção à formação de produtos derivados do triazol, logo produtos sem coloração. Pretende-se, com isto, responder à questão: “Uma vez que apenas se recupera cerca de 40% do 4-vinil-1,2,3-triazol **95a** na reacção de metátese com a porfirina **80**, o que acontece ao triazol que não reage com a porfirina **80** durante esta reacção?”

Para tentar responder a esta pergunta realizou-se a reacção de metátese cruzada entre o complexo **80** e o 4-vinil-1,2,3-triazol **95a** na presença do catalisador de Grubbs de 2ª geração e nas condições descritas anteriormente para a síntese dos conjugados triazol-porfirina **98a-e**. Porém, desta vez, concentrando as atenções na formação de produtos que não são derivados porfirínicos (Esquema 4.18 A). Paralelamente, realizou-se a reacção de metátese do 4-vinil-1,2,3-triazol **95a** apenas na presença do catalisador de Grubbs de 2ª geração (Esquema 4.18 B).

Na reacção de metátese entre o complexo β -vinil-porfirínico **80** e o 4-vinil-1,2,3-triazol **95a** foi possível observar, para além da formação do derivado triazol-porfirina **98a** a formação de um produto sem cor ligeiramente menos polar do que o 4-vinil-1,2,3-triazol **95a**, que foi isolado em 45 % de rendimento. Na reacção em que apenas estava presente o triazol **95a** e o catalisador de Grubbs de 2ª geração foi possível isolar, também, um produto menos polar do que material de partida, com um rendimento de 51%. Por TLC verificou-se que estes compostos eram os mesmos e suspeitou-se que este se tratava do homodímero do triazol **95a**. No entanto, surpreendentemente, verificou-se por RMN de ^1H e por espectrometria de massa que este composto se tratava afinal do conjugado **104**.



Esquema 4.18.

Este resultado totalmente inesperado e levantou a seguinte questão: “Qual seria a fonte do grupo de fenilo do composto **104**?”

De todos os intervenientes na reacção o único que contém esta unidade fenilo é o catalisador de Grubbs de 2ª geração, cuja estrutura é apresentada na figura 4.10.

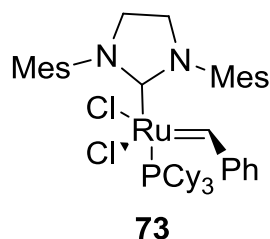
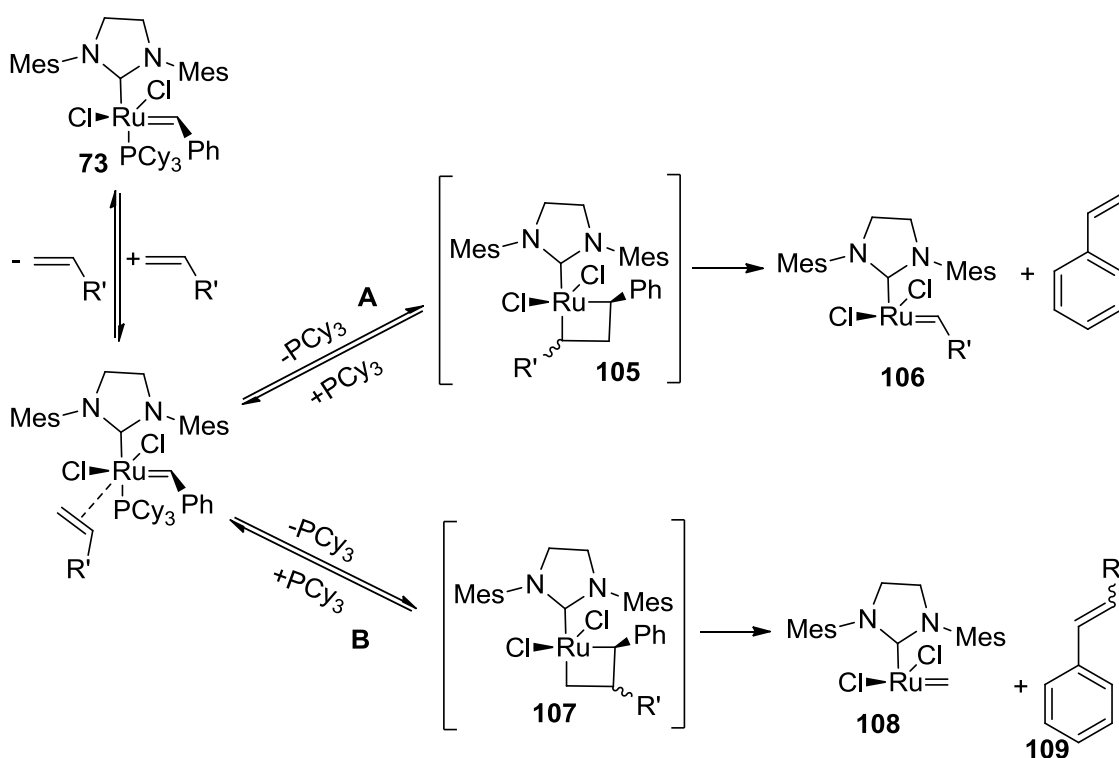


Figura 4.10. Estrutura do catalisador de Grubbs de 2ª geração.

Restava, então, tentar perceber como é que ocorreria a formação do derivado **104** na reacção de metátese cruzada entre o complexo **80** e o 4-vinil-1,2,3-triazol **95a**. No ponto 4.1 foi mostrado o mecanismo geral da reacção de metátese, sem particularizar o que acontece ao catalisador no início da reacção. O catalisador de Grubbs de 2ª geração possui como ligandos dois átomos de cloro, um grupo triciclohexilfosfina, um carbeno *N*-heterocíclico [o grupo 1,3-bis(2,4,6-trimetilfenil)-2-imidazolidinilideno] e o grupo benzilideno. Este grupo será o responsável pelo aparecimento do anel benzénico do derivado **104**. De facto, em 1998, Grubbs mostrou que quando o catalisador benzilideno de ruténio reage com dois alcenos, no primeiro passo do ciclo catalítico a reacção pode ocorrer de duas formas diferentes.⁴⁵ Nos dois casos, ocorre inicialmente a coordenação de um dos alcenos com o átomo de ruténio do catalisador de Grubbs, seguindo-se a dissociação do grupo triciclohexilfosfina formando-se o intermediário metalociclobutano.^{45,46} Dependendo da estrutura deste intermediário o ciclo catalítico pode ocorrer por duas vias. Na via A (Esquema 4.19), o alceno liga-se ao catalisador benzilideno de ruténio de forma a que o seu substituinte esteja mais próximo do ião ruténio, formando o metalociclobutano **105**. Este sofre a primeira cicloversão, gerando o metalcarbeno **106** que poderá seguir o ciclo catalítico através da ligação do outro alceno ao átomo de ruténio. Com esta cicloversão forma-se estireno como produto secundário. Se por outro lado, o alceno

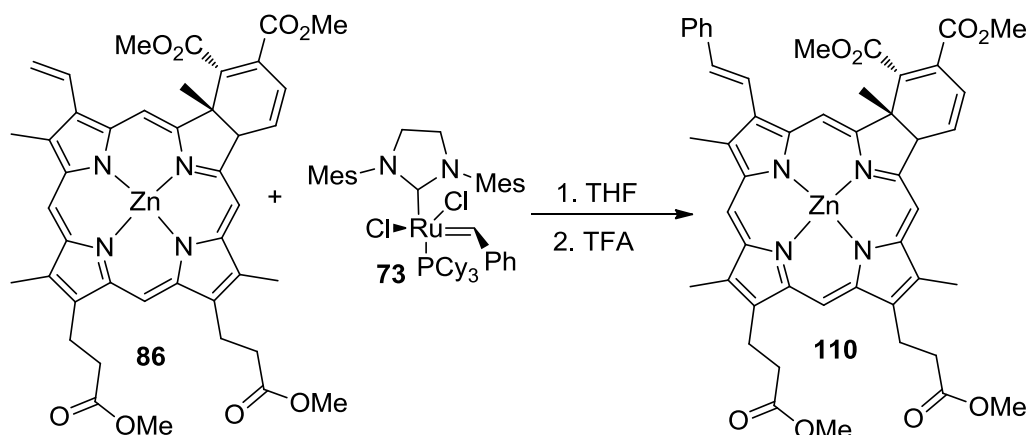
se ligar ao catalisador benzilideno de ruténio de forma a que o seu substituinte esteja numa posição adjacente ao ião ruténio forma-se o metalociclobutano **107** e o mecanismo segue a via B (Esquema 4.19). Ao sofrer a cicloneversão este metalociclobutano gera o metalcarbeno **108** e forma-se o produto de acoplamento do benzilideno do catalisador com o alceno que se ligou inicialmente ao ruténio, o derivado **109**. Grubbs referiu também que quando o catalisador benzilideno de ruténio reage com alcenos terminais com menor impedimento estérico, o metalociclobutano **105** é o primeiro a ser formado. Quando o impedimento estérico do alceno terminal vai aumentando, a reacção segue a via B e existe uma diminuição na taxa de reacção.⁴⁶



Assim, para a reacção de metátese o metalcarbeno **106** formado através da via A é o produto cineticamente mais favorável. No entanto, quando o efeito estérico do substituinte se torna predominante, a reacção ocorre através da via B.

Sem dúvida alguma que no caso da reacção de metátese entre o complexo **80** e os vinil-triazóis **95a-e** ocorre uma competição entre a via A e a via B, em que esta última parece ser predominante. Também Dolphin e seus colaboradores mostraram

que a reacção de metátese com a clorina **96** na presença do catalisador de Grubbs de 2ª geração segue esta via com a formação da clorina **110** (Esquema 4.20).²³

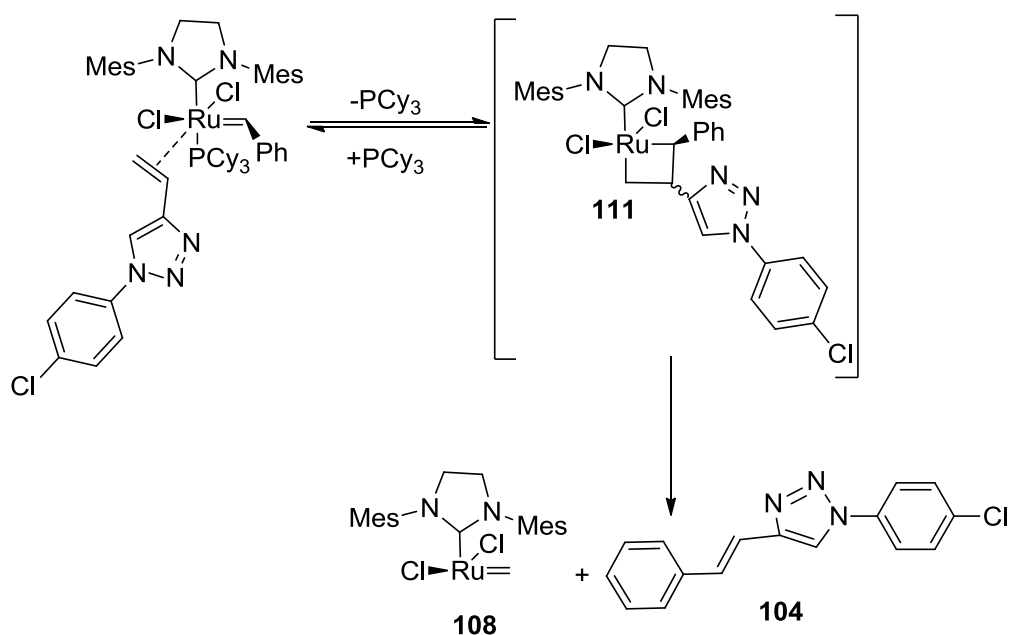


Esquema 4.20.

No entanto, nas reacções de metátese entre o complexo **80** e os vinil-triazóis **95a-e** nunca se verificou a formação do produto de acoplamento entre a porfirina β -vinilada e o benzilideno do catalisador de ruténio, mas sim o produto de acoplamento entre o 4-vinil-1,2,3-triazol **95a** e este ligando do catalisador, o derivado **104**. Assim, e de acordo com o sugerido por Chauvin,⁷ o primeiro alceno que se ligará ao átomo de ruténio do catalisador de Grubbs é aquele que é menos impedido, logo o triazol **95a**, que forma o metalociclobutano **111**. Devido ao impedimento estéreo deste alceno, este intermediário possui o anel triazólico mais afastado do átomo de ruténio. A cicloversão deste metalociclobutano deverá originar o metalcarbeno **108** e o produto de acoplamento entre o 4-vinil-1,2,3-triazol **95a** e o benzilideno do catalisador de ruténio, o derivado **104** (Esquema 4.21). De acordo com Grubbs, com a formação do metalcarbeno do tipo **108** a reacção segue a via B o que pode justificar a baixa eficiência das reacções de metátese entre a porfirina **80** e os vinil-triazóis **95a-e**.

Assim, a baixa eficiência da reacção de metátese entre o complexo porfirínico β -vinilado **80** e os 4-vinil-1,2,3-triazóis **95a-f** pode ser devida a dois problemas:

- o efeito da conjugação entre o grupo vinilo com os respectivos núcleos (porfirínico e triazólico)
- o impedimento estéreo destes dois sistemas.



Esquema 4.21.

Com o objectivo de tentar diminuir o problema do impedimento estérico do macrociclo porfirínico, considerou-se a possibilidade de usar 2-butadienil-5,10,15,20-tetrafenilporfirinatoniquel(II) **90** nas reacções de metátese com os 4-vinil-triazóis **95a-d** (Figura 4.11). Esta porfirina possui a dupla ligação terminal mais afastada do anel porfirínico, logo será menos impedida. Para além disso, em caso de reacção de metátese cruzada com os 4-vinil-1,2,3-triazóis **95a-f**, permitiria obter produtos com maior conjugação entre os núcleos porfirínico e triazólico, o que poderia causar um desvio na absorção da radiação UV-vis para maiores comprimentos de onda, sendo este um dos requisitos importantes para um bom fotossensibilizador em PDT.⁴⁷

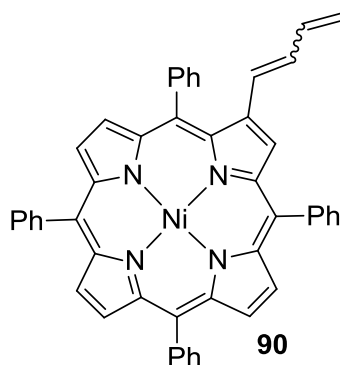


Figura 4.11. Estrutura da 2-butadienil-5,10,15,20-tetrafenilporfirinatóniquel(II) **90**.

Antes da discussão dos resultados obtidos com o complexo **90**, serão apresentadas as caracterizações espectroscópicas dos derivados triazol-porfirina **98a-e**.

4.3.1.1. Caracterização espectroscópica dos derivados triazol-porfirina **98a-e**

As estruturas dos derivados triazol-porfirina **98a-e** foram confirmadas por estudos de RMN de ^1H e de ^{13}C e as suas fórmulas moleculares foram comprovadas por espectrometria de massa de alta resolução por ionização em electrospray em modo positivo (HRMS-ESI). Por vezes, para a identificação inequívoca da ressonância de alguns prótons foi necessária a obtenção dos espectros de RMN 2D (COSY, NOESY e HSQC).

Os espectros de RMN de ^1H destes derivados são muito semelhantes, estando as principais diferenças na ressonância dos prótons do grupo arilo substituinte do triazol na posição 1. Devido às semelhanças encontradas, não serão abordados exaustivamente todos os espectros de RMN dos compostos sintetizados. Serão apenas frisadas as principais diferenças entre eles. É importante ressaltar que, devido ao baixo rendimento obtido para o composto **98e** e do homodímero **99**, não foi possível obter os seus espectros de RMN de ^1H . A estrutura destes compostos foi confirmada apenas por espectrometria de massa de alta resolução (HRMS-ESI).

Na figura 4.12 é apresentado, como exemplo, o espectro de RMN de ^1H do derivado triazol-porfirina **98a**. Neste espectro é possível observar a valores de δ mais elevados a

ressonância dos prótons β -pirrólicos que se dividem em 4 sinais distintos: um duplete a 9,04 ppm ($J = 0,9$ Hz) referente à ressonância do próton H-3 e dois sistemas AB a 8,85 ppm e 8,83 ppm e a 8,80 ppm e 8,75 ppm referentes às ressonâncias dos prótons H-7,8 e H-17,18, respectivamente. O singuleto que surge a 8,82 ppm é referente à ressonância dos prótons H-12,13. A ressonância dos prótons *orto* dos grupos fenilos das posições *meso* do macrociclo porfirínico (H-*o*-Ph-5,10,15,20) surge na forma de um multiplete a 8,27-8,15 ppm, enquanto que a ressonância dos prótons *meta* e *para* (H-*m,p*-Ph-5,10,15,20) destes grupos surge num outro multiplete a 7,85 -7,72 ppm. A ressonância dos prótons H- α e H- β surge como dois dupletos a 7,32 ppm ($J = 16,2$ Hz) e a 6,92 ppm ($J = 16,2$ Hz), no entanto, apenas o espectro de COSY permitiu distingui-los. Assim, neste espectro de RMN 2D (correlações indicadas a vermelho na figura 4.11) é possível observar a correlação a longa distância entre o próton H-3 com o duplete a 6,92 ppm ($J = 16,2$ Hz) que permitiu identificar este sinal como sendo o próton H- α . Este facto justifica a multiplicidade de duplete do próton H-3. Por exclusão, o sinal na forma de duplete a 7,32 ppm ($J = 16,2$ Hz) corresponde a H- β . O valor das constantes de acoplamento entre os sinais referentes a H- α e H- β confirma a configuração *trans* desta ligação dupla, o que está de acordo com o mecanismo proposto por Chauvin que postula que o isómeros *trans* é o produto termodinamicamente mais favorecido.⁴⁸ Ainda através do espectro de COSY foi possível identificar a correlação entre o sinal referente à ressonância dos prótons *meta* do grupo arilo substituinte do triazol, que surge como um duplete a 7,65 ppm ($J = 8,8$ Hz) com o multiplete devido a H-*m,p*-Ph-5,10,15,20, indicando a presença da ressonância dos prótons *orto* do grupo arilo substituinte do triazol neste sinal.

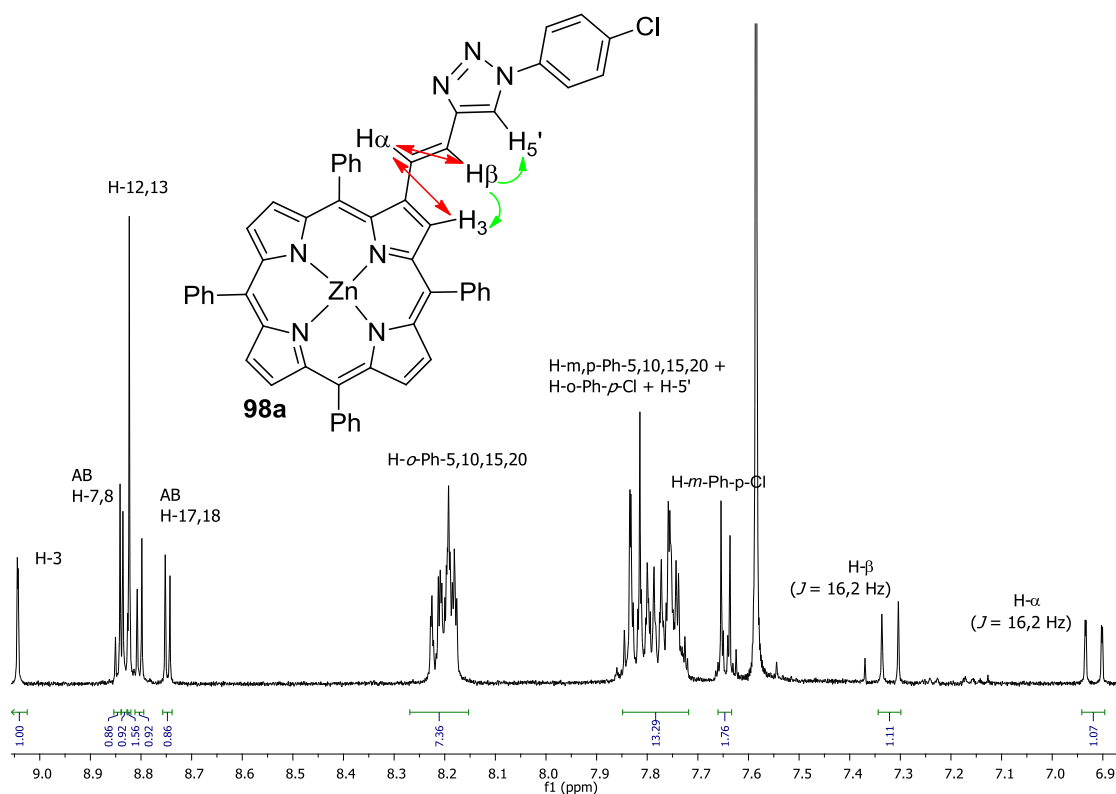


Figura 4.12. Espectro de RMN de ^1H do conjugado **98a** e correlações observadas nos espectros de COSY (a vermelho) e de NOESY (a verde) deste conjugado.

No espectro de NOESY (correlações indicadas a verde na figura 4.12) foi possível verificar que o protão H- β se correlaciona com o sinal referente a multipletto referente a H-*m,p*-Ph-5,10,15,20, o que nos indica que a ressonância de H-5' se encontra sobreposta com o sinal de H-*m,p*-Ph-5,10,15,2. O protão H- β também está especialmente próximo do protão β -pirrólico H-3. Mais, estas correlações confirmam a configuração *trans* da dupla ligação que faz que ligação entre o macrociclo porfirínico e o triazol.

A fórmula molecular do derivado triazol-porfirina **98a** foi confirmada por espectrometria de massa de alta resolução (HRMS-ESI), cujo espectro mostra o pico a valores de m/z a 879,1889, correspondente ao pico do ião molecular M^+ .

Este perfil de RMN de ^1H foi encontrado em todos os derivados triazol-porfirina **98b-d**, principalmente no que diz respeito à ressonância dos protões do macrociclo porfirínico. No entanto, nem sempre foi possível encontrar a definição necessária para observar a presença do sistema AB referente à ressonância dos

protões H-7,8. No caso dos derivados **98b-d** a ressonância destes protões β -pirrólicos surge na forma multipletos a 8,97-8,90 ppm juntamente com a ressonância dos protões β -pirrólicos H-12,13.

As principais diferenças nos espectros dos derivados triazol-porfirina **98b-d** são devidos à ressonância dos protões do grupo arilo substituinte do triazol na posição 1. Por exemplo, no caso do conjugado **98b** esses sinais surgem como multipletos a 7,66 - 7,58 ppm (protões *meta*) e a 7,54 - 7,51 ppm referentes (protão *para*). Através do espectro de COSY foi possível identificar a ressonância dos protões *orto* deste substituinte no sinal a 7,85-7,72 ppm também referente à ressonância dos protões *meta* e *para* dos grupos fenilos das posições *meso* do macrociclo porfirínico.

Também para os conjugados **98b-d** foi possível, através da constante de acoplamento dos protões H- α e H- β , atribuir a configuração *trans* à dupla ligação existente entre a porfirina e a unidade de triazol. Estas constantes de acoplamento assim como o desvio químico dos sinais H- α e H- β são apresentados na figura 4.13.

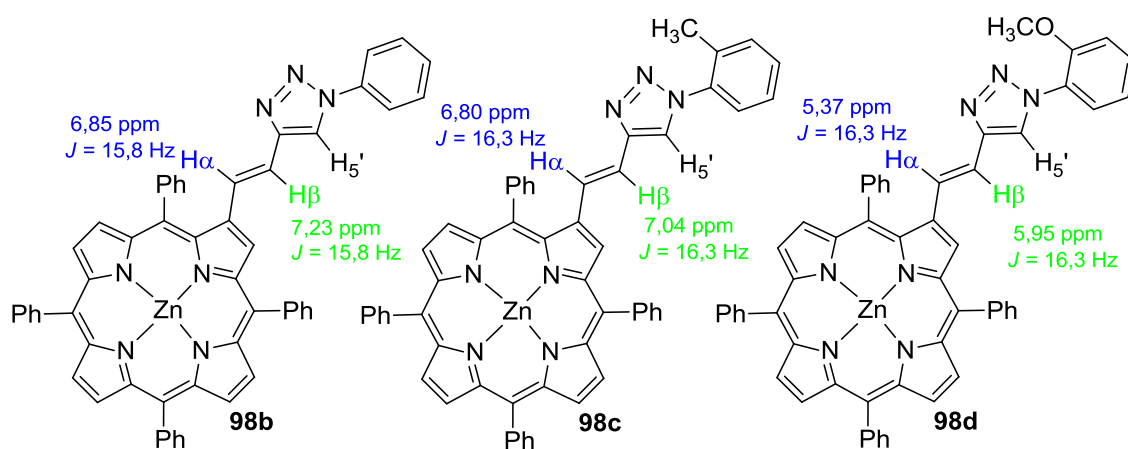


Figura 4.13. Estruturas dos derivados triazol-porfirina **98b-d** com o assinalamento das constantes de acoplamento e desvio químicos dos protões H- α e H- β .

É importante referenciar que nos espectros de RMN de ^1H dos conjugados **98c** e **98d** é possível observar a presença de sinais na forma de singuletos; um a 0,85 ppm referente à ressonância dos protões do grupo metilo de **98c** e outro a 4,08 ppm referente à ressonância dos protões do grupo metoxilo de **98d**.

As estruturas dos derivados triazol-porfirina **98b-e** foram confirmadas por espectrometria de massa de alta resolução (HRMS-ESI), sendo possível observar em todos os espectros o pico do ião molecular correspondente (M^+) (ver parte experimental).

4.3.2 Reacção de metátese cruzada entre 2-butadienil-5,10,15,20-tetrafenilporfirinatóniquel(II) **90** e os 4-vinil-1,2,3-triazóis **95a-f**

Como já foi referido anteriormente, para minimizar o problema de impedimento estérico observado na reacção de metátese cruzada entre o complexo **80** e os 4-vinil-1,2,3-triazóis *N*-substituídos **95a-f** que não proporcionou a síntese de derivados triazol-porfirina em bons rendimentos, este estudo foi estendido ao complexo 2-butadienil-5,10,15,20-tetrafenilporfirinatóniquel(II) **90**, com o objectivo de obter novos derivados triazol-porfirina conjugados.

As reacções de metátese cruzada entre o complexo **90** com os 4-vinil-1,2,3-triazóis **95a-f** (Esquema 4.22) foram realizadas nas melhores condições encontradas para a reacção de metátese entre o complexo **80** e os mesmos triazóis. Assim, a porfirina **90** e os 4-vinil-1,2,3-triazóis **95a-f** em quantidades equimolares e o catalisador de Grubbs de 2ª geração (0,25 equivalentes) foram e colocados num tubo de Schlenk e dissolvidos em 3 mL de THF seco em fio de sódio. O tubo foi degaseificado de acordo com a metodologia descrita anteriormente (ver parte experimental). A reacção foi mantida em agitação a 65°C durante 18 horas. Findo este tempo, verificou-se por TLC que, para todas as reacções, o perfil era muito semelhante (Figura 4.14). Assim, o composto menos polar foi identificado como sendo a porfirina de partida **90** que não reagiu. Seguidamente, com menor R_f que o complexo **90**, surgiu o produto de intraciclização térmica da porfirina de partida, o complexo benzoporfirínico **112**. Por fim, os dois compostos mais polares foram identificadas como sendo os estereoisómeros triazol-porfirina **113a-e** e **114a-e** (Esquema 4.22). No caso em que foi usado o 4-vinil-1,2,3-triazol **95f** não foi observada qualquer formação de produto, à excepção do complexo benzoporfirínico **112**. A mistura reaccional foi fraccionada por cromatografia em coluna de sílica gel usando como eluente uma mistura de diclorometano/hexano (1:1). A primeira fracção recolhida continha o

complexo **90** que não reagiu, a segunda fracção o complexo benzoporfirínico **112** e a terceira os estereoisómeros triazol-porfirina **113a-e** e **114a-e**. Esta terceira fracção foi purificada por TLC preparativa usando como eluente diclorometano.

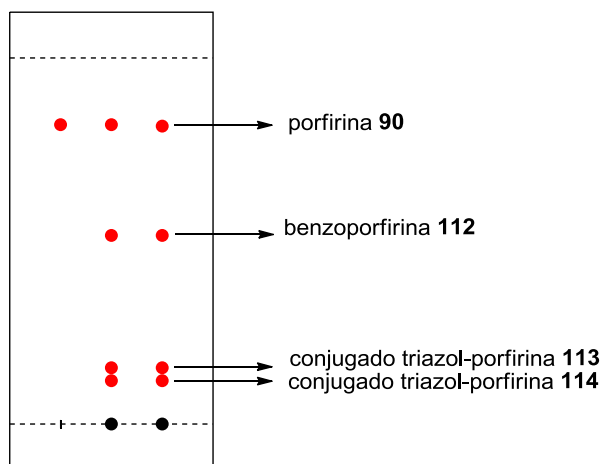
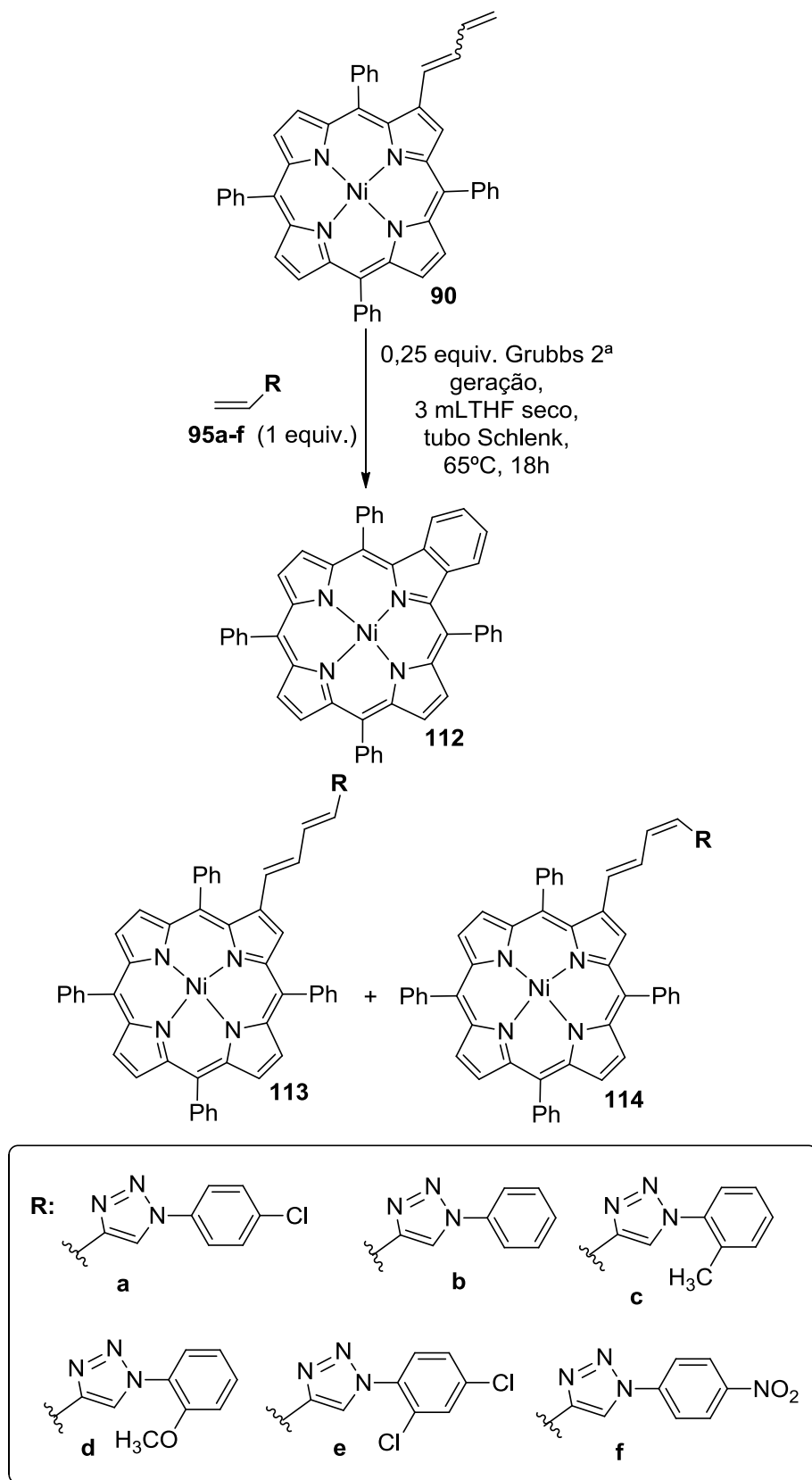


Figura 4.14. Esquema da TLC da reacção o complexo **90** com os 4-vinil-1,2,3-triazóis *N*-substituídos **95a-e**



Esquema 4.22.

Tabela 4.5. Resultados obtidos na reacção do complexo **90** com os 4-vinil-1,2,3-triazóis **95a-f**

Entrada	4-vinil- 1,2,3- triazol 95	% de 90 (recuperado)	η (%) 112	η (%) 113	η (%) 114	η (%) Global de derivados triazol- porfirina
1	a	49	9	21	13	34
2	b	48	10	19	16	35
3	c	42	10	12	9	21
4	d	55	9	21	19	40
5	e	89	2	9		9
6	f	98	2	-	-	-

Como é possível observar através do esquema 4.24 e da tabela 4.4, a reacção de metátese do complexo β -butadienil-porfirínico **90** com os 4-vinil-1,2,3-triazóis **95a-f** permite a obtenção de derivados triazol-porfirina **113** e **114**, em geral, com melhores rendimentos globais do que as mesmas reacções realizadas na presença do complexo **80**. À semelhança do que aconteceu com o complexo **80**, o maior rendimento foi obtido para os produtos de metátese cruzada com o 4-vinil-1,2,3-triazol **95d**, onde foi possível isolar os conjugados triazol-porfirina **113d** e **114d** com um rendimento global de 40% (entrada 4). Os resultados mostram ainda que, também neste caso, a presença de um grupo desactivante no anel de arilo ligado o átomo de azoto do triazol é responsável por uma diminuição da eficiência do processo. Reforçando esta ideia surgem os resultados obtidos para os 4-vinil-1,2,3-triazóis **95e** e **95f** (entradas 5 e 6, respectivamente). Na reacção com **95e** formou-se apenas o conjugado triazol-porfirina **113e** com 9% de rendimento (10 vezes mais do que para o caso do composto **80** e derivado **95e**) e no caso do 4-vinil-1,2,3-triazol **95f** não ocorreu qualquer reacção, tal como aconteceu com o complexo porfirínico β -vinilada **80**.

Também nestes casos se observou a formação em cada caso, o derivado do tipo **104** resultante do triazol usado, no entanto, este foi encontrado em quantidades vestigiais, o que sugere que a reacção pode ter seguido as duas vias A e B representadas no esquema 4.20, existindo por isso concorrência entre elas. Uma vez que os rendimentos globais dos produtos de metátese entre a β -butadienil-porfirina

90 e os 4-vinil-1,2,3-triazóis **95a-e** são, em geral, maiores do que os obtidos com o complexo porfirínico β -vinilado **80**, é possível que a via A seja predominante em relação à via B.

Os derivados triazol-porfirina **114** e **115** foram, desta vez obtidos numa mistura de isómeros cuja configuração foi determinada por espectroscopia de RMN e será discutida no ponto 4.3.3.2. De qualquer forma, estes estudos revelaram que os derivados triazol-porfirina **113a-e** possuem as duas ligações duplas que fazem a ligação entre a porfirina e o triazol com configuração *trans*. No caso dos conjugados triazol-porfirina **114a-e** a ligação dupla mais próxima do macrociclo porfirínico encontra-se com a configuração *trans* enquanto que a ligação dupla mais próxima do triazol encontra-se com a configuração *cis*. É de realçar que o rendimento dos isómeros *trans,trans* (conjugados triazol-porfirina **113a-e**) são, em todas as reacções, maiores do que dos isómeros *trans,cis* (conjugados triazol-porfirina **114a-e**). Isto está de acordo com o postulado pelo mecanismo proposto por Chauvin em que o produto mais favorecido termodinamicamente seja aquele com a configuração *trans*,^{23,48} podendo isso ser justificado por dois factores: pelo facto de a porfirina **90** ser usada numa mistura de isómeros *cis/trans* e pela formação do intermediário metalociclobutano que se gera em cada um dos casos (Figura 4.15). Como é possível observar, no metalociclobutano que gera o derivado triazol-porfirina **113** (*trans,trans*) os dois substituintes das duplas ligações encontram-se afastados espacialmente, enquanto que no metalociclobutano que gera o derivado triazol-porfirina **114** (*trans,cis*) estes dois substituintes estão mais próximos, o que torna este intermediário menos favorável, formando o composto com a isomeria *trans,cis* em menor rendimento.

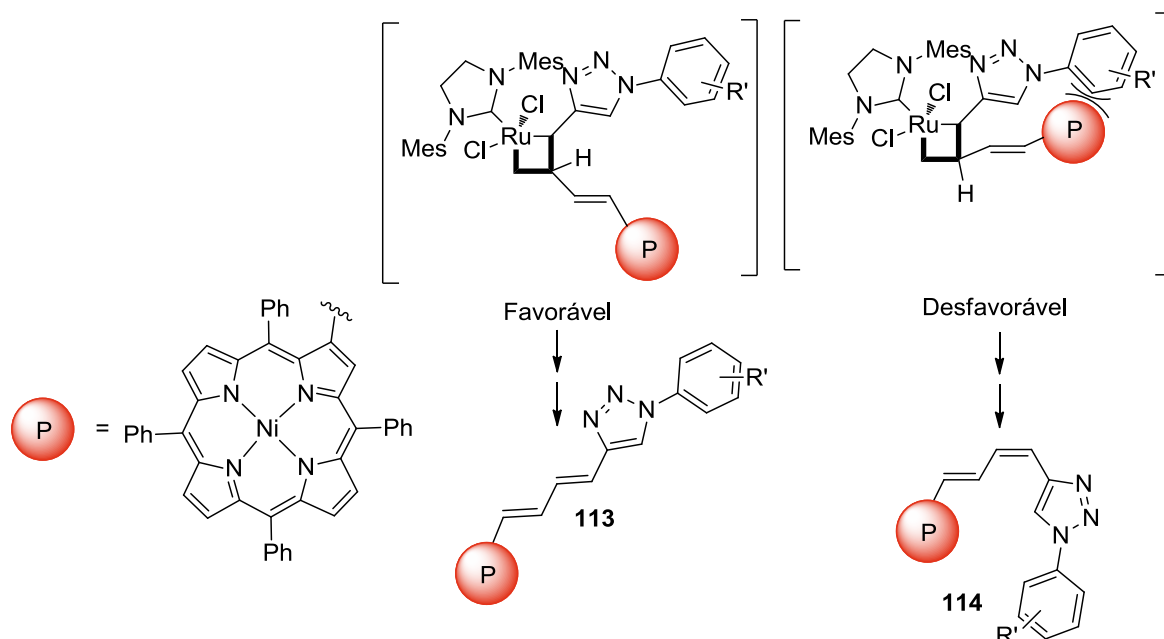
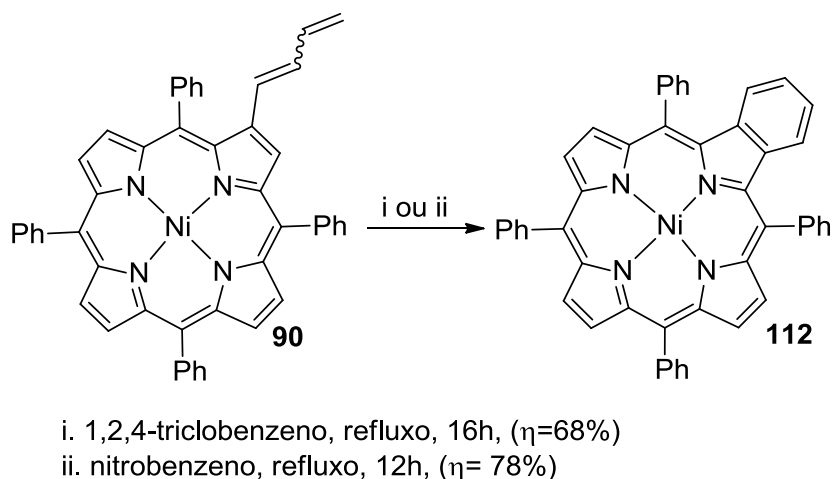


Figura 4.15. Estruturas propostas para os intermediários metalociclobutano que originam os conjugados triazol-porfirina **113** e **114**.

A formação da benzoporfirina **112** não é uma surpresa, uma vez que se forma naturalmente por electrociclização do complexo **90** seguida de oxidação (Esquema 4.23). A síntese desta benzoporfirina em bons rendimentos foi já relatada³⁸ e ocorre na presença de solventes como o 1,2,4-triclorobenzeno ou o nitrobenzeno a temperaturas elevadas. Estas não são as condições da reacção de metátese, porém não podemos ignorar que estamos perante um sistema reaccional complexo e que está sob vácuo, o que permite que ocorra esta electrociclização seguida de oxidação para formar o complexo benzoporfirínico **112**.



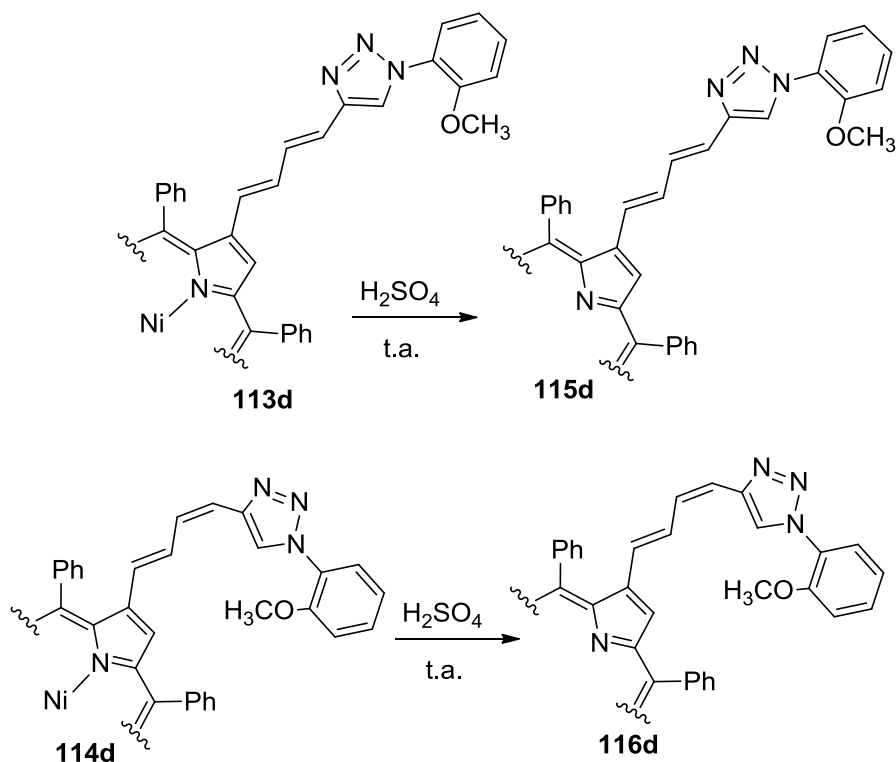
Esquema 4.23.

4.3.2.1. Descomplexação dos derivados triazol-porfirina 113d e 114d

É sabido que para um fotossensibilizador poder vir a ser aplicado na PDT deverá obedecer a alguns requisitos, entre eles⁴⁹:

- Originar elevado rendimento de oxigénio singuleto, e por isso deverá possuir um estado excitado tripleto com tempo de vida e energia adequados;
- A sua síntese deve ser curta e de elevado rendimento;
- Deve absorver perto do vermelho no espectro de visível ($\lambda > 650$ nm), já que a radiação deste comprimento de onda tem maior poder de penetração nos tecidos;

Uma vez que os derivados triazol-porfirina sintetizados são sistemas conjugados, espera-se que estes possuam uma banda de absorção perto do vermelho do espectro de visível. Para comprovar este facto, foi removido o ião metálico do interior do macrociclo dos derivados triazol-porfirina **113d** e **114d** (derivados obtidos com maiores rendimentos). Assim, os derivados **113d** e **114d** foram dissolvidos em diclorometano e a cada solução foi adicionado ácido sulfúrico concentrado. Esta mistura foi mantida em agitação durante 10 minutos. Findo este tempo as reacções foram terminadas, neutralizando o ácido com uma solução aquosa de carbonato de sódio. A fase orgânica foi extraída e lavada com água destilada e seca através de sulfato de sódio anidro. No final, foram obtidos, quantitativamente, os conjugados **115d** e **116d** (Esquema 4.24).



Esquema 4.24.

Os espectros de UV-Vis dos conjugados triazol-porfirina **115d** e **116d** foram adquiridos a partir de soluções em diclorometano, tendo sido observada a presença de quatro bandas Q, característica de compostos descomplexados. Na figura 4.16 são apresentados os espectros de UV-vis dos derivados **113d** e **115d** e ainda da **TPP** e da **Ni-TPP**. Comparativamente com o seu precursor **113d**, o espectro de UV-Vis do composto **115d** mostra uma banda de absorção a 647 nm. O aparecimento desta banda traduz-se num ligeiro desvio para a zona do vermelho do espectro de cerca de 2 nm quando comparado com a última banda Q da **TPP**. No entanto, é possível verificar que o maior desvio ocorre para a banda Soret, onde ocorre um desvio de cerca de 10 nm nos espectros de UV-vis dos compostos **113b** e **115b** quando comparados com os seus precursores **TPP** e **Ni-TPP**.

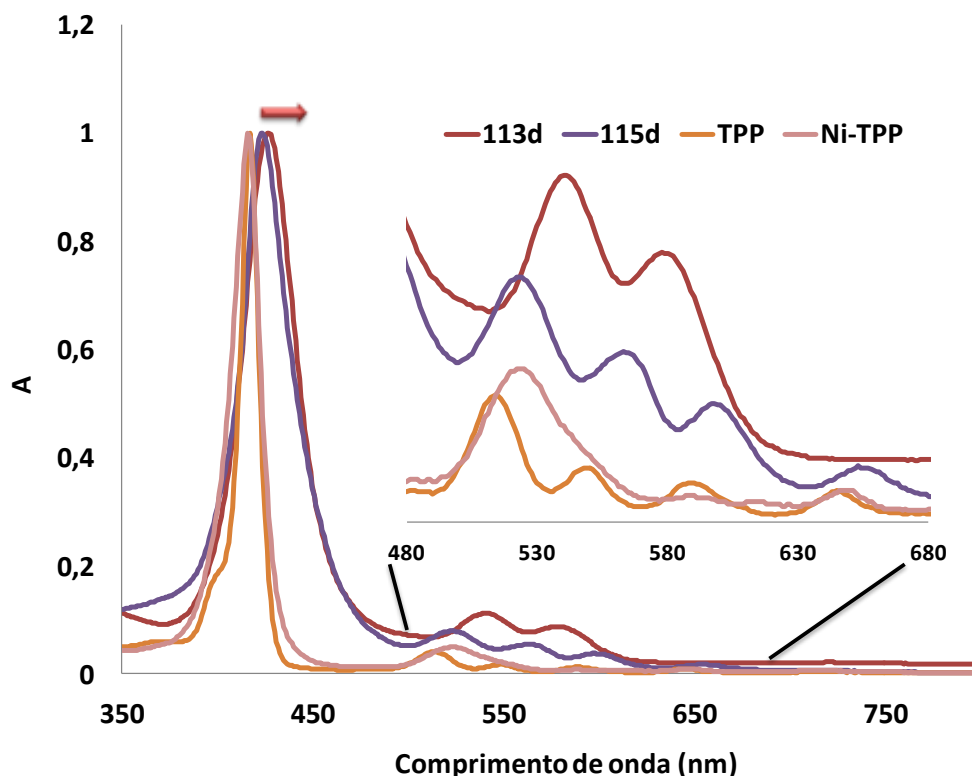


Figura 4.16. Espectros de UV-vis dos derivados **113b** e **115b** e da **TPP** e da **Ni-TPP** em CHCl_3 .

4.3.2.2. Caracterização espectroscópica dos derivados triazol-porfirina **113a-e** e **114a-e**.

Tal como para os derivados triazol-porfirina **98a-e**, também as estruturas dos conjugados **113a-e** e **114a-e** foram confirmadas por estudos de RMN de ^1H e de ^{13}C e as suas fórmulas moleculares foram comprovadas por espectrometria de massa de alta resolução por ionização em electrospray em modo positivo (HRMS-ESI). Para a identificação inequívoca da ressonância de alguns protões e da configuração das ligações duplas conjugadas destes derivados foi necessária a obtenção de espectros de RMN 2D (COSY, HSQC e NOESY).

Os espectros de RMN de ^1H destes derivados apresentam perfis muito semelhantes, residindo as principais diferenças nas constantes de acoplamento dos protões do grupo butadienilo e das interacções que estes protões possuem com os outros protões da molécula. Devido a esta semelhança, também aqui não serão abordados exhaustivamente todos os espectros de RMN dos compostos sintetizados e serão apenas frisadas as principais diferenças entre eles.

Começando, então, por descrever a parte comum para todos os conjugados triazol-porfirina preparados, o núcleo porfirínico e à semelhança do que acontece com os derivados triazol-porfirina **98a-d**, os sinais a desvios químicos mais altos dizem respeito à ressonância dos prótons β -pirrólicos. Estes sinais surgem na forma de multipletos a valores de δ entre 8,80 ppm e 7,98 ppm. É de notar que no caso dos derivados triazol-porfirina **113a-e** a ressonância do próton H-3 surge destacado dos restantes prótons β -pirrólicos na forma de duplete a cerca de 8,83 ppm ($J \sim 0,5$ Hz), tal como no caso dos derivados **98a-d**. No caso da ressonância dos prótons dos grupos fenilo das posições *meso* do macrociclo porfirínico, em todos os conjugados triazol-porfirina sintetizados é possível encontrar três sinais distintos. A δ mais elevados (entre 8,13 ppm e 7,92 ppm) é possível observar um multiplete referente à ressonância dos prótons H-*o*-Ph-5,10,15. A δ entre 7,90 ppm e 7,75 ppm encontram-se os sinais referentes à ressonância dos prótons H-*o*-Ph-20. A multiplicidade deste sinal é de duplete ($J \sim 7,0$ Hz) para todos os derivados, à excepção dos conjugados **113b**, **114b** e **114d** onde os respectivos sinais surgem como multipletos. Por fim, surge a ressonância dos prótons H-*m,p*-5,10,15,20 na forma de multipletos entre 7,82 ppm a 7,52 ppm. Juntamente com a ressonância destes sinais é muitas vezes possível identificar a ressonância dos prótons do grupo arilo do triazol e do próton H-5' desta unidade, assim como o sinal do próton H-c do grupo butadienilo. Estes pormenores serão apresentados ao longo desta discussão.

A identificação inequívoca dos prótons do grupo butadienilo, assim como a sua configuração e a dos prótons do triazol foi conseguida através de espectros de COSY e NOESY. Estes estudos bidimensionais foram iniciados com os derivados obtidos com maior rendimento, os derivados **113d** e **114d**.

Na figura 4.17 é apresentado o espectro de RMN de ^1H do conjugado **113d** e onde são representadas, também, as correlações observadas nos espectros COSY (a vermelho) e NOESY (a verde) deste conjugado.

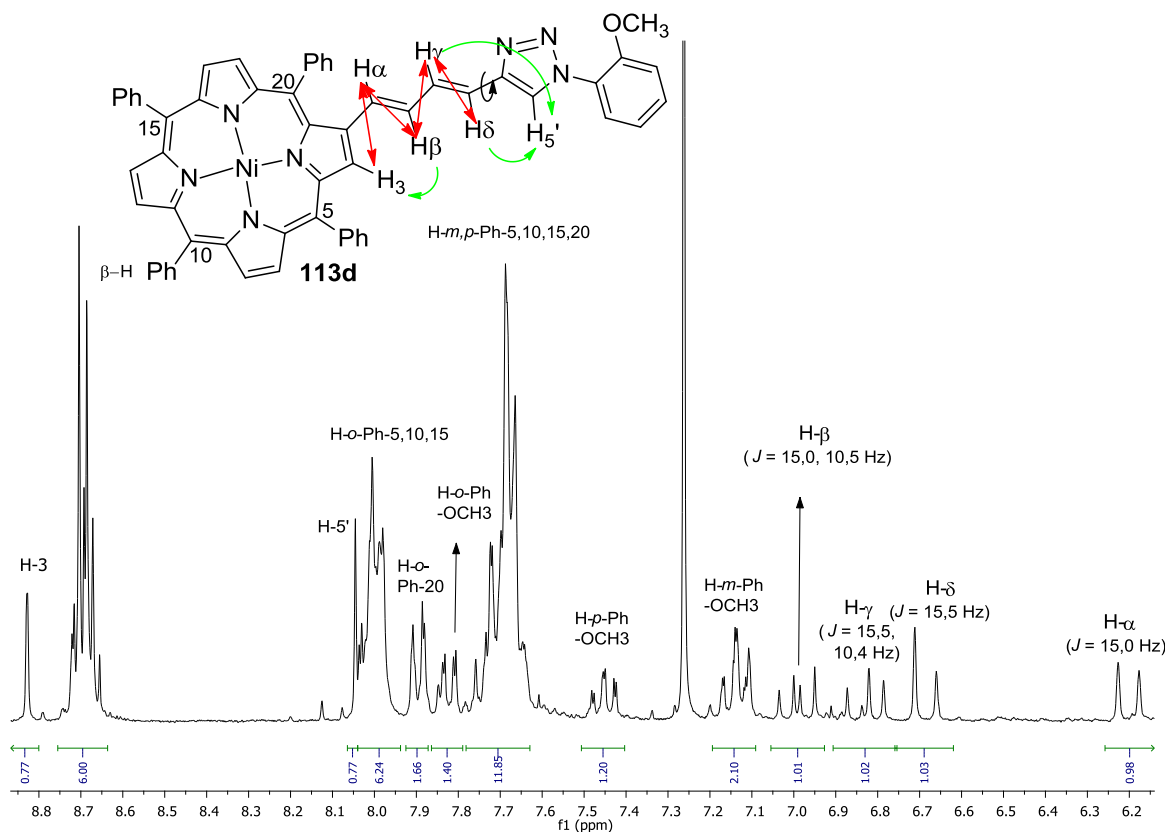


Figura 4.17. Espectro de RMN de ^1H do conjugado **113d** e correlações observadas nos espectros COSY (a vermelho) e NOESY (a verde) deste conjugado.

No espectro de RMN de ^1H do conjugado **113d**, é possível observar, para além da ressonância dos prótons do macrociclo porfirínico descrita anteriormente, a ressonância próton H-5' que surge na forma de um singuleto a 8,05 ppm. Para além disso, é possível identificar na zona alifática do espectro a presença de quatro sinais (dois dupletos e dois duplos dupletos) atribuídos à ressonância dos prótons H- α , H- β , H- γ e H- δ do grupo butadienilo. Para a identificação inequívoca de cada próton e da configuração das duplas ligações deste grupo, os estudos de RMN bidimensional de COSY e NOESY foram imprescindíveis. Assim, no espectro COSY, o sinal na forma de duplete a 6,21 ppm ($J = 15,0$ Hz) mostra correlação com o sinal na forma de duplo duplete ($J = 15,0$ e $10,5$ Hz) a 6,98 ppm. No espectro NOESY, este último sinal está especialmente próximo do próton β -pirrólico H-3, o que permitiu atribuir a ressonância de H- β ao sinal a 6,98 ppm e, por consequência, a ressonância do próton H- α ao sinal a 6,21 ppm. É importante ainda referir, que no espectro COSY, à semelhança do que

acontece com o derivado **98d**, é possível identificar o acoplamento a longa distância entre o protão β -pirrólico H-3 e o sinal de H- α .

O espectro COSY mostra, também, que os sinais a 6,65 ppm (duplete, $J = 15,5$ Hz) e a 6,81 ppm (duplo duplete, $J = 15,5$ e 10,4 Hz) se correlacionam. Já o espectro NOESY mostra que estes protões estão espacialmente próximos do protão H-5' do anel de triazol. Estas correlações permitiram identificar o sinal a 6,65 ppm como o protão H- δ e o sinal a 6,81 ppm como o protão H- γ . A distribuição espacial destes protões e as constantes de acoplamento entre eles permite atribuir a configuração destas duplas ligações do grupo butadienilo como *trans,trans*.

A fórmula molecular do derivado triazol-porfirina **113d** foi confirmada por espectrometria de massa de alta resolução, cujo espectro mostra a presença de um pico a valores de m/z a 895,2564 correspondente ao pico do ião molecular M^+ .

Já no caso do espectro de RMN de 1H do derivado triazol-porfirina **114d** (Figura 4.18), a sua interpretação foi um pouco mais difícil, pois não é possível distinguir inequivocamente os sinais referentes à ressonância dos protões H-5' e H- β . Para além disso, os protões H- γ e H- δ não surgem com a multiplicidade observada para o caso dos derivados **113d**, o que não permitiu calcular as constantes de acoplamento, e logo, confirmar a configuração desta dupla ligação. Mais uma vez os estudos de RMN bidimensional COSY e NOESY foram essenciais e as correlações observadas para este derivado são representadas na figura 4.18. Assim, no espectro COSY deste conjugado foi possível observar que o sinal a 6,79 ppm (duplete, $J = 15,8$ Hz) acopla a longa distância com o sinal referente à ressonância dos protões β -pirrólicos, onde se inclui H-3, o que permite atribuir este sinal à ressonância de H- α . Ainda neste espectro é possível notar que H- α se correlaciona com o multiplete a 7,72-7,52 ppm, referente a H-*m,p*-Ph-5,10,15,20 o que permite concluir que neste sinal se encontra, também, o sinal referente a H- β . Já no espectro NOESY verifica-se que o sinal onde se encontra H- β se correlaciona com o sinal na forma de multiplete a 8,76-8,86 ppm referente à ressonância dos protões β -pirrólicos, onde está incluído o protão H-3. Logo, H- β está espacialmente próximo de H-3. A constante de acoplamento encontrada para H-d ($J = 15,8$ Hz) e estas correlações observados nos espectros de RMN bidimensional permitem concluir que a dupla ligação entre H- α e H- β tem a configuração *trans*. No

espectro NOESY foi também possível verificar que o sinal em forma de multiplete onde se inclui H- γ mostra correlação com o sinal na forma de multiplete a 8,97-7,98 ppm referente à ressonância dos protões H-*o*-Ph-5,10,15, indicando a presença da ressonância do protão H-5' do anel de triazol neste sinal. Foi também possível verificar que H- α se encontra espacialmente próximo de H- γ . Estas correlações confirmam que a dupla ligação entre H- γ e H- δ tem a configuração *cis*.

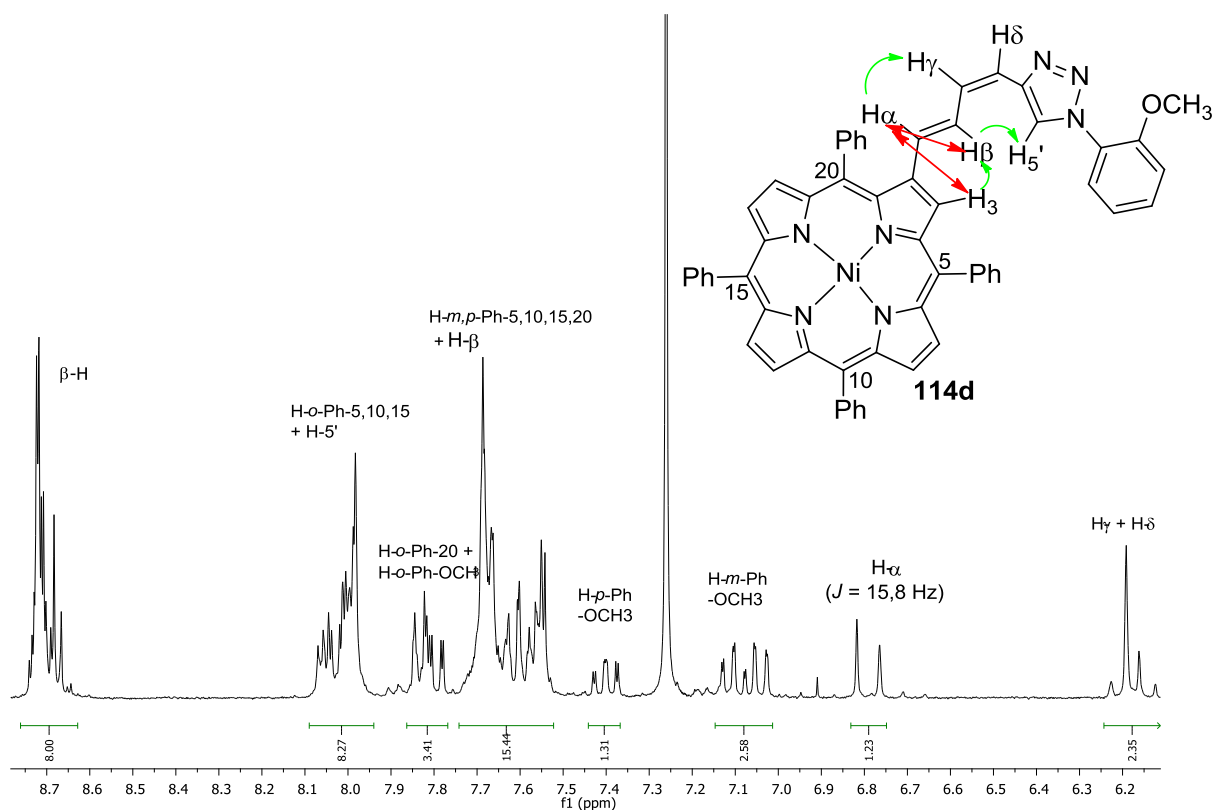


Figura 4.18. Espectro de RMN de ^1H do conjugado **114d** e correlações observadas nos espectros COSY (a vermelho) e NOESY (a verde) deste conjugado.

É de salientar que nos espectros de RMN de ^1H dos derivados **113d** e **114d** foi possível encontrar um sinal em forma de singuleto a 3,95 ppm para **113d** e 3,79 ppm para **114d** referentes à ressonância dos protões do grupo OCH_3 da posição *orto* do arilo substituinte do triazol.

A fórmula molecular do derivado triazol-porfirina **114d** foi, também, confirmada por espectrometria de massa de alta resolução. Este espectro de massa mostra a presença de um pico a valores de m/z a 895,2583 correspondente ao pico do ião molecular M^+ .

Os estudos realizados para a caracterização dos derivados triazol-porfirina **113d** e **114d** foram essenciais para a caracterização dos restantes derivados. Devido às suas semelhanças, a atribuição da ressonância dos prótons e a configuração do grupo butadienilo foi facilitada e muitas vezes realizada por comparação com os espectros de **113d** e **114d**.

Na figura 4.19 é apresentado o espectro de RMN de ^1H do conjugado **113a**. Neste é possível observar a ressonância do próton H-5' do triazol que surge na forma de um singuleto a 7,82 ppm. A ressonância dos prótons *orto* do grupo anilo do triazol surge no multiplete atribuído à ressonância dos prótons H-*m,p*-Ph-5,10,15,20, enquanto que a ressonância dos prótons *meta* deste substituinte surge como um duplete a 7,51 ppm ($J = 8,9$ Hz). Por fim, a δ mais baixos é possível encontrar a ressonância dos quatro prótons do grupo butadienilo. Assim, a 6,97 ppm é possível verificar a existência de um sinal na forma de duplo duplete ($J = 15,2$ e $10,8$ Hz) que foi atribuído à ressonância do próton H- β . É possível verificar que este próton acopla com o próton que surge na forma de duplete a 6,21 ppm ($J = 15,2$ Hz) e que foi atribuído ao próton H- α . Devido ao valor da constante de acoplamento entre estes dois prótons foi possível confirmar a configuração desta ligação dupla como sendo *trans*. A 6,80 ppm observa-se a existência de um sinal na forma de duplo duplete ($J = 15,6$ e $10,8$ Hz) que foi atribuído à ressonância do próton H- γ . Este acopla com o próton que surge a 6,63 ppm na forma de duplete ($J = 15,6$ Hz) correspondente a H- δ . Mais uma vez, a constante de acoplamento entre estes prótons confirma a configuração da ligação como sendo *trans*.

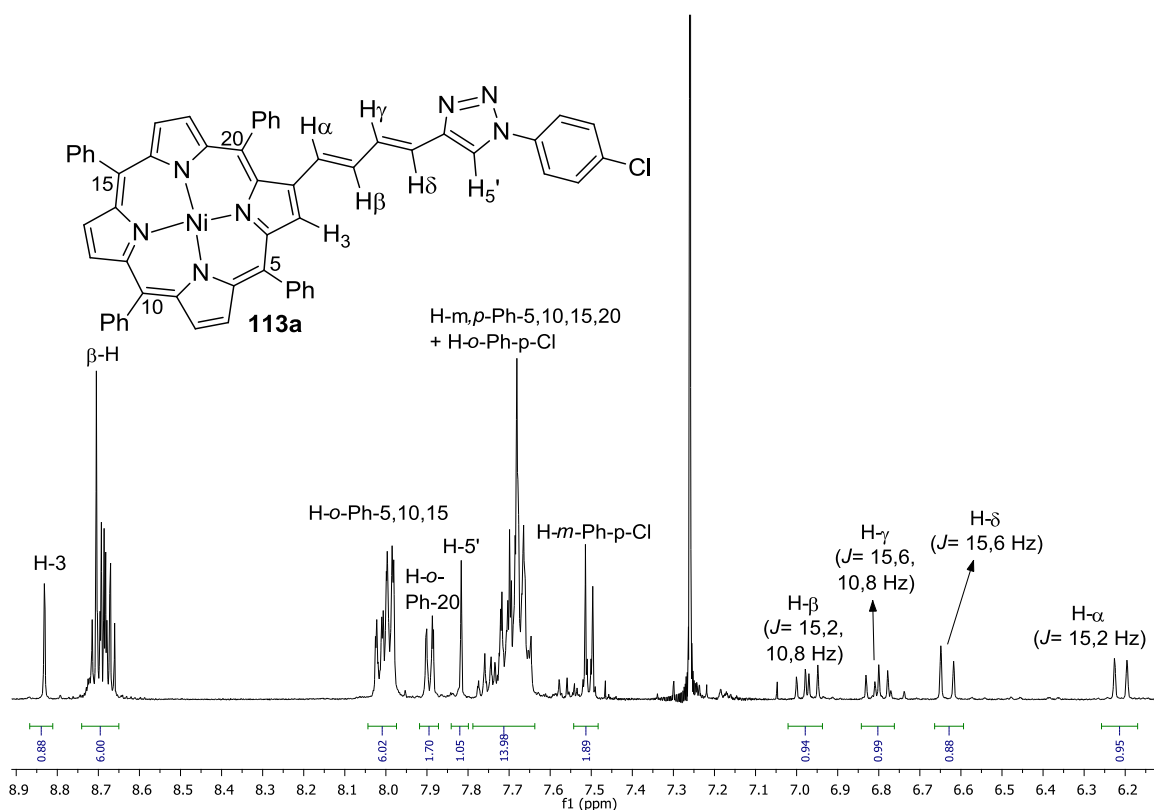


Figura 4.19. Espectros de RMN de ^1H do derivado triazol-porfirina **113a**.

O espectro de massa de alta resolução (HRMS-ESI) do derivado **113a** mostra a presença do pico a valores de m/z a 899,2068 correspondente ao pico do ião molecular M^+ , confirmando a sua fórmula molecular.

Considerando agora o espectro de RMN de ^1H do conjugado **114a** (Figura 4.20) é possível verificar que este espectro é muito semelhante ao do derivado anterior. As principais diferenças residem na ressonância dos prótons do grupo butadienilo. Neste caso, a ressonância do próton H- β surge juntamente com a ressonância dos prótons H- m,p -Ph-5,10,15,20 e dos prótons *orto* do grupo arilo do triazol. A 6,73 ppm é possível observar um sinal na forma de um duplete ($J = 15,8$ Hz) que no espectro COSY mostrou correlação com o multiplete onde se inclui a ressonância do próton H- β . Devido a esta correlação é possível atribuir este sinal à ressonância de H- α e devido ao valor da constante de acoplamento pode-se afirmar que a dupla ligação mais próxima da porfirina se encontra em posição *trans*. Nesta zona do espectro é possível encontrar, ainda, a ressonância do próton H- δ que surge na forma de duplete a 6,26 ppm ($J = 11,2$ Hz) e que, em COSY, apresenta correlação com o multiplete que surge a 6,16-6,12 ppm

e que foi identificado como sendo o protão H- γ . Dada a constante de acoplamento de H- δ confirma-se que a dupla ligação mais próxima do anel de triazol se encontra com configuração *cis*.

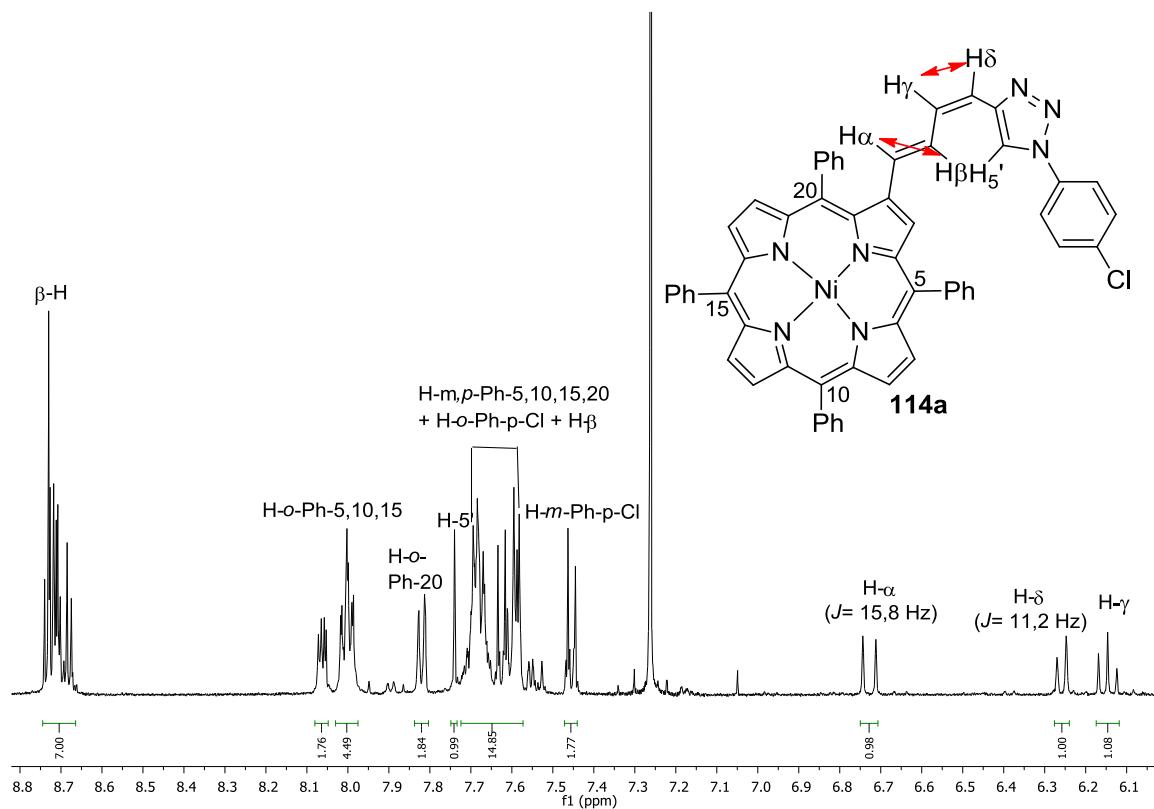


Figura 4.20. Espectros de RMN de ^1H do derivado triazol-porfirina **114a** e correlações observadas no espectro COSY (a vermelho).

A fórmula molecular do derivado triazol-porfirina **114a** foi confirmada por espectrometria de massa de alta resolução (HRMS-ESI), cujo espectro mostra a presença do pico do ião molecular correspondente a M^+ a valores de m/z a 899,2086.

Este perfil de espectro de RMN de ^1H foi observado para os compostos **113c**, **114c** e **113e**, onde foi possível identificar, inequivocamente, todas as ressonâncias dos protões e as configurações das duplas ligações do grupo butadienilo. É de salientar que no espectro de RMN de ^1H dos derivados triazol-porfirina **113c** e **114c** foi possível observar a presença de um sinal a 1,25 ppm na forma de singuleto correspondente à ressonância dos protões do grupo CH_3 da posição *orto* do anel de arilo do triazol.

As fórmulas moleculares destes derivados foram, também, confirmadas por espectrometria de massa de alta resolução (HRMS-ESI) sendo possível observar em cada espectro a presença do pico do ião molecular correspondente a M^+ a valores de m/z a 879,2634 para **113c**, a 879,2603 para **114c** e 933,1693 para **113e**.

Estes estudos de caracterização espectroscópica por RMN foram também realizados para os derivados triazol-porfirina **113b** e **114b** e permitiram igualmente identificar a ressonância do próton H-5' e a configuração das ligações duplas do grupo butadienilo. Assim, para o derivado **113b** verificou-se que a ressonância do próton H-5' se encontra juntamente com a ressonância dos prótons H-*m,p*-Ph-5,10,15,20 no sinal em forma de multiplete a 7,82-7,95 ppm. As constantes de acoplamento dos sinais referentes à ressonância dos prótons H- β (duplo duplete a 6,99 ppm, $J = 15,0$ e 10,5 Hz) e H- α (duplete a 6,99 ppm, $J = 15,0$ Hz) permitiram confirmar a configuração *trans* desta ligação. Da mesma forma, as constantes de acoplamento dos sinais referentes à ressonância dos prótons H- δ (duplete a 6,67 ppm, $J = 15,2$ Hz) e H- γ (duplo duplete a 6,82 ppm, $J = 15,2$ e 10,5 Hz) permitiram confirmar a configuração *trans* desta ligação.

No caso do conjugado **114b** foi possível identificar a ressonância do próton H- β (sinal na forma de multiplete a 6,97-6,91 ppm) através da correlação observada no espectro COSY com o sinal na forma de duplete a 6,75 ppm ($J = 15,9$ Hz), correspondente a H- α . Esta constante de acoplamento e a correlação observada em NOESY entre H- β e o sinal referente à ressonância dos prótons β -pirrólicos onde se inclui H-3, permitiu confirmar que a configuração *trans* desta ligação dupla. À semelhança do observado para o derivado **114d** a ressonância referente aos prótons H- δ e H- γ surge na forma de um multiplete a 6,26-6,11 ppm. Em NOESY verificou-se que H- α se encontra espacialmente próximo de H- γ . Com estas correlações foi possível confirmar que a dupla ligação entre H- γ e H- δ tem a configuração *cis*.

Os derivados triazol-porfirina **113b** e **114b** foram caracterizados por espectrometria de massa de alta resolução (HRMS-ESI), cujos espectros mostram a presença de um pico a valores de m/z a 865,2456 e 865,2471, respectivamente, correspondente a M^+ , confirmando as suas fórmulas moleculares.

Os espectros de RMN de ^1H dos derivados descomplexados triazol-porfirina **115d** e **116d** mostram perfis muito semelhantes aos dos seus precursores, mostrando

os sinais das unidades porfirina e de triazol e ainda da dupla ligação que une estas duas unidades a desvios químicos e multiplicidades semelhantes aos observados para os derivados **113d** e **114d**. As constantes de acoplamento entre os prótons H- δ /H- γ e H- β /H- α mantêm-se iguais aos dos seus precursores, o que indica que não houve isomerização. A descomplexação destes compostos foi confirmada pelo aparecimento dos sinais a desvio químicos mais baixos ($\sim -2,50$ ppm) relacionados com a ressonância dos prótons NH do interior do macrociclo porfirínico.

As suas fórmulas moleculares foram confirmadas por espectrometria de massa de alta resolução (HRMS), cujos espectros mostram a presença de um pico a valores de m/z a 840,3446 para **115d** e 840,3408 para **116d**, correspondentes ao pico do ião $[M+H]^+$.

4.4. Conclusão

Nesta parte do trabalho foram preparados novos derivados triazol-porfirina recorrendo à reacção de metátese. Durante este estudo, verificou-se que a eficiência da reacção de metátese cruzada entre o 2-vinil-5,10,15,20-tetrafenilporfirinatozínco(II) **80** e o 4-vinil-1,2,3-triazol **95a** dependia das condições reaccionais e do triazol usado. As melhores condições reaccionais encontradas (reacção realizada em tubo de Schlenk usando THF como solvente a 65°C) permitiram obter os novos derivados triazol-porfirina **98** com rendimentos entre 0,9 e 26,3%.

O estudo mais aprofundado do mecanismo da reacção permitiu concluir que o impedimento estérico das espécies envolvidas é um dos responsáveis pelo ciclo catalítico prosseguir por uma via secundária, originando uma espécie de ruténio pouco eficiente como catalisador.

De facto, a extensão deste estudo à reacção de metátese entre os 4-vinil-1,2,3-triazol **95a-f** e a 2-butadienil-5,10,15,20-tetrafenilporfirinato níquel(II) **90** (porfirina com o grupo alcenilo menos impedida) permitiu obter a mistura de isómeros dos derivados triazol-porfirina **113a-d** (*trans, trans*) e **114a-e** (*trans, cis*), em geral, com maiores rendimentos globais do que a reacção com o complexo **80**. Isto é indicativo de que a reacção segue, predominantemente, a via mais eficiente.

Também se verificou que na reacção de metátese cruzada entre o estireno e o complexo **80**, a via secundária é predominante, uma vez que não foi isolado qualquer produto de metátese entre a porfirina e o estireno. Este facto, permite concluir que os 4-vinil-1,2,3-triazóis usados são, mesmo assim, mais reactivos que o estireno.

4.5. Parte experimental

4.5.1. Reagentes, solventes e equipamento

Os reagentes comerciais utilizados neste trabalho não sofreram qualquer purificação prévia à sua utilização.

Os solventes utilizados nas diferentes etapas de síntese e cristalização eram analiticamente puros ou, quando necessário, foram previamente secos. Os solventes utilizados para a purificação das misturas reaccionais foram destilados e passados por coluna de alumina neutra activada.

O diclorometano e o 1,2-dicloroetano usados como solventes nas reacções foram previamente secos em hidreto de sódio a refluxo. Após 60 minutos a refluxo, o solvente foi destilado, tendo sido desprezados os primeiros 20 mL. O tolueno usado como solvente nas reacções foi previamente seco em fio de sódio. O THF usado como solvente nas reacções foi previamente seco em sódio e benzoquinona a refluxo. Após 60 minutos a refluxo, o solvente foi destilado, tendo-se desprezado os primeiros 20 mL.

As reacções foram seguidas por TLC, utilizando folhas plásticas revestidas por sílica gel 60 F₂₅₀. Depois da eluição, as placas foram observadas à luz ultravioleta a 254 e/ou a 366 nm.

As purificações das misturas reaccionais foram realizadas por coluna com sílica gel 60 de 0,063-0,200 mm, da Merck, ou por cromatografia de camada fina preparativa. As placas de cromatografia utilizadas eram de vidro (20x20 cm), previamente revestidas com uma camada de sílica gel 60 Merck, com uma espessura de 0,75 mm e posteriormente activadas na estufa a 100 °C durante 10 h.

Os espectros de visível foram adquiridos num espectrofotómetro UV-2501PC Shimadzu em células de vidro de percurso óptico de 1 cm.

Os espectros de RMN de ¹H e ¹³C foram adquiridos num aparelho Bruker Avance 300 a 300,13, e 75,47 MHz, respectivamente ou num aparelho Avance 500 a 500,13 e 125,77 MHz para ¹H e ¹³C, respectivamente. O solvente utilizado para a aquisição dos espectros foi clorofórmio deuterado e usou-se TMS como referência. Os assinalamentos inequívocos das ressonâncias dos prótons e carbonos foram

efectuados com recurso às técnicas bidimensionais de HSQC e HMBC e em alguns casos também à técnica de COSY e NOESY.

Os espectros de massa de electrospray em modo positivo de alta resolução foram efectuados na Universidade de Vigo, num espectrómetro VG Autospec M usando CHCl_3 como solvente e álcool 3-nitrobenzílico (NBA) como matriz.

4.5.2. Síntese das porfirinas de partida

A síntese das porfirinas usadas como material de partida para a síntese de novos derivados triazol-porfirina foi realizada de acordo com procedimentos experimentais bem conhecidos e reportados na literatura. No entanto, para que a parte experimental deste documento fique completa, permitindo a reprodutibilidade da mesma, a síntese destes derivados porfirínicos será descrita pormenorizadamente.

- ***Síntese dos complexos de cobre (Cu-TPP) e de níquel (Ni-TPP) da 5,10,15,20-tetrafenilporfirina (TPP)***

Cu-TPP

Dissolveu-se 1 g (1,63 mmol) de **TPP** numa mistura de clorofórmio e metanol (300:100) e a esta solução foi adicionado acetato de cobre mono-hidratado em excesso (2 g, 10,0 mmol; 6 equiv.). A mistura foi mantida sob agitação a 65 °C tendo-se verificado por TLC que a reacção de complexação tinha sido completa depois de 6 horas. Findo este período, a mistura reaccional foi lavada com água destilada, extraída com diclorometano e a fase orgânica seca através de sulfato de sódio anidro. Depois da remoção do solvente a pressão reduzida, o resíduo foi retomado em diclorometano e sujeito a uma filtração por uma pequena coluna de alumina. Após cristalização em diclorometano/éter de petróleo, o complexo **Cu-TPP** foi obtido com um rendimento de 93% (1,02 g). A estrutura do composto foi confirmada por comparação dos respectivos dados analíticos (TLC, UV-vis e MS) com os de uma amostra autêntica.

Ni-TPP

Dissolveram-se 500 mg **TPP** (0,814 mmol) e 215 mg de acetato de níquel (1,22 mmol, 1,5 equiv.) em DMF. Esta solução foi mantida sob agitação e a refluxo tendo-se verificado por TLC que esta reacção de complexação tinha sido completa depois de 15 minutos. Após este período a mistura reaccional foi arrefecida até à temperatura ambiente e adicionada a água e gelo. O precipitado entretanto formado foi filtrado e lavado com metanol e o complexo **Ni-TPP** foi obtido com um rendimento de 92% (502 mg). A estrutura do composto foi confirmada por comparação dos respectivos dados analíticos (TLC, UV-vis e MS) com os de uma amostra autêntica.

- **Síntese de 2-formil-5,10,15,20-tetrafenilporfirinatozínco(II) (92)**

A uma solução de **Cu-TPP** (500 mg, 0,741 mmol) em 1,2-dicloroetano (50 mL) foi adicionada uma solução de reagente de Vilsmeier-Haack, preparado *in situ* a partir de *N,N*-dimetilformamida (5,75 mL) e cloreto de fosforilo (4,75 mL). Esta mistura foi mantida em agitação e refluxo durante 16 horas.³³ Findo este período de tempo, a mistura reaccional foi arrefecida até à temperatura ambiente. A esta solução em agitação vigorosa foi adicionado ácido sulfúrico concentrado (9,5 mL) e esta reacção permaneceu em agitação durante 6 minutos. Seguiu-se a neutralização da mistura reaccional através da adição lenta a uma solução fria de hidróxido de sódio seguida da adição de clorofórmio. A fase orgânica foi extraída, lavada com água e seca através de sulfato de sódio anidro. O resíduo obtido após a remoção dos solventes a pressão reduzida foi purificado através de uma coluna de sílica gel usando como eluente diclorometano. A porfirina β -formilada **91** foi obtida com um rendimento de 85% (405 mg), após cristalização em diclorometano/éter de petróleo. A estrutura do composto foi confirmada por comparação dos respectivos dados analíticos (TLC, UV-vis e MS) com os de uma amostra autêntica.

Para a síntese do complexo de zinco **92**, a porfirina **91** (230,2 mg, 0,359 mmol) foi dissolvida em clorofórmio e metanol (250mL, 1,5:1) e esta solução foi mantida em agitação com um excesso de acetato de zinco di-hidratado (197 mg, 0,897 mmol, 2,5 equiv.) a 65 °C durante 20 minutos.³² Findo este tempo, a mistura reaccional foi lavada

com água destilada e a fase orgânica foi extraída, lavada com água destilada e seca através de sulfato de sódio anidro. Após a remoção dos solventes a pressão reduzida, o complexo de zinco **92** foi cristalizado em diclorometano/éter de petróleo e obtido com um rendimento de 95% (240,2 mg). A estrutura do composto foi confirmada por comparação dos respectivos dados analíticos (TLC, UV-vis e MS) com os de uma amostra autêntica.

- **Síntese da 2-formil-5,10,15,20-tetrafenilporfirinato níquel(II) (93)**

A uma solução de **Ni-TPP** (370 mg, 0,522 mmol) em 1,2-dicloroetano (60 mL) foi adicionada uma solução de reagente de Vilsmeier-Haack, preparado *in situ* a partir de *N,N*-dimetilformamida (3 mL) e cloreto de fosforilo (3 mL). A mistura foi mantida em agitação e refluxo durante 16 horas. Findo este período de tempo, a mistura reaccional foi arrefecida até à temperatura ambiente e, de seguida, tratada com uma solução saturada de hidróxido de sódio até se verificar a mudança de cor de verde para vermelho.³⁶ A mistura reaccional foi lavada com água destilada e a fase orgânica foi extraída com clorofórmio, lavada com água e seca através de sulfato de sódio anidro. Depois da remoção do solvente a pressão reduzida, o resíduo foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel usado como eluente clorofórmio/hexano (2:1). A fracção principal foi cristalizada em diclorometano/metanol tendo-se obtido a porfirina **93** com um rendimento de 89% (325 mg). A estrutura do composto foi confirmada por comparação dos respectivos dados analíticos (TLC, UV-vis e MS) com os de uma amostra autêntica.

- **Síntese de 2-vinil-5,10,15,20-tetrafenilporfirinato zinco(II) (80)**

A uma suspensão de brometo de trifenilmetilfósfonio (577 mg, 1,62 mmol) em THF (30 mL) foi adicionado, sob atmosfera de azoto, hidreto de sódio (50% disperso em óleo, 89 mg, 3,71 mmol). A mistura resultante foi sonicada em ultra-sons durante 15 minutos e de seguida agitada à temperatura ambiente, durante aproximadamente 2 horas, até se verificar o surgimento da coloração amarela indicativa da formação do ileto. Posteriormente, procedeu-se à adição da porfirina **92** (200 mg, 0,284 mmol) e a

mistura reaccional foi mantida em agitação à temperatura ambiente durante mais dez minutos. A reacção foi terminada por adição de 200 mL de clorofórmio e de água à mistura reaccional, que depois deste processo foi lavada com água. A fase orgânica extraída com clorofórmio, lavada com água destilada e seca através de sulfato de sódio anidro. Depois da remoção do solvente a pressão reduzida, o resíduo obtido foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel, usando como eluente clorofórmio/hexano (2:1). A cristalização da fracção principal em clorofórmio/hexano permitiu obter o complexo **80** pretendida com um rendimento de 79% (157,5 mg). A estrutura do composto foi confirmada por comparação dos respectivos dados analíticos (TLC, UV-vis e MS) com os de uma amostra autêntica.

- ***Síntese de 2-butadienil-5,10,15,20-tetrafenilporfirinatóniquel(II) (90)***

A uma suspensão de brometo de aliltrifenilfosfónio (112 mg, 0,293 mmol) em tolueno seco (5 mL) sob atmosfera de azoto, foi adicionado hidreto de sódio (50% disperso em óleo, 11 mg, 0,583 mmol). A mistura resultante foi refluxada até se observar o surgimento da coloração laranja (cerca de 15 minutos) indicativa da formação do ileto. De seguida, foi adicionada a porfirina **93** (50 mg, 71,6 μ mol) e a mistura reaccional foi mantida em agitação e refluxo durante 4 horas. Uma segunda solução de ileto foi preparada e adicionada à mistura reaccional, que foi mantida nas mesmas condições de agitação e temperatura durante mais duas horas.³⁸ Após este período, a reacção foi lavada com água, e a fase orgânica foi extraída com diclorometano, lavada novamente com água destilada e seca através de sulfato de sódio anidro. Após a remoção do solvente por evaporação a pressão reduzida, o resíduo obtido foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel usando tolueno como eluente. A cristalização da fracção principal em diclorometano/hexano permitiu obter o complexo **90** sob a forma de uma mistura dos isómeros *cis/trans* (1:1,5) com um rendimento de 74% (38,3 mg).

4.5.3. Estudos das condições reaccionais da reacção de metátese entre o 2-vinil-5,10,15,20-tetrafenilporfirinatozínco(II) (**80**) e o 4-vinil-1,2,3-triazol **95a**.

- **Reacção de metátese entre o complexo **80** e 4-vinil-1,2,3-triazol **95a** na presença do catalisador de Grubbs de 2ª geração - Procedimento geral para as entradas 1, 2 e 3 da Tabela 4.1.**

O complexo **80** (10 mg, 14,2 μ mol), o 4-vinil-1,2,3-triazol **95a** (1 equiv., 3,0 mg) e o catalisador de Grubbs de 2ª geração (0,25 equiv., 3,0 mg, 3,11 μ mol) foram colocados num balão de duas tubuladoras que foi passado por uma corrente de azoto. De seguida, estes sólidos foram dissolvidos em 3 mL de diclorometano (para o caso das entradas 1 e 2, Tabela 4.1) ou 1,2-dicloetano (para o caso da entrada 3, Tabela 4.1), seco e desgaseificado em ultra-sons, e a reacção foi mantida em agitação, sob refluxo e atmosfera de azoto durante 28 horas. No caso das condições das entradas 2 e 3 da Tabela 4.1, após 14 horas de reacção foram adicionados mais 1 equiv. de triazol **95a** e 0,25 equiv. de catalisador de Grubbs de 2ª geração. Findo este tempo, o solvente foi evaporado a pressão reduzida e a mistura reaccional foi retomada numa mistura de clorofórmio/hexano (2:1) e fraccionada por cromatografia em coluna de sílica gel usando este sistema de solvente como eluente. A primeira fracção recolhida foi identificada como sendo a porfirina **80** que não reagiu. A segunda fracção, constituída pelo conjugado triazol-porfirina **98a** e o homodímero porfirínico **99**, foi purificada por TLC preparativo usando como eluente uma mistura de hexano/acetato de etilo (4:1). Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 4.1, entradas 1,2 e 3.

- **Reacção de metátese entre o complexo **80** e 4-vinil-1,2,3-triazol **95a** na presença do catalisador de Grubbs de 2ª geração – Procedimento geral para as entradas 4 e 5 da Tabela 4.1.**

O complexo **80** (10 mg, 14,2 μ mol), o 4-vinil-1,2,3-triazol **95a** (1 equiv., 3,0 mg) e o catalisador de Grubbs de 2ª geração (0,25 equiv., 3,0 mg, 3,11 μ mol) foram colocados num balão de duas tubuladoras que foi passado por uma corrente de argón. De seguida, estes sólidos foram dissolvidos em 3 mL de diclorometano (para o caso da entrada 4 da Tabela 4.1) ou tolueno (para o caso da entrada 5 da Tabela 4.1) seco e

desgaseificado em ultra-sons e a reacção foi mantida em agitação, sob refluxo e atmosfera de árgon durante 28 horas. No caso das condições da entrada 5 da tabela 4.1, após 14 horas de reacção foram adicionados mais 1 equiv. de triazol **95a** e 0,25 equiv. de catalisador de Grubbs de 2ª geração. Findo este tempo, a reacção foi terminada e purificada nas mesmas condições descritas no ponto anterior. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 4.1, entradas 4 e 5.

- ***Reacção de metátese entre o complexo 80 e 4-vinil-1,2,3-triazol 95a na presença do catalisador de Grubbs de 2ª geração – Procedimento geral para as entradas 6 e 7 da Tabela 4.1.***

O complexo **80** (10 mg, 14,2 μmol), o 4-vinil-1,2,3-triazol **95a** (1 equivalente, 3,0 mg) e o catalisador de Grubbs de 2ª geração (0,25 equiv., 3,0 mg, 3,11 μmol) foram colocados num tubo de Schlenk. De seguida, estes sólidos foram dissolvidos em 3 mL de tolueno (entrada 6, Tabela 4.1) ou 1,2-dicloroetano (entrada 7, Tabela 4.1) seco e o tubo foi ligado a uma bomba de vácuo e sonicado durante cerca de 2 minutos em ultra-sons. Desta forma o sistema reaccional fica sob vácuo, logo, na ausência de qualquer gás que possa desactivar o catalisador. O tubo foi selado e mantido sob agitação e aquecimento a 80°C durante 14 horas. Após este tempo foram adicionados mais 1 equiv. de triazol **95a** e 0,25 equiv. de catalisador de Grubbs de 2ª geração. O tubo foi novamente ligado a uma bomba de vácuo e sonicado durante cerca de 2 minutos em ultra-sons e a mistura foi mantida em agitação e aquecimento durante mais 14 horas. Findo este tempo, a reacção foi terminada e purificada nas mesmas condições descritas nos pontos anteriores. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 4.1, entradas 6 e 7.

- ***Reacção de metátese entre o complexo 80 e 4-vinil-1,2,3-triazol 95a na presença do catalisador de Grubbs de 2ª geração – Procedimento para a entrada 8 da Tabela 4.1***

O complexo **80** (10 mg, 14,2 μmol), o 4-vinil-1,2,3-triazol **95a** (1 equiv., 3,0 mg) e o catalisador de Grubbs de 2ª geração (0,25 equiv., 3,0 mg, 3,11 μmol) foram colocados num tubo de Schlenk. De seguida, estes sólidos foram dissolvidos em 3 mL de THF seco e o tubo foi ligado a uma bomba de vácuo e sonicado durante cerca de 2

minutos em ultra-sons. O tubo foi selado e mantido sob agitação e aquecimento a 80°C durante 18 horas. Findo este tempo, a reacção foi terminada e purificada nas mesmas condições nos pontos anteriores. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 4.1, entrada 8.

4.5.4. Estudos das condições reaccionais da reacção de metátese entre 2-vinil-5,10,15,20-tetrafenilporfirinatozínco(II) (**80**) e 4-vinil-1,2,3-triazol **95a** na presença de $Ti(O^iPr)_4$.

- **Reacção de metátese entre o complexo **80** e 4-vinil-1,2,3-triazol **95a** na presença do catalisador de Grubbs de 2ª geração e $Ti(O^iPr)_4$ – Procedimento geral para as entradas 1 e 2 da Tabela 4.2.**

O 4-vinil-1,2,3-triazol **95a** (1 equiv., 3,0 mg) e o catalisador de Grubbs de 2ª geração (0,25 equiv., 3,0 mg, 3,11 μ mol) foram colocados num balão de duas tubuladoras que foi passado por uma corrente de árgon. De seguida, estes sólidos foram dissolvidos em 3 mL de diclorometano seco e foi adicionado 1 equiv. de $Ti(O^iPr)_4$ (4,0 mg, 21,7 μ L). Esta mistura foi mantida em agitação e aquecimento durante 1 hora. Findo este período a β -vinil-porfirina **80** (10 mg, 14,2 μ mol) foi adicionada à mistura reaccional. A reacção foi mantida em agitação, sob refluxo e atmosfera de árgon durante 48 horas. No caso das condições da entrada 2 da tabela 4.2, após 14 horas de reacção foram adicionados mais 1 equiv. de triazol **95a** e 0,25 equiv. de catalisador de Grubbs de 2ª geração. Findo este tempo, a reacção foi terminada e purificada nas mesmas condições descritas nos pontos anteriores. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 4.2, entradas 1 e 2.

- **Reacção de metátese entre o complexo **80** e 4-vinil-1,2,3-triazol **95a** na presença do catalisador de Grubbs de 2ª geração e $Ti(O^iPr)_4$ – Procedimento geral para a entrada 3 da Tabela 4.2.**

O complexo **80** (10 mg, 14,2 μ mol), o 4-vinil-1,2,3-triazol **95a** (1 equiv., 3,0 mg) e o catalisador de Grubbs de 2ª geração (0,25 equiv., 3,0 mg, 3,11 μ mol) foram colocados num tubo de Schlenk. De seguida, estes sólidos foram dissolvidos em 3 mL de 1,2-dicloetano seco e foi adicionado 1 equiv. de $Ti(O^iPr)_4$ (4,0 mg, 21,7 μ L). O tubo foi ligado a uma bomba de vácuo e sonificado durante cerca de 2 minutos em ultra-

sons. A mistura reaccional foi mantida sob agitação e aquecimento a 80°C durante 28 horas. Findo este tempo, a reacção foi terminada e purificada nas mesmas condições descritas nos pontos anteriores. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 4.2, entrada 3.

- ***Reacção de metátese entre o complexo 80 e 4-vinil-1,2,3-triazol 95a na presença do catalisador de Grubbs de 2ª geração e $Ti(O^iPr)_4$ – Procedimento geral para as entradas 4 e 5 da Tabela 4.2.***

O complexo **80** (10 mg, 14,2 μ mol), o 4-vinil-1,2,3-triazol **95a** (1 equivalente, 3,0 mg) e o catalisador de Grubbs de 2ª geração (0,25 equiv., 3,0 mg, 3,11 μ mol) foram colocados num tubo de Schlenk. De seguida, estes sólidos foram dissolvidos em 3 mL de 1,2-dicloetano (entrada 4, Tabela 4.2) ou THF (entrada 5, Tabela 4.2) seco e foram adicionados 3 equiv. de $Ti(O^iPr)_4$ (12,0 mg, 65,0 μ L). O tubo foi ligado a uma bomba de vácuo e sonicado durante cerca de 2 minutos em ultra-sons. A mistura reaccional foi mantida sob agitação e aquecimento a 80°C durante 28 horas, para o caso das condições da entrada 4 da Tabela 4.2, ou 18 horas, para o caso das condições da entrada 5 da Tabela 4.2. Findo este tempo, a reacção foi terminada e purificada nas mesmas condições descritas nos pontos anteriores. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 4.2, entradas 4 e 5.

- ***Reacção de metátese entre o complexo 80 e o 4-vinil-1,2,3-triazol 95a na presença do catalisador de Grubbs de 2ª geração e $Ti(O^iPr)_4$ – Procedimento geral para a entrada 6 da Tabela 4.2.***

O complexo **80** (10 mg, 14,2 μ mol), o 4-vinil-1,2,3-triazol **95a** (1 equiv., 3,0 mg) e o catalisador de Grubbs de 2ª geração (0,25 equiv., 3,0 mg, 3,11 μ mol) foram colocados num balão de duas tubuladoras que foi passado por uma corrente de árgon. De seguida, estes sólidos foram dissolvidos em 3 mL $Ti(O^iPr)_4$. A reacção foi mantida em agitação, sob refluxo e atmosfera de árgon durante 48 horas. Findo este tempo, a reacção foi terminada e purificada nas mesmas condições descritas nos pontos anteriores. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 4.2, entrada 6.

4.5.5. Estudos das condições reaccionais da reacção de metátese entre 2-vinil-5,10,15,20-tetrafenilporfirinatozinco(II) (80**) e 4-vinil-1,2,3-triazol **95a** através da radiação de microondas.**

O complexo **80** (10 mg, 14,2 μ mol), o 4-vinil-1,2,3-triazol **95a** (1 equiv., 3,0 mg) e o catalisador de Grubbs de 2ª geração (0,25 equiv., 3,0 mg, 3,11 μ mol) foram colocados num tubo selado no microondas. As reacções foram realizadas em vaso fechado, usando como temperatura máxima 120°C. Estas foram submetidas a 200 W, 300 W e 400 W durante 10 minutos. Uma das reacções foi submetida a 500 W durante 10 minutos, 20 minutos e 1 hora. Findo este tempo, a reacção foi terminada e purificada nas mesmas condições descritas nos pontos anteriores. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 4.3.

4.5.6. Reacção de metátese entre 2-vinil-5,10,15,20-tetrafenilporfirinatozinco(II) (80**) e 4-alil-1,2,3-triazol *N*-substituído **100**.**

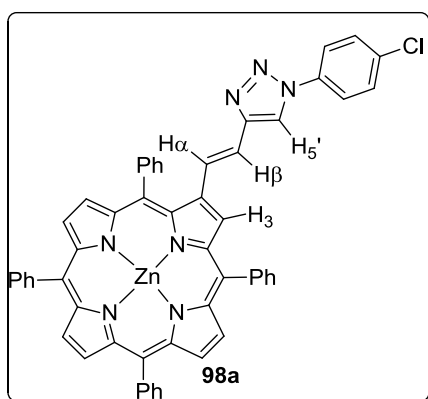
O complexo **80** (10 mg, 14,2 μ mol), o 4-alil-1,2,3-triazol **100** (1 equiv., 3,1 mg) e o catalisador de Grubbs de 2ª geração (0,25 equiv., 3,0 mg, 3,11 μ mol) foram colocados num tubo de Schlenk. De seguida, estes sólidos foram dissolvidos em 3 mL de THF seco e o tubo foi ligado a uma bomba de vácuo e sonicado durante cerca de 2 minutos em ultra-sons. A mistura reaccional foi mantida em agitação e aquecimento a 80°C durante 18 horas. Findo este tempo, o solvente foi evaporado e a mistura reaccional foi retomada numa mistura de clorofórmio/hexano (2:1) e fraccionada por cromatografia em coluna de sílica gel usando este sistema de solvente como eluente. A primeira fracção recolhida foi identificada como sendo o complexo **80** que não reagiu. A segunda fracção, constituída pelo conjugado triazol-porfirina **98a** e o 4-alil-1,2,3-triazol **100** que não reagiu, foi purificada por TLC preparativo usando como eluente uma mistura de hexano/acetato de etilo (4:1).

4.5.7. Reacção de metátese entre 2-vinil-5,10,15,20-tetrafenilporfirinatozinco(II) (80**) e os 4-vinil-1,2,3-triazóis **95a-f**. Procedimento geral**

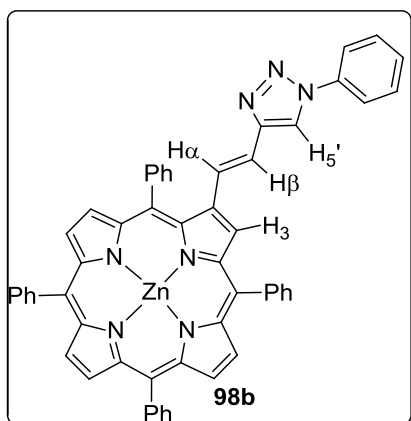
A β -vinil-porfirina **80** (10 mg, 14,2 μ mol), os 4-vinil-1,2,3-triazóis **95a-f** (1 equiv.) e o catalisador de Grubbs de 2ª geração (0,25 equiv., 3,0 mg, 3,11 μ mol) foram colocados num tubo de Schlenk. De seguida, estes sólidos foram dissolvidos em 3 mL de THF seco e o tubo foi ligado a uma bomba de vácuo e sonicado durante cerca de 2

minutos em ultra-sons. A mistura reaccional foi mantida em agitação e aquecimento a 80°C durante 18 horas. Findo este tempo, o solvente foi evaporado e a mistura reaccional foi retomada numa mistura de clorofórmio/hexano (2:1) e fraccionada por cromatografia em coluna de sílica gel usando este sistema de solventes como eluente. A primeira fracção recolhida foi identificada como sendo o complexo **80** que não reagiu. A segunda fracção constituída pelos conjugados triazol-porfirina **98a-e**, e, em cada caso, o derivado do tipo **104** resultante do triazol usado e os 4-vinil-1,2,3-triazóis **95a-e** que não reagiram. Esta foi purificada por TLC preparativo usando como eluente uma mistura de hexano/acetato de etilo (4:1).

(E)-2-[2-[1-(4-clorofenil)-1H-1,2,3-triazol-4-il]vinil]-5,10,15,20-tetrafenilporfirinatozinco(II) (98a).



η = 25%. **RMN de ^1H** (500 MHz, CDCl_3) δ 9,04 (d, J = 0,9 Hz, 1H, H-3), 8,85 e 8,83 (AB, J = 4,6 Hz, 2H, H-7,8), 8,82 (s, 2H, H-12,14), 8,80 e 8,75 (AB, J = 4,6 Hz, 2H, H-17,18), 8,27 – 8,15 (m, 8H, H-*o*-Ph-5,10,15,20), 7,85 – 7,72 (m, 15H, H-*m,p*-Ph-5,10,15,20 + H-*o*-Ph-*p*-Cl + H-5'), 7,65 (d, J = 8,8 Hz, 2H, H-*m*-Ph-*p*-Cl), 7,32 (d, J = 16,2 Hz, 1H, H- β), 6,92 (d, J = 16,2 Hz, 1H, H- α). **RMN ^{13}C** (75,47 MHz, CDCl_3): δ 150,5, 150,1, 149,9, 148,1, 134,3 (H-*o*-Ph-5,10,15,20), 134,2 (C-*o*-Ph-5,10,15,20), 131,9 (C- β -pirrólicos), 131,8 (C-pirrólicos), 131,8 (C-pirrólicos), 131,7 (C-pirrólicos), 131,3 (C-pirrólicos), 129,9 (C-3), 129,8, 128,5 (C- α), 127,3, 127,2, 126,8, 126,3, 121,3, 120,2, 117,6 (C- β), 117,3. **UV-vis (CHCl_3):** λ_{max} (log ϵ) = 428 (4,97), 554 (3,92), 590 (3,61), 619 (3,39) nm. **HRMS-ESI:** m/z 879,1889. Calcd. para $\text{C}_{54}\text{H}_{34}\text{ClN}_7\text{Zn}$ M^+ 879,1856.

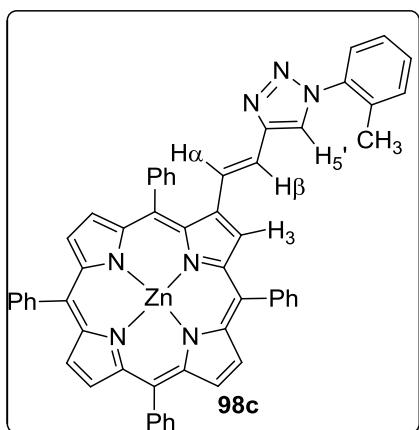


(E)-2-[2-(1-fenil-1H-1,2,3-triazol-4-il)vinil]-5,10,15,20-tetrafenilporfirinatozinco(II) (98b).

η = 13%. **RMN de ^1H** (500 MHz, CDCl_3) δ 9,13 (d, J = 0,9 Hz, 1H, H-3), 8,97 – 8,91 (m, 3H, β -H), 8,89 e 8,82 (AB, J = 4,7 Hz, 2H, H-17,18), 8,26 – 8,15 (m, 8H, H-*o*-

Ph-5,10,15,20), 7,92 (s, 1H, H-5'), 7,87 – 7,68 (m, 14H, H-*m,p*-Ph-5,10,15,20 + H-*o*-Ph), 7,66 – 7,58 (m, 2H, H-*m*-Ph), 7,54-7,51 (m, 1H, H-*p*-Ph), 7.23 (d, $J = 15,8$ Hz, 1H, H- β), 6,85 (d, $J = 15,8$ Hz, 1H, H- α). **UV-vis (CHCl₃):** λ_{\max} (log ϵ) = 428 (5,54), 516 (3,75), 555 (4,40), 589 (5,04) nm. **HRMS-ESI:** m/z 845,2264. Calcd. para C₅₄H₃₅N₇Zn M⁺ 845,2245.

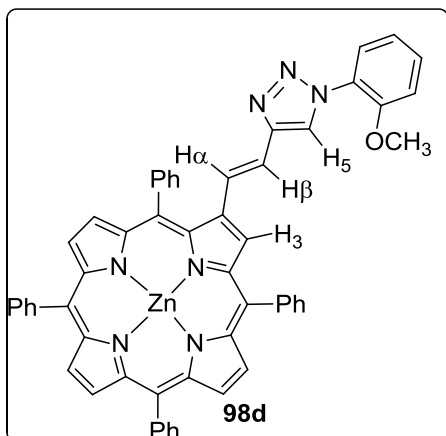
(E)-2-{2-[1-(2-tolil)-1H-1,2,3-triazol-4-il]vinil}-5,10,15,20-tetrafenilporfirinatozinco(II) (98c)



$\eta = 19\%$. **RMN de ¹H** (300 MHz, CDCl₃) δ 9,10 (d, $J = 0,9$ Hz, 1H, H-3), 8,95 – 8,90 (m, 4H, β -H), 8,88 e 8,79 (AB, $J = 4.7$ Hz, 2H, H-17,18), 8,24 – 8,14 (m, 8H, H-*o*-Ph-5,10,15,20), 7,83 – 7,66 (m, 14H, H-*m,p*-Ph-5,10,15,20 + H-*o*-Ph-*o*-CH₃ + H-*p*-Ph-*o*-CH₃), 7,56 (s, 1H, H-5'), 7,30 (d, $J = 8,1$ Hz, 2H, H-*m*-Ph-*o*-CH₃), 7,04 (d, $J = 16,3$ Hz, 1H, H- β), 6,80 (d, $J = 16,3$ Hz, 1H, H- α), 0,85 (s, 3H, CH₃). **RMN ¹³C**

(75,47 MHz, CDCl₃): δ 149.93, 149.70, 149.62, 149.53, 149.41, 149.34, 147.77, 147.60, 145.68, 145.39, 143.30, 142.76, 142.57, 141.57, 133.9, 131.5 (C-pirrólicos), 131.4 (C-pirrólicos), 131.3 (C-pirrólicos), 130.8 (C-3), 129.5, 128.1, 127.0 (C-5'), 126.9 (C- α), 126.7, 126.3, 125.9, 121.7, 121.6, 120.4, 119.9, 119.77, 117.3 (C-*m*-Ph-*o*-CH₃), 116.9 (C-*m*-Ph-*o*-CH₃), 116.5 (C- β), 116.2, 28.9 (CH₃). **UV-vis (CHCl₃):** λ_{\max} (log ϵ) = 428 (5,40), 513 (3,55), 555 (4,24), 589 (4,84) nm. **HRMS-ESI:** m/z 859,2432. Calcd. para C₅₅H₃₇N₇Zn M⁺ 859,2402.

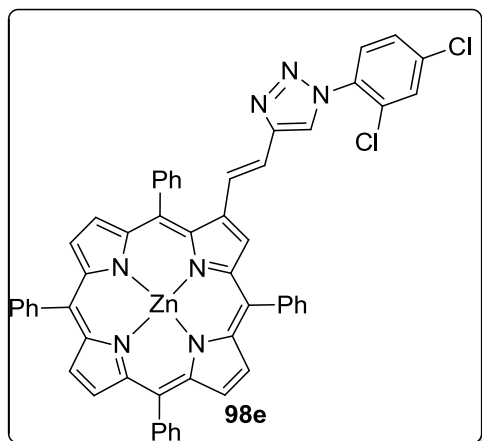
(E)-2-{2-[1-(2-metoxifenil)-1H-1,2,3-triazol-4-il]vinil}-5,10,15,20-tetrafenilporfirinatozinco(II) (98d).



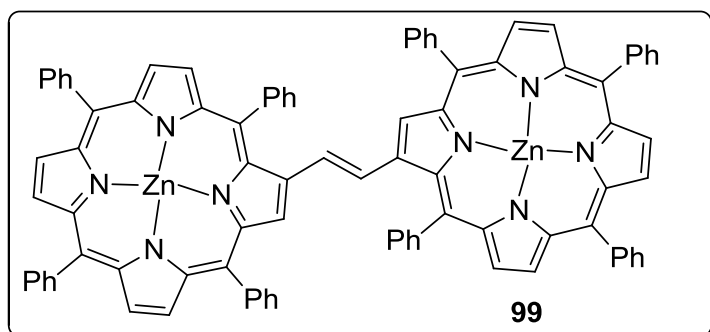
$\eta = 26\%$. **RMN de ¹H** (300 MHz, CDCl₃) δ 9,12 (d, $J = 0,8$ Hz, 1H, H-3), 8,93 – 8,91 (m, 4H, β -H), 8,89 e 8,82 (AB, $J = 4.7$ Hz, 2H, H-17,18), 8,24 – 8,13 (m, 8H, H-*o*-Ph-5,10,15,20), 8,04 (s, 1H, H-5') 7,88 – 7,67 (m, 14H, H-*m,p*-Ph-5,10,15,20 + H-*o,p*-Ph-*o*-

OCH₃), 7,30 (d, $J = 8,1$ Hz, 2H, H-*m*-Ph-*o*-OCH₃), 5,95 (d, $J = 16,3$ Hz, 1H, H- β), 5,37 (d, $J = 16,3$ Hz, 1H, H- α), 4,08 (s, 3H, OCH₃). **UV-vis (CHCl₃):** λ_{\max} (log ϵ) = 426 (5,53), 513 (3,87), 554 (4,45), 589 (4,04) nm. **HRMS-ESI:** m/z 875,2372 . Calcd. para C₅₅H₄₂N₇OZn M⁺ 875,2251.

(E)-2-{2-[1-(2,4-diclorofenil)-1H-1,2,3-triazol-4-il]vinil}-5,10,15,20-tetrafenilporfirinatozínco(II) (98e).



$\eta = 1\%$. **UV-vis (CHCl₃):** λ_{\max} (log ϵ) = 428 (4,89), 553 (3,95), 449 (3,54), 618 (3,41) nm. **HRMS-ESI:** m/z 916,1718. Calcd. para C₅₄H₃₃Cl₂N₇Zn M⁺ 916,1727.



Homodímero 99: UV-vis (CHCl₃): λ_{\max} (log ϵ) = 432 (4,94), 513 (3,55), 555 (4,24), 589 (3,84) nm. **HRMS-ESI:** m/z 1376, 3260. Calcd. para C₉₀H₅₆N₈Zn₂ [M+H]⁺ 1376,3211.

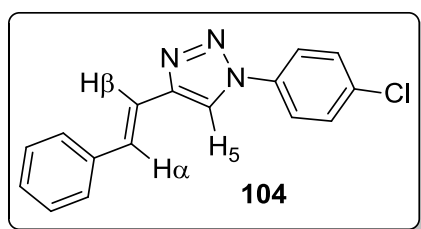
4.5.8. Reacção de metátese entre 2-vinil-5,10,15,20-tetrafenilporfirinatozínco(II) (80) e o estireno 103.

O complexo **80** (10 mg, 14,2 μ mol), o estireno **103** (1 equiv., 2,0 η L) e o catalisador de Grubbs de 2^a geração (0,25 equiv., 3,0 mg, 3,11 μ mol) foram colocados num balão de duas tubuladoras por onde foi passada uma corrente de azoto. De seguida, estes sólidos foram dissolvidos em 3 mL de diclorometano seco e a reacção foi mantida em agitação, sob refluxo e atmosfera de azoto durante 18 horas. Findo este tempo verificou-se que não tinha ocorrido reacção.

4.5.9. Reacção de metátese entre o 4-vinil-1,2,3-triazol **95a** e o estireno **103**.

O 4-vinil-1,2,3-triazol **95a** (3,0 mg, 14,2 μ mol), o estireno (1equivalente, 2,0 μ L) e o catalisador de Grubbs de 2^a geração (0,25 equiv., 3,0 mg, 3,11 μ mol) foram colocados num balão de duas tubuladuras que foi passado por uma corrente de azoto. De seguida, estes sólidos foram dissolvidos em 3 mL de diclorometano e a reacção foi mantida em agitação, sob refluxo e atmosfera de azoto durante 18 horas. Findo este tempo, o solvente foi evaporado e a mistura reaccional foi retomada numa mistura de clorofórmio/hexano (2:1) e fraccionada por cromatografia em coluna de sílica gel usando este sistema de solvente como eluente. A primeira fracção recolhida foi identificada como sendo ao estireno **103** que não reagiu. A segunda fracção constituída pelo conjugado triazol-estireno **104** e terceira fracção constituída pelo triazol **95a** que não reagiu.

(E)-1-(4-clorofenil)-4-estiril-1H-1,2,3-triazol (**104**).



η = 26% RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 7,99 (s, 1H, H-5), 7,72 (d, J = 8,9 Hz, 2H, H-*o*-Ph), 7,56 – 7,49 (m, 4H, H-*m*-Ph + H-*o*-Ph-*p*-Cl), 7,42 – 7,29 (m, 3H, H-*m*-Ph-*p*-Cl, H-*p*-Ph), 7,31 (d, J = 16,5 Hz, 1H, H- β), 7,14 (d, J = 16,5 Hz, 1H, H- α). HRMS-ESI:

m/z 282,0792. Calcd. para $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{ClN}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 282,0793.

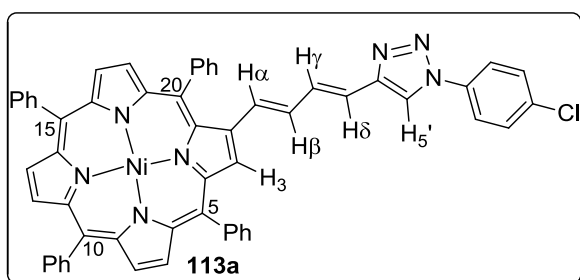
4.5.10. Reacção de metátese do 4-vinil-1,2,3-triazol **95a**.

O 4-vinil-1,2,3-triazol **95a** (5,0 mg, 24,4 μ mol) e o catalisador de Grubbs de 2^a geração (0,25 equiv., 5,2 mg, 6,3 μ mol) foram colocados num balão de duas tubuladuras por onde foi passada uma corrente de azoto. De seguida, estes sólidos foram dissolvidos em 3 mL de diclorometano e a reacção foi mantida em agitação, sob refluxo e atmosfera de azoto durante 18 horas. Findo este tempo, o solvente foi evaporado e a mistura reaccional foi retomada numa mistura de clorofórmio/hexano (2:1) e fraccionada por cromatografia em coluna de sílica gel usando este sistema de solvente como eluente. A primeira fracção recolhida foi identificada como sendo o derivado **104** e a segunda fracção constituída pelo triazol **95a** que não reagiu.

4.5.11. Reacção de metátese entre o 2-butadienil-5,10,15,20-tetrafenilporfirinatóniquel(II) (90) e os 4-vinil-1,2,3-triazóis 95a-f. Procedimento Geral:

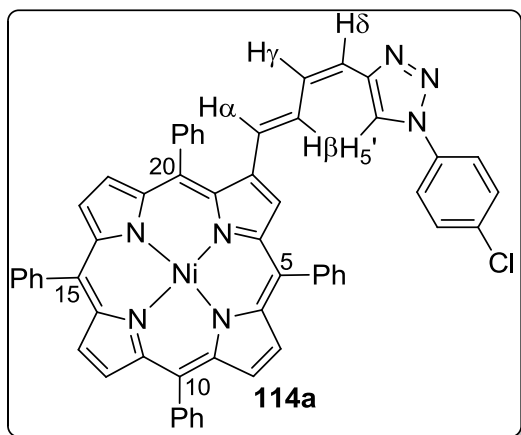
O complexo **90** (10 mg, 13,7 μ mol), os 4-vinil-1,2,3-triazóis **95a-f** (1 equiv.) e o catalisador de Grubbs de 2ª geração (0,25 equiv, 2,9 mg, 3,45 μ mol) foram colocados num tubo de Schlenk. De seguida, estes sólidos foram dissolvidos em 3 mL de THF seco e o tubo foi ligado a uma bomba de vácuo e sonicado durante cerca de 2 minutos desgaseificado em ultra-sons. A mistura reaccional foi mantida em agitação e aquecimento a 80°C durante 18 horas. Findo este tempo, o solvente foi evaporado e a mistura reaccional foi retomada numa mistura de clorofórmio/hexano (2:1) e fraccionada por cromatografia em coluna de sílica gel usando este sistema de solvente como eluente. A primeira fracção recolhida foi identificada como sendo a porfirina **90** que não reagiu. A segunda fracção constituída pela benzoporfirina **112**. A terceira fracção constituída pelos conjugados triazol-porfirina **113a-e** e **114a-d** e o derivado **104**. Esta fracção foi purificada por TLC preparativo usando como eluente uma mistura de clorofórmio com 1% de metanol.

(1E,3E)-2-{4-[1-(4-clorofenil)-1H-1,2,3-triazol-4-il]-1,3-butadien-1-il}-5,10,15,20-tetrafenilporfirinatóniquel(II) (113a).



η = 21 %. **RMN de ^1H** (500 MHz, CDCl_3) δ 8,83 (d, J = 0,5 Hz, 1H, H-3), 8,74 – 8,65 (m, 7H, β -H), 8,02-7,98 (m, 6H, H-*o*-Ph-5,10,15), 7,89 (d, J = 6,8 Hz, 2H, H-*o*-Ph-20), 7,82 (s, 1H, H-5'), 7,78 – 7,63 (m, 14H, H-*m,p*-Ph-5,10,15,20 + H-*o*-Ph-*p*-Cl), 7,51 (d, J = 8,9 Hz, 2H, H-*m*-Ph-*p*-Cl), 6,97 (dd, J = 15,2, 10,8 Hz, 1H, H- β), 6,80 (dd, J = 15,6, 10,8 Hz, 1H, H- γ), 6,63 (d, J = 15,6 Hz, 1H, H- δ), 6,21 (d, J = 15,2 Hz, 1H, H- α). **UV-vis (CHCl_3):** λ_{max} (log ϵ) = 428 (5,30), 540 (4,29), 579 (4,17) nm. **HRMS-ESI:** m/z 899,2067. Calcd. para $\text{C}_{56}\text{H}_{36}\text{ClN}_7\text{Ni}$ M^+ 899,2074.

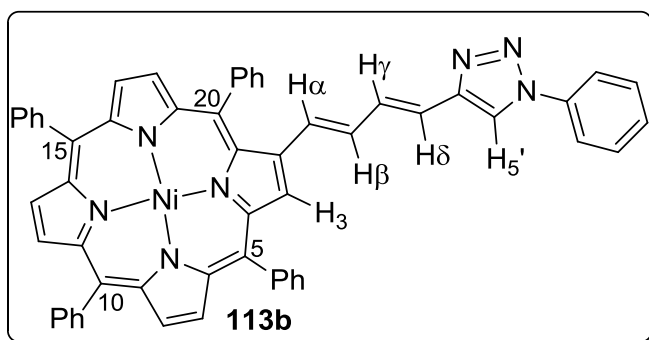
(1E,3Z)-2-{4-[1-(4-clorofenil)-1H-1,2,3-triazol-4-il]-1,3-butadien-1-il}-5,10,15,20-tetrafenilporfirinatoniquel(II) (114a).



$\eta = 13$ %. **RMN de ^1H** (500 MHz, CDCl_3) δ 8,77 – 8,65 (m, 7H, β -H), 8,07-7,98 (m, 6H, H-*o*-Ph-5,10,15), 8,82 (d, $J = 6,8$ Hz, 2H, H-*o*-Ph-20), 7,74 (s, 1H, H-5'), 7,73 – 7,56 (m, 15H, H-*m,p*-Ph-5,10,15,20 + H-*o*-Ph-p-Cl + H- β), 7,45 (d, $J = 9,0$ Hz, 2H, H-*m*-Ph-p-Cl), 6,73 (d, $J = 15,8$ Hz, 1H, H- α), 6,26 (d, $J = 11,2$ Hz, 1H, H- δ), 6,16-6,12 (m, 1H,

H- γ). **UV-vis (CHCl_3):** λ_{max} (log ϵ) = 423 (5,17), 536 (4,14), 570 (3,88) nm. **HRMS-ESI:** m/z 899,2086. Calcd. para $\text{C}_{56}\text{H}_{36}\text{ClN}_7\text{Ni M}^+$ 899,2074.

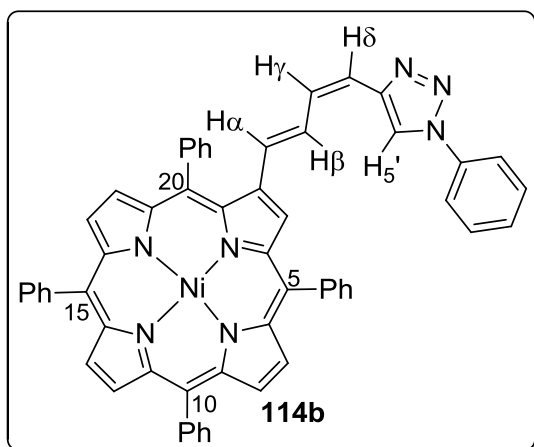
(1E,3E)-2-[4-(1-fenil-1H-1,2,3-triazol-4-il)1,3-butadien-1-il]-5,10,15,20-tetrafenilporfirinatoniquel(II) (113b).



$\eta = 19$ %. **RMN de ^1H** (300 MHz, CDCl_3) δ 8,83 (d, $J = 0,4$ Hz, 1H, H-3), 8,80 – 8,62 (m, 6H, β -H), 8,06 – 7,95 (m, 6H, H-*o*-Ph-5,10,15), 7,94 – 7,84 (m, 2H, H-*o*-Ph-20), 7,82 – 7,62 (m, 15H, H-*m,p*-Ph-5,10,15,20 + H-

o-Ph, H-5'), 7,58-7,53 (m, 2H, H-*m*-Ph), 7,48-7,45 (m, 1H, H-*p*-Ph), 6,99 (dd, $J = 15,0$, 10,5 Hz, 1H, H- β), 6,82 (dd, $J = 15,2$, 10,5 Hz, 1H, H- γ), 6,67 (d, $J = 15,2$ Hz, 1H, H- δ), 6,21 (d, $J = 15,0$ Hz, 1H, H- α). **RMN de ^{13}C** (75,47 MHz, CDCl_3): δ 146,9, 143,8, 143,4, 142,8, 142,4, 142,3, 141,1, 140,81, 140,7, 140,6, 136,9, 133,6 (C-*o*-Ph-5,10,15), 133,3 (C-*o*-Ph-20), 132,5 (C-pirrólico), 132,3 (C-pirrólico), 132,3 (C-pirrólico), 132,2 (C-pirrólico), 131,8 (C- γ), 130,0 (C-*m*-Ph), 129,7 (C-3), 129,6 (C-*p*-Ph), 129,5 (C- β), 128,7 (C- α), 128,3, 127,7, 127,2, 127,0, 126,9, 120,4 (C- δ), 120,2, 119,4, 119,2, 118,6, 118,2, 118,1. **UV-vis (CHCl_3):** λ_{max} (log ϵ) = 427 (5,23), 541 (4,21), 579 (4,07) nm. **HRMS-ESI:** m/z 865,2456. Calcd. para $\text{C}_{56}\text{H}_{37}\text{N}_7\text{Ni M}^+$ 865,2464.

(1E,3Z)-2-[4-(1-fenil-1H-1,2,3-triazol-4-il)1,3-butadien-1-il]-5,10,15,20-tetrafenilporfirinatoniquel(II) (114b).

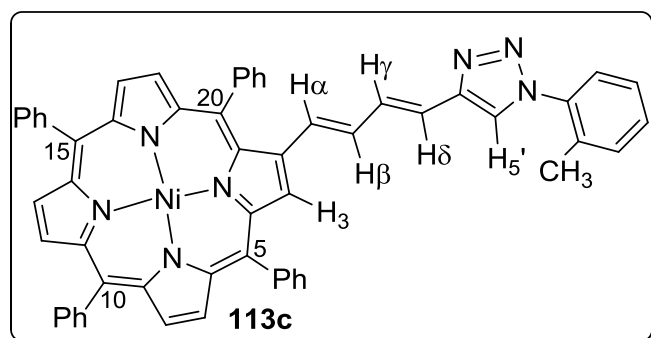


η = 16 %. **RMN de ^1H** (300 MHz, CDCl_3) δ 8,81 – 8,64 (m, 7H, β -H), 8,13 – 7,95 (m, 6H, H-*o*-Ph-5,10,15), 7,90-7,81 (m, 2H, H-*o*-Ph-20), 7,78 (s, 1H, H-5'), 7,72-7,59 (m, 12H, H-*m,p*-Ph-5,10,15,20), 7,58 – 7,49 (m, 5H, H-Ph), 6,97-6,91 (m, 1H, H- β), 6,75 (d, J = 15,9 Hz, 1H, H- α), 6,26-6,11 (m, 2H, H- δ + H- γ). **RMN de ^{13}C** (75,47 MHz, CDCl_3): δ

143,4, 142,7, 142,5, 142,4, 142,3, 140,9, 140,7, 140,6, 134,5 (C-*o*-Ph-5,10,15,20), 133,8 (C-*o*-Ph-20), 133,6, 133,3, 133,3, 132,5 (C-pirrólico), 132,4 (C-pirrólico), 132,3 (C-pirrólico), 132,2 (C-pirrólico), 129,7, 128,7 (C- γ +C- δ), 128,1 (C- δ +C- γ), 127,8, 127,7, 127,3, 126,9 (C- β), 121,5 (C- α), 120,4, 120,3, 117,6. **UV-vis (CHCl_3):** λ_{max} (log ϵ) = 424 (5,25), 537 (4,21), 573 (3,95) nm. **HRMS-ESI:** m/z 865,2471. Calcd. para $\text{C}_{56}\text{H}_{37}\text{N}_7\text{Ni M}^+$ 865,2464.

(1E,3E)-2-{4-[1-(2-tolil)-1H-1,2,3-triazol-4-il]-1,3-butadien-1-il}-5,10,15,20-tetrafenilporfirinatoniquel(II) (113c).

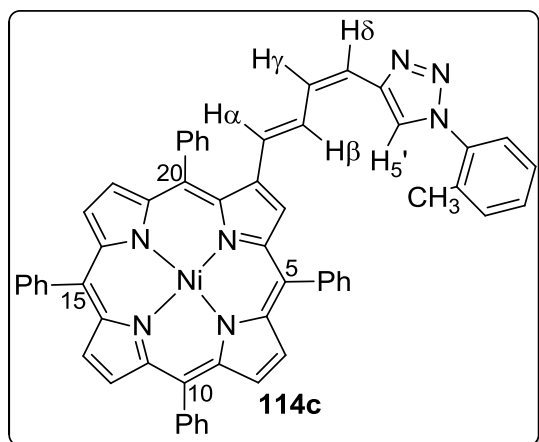
η = 12 %. **RMN de ^1H** (300 MHz, CDCl_3) δ 8,83 (d, J = 0,5 Hz, 1H, H-3), 8,75 – 8,63 (m,



6H, β -H), 8,03-7,97 (m, 6H, H-*o*-Ph-5,10,15), 7,90 (d, J = 6,8 Hz, 2H, H-*o*-Ph-20), 7,83 (s, 1H, H-5'), 7,78 – 7,57 (m, 15H, H-*m,p*-Ph-5,10,15,20 + H-*o,m,p*-Ph-*o*-CH₃), 6,98 (dd, J = 14,9, 10,5 Hz, 1H, H- β), 6,81 (dd, J = 15,3, 10,6 Hz, 1H,

H- γ), 6,65 (d, J = 15,3 Hz, 1H, H- δ), 6,21 (d, J = 14,9 Hz, 1H, H- α), 1,25 (s, 3H, CH₃). **UV-vis (CHCl_3):** λ_{max} (log ϵ) = 426 (5,74), 539 (4,64), 577 (4,51) nm. **HRMS-ESI:** m/z 879,2634 Calcd. para $\text{C}_{57}\text{H}_{39}\text{N}_7\text{Ni [M]}^+$ 879,2620.

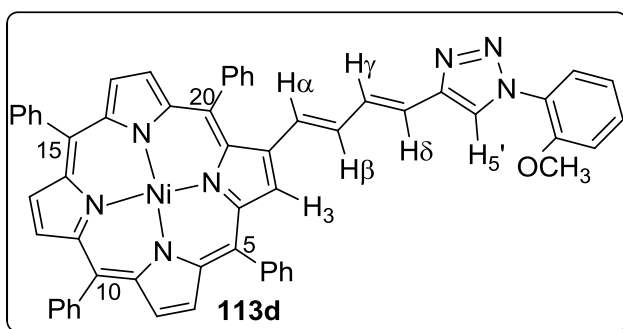
(1E,3Z)-2-{4-[1-(2-tolil)-1H-1,2,3-triazol-4-il]-1,3-butadien-1-il}-5,10,15,20-tetrafenilporfirinatoniquel(II) (114c).



η = 9 %. RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 8,79 – 8,61 (m, 7H, β -H), 8,13 – 7,92 (m, 6H, H-*o*-Ph-5,10,15), 7,82 (d, J = 6,7 Hz, 2H, H-*o*-Ph-20), 7,77 – 7,48 (m, 16H, H-*m,p*-5,10,15,20 + H-*o,m,p*-Ph-*o*- CH_3), 7,17-7,14 (m, 1H, H- β), 6,73 (d, J = 15,8 Hz, 1H, H- α), 6,27-6,10 (m, 2H, H- δ +H- γ), 1,25 (s, 3H, CH_3). UV-vis (CHCl_3): λ_{max} ($\log \epsilon$) = 423 (4,98), 537 (3,94), 571 (3,60) nm.

HRMS-ESI: m/z 879,2603 Calcd. para $\text{C}_{57}\text{H}_{39}\text{N}_7\text{Ni}$ $[\text{M}]^+$ 879,2620.

(1E,3E)-2-{4-[1-(2-metoxifenil)-1H-1,2,3-triazol-4-il]-1,3-butadien-1-il}-5,10,15,20-tetrafenilporfirinatoniquel(II) (113d).

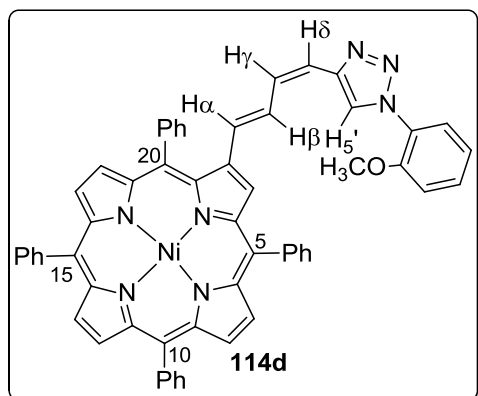


η = 21%. RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 8,83 (d, J = 0,5 Hz, 1H, H-3), 8,76 – 8,64 (m, 6H, β -H), 8,05 (s, 1H, H-5'), 8,03-7,98 (m, 6H, H-*o*-Ph-5,10,15), 7,90 (d, J = 6,8 Hz, 2H, H-*o*-Ph-20), 7,82 (dd, J = 7,8, 1,6 Hz, 1H, H-*o*-Ph- OCH_3), 7,78 – 7,62 (m, 12H, H-*m,p*-Ph-5,10,15,20), 7,51 – 7,39 (m, 1H, H-*p*-Ph- OCH_3), 7,14 (td, J = 8,7, 1,6 Hz, 2H, H-*m*-Ph- OCH_3), 6,99 (dd, J = 15,0, 10,5 Hz, 1H, H- β), 6,83 (dd, J = 15,5, 10,4 Hz, 1H, H- γ), 6,69 (d, J = 15,5 Hz, 1H, H- δ), 6,20 (d, J = 15,0 Hz, 1H, H- α), 3,95 (s, 3H, OCH_3). RMN ^{13}C (75,47 MHz, CDCl_3): δ 151,1, 151,0, 145,7, 144,0, 143,4, 142,7, 142,4, 142,3, 141,1, 140,8, 140,7, 140,5, 133,7 (C-*o*-Ph-5,10,15), 133,4 (C-*o*-Ph-20), 132,6 (C- γ), 132,5 (C-pirrónico), 132,3 (C-pirrónico), 132,1 (C-pirrónico), 130,0 (C-3), 130,1 (C- α) 129,5 (C-*p*-Ph- OCH_3), 129,4 (C-*m,p*-Ph-5,10,15,20), 129,3 (C-*m,p*-Ph-5,10,15,20), 128,3, 127,7, 127,2, 126,9, 126,9, 126,2, 125,4 (C-*o*-Ph- OCH_3), 122,5 (C-5'), 121,2 (C-*m*-Ph- OCH_3), 120,0 (C- δ), 119,2, 118,7, 118,5, 118,1, 112,3

(C- β), 56,0 (OCH₃). **UV-vis (CHCl₃):** λ_{\max} (log ϵ) = 427 (5,36), 540 (4,31), 578 (4,23) nm.

HRMS-ESI: m/z 895,2589. Calcd. para C₅₇H₃₉N₇NiO M⁺ 895,2570.

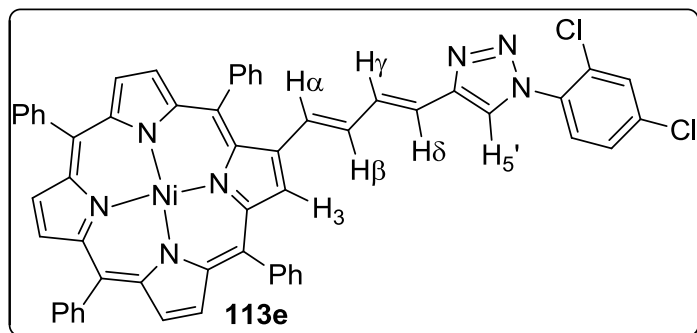
(1E,3Z)-2-{4-[1-(2-metoxifenil)-1H-1,2,3-triazol-4-il]-1,3-butadien-1-il}-5,10,15,20-tetrafenilporfirinatóniquel(II) (114d).



η = 19%. **RMN de ¹H** (300 MHz, CDCl₃) δ 8,76 – 8,66 (m, 7H, β -H), 8,07-7,98 (m, 7H, H-*o*-Ph-5,10,15 + H-5'), 7,86 – 7,75 (m, 3H, H-*o*-ph-20 + H-*o*-Ph-OCH₃), 7,72 – 7,52 (m, 13H, H-*m,p*-5,10,15,20 + H- β), 7,43-7,37 (m, 1H, H-*p*-Ph-OCH₃), 7,13-7,10 (m, 2H, H-*m*-Ph-OCH₃), 6,79 (d, J = 15,8 Hz, 1H, H- α), 6,24 – 6,09 (m, 2H, H- δ +H- γ), 3,79 (s, 3H, OCH₃).

RMN ¹³C (75,47 MHz, CDCl₃): δ 150,9, 146,4, 143,3, 142,7, 142,6, 142,4, 142,3, 142,3, 142,1, 140,8, 140,7, 140,7, 140,6, 140,5, 140,1, 140,0, 139,8, 138,9, 134,7, 134,7, 134,6, 133,8, 133,6 (C- β -pirrónico), 133,3 (C-pirrónico), 132,5 (C-pirrónico), 132,4 (C-pirrónico), 132,2, 132,1, 131,8, 131,8, 131,8, 130,0 (C-*p*-Ph-OCH₃), 128,3 (C- δ +C- γ), 128,1 (C- δ +C- γ), 128,0, 127,7, 127,1, 127,0, 126,9, 126,2, 125,4, 122,3 (C- α) 122,1 (C-*m*-Ph-OCH₃), 121,9 (C-*m*-Ph-OCH₃), 121,2, 119,2, 118,8, 118,7, 118,3, 112,1, 55,9 (OCH₃). **UV-vis (CHCl₃):** λ_{\max} (log ϵ) = 424 (5,39), 536 (4,34), 573 (4,04) nm. **HRMS-ESI:** m/z 895,2583. Calcd. para C₅₇H₃₉N₇NiO M⁺ 895,2570.

(1E,3E)-2-{4-[1-(2,4-diclorofenil)-1H-1,2,3-triazol-4-il]-1,3-butadien-1-il}-5,10,15,20-tetrafenilporfirinatóniquel(II) (113e).



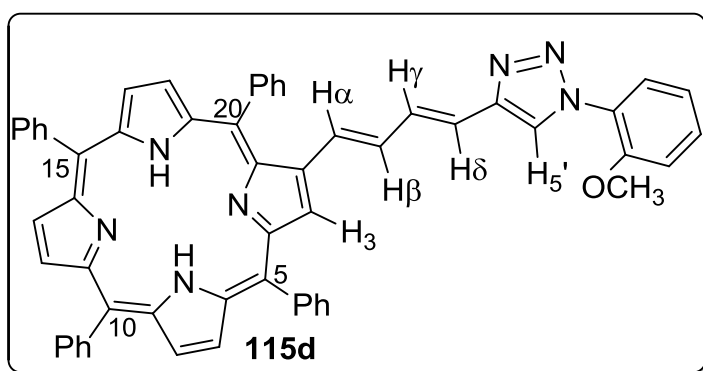
η = 9%. RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 884 (d, J = 0,4 Hz, 1H, H-3), 878 – 859 (m, 6H, β -H), 8,04 (s, 1H, H-5') 8,01-7,89 (m, 8H, H-*o*-Ph-5,10,15,10), 7,73-7,54 (m, 15H, H-*m,p*-5,10,15,10 + H-

o,m-Ph- Cl_2), 6,97 (dd, J = 15, 2, 10,5 Hz, 1H, H- β), 6,80 (dd, J = 15,9, 10,5 Hz, 1H, H- α), 6,67 (d, J = 15,9 Hz, 1H, H- δ), 6,23 (d, J = 15,2 Hz, 1H, H- γ). UV-vis (CHCl_3): λ_{max} (log ϵ) = 427 (5,24), 540 (4,31), 581 (4,16) nm. HRMS-ESI: m/z 933,1693. Calcd. para $\text{C}_{56}\text{H}_{35}\text{Cl}_2\text{N}_7\text{Ni M}^+$ 9332,1684.

4.5.12. Descomplexação dos derivados triazol-porfirina 113d e 114d.

Os derivados triazol-porfirina **113d** e **114d** (5 mg) foram dissolvidos em 3 mL de clorofórmio. De seguida adicionou-se, lentamente, o ácido sulfúrico (300 μL) e manteve-se a mistura reaccional em agitação e à temperatura ambiente durante 10 minutos. Findo este tempo, a solução foi neutralizada com uma solução aquosa de carbonato de sódio. A fase orgânica foi extraída com clorofórmio, lavada com água e seca através de sulfato de sódio anidro. O solvente foi evaporado a pressão reduzida e o resíduo foi cristalizado com clorofórmio/hexano, obtendo-se os derivados triazol-porfirina **115d** e **116d** com cerca de 99% de rendimento.

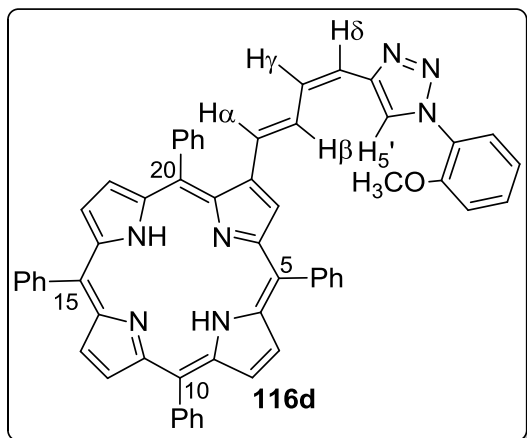
(1E,3E)-2-{4-[1-(2-metoxifenil)-1H-1,2,3-triazol-4-il]-1,3-butadien-1-il}-5,10,15,20-tetrafenilporfirina (115d).



η = 99 %. RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 8,92 (s, 1H, H-3), 8,82 – 8,76 (m, 6H, β -H), 8,45 (s, 1H, H-5'), 8,33-8,09 (m, 6H, H-*o*-Ph-5,10,15), 7,98

(d, $J = 6,8$ Hz, 2H, H-*o*-Ph-20), 7,92 (dd, $J = 7,8, 1,6$ Hz, 1H, H-*o*-Ph-OCH₃), 7,82 – 7,70 (m, 12H, H-*m,p*-Ph-5,10,15,20), 7,68 – 7,42 (m, 1H, H-*p*-Ph-OCH₃), 7,41 (td, $J = 8,7, 1,6$ Hz, 2H, H-*m*-Ph-OCH₃), 7,09 (dd, $J = 15,0, 10,5$ Hz, 1H, H- β), 6,98 (dd, $J = 15,5, 10,5$ Hz, 1H, H- α), 6,70 (d, $J = 15,5$ Hz, 1H, H- δ), 6,45 (d, $J = 15,0$ Hz, 1H, H- γ), 3,98 (s, 3H, OCH₃), -2,58 (s, 2H, NH). **UV-vis (CHCl₃):** λ_{\max} (log ϵ) = 427 (100), 522 (12,9), 563 (13,6), 599 (11,8) 649 (7,69) nm. **HRMS-ESI:** m/z 840,3446 Calcd. para C₅₇H₄₂N₇O [M+H]⁺ 840,3445.

(1E,3Z)-2-{4-[1-(2-metoxifenil)-1H-1,2,3-triazol-4-il]-1,3-butadien-1-il}-5,10,15,20-tetrafenilporfirina (116d).



$\eta = 99$ %. **RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃)** δ 8,95 (s, 1H, H-3), 8,83-8,76 (m, 6H, β -H), 8,30 – 8,16 (m, 6H, H-*o*-Ph-5,10,15), 8,13 (d, $J = 7,0$ Hz, 2H, H-*o*-Ph-20), 8,08 (s, 1H, H-5'), 7,87 – 7,71 (m, 13H, H-*m,p*-Ph-5,10,15,20 + H- β), 7,56 – 7,43 (m, 1H, H-*p*-Ph-OCH₃), 7,16-7,13 (m, 2H, H-*m*-Ph-OCH₃), 6,75 (d, $J =$

15,5 Hz, 1H, H- α), 6,35 – 6,30 (m, 2H, H- δ +H- γ), 3,97 (s, 3H, OCH₃), -2,60 (s, 2H, NH).

UV-vis (CHCl₃): λ_{\max} (log ϵ) = 424(100), 521 (12,6), 562 (13,2), 597 (10,9) 647 (7,09) nm.

HRMS-ESI: m/z 840,3407 Calcd. para C₅₇H₄₂N₇O [M+H]⁺ 840,3445.

4.6. Referências Bibliográficas

1. Connon, S.J.; Blechert, S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 1900-1923.
2. *Handbook of Metathesis* Robert Grubbs (Eds.), Vol. 1-3, Wiley-VCH Verlag GmbH Co: Weinheim, **2003**.
3. Ivin, K.J.; Mol, J.C. In *Olefin metathesis and metathesis polymerization*, Academic Press: New York, **1997**.
4. Frederico, D.; Brockson, U.; Brockson, J.; *Quim. Nova* **2005**, *28*, 692-702.
5. Banks, R.L.; Bailey, G.C. *Ind. Eng. Chem. Prod. Res. De.* **1964**, *3*, 170-173.
6. Calderon, N.; Chen, H.Y.; Scott, K.W. *Tetrahedron Lett.* **1967**, 3327-3329.
7. Hérisson, J.L.; Chauvin, Y. *Makromol. Chem.* **1971**, *141*, 161-176.
8. Schrock, R.R. *Handbook of Metathesis* Robert Grubbs (Eds.), Vol. 1, pp. 8-29, Wiley-VCH Verlag GmbH Co: Weinheim, **2003**.
9. Nolan, S.P.; Clavier, H. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 3305-3316.
10. Werner, H.; Wolf, J. *Handbook of Metathesis* Robert Grubbs (Eds.), Vol. 1, pp. 95-109, Wiley-VCH Verlag GmbH Co: Weinheim, **2003**.
11. http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2005/grubbs.html
12. Schrodi, Y.; Pederson, R. L.; *Aldrichimica Acta* **2007**, *40*, 45-52.
13. İmamoglu, Y.; Dragutan, V. In *Metathesis Chemistry From Nanostructure Design to Sustainable Technologies for Synthesis of Advanced Materials*, Solmaz Karabulut (Ed.), Springer: Antalya, **2006**.
14. Calderon, N.; Ofstead, E.; Ward, S. P.; Judy, W. A.; Scott, K. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, *90*, 4133-4140.
15. Lewandos, G. S.; Pettit, R. *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 7087-7088.
16. (a) Mulholland, A.R.; Woodward, C.P.; Langford, S.J. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 1494-1496. (b) Hajjaj, F.; Tashiro, K.; Nikawa, H.; Mizorogi, N.; Akasaka, T.; Nagase, S.; Furukawa, K.; Kato, T.; Aida, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 9290-9292. (c) Sergeeva, N.N.; Bakar, M.B.; Senge, M.O. *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 1488-1497. (d) Youm, K.T.; Nguyen, S.T.; Hupp, J.T. *Chem. Commun.* **2008**, 3375-3377. (e) Dy, J.; Ogawa, K.; Kamada, K.; Ohtab, K.; Kobuke, Y. *Chem. Commun.* **2008**, 3411-3413. (f) Satake, A.; Yamamura, M.; Oda, M.; Kobuke, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 6314-6315. (g) Langford, S.J.; Latter, M.J.; Woodward, C.P. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 2595-2598. (h) Gerven, P.C.M.; Elemans, J.A.A.W.; Gerritsen, J.W.; Speller, S.; Nolte, R.J.M.; Rowan, A.E. *Chem. Commun.* **2005**, 3535-3537. (i) Ikeda, C.; Satake, A.; Kobuke, Y. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 4535-4938.

17. Sol, V.; Chaleix, V.; Granet, R.; Krausz, P. *Tetrahedron* **2008**, *64*, 364–371.
18. Zheng, G.; Dougherty, T.J.; Pandey, R.K. *Chem. Commun.* **1999**, 2469–2470.
19. (a) Bonnett, R. In *Chemical Aspects of Photodynamic Therapy*, Gordon and Breach Science Publishers: London, **2000**, 177. (b) Moser, J. G. In *Photodynamic Tumour Therapy – 2nd and 3rd Generation Photosensitizers*, Harwood Academic Publishers: Amsterdam, **1998**.
20. Zheng, G.; Graham, A.; Shibata, M.; Missert, J.R.; Oseroff, A.R.; Dougherty, T.J.; Pandey, R.K. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 8709–8716.
21. Silva, F.C.; Ferreira, V.F.; Souza, M.C.B.V.; Tomé, A.C.; Neves, M.G.P.M.S.; Silva, A.M.S.; Cavaleiro, J.A.S. *Synlett* **2008**, *8*, 1205–1207.
22. Liu, X.; Sternberg, E.; Dolphin, D. *Chem. Commun.* **2004**, 852–853.
23. Liu, X.; Sternberg, E.; Dolphin, D. *J. Org. Chem.* **2008**, *78*, 6542–6550.
24. Jiao, L.; Hao, E.; Fronczek, F. R.; Vicente, M. G. H.; Smith, K. M. *Chem. Commun.* **2006**, 3900–3902.
25. Bhosalea, S.V.; Kalyankarb, M.B.; Bhosaleb, S.B.; Patila, S.G.; Lalandera, C.H.; Langforda, S.J.; Nalage, S.V. *Supramol. Chem.* **2011**, *23*, 263–268.
26. (a) Cavaleiro, J.A.S.; Tomé, J.P.C.; Faustino, M.A.F. *Top. in Heterocycl. Chem.* **2007**, *7*, 179–248; (b) X. Xeng, R. Q. Pandey. *Anti-cancer Agents Med. Chem.* **2008**, *8*, 241–268.
27. (a) Srivastava, B. K.; Solanki, M.; Mishra, B.; Soni, R.; Jayadev, S.; Valani, D.; Jain, M.; Patel, P. R. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 1924–1929. (b) Pandey, R.K.; Zheng, G.; Porphyrins as Photosensitizers in Photodynamic Therapy. In *The Porphyrin Handbook Applications: Past, Present and Future*, vol. 6. Academic Press: San Diego, **2000**.
28. Zhang, Q., Peng, Y.; Wang, X.I.; Keenan, S.M.; Arora, S.; Welsh, W.J. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 749.
29. Alvarez, R.; Velazquez, S.; San-Felix, A.; Aquaro, S.; Clercq, E.D.; Perno, C.F.; Karlson, A.; Balzarini, J.; Camarasa, M.J. *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 4185–4194.
30. Genin, M.J.; Allwine, D.A.; Anderson, D.J.; Barbachyn, M.R.; Emmert, D.E.; Garmon, S.A.; Graber, D.R.; Grega, K.C.; Hester, J.B.; Hutchinson, D.K.; Morris, J.; Reischer, R.J.; Ford, C.W.; Zurenko, G.E.; Hamel, J.C.; Schaadt, R.D.; Stapert, D.; Yagi, B.H. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 953–970.
31. Para ver alguns exemplos consultar: (a) Meudtner, R.M.; Ostermeier, M.; Goddard, R.; Limberg, C.; Hecht, S.; *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 9834–9840. (b) Genady, A.R.; Gabel D. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44* 2915–2917. (c) Kimura, M.; Nakano, Y.; Adachi, N.; Tatewaki, Y.; Shirai, H.; Kobayashi, N. *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 2617–2624. (d) Fazio, M.A.; Lee, O.P.; Schuster, D.I. *Org. Lett.* **2008**, *10*, 4979–4982. (e) Maeda, C.; Yamaguchi, S.; Ikeda, C.; Shinokubo, H.;

- Osuka, A. *Org. Lett.* **2008**, *10*, 549-552. (f) Punidha, S.; Sinha, J.; Kumar, A.; Ravikanth, M. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 323-326. (g) Lacerda, P.S.S.; Silva, A.M.G.; Tomé, A.C.; Neves, M.G.P.M.S.; Silva, A.M.S.; Cavaleiro, J.A.S.; Llamas-Saiz, A.L. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 5487-5491.
32. (a) Buchler, J.W. *The Porphyrins*; Dolphin, D. Ed.; Academic Press: New York, **1978**, volume 1, pp. 389-483. (b) Buchler, J.W. *Porphyrins and Metalloporphyrins*; Smith, K. Ed.; Elsevier: Amsterdam, **1975**.
33. Bonfantini, E. E.; Burrell, A.K.; Campbell, W.M.; Crossley, M.J.; Gosper, J.J.; Harding, M.M.; Officer, D.L.; Reid, D.C.W. *J. Porphyrins Phthalocyanines* **2002**, *6*, 708-719.
34. Brückner, R. In *Advanced Organic Chemistry-Reaction Mechanisms*, Academic Press: London, **2002**, pp. 169-219.
35. (a) Faustino, M. A. F.; Neves, M. G. P. M. S.; Tomé, A. C.; Silva, A. M. S.; Cavaleiro, J. A. S. *ARKIVOC* **2005**, (ix), 332-343. (b) Arnold, D. P.; Gaete-Holmes, R.; Johnson, A. W.; Smith, A. R. P.; Williams, G. A. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1978**, 1660-1670.
36. Callot, H. J. *Tetrahedron* **1973**, *29*, 899-901.
37. Bruckner, R. *Advanced Organic Chemistry-Reaction Mechanisms*, Academic Press: London, **2002**, pp.355.
38. Silva, A.M.G.; Oliveira, K.T.; Faustino, M.A.F.; Neves, M.G.P.M.S.; Tomé, A. C.; Silva, A.M.S.; Cavaleiro, J.A.S.; Felix, V. *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 704-712.
39. Boechat; N.; Ferreira, V.F.; Ferreira, C.B.; Ferreira, M.L.G.; Silva, F.C.; Bastos, M.B.; Costa, M.S.; Lourenço, M.C.S.; Pinto, A.C.; Krettli, A.U.; Aguiar, A.C.; Teixeira, B.M.; Silva, N.V.; Martins, P.R.C.; Bezerra, F.A.F.M.; Camilo, A.L.S.; Silva, G.P.; Costa, C.C.P. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 5988-5999.
40. Furstne, A.; Langemann, K. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 9130-9136.
41. Cavaleiro, J. A. S.; Tomé, A. C.; Neves, M. G. P. M. S. In *Handbook of Porphyrin Science*; Vol. 2; Kadish, K.; Smith, K. M.; Guillard, R., Eds.; World Scientific Publishing Company: Singapore, **2010**.
42. Collins, S. K., Grandbois, A., Vachon, M.P., Côté, J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 2923-2926.
43. Kawai, T.; Shida, Y.; Yoshida, H.; Abe, J.; Iyoda, T. *J. Mol. Catal. A: Chem.* **2002**, *190*, 33-43.
44. (a) Hong, S.H.; Sanders, D.P.; Lee, X.W.; Grubbs, R.H. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 17160-17161. (b) Hong, S.H.; Day, M.W.; Grubbs, R.H. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 7414-7415.
45. Ulman, M.; Grubbs, R.H. *Organometallics*, **1998**, *17*, 2484-2489.
46. Trnka, T.R.; Grubbs, R. H. *Acc. Chem. Res.* **2001**, *34*, 18-29

47. (a) Bonnett, R. In *Chemical Aspects of Photodynamic Therapy*, Gordon and Breach Science Publishers: London, **2000**, 177. (b) Moser, J. G. In *Photodynamic Tumour Therapy – 2nd and 3rd Generation Photosensitizers*, Harwood Academic Publishers: Amsterdam, **1998**.
48. Chatterjee, A. K.; Choi, T.; Sanders, D. P.; Grubbs, R. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 11360-11370.
49. Jori, G; Berg, K.; Young, A. R., In *The Fundamental Bases of Phototherapy*, OEMF spa, Milano, **1996**; 1.