

Ana Rita Rodrigues Familiar de Sousa Ferreira

# CLORINAS E BACTERIOCLORINA FUNDIDAS COM O ANEL 4,5,6,7-TETRA-HIDROPIRAZOLO[1,5-*a*] PIRIDINA COMO NOVOS FOTOSSENSIBILIZADORES PARA O TRATAMENTO DO CANCRO

Mestrado em Química Medicinal

Departamento de Química  
FCTUC

Junho 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA







Ana Rita Rodrigues Familiar de Sousa Ferreira

**CLORINAS E BACTERIOCLORINA  
FUNDIDAS COM O ANEL 4,5,6,7-TETRA-  
HIDROPIRAZOLO[1,5- $\alpha$ ]PIRIDINA COMO  
NOVOS FOTOSSENSIBILIZADORES PARA O  
TRATAMENTO DO CANCRO**

Dissertação apresentada para provas de Mestrado em Química  
Medicinal

Orientadora: Teresa Margarida de Vasconcelos Dias de Pinho e Melo

Junho 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA



*Aos meus pais e ao meu irmão*





## AGRADECIMENTOS

À Professora Doutora Teresa Margarida Vasconcelos de Pinho e Melo, orientadora deste trabalho, pelos ensinamentos transmitidos, atenção, disponibilidade e apoio sempre demonstrados.

Ao Doutor Néilson António Melo Pereira e à Doutora Susana Margarida Martins Lopes, que mesmo não sendo meus co-orientadores, estiveram sempre disponíveis e me auxiliaram no laboratório.

À Professora Doutora Marta Piñeiro, agradeço por toda a disponibilidade e apoio demonstrado na realização dos estudos fotofísicos, pela paciência, incentivo e autoconfiança que sempre me transmitiu.

Ao Doutor Rui Brito e ao Pedro Cruz pela colaboração nos estudos de ressonância magnética nuclear.

A todas as pessoas do grupo de Síntese Orgânica, em especial à Doutora Ana Lúcia, à Dora Costa e à Fernanda Laia pelo bom humor e incentivo constante, à Rita Félix e à Cristina Chaves pela ajuda, apoio e principalmente pela amizade. À Dona Lurdes pelo trabalho de preparação dos solventes que necessitava e sobretudo pelo seu bom humor.

Às minhas colegas de casa Joana e Sara pela amizade, ajuda e apoio incondicional durante o meu trajeto universitário.

À Joana Campos, o meu muito obrigada por ter estado sempre tão presente.

Aos meus restantes amigos, em especial à Bárbara, que apesar de estarmos longe sempre se mostrou tão perto.

A todos aqueles que de uma forma ou de outra fizeram parte da minha vida nestes últimos anos e deixaram a sua marca.

Aos meus padrinhos, ao meu primo Diogo, à minha tia Celeste e à Marina por toda a motivação e apoio sempre transmitidos.

Por fim, um agradecimento muito especial aos meus pais e ao meu irmão por todo o amor, carinho, apoio, paciência, dedicação e incentivo e ao Roberto, por estar sempre do meu lado em todos os momentos.



# ÍNDICE

RESUMO	i
ABSTRACT	iii
ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	v
NOMENCLATURA	vii
CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO	
1.1.Cancro e terapia fotodinâmica	3
1.1.1. Características de um fotossensibilizador	11
1.1.2. À procura do fotossensibilizador ideal	15
1.2.Porfirinas, clorinas e bacterioclorinas	17
1.2.1. Porfirinas	18
1.2.1.1.Métodos de Síntese	19
1.2.2. Clorinas e bacterioclorinas	21
1.2.2.1.Redução de porfirinas	22
1.2.2.2.Oxidação de porfirinas	23
1.2.2.3.Reações de cicloadição	24
1.2.2.3.1. Reação de Diels-Alder	24
1.2.2.3.2. Reação de cicloadição 1,3-dipolar	25
1.2.2.3.3. Reação de cicloadição 1,7-dipolar	27
CAPÍTULO 2 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	
2.1.Objetivos	31
2.2.Reação de aniões metil diazafulvénio com porfirinas para obtenção de clorinas e bacterioclorinas	35
2.3.Estudos preliminares das características fotofísicas	49
CAPÍTULO 3 – CONCLUSÃO E PERSPETIVAS FUTURAS	59
CAPÍTULO 4 – PARTE EXPERIMENTAL	
4.1.Aparelhagem utilizada	65
4.2.Solventes e reagentes	66
4.3.Síntese dos compostos	67
4.3.1. Síntese dos precursores dos aniões metil diazafulvénio	67
4.3.2. Síntese das porfirinas	70
4.3.3. Síntese das clorinas e bacterioclorina	71
4.3.4. Síntese dos derivados hidroxilados das clorinas e bacterioclorina	74
4.4.Estudos preliminares das características fotofísicas	78
CAPÍTULO 5 – BIBLIOGRAFIA	79
ANEXOS	85



## RESUMO

A terapia fotodinâmica (PDT, do inglês, *photodynamic therapy*) constitui uma modalidade terapêutica promissora no combate ao cancro, apresentando maior seletividade e menos efeitos secundários relativamente às terapias convencionais (cirurgia, quimioterapia e radioterapia). O efeito terapêutico desta terapia resulta da associação de três componentes: fotossensibilizador, luz e oxigénio.

Os derivados porfirínicos, clorinas e bacterioclorinas, apresentam uma forte absorção na “janela terapêutica” (650-850 nm) e quando excitados pela luz, produzem espécies reativas de oxigénio (ROS, do inglês, *reactive oxygen species*), as quais podem destruir o tecido lesado. Estas características permitem que as clorinas e bacterioclorinas sejam utilizados como fotossensibilizadores em PDT.

Recentemente, Pinho e Melo e seus investigadores desenvolveram um processo sintético que permitiu a preparação de clorinas e bacterioclorinas fundidas com o anel tetrahidropirazolo[1,5-*a*]piridina, as quais apresentaram uma elevada estabilidade. Os estudos *in vitro* de algumas destas clorinas mostraram que elas poderão ser utilizadas como fotossensibilizadores em PDT contra as células de cancro do melanoma. Estes resultados positivos justificam estudos adicionais para obter novos derivados de clorinas e bacterioclorinas.

Este trabalho tinha como objetivo principal explorar a síntese de novos derivados de *meso*-tetraarilclorinas e bacterioclorina fundidos com o anel 4,5,6,7-tetra-hidropirazolo[1,5-*a*]piridina funcionalizados com grupos ésteres. Estes foram obtidos de forma seletiva, através da cicloadição [ $8\pi+2\pi$ ] entre diferentes porfirinas e aniões metil diazafulvénio, gerados a partir da extrusão térmica de dióxido de enxofre de 2,2-dioxo-1*H*,3*H*pirazolo[1,5-*c*][1,3]tiazoles. Para aumentar a hidrofiliabilidade das clorinas e da bacterioclorina e assim, a sua possível aplicação em PDT, os grupos ésteres foram reduzidos a álcoois.

Estudos preliminares das características fotofísicas mostraram que as clorinas preparadas neste trabalho apresentam uma intensa banda de absorção a 650 nm, apresentando uma das características adequadas para a sua possível utilização na terapêutica.



## ABSTRACT

Photodynamic therapy (PDT) is a promising technique to combat cancer with high selectivity and less side effects than traditional therapies (surgery, chemotherapy and radiotherapy). The therapeutic effect results from the combination of three components: a photosensitizer, light and oxygen.

Porphyrin derivatives, chlorins and bacteriochlorins, have a strong absorbance within the phototherapeutic window (650-850 nm) and when excited by light, produce reactive oxygen species (ROS) that can destroy the diseased tissue. These characteristics make them ideal photosensitizers to be used in PDT.

Recently, Pinho e Melo and co-workers reported a synthetic methodology which allowed the preparation of a new type of stable 4,5,6,7-tetrahydropyrazolo[1,5-*a*]pyridine-fused chlorins and bacteriochlorins. The first results regarding the *in vitro* study of some of these chlorins showed that they are promising photosensitizers to be used in PDT against melanoma cancer cells. These positive results justify further studies in order to obtain new chlorins and bacteriochlorins derivatives.

The present work aimed at developing new *meso*-tetraarylchlorins and bacteriochlorin derivatives fused with 4,5,6,7-tetrahydropyrazolo[1,5-*a*]pyridine ring functionalized with ester groups. These were obtained selectively by cycloaddition [ $8\pi+2\pi$ ] between different porphyrins and diazafulvenium methides, generated by thermal extrusion of sulfur dioxide from 2,2-dioxo-1*H*,3*H*pyrazol[1,5-*c*]thiazoles. To increase the hydrophilicity of chlorins and bacteriochlorin and thus to potential application in PDT, the ester groups were reduced to alcohols.

Preliminary studies of photophysical characteristics showed that the chlorins prepared in this work exhibit an intense absorption band at 650 nm, thus they have one of the appropriate features for their possible use in therapy.





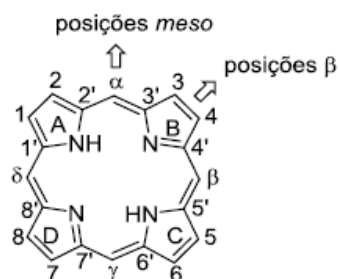
## ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ADPMs	<i>Tetra-aryl-azadipyrromethenes</i>
d	Dupleto
dd	Duplo dupleto
DDQ	2,3-diciano-5,6-dicloro-1,4-benzoquinona
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
EMAR	Espetrometria de Massa de Alta Resolução
equiv.	Equivalentes
ESI	<i>ElectroSpray Ionisation</i>
HbO <sub>2</sub>	Oxihemoglobina
HOMO	<i>Highest Occupied Molecular Orbital</i>
Hp	<i>Hematoporphyrin</i>
HpD	<i>Hematoporphyrin derivative</i>
IC <sub>50</sub>	<i>Half maximal inhibitory concentration</i>
IE	Impacto eletrônico
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
IV	Espetroscopia de Infravermelho
LUMO	<i>Lowest Unoccupied Molecular Orbital</i>
m	Multiplete
M	lão molecular
MCPBA	Ácido 3-cloroperoxibenzóico
MW	<i>Microwave</i>
NIR	<i>Near Infrared</i>
PDT	<i>Photodynamic Therapy</i>
P.f.	Ponto de fusão
ppm	Partes por milhão
PS	<i>Photosensitizer</i>
q	Quarteto
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
RMN <sup>1</sup> H	Ressonância Magnética Nuclear de Protão
RMN <sup>13</sup> C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
s	Singuleto
sl	Singuleto largo
t	Triplete
t.a.	Temperatura ambiente
TFA	<i>Trifluoroacetic acid</i>
TFAA	<i>Trifluoroacetic anhydride</i>
TLC	<i>Thin layer chromatography</i>

TMS	Tetrametilsilano
UV-Vis	Espectroscopia de Ultravioleta-Visível
$\delta$	Desvio químico em ppm
$\lambda$	Comprimento de onda
$\lambda_{\max}$	Comprimento de onda onde a absorvância é máxima
$\epsilon$	Coefficiente de absorvidade molar
$^{\circ}\text{C}$	Graus centígrados

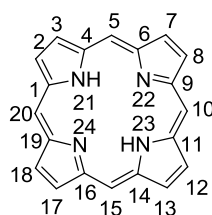
## NOMENCLATURA<sup>I-V</sup>

Atualmente podem ser distinguidos dois sistemas de nomenclatura para os macrociclos tetrapirrólicos. Um proposto por H. Fischer e outro, bem mais recente, proposto pela IUPAC (do inglês *International Union of Pure and Applied Chemistry*). No primeiro, as unidades pirrólicas são identificadas pelas letras A, B, C, D e cada unidade pirrólica é constituída na periferia por carbonos nas posições  $\beta$ -pirrólicas, numerados de 1 a 8. Os carbonos metínicos (que estabelecem a ligação entre as unidades pirrólicas) são designados pelas letras gregas  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ , situando-se nas posições *meso*. Os carbonos adjacentes aos azotos são denominados por  $\alpha$ -pirrólicos e são numerados de 1' a 8' (Figura I). O mesmo autor adotou ainda nomes triviais para um vasto número de compostos desta família, geralmente atribuídos tendo em atenção a ocorrência natural dos mesmos ou a (dis)função metabólica associada (como por exemplo, uroporfirina isolada da urina de doentes com porfíria, uma disfunção do metabolismo de porfirinas).

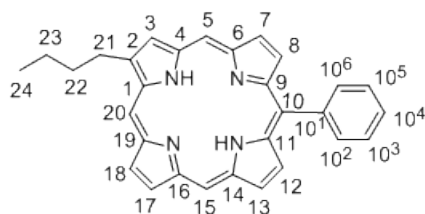


**Figura I.** Sistema de numeração do macrociclo tetrapirrólico proposto por H. Fischer.

Devido ao grande desenvolvimento da química das porfirinas foi necessário criar, em 1979, um novo sistema de nomenclatura, surgindo assim, o sistema proposto pela IUPAC. Neste os carbonos são numerados de 1 a 20 e os azotos pirrólicos de 21 a 24. As posições 2, 3, 7, 8, 12, 13, 17 e 18 correspondem aos carbonos  $\beta$ , as posições 1, 4, 6, 9, 11, 14, 16 e 19 aos carbonos  $\alpha$  pirrólicos e as posições 5, 10, 15 e 20 aos carbonos *meso* (Figura II). Quando o macrociclo é substituído, os grupos substituintes são referenciados pelo número do átomo de carbono ao qual se encontram ligados e ordenados alfabeticamente, sendo os números dos carbonos dos grupos substituintes representados em expoente (Figura III). No entanto, a IUPAC admite a utilização de uma nomenclatura semi-sistemática, onde é permitida a utilização dos nomes triviais propostos por Fischer. Os nomes IUPAC dos derivados porfirínicos 2,3-di-hidroporfirinas e 7,8,17,18-tetra-hidroporfirinas podem também ser substituídos pelos respectivos nomes triviais clorina e bacterioclorina (Figura IV).



**Figura II.** Sistema de numeração do macrocíclico tetrapirrólico proposto pela IUPAC.

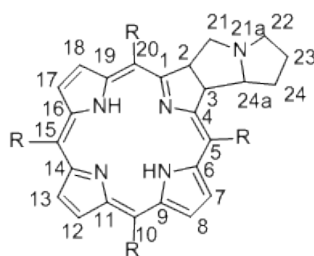


**Figura III.** Sistema de numeração do macrociclo base e substituintes proposto pela IUPAC.



**Figura IV.** Derivados porfirínicos: clorina e bacterioclorina.

Nesta tese foi utilizada a nomenclatura da IUPAC recorrendo, em certos casos, aos nomes triviais por simplificação. Na numeração das clorinas e bacterioclorinas com anéis fundidos seguimos a nomenclatura adotada neste tipo de sistemas (Figura V).



**Figura V.** Numeração das clorinas e bacterioclorinas com anéis fundidos.

A nomenclatura do anião metil azafulvênio foi adotada do inglês *azafulvenium methide* considerando o catião azafulvênio como um substituinte do anião metilo.

Na escrita da tese foi adotado o plural “les” para compostos heterociclos em que o singular é “le”, de modo a ficar mais próximo do inglês (Exemplo: pirrole-pirroles, pirazole-pirazoles).

<sup>I</sup> G.P. Moss. *Pure Appl. Chem.* **1987**, *59*, 779-836.

<sup>II</sup> L. R. Milgrom. *The colours of Life: an Introduction to the Chemistry of Porphyrins and Related Compounds*. Oxford University Press: Oxford, **1997**.

<sup>III</sup> David Dolphin. *The Porphyrins: Structure and Synthesis Part A*. Academic Press Inc: Nova Iorque, **1978**.

<sup>IV</sup> Ana M. G. Silva; Augusto C. Tomé; Maria G. P. M. S. Neves; Artur M. S. Silva; José A. S. Cavaleiro. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 2306-2314.

<sup>V</sup> Maria Isabel Lopes Soares, *A química de dipolos conjugados na síntese de pirróis e pirazóis*. Tese de Doutoramento, Universidade de Coimbra, **2007**.

# **CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO**



## 1.1. Cancro e terapia fotodinâmica

O termo cancro, também denominado de tumor maligno ou neoplasia maligna, diz respeito a um conjunto de doenças muito heterogéneo e multifatorial que têm em comum o facto de apresentarem sempre o crescimento de um tecido neoformado.<sup>1,2</sup>

O aparecimento do cancro está normalmente associado a alterações dos mecanismos que regulam a divisão celular. Em cada momento, cada organismo pluricelular é o resultado de um equilíbrio que se gera entre a proliferação celular e a morte celular. Quando este equilíbrio se rompe, pode surgir um cancro - uma divisão descontrolada, com as células a dividirem-se e a multiplicarem-se rapidamente e aleatoriamente.<sup>1,2</sup>

Com base nas características das células tumorais podemos definir dois tipos de tumores: os benignos e os malignos. Os tumores benignos não invadem os tecidos adjacentes sendo, por isso, geralmente inofensivos. Contrariamente os tumores malignos proliferam muito rapidamente, invadem os tecidos adjacentes e formam tumores secundários – metastização. A metastização é favorecida pela angiogénese, um processo complexo que envolve a formação de novos vasos sanguíneos, responsáveis pela rápida proliferação das células tumorais. A capacidade para distinguir entre tumores malignos e benignos é crucial na determinação da escolha do tratamento mais adequado.<sup>3-6</sup>

Embora todos os cancros sejam genéticos, isto é, resultarem de alterações mais ou menos complexas e sucessivas da informação genética numa determinada célula (como por exemplo: erros durante a replicação do DNA, instabilidade das bases azotadas que constituem a dupla hélice do DNA ou a ação de radicais livres formados durante o metabolismo celular), os cancros hereditários são muito raros. Neste caso a alteração genética está presente em todas as células do indivíduo, manifestando-se muito cedo. A maioria dos cancros (cerca de 95%) é designada por cancro esporádico e surge como resultado de mutações somáticas. Estas mutações ocorrem devido às interações que se estabelecem entre o genoma do indivíduo e o ambiente que o rodeia (dieta, fumo do tabaco, sol, poluição atmosférica, etc). A componente genética e a componente ambiental estão sempre presentes assumindo uma importância diferente consoante o cancro.<sup>1,2,5,6</sup>

Em 2012 foram detetados cerca de 14,1 milhões de novos casos de cancro e 8,2 milhões de mortes em todo o mundo.<sup>7</sup> A taxa de incidência do cancro nos países desenvolvidos é aproximadamente o dobro da verificada nos países em desenvolvimento. No entanto, as taxas de mortalidade não seguem a mesma tendência, refletindo assim, as diferenças existentes nas práticas de diagnóstico e tratamento aplicadas em ambas as classes demográficas.<sup>8,9</sup>

Estima-se que em 2030 sejam diagnosticados 23,6 milhões de doentes com cancro em todo o mundo, o que corresponde a um aumento de 68% dos casos em relação a 2012. Prevê-se que ocorra um aumento de 66% dos casos nos países em desenvolvimento e nos países desenvolvidos este aumento será de 56%.<sup>7</sup>

Para um tratamento bem-sucedido do cancro, para além de ser fundamental um diagnóstico precoce é essencial provocar a morte das células tumorais e assim, inibir a sua proliferação. As terapias convencionais desta patologia, nomeadamente a cirurgia, quimioterapia e radioterapia são eficazes em alguns estádios da doença e, em alguns casos,

proporcionam um considerável aumento no tempo de vida do doente. Mas apesar deste relativo sucesso, estes tratamentos invasivos apresentam efeitos secundários uma vez que, para além de destruírem as células cancerígenas, afetam os tecidos saudáveis circundantes. Outro obstáculo inerente a estas terapêuticas é a possível resistência das células cancerígenas ao tratamento. Deste modo, é de enorme importância o desenvolvimento de terapias não invasivas, bastante localizadas, que permitam a destruição mais seletiva das células tumorais (minimizando e/ou eliminando os efeitos secundários) e que possibilitem o tratamento de tumores resistentes às terapias convencionais. Surge assim a terapia fotodinâmica (PDT, do inglês, *photodynamic therapy*) como uma abordagem terapêutica bastante promissora.<sup>10</sup>

Apesar da sua utilização limitada, a PDT está aprovada para aplicação em determinados tipos de doenças oncológicas e não-oncológicas. Relativamente às doenças oncológicas, a PDT pode constituir uma alternativa às terapias convencionais, nomeadamente à quimioterapia e radioterapia.<sup>11</sup>

O uso da luz como terapia na medicina teve a sua origem nas antigas civilizações da Grécia, Egipto e Índia. Estes povos combinavam a luz com o efeito dos extratos de plantas (por exemplo, psoraleno) para o tratamento da psoríase e cancro da pele.<sup>12,13</sup> Na Alemanha, em 1900, Oscar Raab, estudante de doutoramento sob a orientação de Hermann von Tappeiner, observou que a combinação da luz solar com o corante acridina culminava na morte de alguns microorganismos, nomeadamente paramécias. Sendo que na ausência da luz este corante não tinha qualquer efeito.<sup>12,13</sup>

Na Dinamarca, Niels Finsen desenvolveu a fototerapia no tratamento de doenças da pele e os seus trabalhos permitiram-lhe receber o prémio Nobel da Medicina, em 1903.<sup>12,13</sup> Nesse mesmo ano, von Tappeiner e Jesionek realizaram a primeira aplicação clínica da terapia fotodinâmica, administrando topicamente a eosina e aplicando luz para o tratamento do cancro da pele não-melanoma.<sup>12,13</sup>

Em 1907, von Tappeiner definiu a “ação fotodinâmica” (terapia fotodinâmica) como sendo a interação entre a luz, uma substância fotossensibilizadora e moléculas de oxigénio.<sup>12,13</sup>

Policar, em 1924, observou que as porfirinas (hematoporfirina) podiam ser encontradas em elevadas concentrações em tumores malignos. Ele observou também que as porfirinas se tornavam citotóxicas para os tecidos humanos apenas na presença de luz visível e oxigénio.<sup>14</sup> Durante vários anos utilizou-se a hematoporfirina (Hp) como agente fotossensibilizador porém, em 1955, Samuel Schwartz demonstrou que esta porfirina era, na verdade, uma mistura complexa de porfirinas.<sup>12,15</sup>

No início de 1960, Richard Lipson e Edward Baldes utilizaram os derivados da hematoporfirina (HpD) na deteção de tumores, demonstrando que este derivado era eficazmente captado pelos tecidos tumorais. Em 1976, John F. Kelly eliminou as células humanas do carcinoma da bexiga, transplantadas em ratinhos imunossuprimidos, por ação combinada da luz com HpD. Em 1978, Dougherty foi responsável pelo primeiro ensaio clínico em grande escala, descrevendo a resposta de vários tipos de cancros (mama, cólon, próstata e pele) ao tratamento com HpD.<sup>12,16</sup> Dougherty efetuou a purificação parcial do HpD por remoção de monómeros e a mistura resultante foi denominada de Photofrin II. O Photofrin®



foi o primeiro fotossensibilizador (PS, do inglês, *photosensitizer*) aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) no Canadá, em 1993, sendo comercializado para o tratamento do cancro.<sup>12</sup>

A tabela 1.1 apresenta os principais eventos que demonstram a evolução da história da terapia fotodinâmica até à aprovação do primeiro fotossensibilizador.

**Tabela 1.1.** Principais eventos que demonstram a evolução histórica da terapia fotodinâmica até à aprovação do primeiro fotossensibilizador.

Oscar Raab mostra os efeitos citotóxicos da acridina e da luz nas paramécias	1900
Niels Finsen ganha o Prémio Nobel pelo seu trabalho em fototerapia	1903
von Tappeiner e Jesionek usam a luz e a eosina para tratar o cancro da pele	
von Tappeiner introduz o tema “ação fotodinâmica”	1907
Schwartz descobre o derivado da Hp, o HpD	1955
Lipson e Baldes descrevem a acumulação do HpD em tecidos tumorais	1960
Kelly usa HpD em células humanas do carcinoma da bexiga	1976
Dougherty coordena o 1º ensaio clínico em Humanos	1978
Primeiro fotossensibilizador aprovado no Canadá - Photofrin®	1993

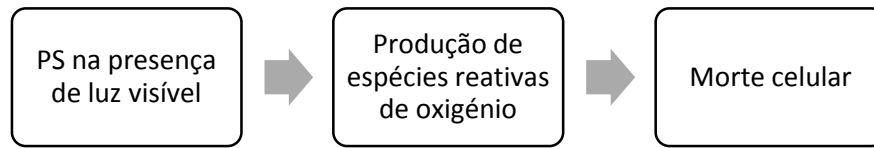
A aprovação do Photofrin® impulsionou a investigação e o desenvolvimento de novos fotossensibilizadores para aplicação em PDT. Nos últimos anos, os investigadores têm-se centrado na procura de fotossensibilizadores de segunda e terceira geração, com o objetivo de colmatar algumas falhas do Photofrin®. Alguns destes compostos já foram aprovados em vários países para serem aplicados em PDT.<sup>10</sup>

Tal como referido anteriormente, a terapia fotodinâmica é uma modalidade terapêutica clinicamente aprovada para o tratamento de diversas doenças oncológicas (ex: cancro da pele não-melanoma) e não-oncológicas (ex: acne, psoríase, degeneração macular da retina, arteriosclerose, destruição de infeções bacterianas resistentes ao tratamento com antibióticos).<sup>17,18</sup> É importante referir que a PDT tem apresentado um enorme potencial para aplicação ambiental, através da desinfeção da água (pela inativação de microorganismos) em estações de tratamento.<sup>19</sup>

A PDT baseia-se na combinação simultânea de três fatores: uma molécula fotossensibilizadora (PS), a irradiação com um feixe de luz de comprimento de onda específico ( $\lambda$ ) e a presença de oxigénio molecular.<sup>20</sup>

O princípio geral desta terapêutica baseia-se na administração de forma tópica ou intravenosa do fotossensibilizador, selecionado de acordo com o tipo de lesão neoplásica a tratar, o qual se acumula preferencialmente no tecido tumoral. Passado o tempo suficiente para se atingir a concentração máxima do mesmo no interior das células tumorais é realizada a irradiação com luz a um comprimento de onda adequado, o que conduz à ativação do

fotossensibilizador e consequente destruição do tumor, devido à formação de espécies reativas de oxigénio (ROS, do inglês, *reactive oxygen species*) (Esquema 1.1).<sup>12,21,22</sup>



**Esquema 1.1.** Representação do mecanismo geral de ação da PDT.

Os fatores que determinam a acumulação seletiva do PS nas células tumorais não estão ainda completamente determinados. No entanto, sabe-se que os tecidos tumorais apresentam uma fisiologia anormal: baixa drenagem linfática, pH ácido, aumento do número de recetores para as lipoproteínas de baixa densidade (LDL, do inglês, *low density lipoproteins*) e apresentam macrófagos associados ao tumor, o que poderá contribuir para esta seletividade. Por outro lado, as características estruturais do PS, como por exemplo, peso molecular, caráter hidrofóbico/hidrofílico, estado de agregação e a afinidade para os locais de ligação biológicos, também contribuirão para esta seletividade.<sup>23-26</sup>

A citotoxicidade das células tumorais e, portanto, a eficácia da PDT depende do tipo de tecido alvo, da natureza, concentração, localização na célula e da dose administrada do PS, do tipo de irradiação utilizada, do tempo entre a administração do PS e a aplicação da luz, da dosimetria (dose de luz irradiada sobre o tecido) e da disponibilidade de oxigénio no local (quanto maior for a concentração de oxigénio no tumor, melhor será o resultado).<sup>27</sup> Assim percebe-se facilmente que a hipóxia tumoral (falta de oxigénio nas células tumorais) é responsável pela menor eficácia da terapia fotodinâmica.<sup>28</sup>

Depois da entrada do PS nas células tumorais, a maioria deles acumula-se preferencialmente em compartimentos lipofílicos: membranas plasmática, mitocondrial, lisossomal e no retículo endoplasmático. Quase nenhum dos fotossensibilizadores utilizados em PDT se acumula no núcleo. Deste modo, este tipo de tratamento induz poucos danos no DNA, apresentando assim um baixo potencial mutagénico ou carcinogénico.<sup>29-31</sup>

A PDT é um procedimento clínico que apresenta numerosas vantagens quando comparada com os métodos terapêuticos convencionais (quimioterapia, radioterapia e cirurgia). Estes apresentam baixa seletividade, o que resulta no surgimento de efeitos secundários, que no caso da quimioterapia e radioterapia podem ser graves devido à elevada toxicidade para as células não tumorais.<sup>10,32,33</sup>

A acumulação do fotossensibilizador no tecido alvo e a aplicação da luz de forma direcionada na região a tratar conferem à PDT uma dupla seletividade, permitindo minimizar os danos nos tecidos saudáveis adjacentes. O tempo de vida e o raio de ação das ROS formadas para provocar a destruição das células tumorais, não permite que estas se difundam para os tecidos saudáveis, contribuindo também para a minimização dos efeitos secundários.

Trata-se de um tratamento pouco invasivo, geralmente indolor, um único procedimento pode resultar na destruição do tecido tumoral. Na PDT as fibras de colagénio e elastina do tecido conjuntivo são mantidas intactas, preservando a matriz que serve de

suporte à regeneração do tecido, ocorrendo a recuperação do mesmo sem formação de cicatriz.<sup>23</sup>

Ao contrário dos métodos de tratamento convencionais, na PDT a repetição do tratamento não resulta em toxicidade cumulativa e não há desenvolvimento de resistência à terapia. Esta modalidade terapêutica pode ser utilizada como tratamento adjuvante e no tratamento de tumores resistentes às outras terapêuticas.<sup>31,34</sup>

As principais desvantagens da PDT prendem-se com o facto de esta ainda não conseguir tratar tumores não sólidos (exemplo, Leucemia) e doenças dermatológicas que apresentem uma grande disseminação corporal. Certos fotossensibilizadores são eliminados muito lentamente do organismo (dias a semanas) o que conduz à fotossensibilidade cutânea (exemplo: Photofrin®), a qual tem sido contornada pelos fotossensibilizadores mais recentes. Nestas situações os doentes têm de evitar a exposição à luz com o objetivo de minimizar este problema.<sup>35</sup>

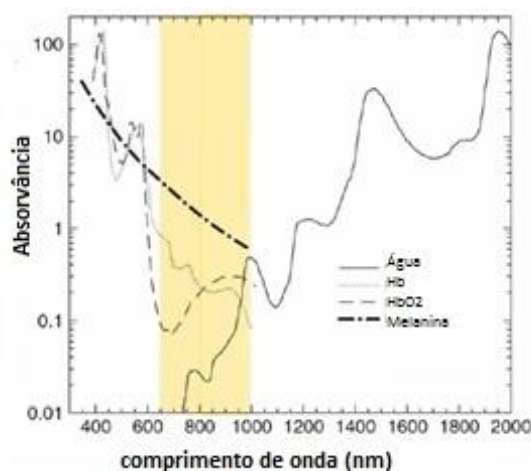
Apesar de serem conhecidas as vantagens da utilização da terapia fotodinâmica relativamente às terapias convencionais, os processos de aprovação clínica desta terapêutica inovadora são complicados porque é necessário ter em atenção não só a aplicação do fármaco, mas todo o sistema de aplicação da luz. Apesar deste obstáculo, alguns fotossensibilizadores foram aprovados para a utilização em seres humanos nos Estados Unidos da América, no Canada, no Japão e na Europa.<sup>10</sup>

Após a administração do fotossensibilizador este acumula-se no tecido alvo e, de seguida, irradia-se com um feixe de luz com comprimento de onda adequado, onde o fotossensibilizador absorve extensamente comparativamente aos cromóforos endógenos. A absorção de luz pelos cromóforos biológicos (Figura 1.1), como por exemplo, a hemoglobina (Hb) e a melanina, delimita o comprimento de onda adequado à PDT a uma gama compreendida entre 650 a 850 nm (denominada de “janela terapêutica”).

A hemoglobina, proteína principal do sangue, apresenta no seu local ativo o grupo heme, o qual é uma porfirina, cujo espectro de absorção UV-Vis (Ultravioleta-Visível) apresenta bandas de absorção com máximos em 425, 544 e 577 nm (Figura 1.1).

O limite superior deste intervalo é de 850 nm pois comprovou-se que a comprimentos de onda superiores não há a energia mínima necessária para desencadear a produção de ROS (uma vez que não há energia suficiente para a formação do oxigénio singuleto). Por outro lado, é importante referir que a partir de 1000 nm a água absorve intensamente (Figura 1.1).<sup>36,37</sup>

O comprimento de onda a utilizar deve ser selecionado com base no espectro de absorção do fotossensibilizador bem como nas propriedades do tecido lesado (localização, tamanho e profundidade). Uma vez que o comprimento de onda determina a profundidade de penetração da luz no tecido, torna-se essencial escolher um comprimento que permita a ativação do PS, bem como a profundidade necessária.<sup>38,39</sup> A luz deve penetrar até ao local onde se encontra o tumor para ter o efeito desejado.



**Figura 1.1.** Espectro de absorção da água, desoxihemoglobina e oxihemoglobina em função do comprimento de onda. A absorção destas moléculas define o comprimento de onda a aplicar em PDT: 650 -850 nm, denominado de “janela terapêutica” [Adaptado da referência 36].

Quando o fotossensibilizador absorve luz há a excitação do mesmo do estado fundamental singuleto ( $S_0$ ) para um estado excitado de maior energia ( $S_1$ ), o qual apresenta um reduzido tempo de vida ( $10^{-6}$  a  $10^{-9}$  segundos). Neste estado excitado, a molécula pode voltar para o estado fundamental diretamente (via fluorescência) ou, por outro lado, através de processos de relaxação não radiativos [cruzamento intersistemas (ISC, do inglês, *intersystem crossing*)] transitar para o estado tripleto de menor energia ( $T_1$ ), o qual apresenta um tempo de vida mais longo ( $10^{-3}$  segundos). Quando o PS se encontra neste novo estado excitado pode reagir segundo duas vias: mecanismos tipo I e/ou II e, posteriormente, pode regressar ao estado fundamental via fosforescência (Figura 1.2).<sup>40-42</sup>

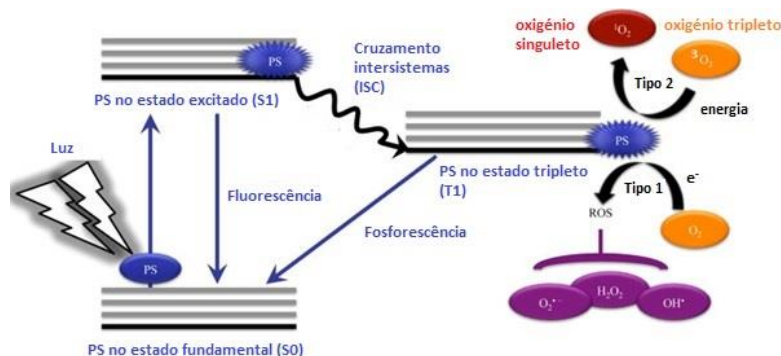
No mecanismo tipo I, o fotossensibilizador no estado  $T_1$  reage diretamente com os substratos, tais como, membranas celulares ou moléculas, havendo a transferência de um eletrão ou um protão entre ambos dando origem a um radical anião ou a um radical catião, respetivamente. No caso em que o substrato é o oxigénio ocorre a formação da espécie  $O_2^{\bullet-}$  (radical anião superóxido) que pode reagir com  $H_2O_2$  (peróxido de hidrogénio) convertendo-se facilmente na espécie  $OH^{\bullet}$  (radical hidroxilo), a qual é bastante reativa. Estas espécies citotóxicas podem posteriormente reagir com outros substratos orgânicos, levando assim, à destruição das células.<sup>39,43</sup>

O mecanismo tipo II envolve a transferência de energia do fotossensibilizador no estado tripleto para o estado fundamental tripleto do oxigénio molecular ( $^3O_2$ ), convertendo-o em oxigénio singuleto ( $^1O_2$ ). Esta espécie citotóxica apesar de ser altamente reativa, apresenta um raio de ação e um tempo de vida limitados. Por este motivo, as primeiras moléculas a sofrer os danos da formação do oxigénio singuleto são as que estiverem mais próximas do seu local de formação.

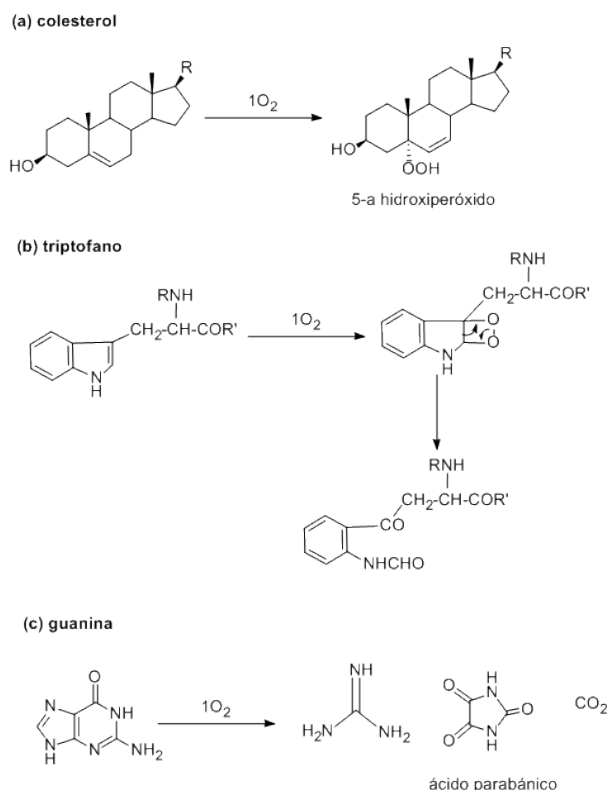
$^1O_2$  é capaz de oxidar biomoléculas, tais como: lípidos que poderão estar presentes nas membranas plasmáticas (como por exemplo, o colesterol), proteínas (em especial os resíduos de aminoácidos, como por exemplo, o triptofano) e ácidos nucleicos (guanina e outras bases nucleotídicas) (Figura 1.3).<sup>44</sup> Estas interações podem provocar: a destruição das membranas celulares e desativação de enzimas, recetores e transportadores que lhe estão

associados. A inativação das proteínas envolvidas na reparação do DNA também é um fator importante na morte celular.<sup>39,43-45</sup>

Os dois mecanismos podem ocorrer em simultâneo e poderá haver a prevalência de um face ao outro, no entanto, o mais importante é que ambos culminam na morte das células.



**Figura 1.2.** Diagrama de Jablonski que representa os dois mecanismos que ocorrem em PDT. A absorção de um fóton de luz promove a excitação do PS do estado fundamental (S<sub>0</sub>) para o estado excitado singuleto (S<sub>1</sub>). Neste estado, o PS pode regressar ao estado fundamental por emissão de fluorescência ou transitar para o estado excitado tripleto onde pode reagir de duas formas distintas: mecanismos tipo I e/ou II, sendo que ambos levam à formação de ROS e, desta forma, à destruição das células [Adaptado da referência 42].

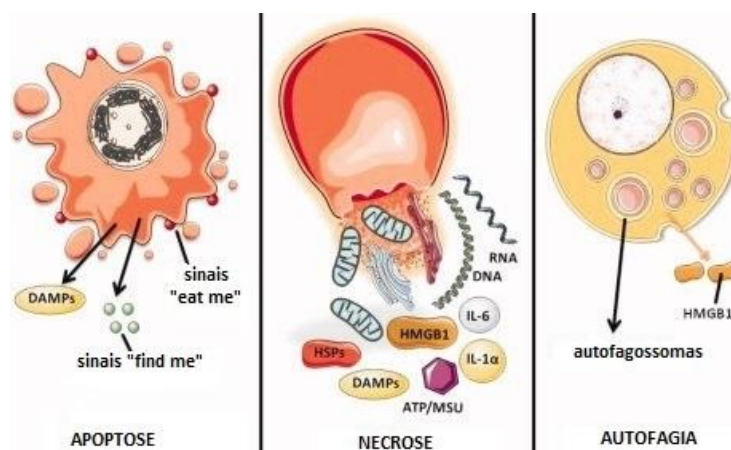


**Figura 1.3.** Mecanismo de oxidação (a) do colesterol, (b) do aminoácido triptofano e (c) da base azotada guanina, por ação do oxigênio singuleto - mecanismo tipo II.

A morte das células tumorais pode ocorrer por destruição direta, destruição da vascularização tumoral e ativação do sistema imunitário. Por sua vez, a destruição direta das

células tumorais pode ocorrer por diferentes vias: apoptose, necrose e autofagia (Figura 1.4).<sup>28,38</sup>

O tipo de morte celular que predomina depende de diversos fatores, tais como: da concentração e localização subcelular do fotossensibilizador, da intensidade da luz incidente e da concentração de oxigênio intracelular.



**Figura 1.4.** A PDT promove danos celulares que culminam na destruição das células cancerígenas. Neste caso está representada a destruição direta, a qual pode ocorrer por três vias diferentes [Adaptado da referência 38].

A apoptose, também conhecida como morte celular programada, caracteriza-se por uma série de alterações na morfologia da célula, nomeadamente pela contração celular, condensação da cromatina, fragmentação do DNA e formação de corpos apoptóticos. As células em apoptose produzem sinais que proporcionam a sua fagocitose por células fagocíticas. Neste processo há a perda da integridade membranar e os danos celulares são mais suaves comparativamente com a necrose.<sup>22,38</sup>

A necrose é uma forma de morte rápida e violenta que se caracteriza pela formação de um edema celular e ruptura da membrana plasmática, com consequente libertação de moléculas pró-inflamatórias, desencadeando-se assim um processo inflamatório.<sup>38,39</sup>

A autofagia é um processo altamente regulado, no qual os componentes celulares e os organelos são internalizados em vesículas (autofagossomas) que se fundem com os lisossomas, sendo degradados por ação de enzimas. Este processo pode ser estimulado pelos danos nos componentes celulares vitais provocados pelas ROS.<sup>38</sup>

Para além dos efeitos diretos, os efeitos sobre o sistema vascular e a ativação do sistema imunitário (efeitos indiretos) são também essenciais para a destruição eficiente das células tumorais.

A destruição do sistema vascular impede a formação de novos vasos sanguíneos promovendo a morte das células tumorais, devido à falta de nutrientes e oxigênio.<sup>29,30,39</sup>

A resposta inflamatória local gerada pela ação direta da PDT pode conduzir à ativação do sistema imunitário (macrófagos, monócitos, linfócitos e células dendríticas), o que, contribuirá também para a destruição do tecido alvo. É importante referir que a ativação do sistema imunitário para além de destruir as células tumorais permite o reconhecimento das mesmas, prevenindo assim possíveis recorrências da patologia ou metástases.<sup>17,46</sup>

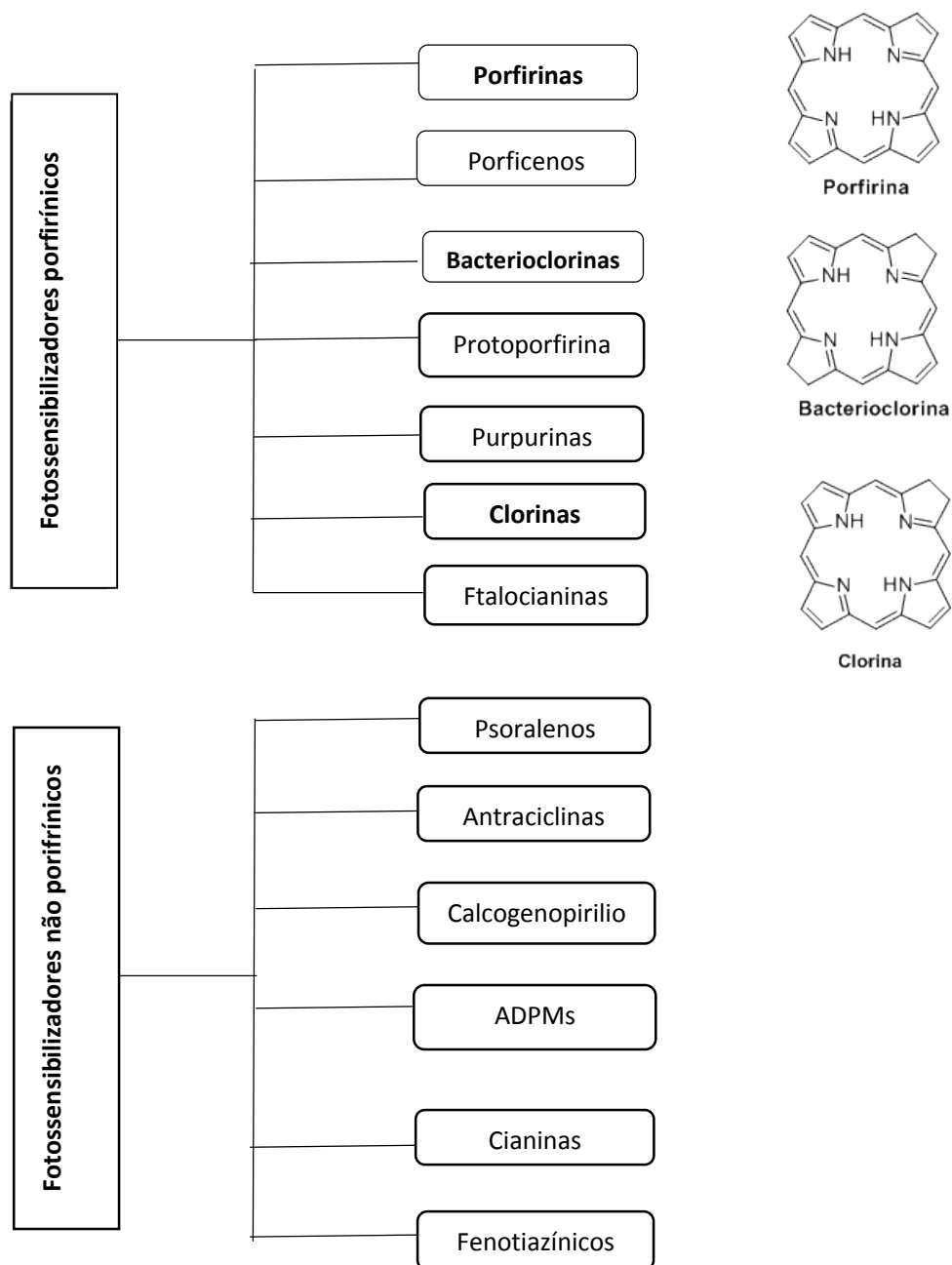
### 1.1.1. Características de um fotossensibilizador

Tal como mencionado anteriormente, um dos componentes essenciais em PDT é a molécula fotossensibilizadora. Os investigadores têm-se dedicado à investigação e ao desenvolvimento de moléculas que possam culminar em fotossensibilizadores com características ideais.

Idealmente um fotossensibilizador deve cumprir as seguintes características: (1) ser puro e estável, possuir uma estrutura bem definida e apresentar uma síntese fácil, reproduzível e economicamente viável; (2) absorver luz na gama dos 650-850 nm (“janela terapêutica”); (3) ser seletivo e acumular-se no tecido alvo; (4) apresentar citotoxicidade na presença de luz no comprimento de onda adequado; (5) possuir um elevado rendimento quântico de formação do estado tripleto ( $\phi_T$ ) e de oxigénio singuleto ( $\phi_\Delta$ ); (6) ser solúvel nos fluídos corporais; (7) não deve provocar efeitos mutagénicos ou carcinogénicos e, (8) deve ser eliminado do organismo de uma forma rápida para minimizar a fotossensibilidade prolongada da pele.<sup>41.47.48</sup>

Vários investigadores defendem que o fotossensibilizador ideal deve apresentar um carácter anfifílico. A natureza do PS influencia a sua captação, distribuição nos tecidos tumorais e capacidade de absorção de luz. Um PS hidrofílico tem dificuldade em difundir através da membrana plasmática mas é solúvel nos fluídos biológicos. Por sua vez, um PS hidrofóbico apresenta dificuldade em solubilizar-se nos fluídos corporais, o que pode conduzir a uma possível agregação do mesmo.<sup>41</sup> Esta agregação reduz a capacidade de absorver luz, diminuindo o tempo de semivida do estado tripleto e o rendimento quântico de formação do oxigénio singuleto.<sup>49</sup>

Os fotossensibilizadores são geralmente classificados como porfirínicos e não porfirínicos (Esquema 1.2).<sup>47,50</sup> A maioria dos fotossensibilizadores que existem no mercado e que se encontram em ensaios clínicos são compostos macrociclos tetrapirrólicos, tal como será possível verificar de seguida. Informação mais detalhada sobre porfirinas e os seus derivados hidroporfirínicos (clorinas e bacterioclorinas) será abordada no subcapítulo 1.2 desta tese.



**Esquema 1.2.** Classificação dos fotossensibilizadores como porfirínicos e não porfirínicos. Encontra-se representada a estrutura geral dos compostos destacados a negrito.

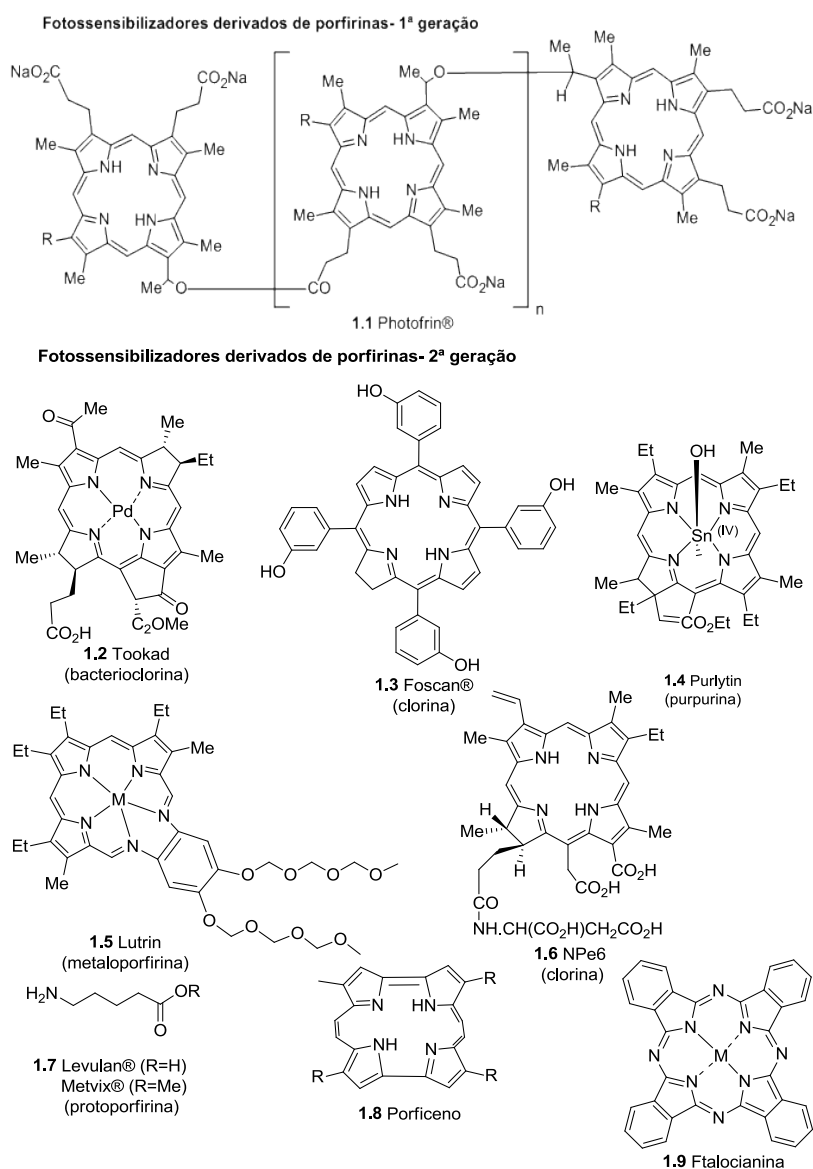
Embora a PDT seja uma terapêutica reconhecida em muitos países, possui um número limitado de fotossensibilizadores comercializados para o tratamento de diferentes doenças. No entanto, atualmente encontram-se várias moléculas em ensaios pré-clínicos ou clínicos, com o intuito de serem aprovados para o tratamento oncológico e não oncológico (Tabela 1.2 e Figura 1.5).<sup>12,47</sup>



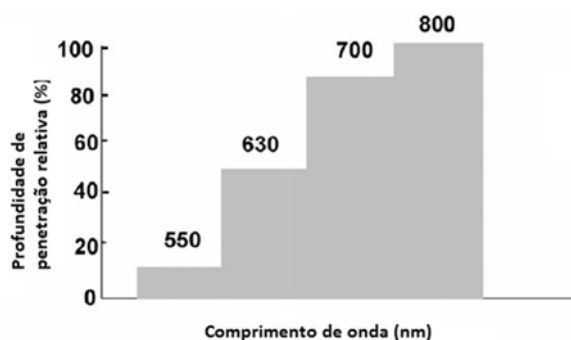
**Tabela 1.2.** Alguns dos fotossensibilizadores existentes no mercado ou que se encontram em ensaios pré-clínicos ou clínicos.

Photofrin®	630	24-48 h	Golgi, membrana plasmática	Dano vascular e isquémia das células tumorais; necrose	Cancro do esófago, pulmão	Eritema leve a moderado, fotossensibilidade	Sim
Tookad®	763	15 min	Vasculatura	Dano vascular	Cancro da próstata		Não. Em ensaios clínicos
Foscan®	652	96 h	Reticulo Endoplasmático, mitocôndria	Dano vascular e citotoxicidade direta no tumor	Cancro da cabeça e do pescoço	Inchaço, fotossensibilidade	Sim
Purlytin	664	24 h	Mitocôndria, lisossoma	Citotoxicidade direta no tumor	Cancro da mama metastático, carcinoma basocelular	Fotossensibilidade	Não. Em ensaios clínicos
Lutrin	732	3 h	Lisossoma	Dano vascular e citotoxicidade direta no tumor	Cancro da próstata e cervical	Fotossensibilidade (mínima)	Não. Em ensaios clínicos
NPe6	664	2-4 h	Lisossoma, endossoma	Estase vascular e citotoxicidade direta no tumor	Cancro do pulmão		Sim. No lapão
Levulan®	635	4-6 h	Mitocôndria, citosol, membrana citosólica	Citotoxicidade direta no tumor	Queratose actínica	Ardor, queimadura, vermelhidão	Sim
Metvix®	635	3 h	Mitocôndria, citosol, membrana citosólica	Citotoxicidade direta no tumor	Queratose actínica, carcinoma basocelular	Sensação de queimadura, vermelhidão	Sim
Hipericina	595	0,5-6 h	Reticulo endoplasmático, complexo de golgi	Citotoxicidade no tumor e dano vascular	Cancro da bexiga, nasofaríngeo	Dano leve no tecido normal circundante	Não. Em testes pré-clínicos
Corantes calcogenopirilo	592-746	24 h	Lisossomas	Citotoxicidade no tumor	Cancro da próstata, mama, cólon	Toxicidade no escuro	Não. Em testes pré-clínicos
Azul de metileno (corante fenotiazínico)	666	1-4 h	Mitocôndria, lisossomas	Citotoxicidade no tumor	Cancro da bexiga, cólon		Não. Em testes pré-clínicos
Azul de Nilo (corante fenotiazínico)	626,632	1 h	Reticulo endoplasmático, complexo de golgi	Citotoxicidade no tumor	Leucemia (células T)	Efeitos secundários mínimos	Não. Em testes pré-clínicos
Azul de Nilo e derivados (corante fenotiazínico)	650-660	30 min	Lisossomas	Citotoxicidade no tumor	Cancro da bexiga, sarcoma mamário em ratos	Efeitos secundários mínimos	Não. Em testes pré-clínicos
Cianinas	535-574	1 h	Mitocôndria, membrana plasmática	Citotoxicidade no tumor	Leucemia, linfoma	Efeitos secundários mínimos	Não. Em testes pré-clínicos
ADPM06	680	< 5 min	Mitocôndria, reticulo endoplasmático	Alvo vascular	Cancro da bexiga, pulmão em ratos		Não. Em testes pré-clínicos

Um dos fotossensibilizadores mais usados atualmente em PDT é o Photofrin<sup>®</sup>, derivado da hematoporfirina, que se caracteriza como sendo um fotossensibilizador de primeira geração. (1.1, Figura 1.5).<sup>47</sup> Apesar de ser amplamente utilizado no tratamento do cancro esofágico, é usado também no tratamento do cancro do pulmão de células não pequenas em doentes em que as terapias convencionais não são adequadas. Este fotossensibilizador apresenta algumas desvantagens, das quais se destacam: a prolongada fotossensibilidade cutânea, pois o fármaco permanece um longo período de tempo no organismo; a baixa seletividade para o tecido tumoral; e apresenta uma banda de absorção em torno de 630 nm, a qual possui um baixo coeficiente de absorvidade molar ( $\epsilon$ ). A luz a este comprimento de onda penetra os tecidos apenas a uma profundidade de aproximadamente 1 mm (Figura 1.6). Além disso este fotossensibilizador é uma mistura complexa de vários componentes, deixando algumas dúvidas em relação à identidade dos componentes ativos.<sup>45,51-53</sup>



**Figura 1.5.** Estrutura dos fotossensibilizadores derivados de porfirinas (1ª e 2ª geração) existentes no mercado ou que se encontram em ensaios pré-clínicos ou clínicos.



**Figura 1.6.** Profundidade de penetração relativa da luz em vários comprimentos de onda (assumindo que a profundidade de penetração é 100% a 800 nm) [Adaptado da referência 53].

Com o objetivo de colmatar as falhas dos fotossensibilizadores de primeira geração, surgiram os fotossensibilizadores de segunda geração. Estes são mais seletivos, causam menor fotossensibilidade, têm maior rendimento quântico de formação de oxigênio singuleto, são quimicamente puros e absorvem comprimentos de onda mais longos (650-850 nm) aumentando assim a capacidade de penetração nos tecidos (Figura 1.6).<sup>41,53</sup>

Os fotossensibilizadores de segunda geração Levulan® (ALA- ácido aminolevulinato) e o seu derivado lipofílico, Metvix® (MAL- aminolevulinato de metilo), são muito utilizados no tratamento dermatológico (1.7, Figura 1.5). A hidrofobicidade do PS Levulan® limitava a sua permeabilidade celular, sendo que, a sua esterificação dando origem ao Metvix® proporcionou um aumento da lipofobicidade e da eficácia de penetração na pele.<sup>43,47,54</sup>

O Toodak (bacteriofeoforbideo de paládio (Pd) derivado da bacterioclorofila) é considerado um dos PS de segunda geração mais promissores (1.2, Figura 1.5). Este PS hidrofóbico penetra eficientemente os tecidos e demonstrou resultados bastante promissores em ensaios clínicos (fase II/III) para o tratamento de lesões mais profundas, como o cancro da próstata.<sup>43,47</sup>

Os excelentes resultados em PDT que as clorinas e bacterioclorinas têm apresentado em vários tipos de patologias, motivam os investigadores para a investigação e desenvolvimento de compostos deste tipo.

### 1.1.2. À procura do fotossensibilizador ideal

Os fotossensibilizadores de segunda geração apresentam bons resultados no tratamento fotodinâmico no entanto, é necessário melhorá-los para alcançarmos fotossensibilizadores com características ideais. Surgem assim, os PS de terceira geração. Com estes pretende-se aumentar a solubilidade nos fluídos corporais, a seletividade para o tecido alvo, a captação nas células tumorais do PS, bem como, diminuir a fotossensibilidade.<sup>43,55</sup>

A terceira geração corresponde à conjugação dos PS de segunda geração com nanopartículas, lipossomas ou outras moléculas que apresentem atividade biológica e que permitam direcionar o PS para o tecido tumoral.

A encapsulação em sistemas de transporte (como por exemplo, em lipossomas) embora possa aumentar a seletividade para o tumor pode, no entanto, diminuir o rendimento

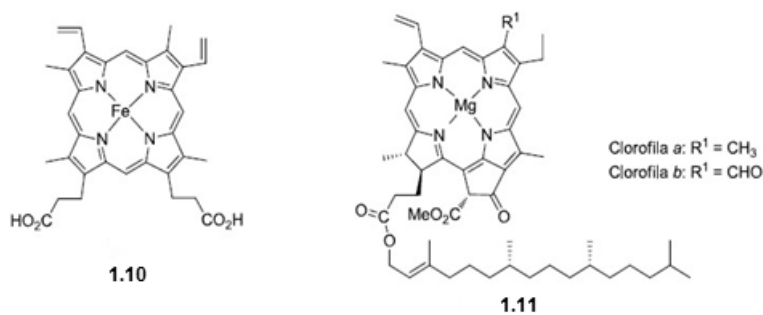
quântico de formação de oxigênio singuleto uma vez que, o oxigênio singuleto formado tem que se difundir para fora do sistema e, tal como já referido anteriormente, o raio de ação do oxigênio singuleto é curto (assim como o seu tempo de vida). Deste modo pode não conseguir alcançar o alvo, não tendo o efeito pretendido. De forma a contornar este problema, uma possível alternativa consiste em ligar diretamente os fotossensibilizadores a moléculas biologicamente ativas, tais como, ligandos específicos (glicoproteínas, vitaminas, fatores de crescimento, lipoproteínas), anticorpos monoclonais (estratégia denominada de fotoimunoterapia) e nanobodies.<sup>45,56,57</sup>

Esta classe de fotossensibilizadores que tem em atenção as propriedades que diferenciam as células tumorais das células saudáveis representa uma área de investigação em desenvolvimento. A encapsulação do Foscan® em lipossomas tem revelado ser uma estratégia bastante promissora para aplicação em PDT.<sup>58</sup>

## 1.2. Porfirinas, clorinas e bacterioclorinas

Os macrocíclicos tetrapirrólicos, porfirinas e seus derivados (clorinas, bacterioclorinas) surgem em animais e plantas assumindo um papel fundamental em funções vitais, tais como, a respiração e fotossíntese. Por este motivo estes compostos são denominados de “pigmentos da vida”.

O grupo heme (**1.10**, Figura 1.7) e as clorofilas (**1.11**, Figura 1.7) são alguns dos exemplos que demonstram a presença das porfirinas e dos seus derivados na natureza. O grupo heme, protoporfirina IX complexada com ferro, é o grupo prostético da hemoglobina, responsável pelo transporte do oxigênio nos tecidos celulares. As clorofilas são pigmentos responsáveis pela fotossíntese, possuindo uma forma estrutural semelhante à do grupo heme, no entanto, o macrociclo encontra-se reduzido e coordenado com magnésio, possuindo diferentes grupos substituintes, estando estes de acordo com a função que desempenham.<sup>59</sup>



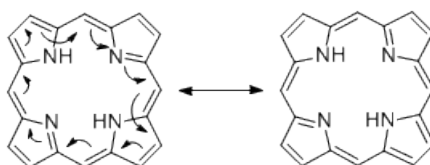
**Figura 1.7.** Estruturas do grupo heme **1.10** e das clorofilas *a* e *b* **1.11**.

Para além de surgirem como produtos naturais, as porfirinas e os seus derivados, ao possuírem absorção típica na região do vermelho e do NIR (infravermelho próximo, do inglês, *near infrared*) apresentam características fotofísicas ideais para serem utilizados em células solares (como sensores), em catálise e na área da medicina. Nesta última são usados como fotossensibilizadores para diagnóstico, através de imagem, ou em tratamento, através da PDT (tal como referido no subcapítulo 1.1).<sup>60</sup>

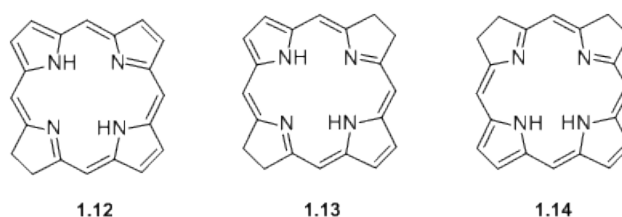
As porfirinas designam-se como uma classe de compostos de cor vermelha ou púrpura, cujo núcleo base é constituído por quatro anéis pirrólicos unidos entre si por pontes metínicas (=CH-).<sup>59</sup> O macrociclo porfirínico é um sistema altamente conjugado podendo ser representado por duas estruturas de ressonância. Apesar dos vinte e dois electrões  $\pi$  que o constituem seguirem a regra de Hückel para a aromaticidade ( $4n + 2$ ,  $n = 5$ ), apenas dezoito deles se encontram em condição para se deslocalizarem (Figura 1.8). Assim os quatro electrões  $\pi$  restantes podem reagir formando clorinas **1.12**, bacterioclorinas **1.13** e isobacterioclorinas **1.14** (Figura 1.8).<sup>59,61</sup>

As clorinas e bacterioclorinas são estruturalmente bastante semelhantes entre si e muito próximas das porfirinas. Enquanto o macrociclo da porfirina é completamente insaturado, a clorina ou di-hidroporfirina perde uma ligação dupla numa unidade pirrólica e a bacterioclorina ou tetra-hidroporfirina perde duas ligações duplas em duas unidades

pirrólicas opostas. Estas hidroporfirinas continuam a respeitar a regra de Hückel para a aromaticidade, apresentando 18 electrões  $\pi$  que apresentam capacidade para se deslocalizarem. As isobacterioclorinas, formas isoméricas das bacterioclorinas, apresentam as duas unidades pirrólicas adjacentes reduzidas não sendo assim macrociclos aromáticos (Figura 1.9).<sup>60</sup>



**Figura 1.8.** Exemplo de deslocalização no macrocilo porfirínico.



**Figura 1.9.** Representação das estruturas básicas da clorina, bacterioclorina e isobacterioclorina.

A redução de uma dupla ligação numa unidade pirrólica, ou de duas, em duas unidades pirrólicas opostas do macrocíclico porfirínico, originando clorinas e bacterioclorinas, culmina numa maior absorção da luz na zona do vermelho e do infravermelho próximo, respetivamente.<sup>60</sup>

Tal como mencionado no subcapítulo 1.1, um bom fotossensibilizador terá que absorver dentro da “janela terapêutica” (650-850 nm) para garantir um bom compromisso entre a penetração da luz nos tecidos (que aumenta com o comprimento de onda) e a energia suficiente nos fotões, de modo a obter estados excitados com energia suficiente para poderem dar origem às ROS.<sup>38</sup> Este requisito de absorção de luz na zona do vermelho e do NIR torna as clorinas e as bacterioclorinas como moléculas com um enorme potencial para aplicação em PDT.

### 1.2.1. Porfirinas

As porfirinas em virtude da elevada conjugação que apresentam são compostos altamente corados, possuindo um espectro de absorção extremamente típico constituído por uma banda de absorção de forte intensidade, que se situa no intervalo dos 400-450 nm, denominada banda Soret (característica da deslocalização dos 18 electrões  $\pi$ ) e por um conjunto de quatro bandas de menor intensidade localizadas entre os 500-700 nm, designadas por bandas Q. Estes compostos absorvem fracamente no vermelho apresentando um  $\epsilon$  de cerca de  $3500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (620-640 nm).<sup>41,59,61</sup>

Relativamente à reatividade dos compostos porfirínicos, é importante referir que estes poderão sofrer reações no interior ou nas posições periféricas do anel, nomeadamente nas posições *meso* e nas  $\beta$ -pirrólicas.

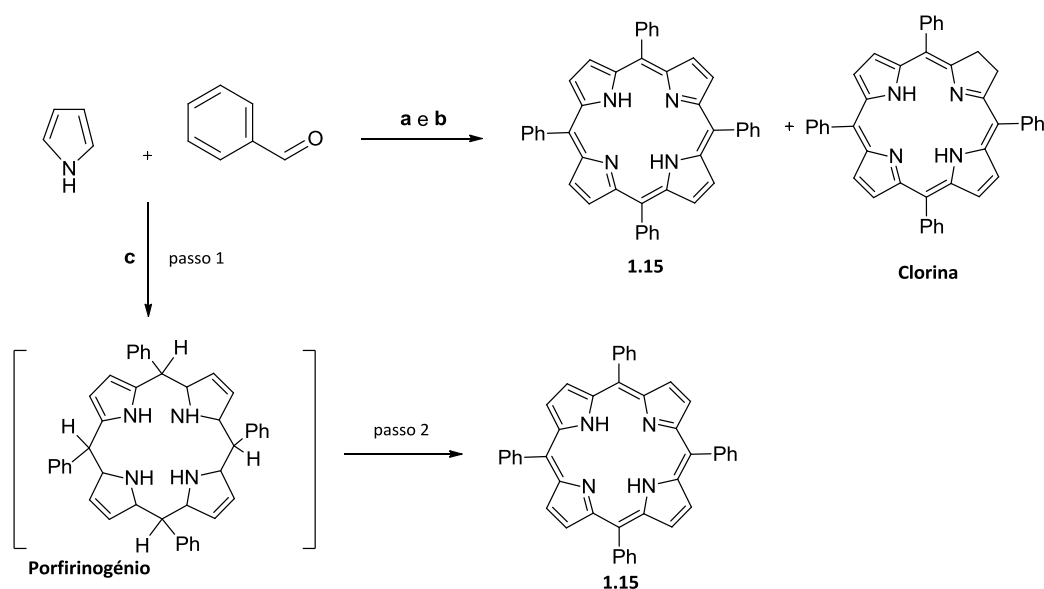
As porfirinas no seu estado livre apresentam propriedades ácido-base devido aos seus azotos pirrólicos, em que dois dos quatro azotos podem ganhar e os outros dois poderão perder prótons.<sup>62</sup>

Os átomos de azoto do interior do macrociclo são excelentes na coordenação de cátions metálicos formando metaloporfirinas. As metaloporfirinas desempenham um papel importante em processos biológicos, tal como já referido no caso do grupo heme da hemoglobina ou das clorofilas. Os complexos metálicos de porfirinas podem sofrer uma grande variedade de reações dependendo da eletronegatividade do metal que coordena com a porfirina.<sup>62</sup>

As reações que podem ocorrer na periferia do anel porfirínico são de oxidação, cicloadição, redução e de substituição nucleofílica ou eletrofílica. Estas últimas ocorrem geralmente em metaloporfirinas. As transformações que poderão ocorrer nos grupos substituintes periféricos são também um tipo de reação muito importante.<sup>59</sup>

### 1.2.1.1. Métodos de síntese

A síntese de porfirinas *meso*-substituídas teve a sua origem com Rothemund, que em 1941, descreveu a síntese da 5,10,15,20—tetrafenilporfirina (TPP, do inglês, *tetraphenylporphirin*) **1.15** a partir da reação do benzaldeído e pirrole, usando como solvente piridina, em atmosfera inerte, a uma temperatura de 220 °C e durante 48 horas, com rendimentos entre os 7 e os 9% (Esquema 1.3 a).<sup>63-66</sup>



a) Condições de Rothemund: piridina, 220 °C, 48 h., ausência de O<sub>2</sub>.

b) Condições de Adler e Longo: CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>H, refluxo, 30 min., presença de O<sub>2</sub>.

c) Condições de Lindsey: 1. TFA ou BF<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, temp. amb., 30-60 min.; 2. DDQ, 45 °C, 1h.

**Esquema 1.3.** Síntese da TPP **1.15** seguindo os três métodos descritos: **a)** método de Rothemund; **b)** método de Adler e Longo; **c)** método de Lindsey.

Com o objetivo de melhorar os resultados obtidos por Rothemund, Adler e Longo, nos anos 60, realizaram a reação de condensação do pirrole e do benzaldeído em meio ácido (ácido propiônico ou ácido acético) e em condições aeróbias. A reação foi realizada sob refluxo, a 140 °C, por um período de 30 minutos, obtendo-se a TPP **1.15** com rendimentos na ordem dos 20%. No entanto, havia o aparecimento da clorina **1.16**, tal como acontecia no método anterior. Contudo esta era facilmente convertida na porfirina correspondente por ação de agentes oxidantes, como por exemplo, 2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-*p*-benzoquinona (DDQ) (Esquema 1.3 b).<sup>67-69</sup> Apesar do isolamento das porfirinas ser facilitado, devido à precipitação por arrefecimento lento no meio reacional, a contaminação do produto com outros subprodutos de difícil separação constitui um inconveniente deste método. Este é ainda limitado pelo facto de a síntese de porfirinas a partir de aldeídos alquílicos e aromáticos contendo grupos funcionais sensíveis ácidos ou substituintes volumosos nas posições *orto*, não ser bem sucedida.<sup>69</sup>

Com o intuito de contornar os problemas mencionados anteriormente, entre 1979 e 1987, Lindsey desenvolveu uma nova metodologia de síntese baseada no facto de que o porfirinogénio é o intermediário mais estável da reação de condensação, o que culminou na preparação de uma gama variada de *meso*-tetra-arylporfirinas simétricas. Este tipo de síntese foi executado em duas etapas. Para a síntese da TPP **1.15**, o primeiro passo consistiu na reação do pirrole com o benzaldeído em diclorometano, à temperatura ambiente, durante 30 a 60 minutos, usando como catalisador ácido trifluoroacético (TFA) ou trifluoreto de boro (BF<sub>3</sub>). Numa segunda fase, o porfirinogénio formado foi oxidado à correspondente porfirina através da utilização de um agente oxidante (DDQ ou cloranil). A oxidação demorou aproximadamente 1 hora, a 45 °C (Esquema 1.3 c). Com este método foi possível obter a TPP **1.15** com um rendimento de 35%, superior ao do método anterior.<sup>67</sup> Outra vantagem deste método é a possibilidade de utilizar os aldeídos que eram sensíveis às condições do método de Adler-Longo. As desvantagens do método de Lindsey prendem-se com o facto de ser necessária a utilização de grandes quantidades de agentes oxidantes e o recurso a técnicas cromatográficas para isolar a porfirina, tornando-o num processo sintético com um grande impacto ambiental e caro.

Na mesma altura de Lindsey, Rocha Gonsalves desenvolveu um método que permitiu a síntese de *meso*-tetra-alkylporfirinas basendo-se na condensação do pirrole com acetais alquílicos, catalisada por TFA, seguindo-se a oxidação do porfirinogénio com quinonas de alto potencial ou através de radiação.<sup>70</sup>

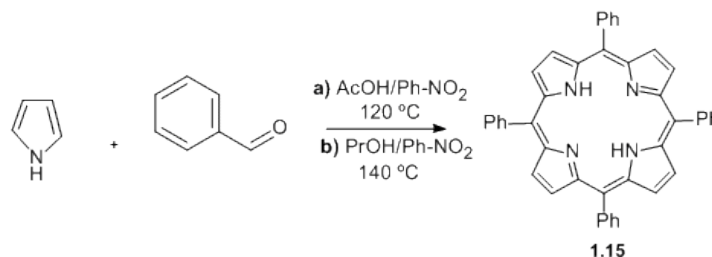
Posteriormente, em 1991, Rocha Gonsalves demonstrou que se podiam preparar *meso*-tetra-arylporfirinas, como por exemplo, a TPP **1.15**, num só passo, através da utilização de uma mistura de ácido acético ou ácido propiônico e nitrobenzeno, em refluxo (Esquema 1.4). O nitrobenzeno para além de funcionar como solvente vai oxidar o porfirinogénio à respetiva porfirina, evitando a formação de clorina. Uma vantagem adicional destas condições reacionais está na facilidade de cristalização da porfirina no meio reacional, obtendo-se esta com uma pureza bastante significativa.<sup>71,72</sup>

Nos últimos anos, a síntese de algumas porfirinas tem ocorrido através da utilização da tecnologia de micro-ondas. Esta metodologia sintética para além de diminuir o tempo de



reação, diminuí os custos do processo e o impacto ambiental uma vez que, utiliza um volume mínimo de solvente.<sup>73</sup>

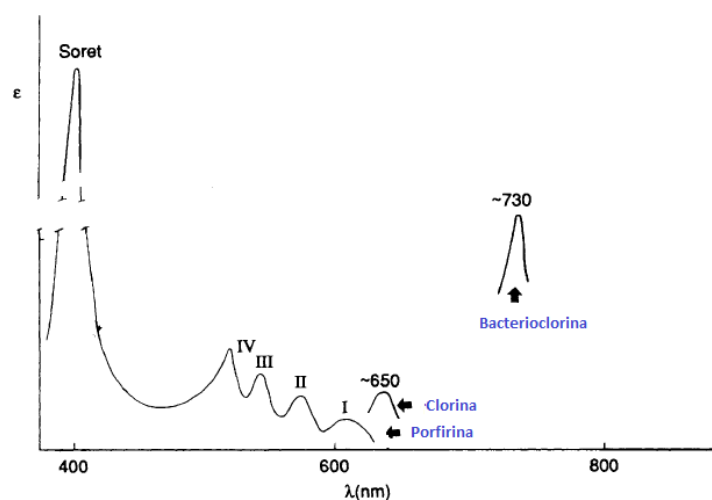
Recentemente, Pereira e seus investigadores desenvolveram um método que permite a síntese de porfirinas utilizando a tecnologia de micro-ondas e água como solvente.<sup>74</sup>



**Esquema 1.4.** Representação do esquema sintético para a obtenção da TPP **1.15** usando o método de um só passo de Rocha Gonsalves.

### 1.2.2. Clorinas e bacterioclorinas

As clorinas e bacterioclorinas, formas reduzidas do macrociclo porfirínico, apresentam uma pequena alteração estrutural relativamente à porfirina, tal como descrito anteriormente. No entanto esta pequena diferença influencia bastante as propriedades fotofísicas destes compostos. A progressiva saturação do macrociclo leva a um aumento do comprimento de onda e da intensidade da última banda de energia. Deste modo, as hidroporfirinas apresentam uma maior absorção na região do vermelho e do NIR, em comparação com as porfirinas. As clorinas possuem uma absorção forte no vermelho, absorvendo por volta dos 650 nm (o  $\epsilon$  desta banda das clorinas é em média uma ordem de grandeza maior ao da respetiva porfirina). As bacterioclorinas absorvem muito fortemente no NIR, apresentando uma forte absorção por volta dos 730 nm (o  $\epsilon$  desta banda de absorção das bacterioclorinas em média uma ordem de grandeza maior que o da respetiva clorina) (Figura 1.10).<sup>41,44,75,76</sup>



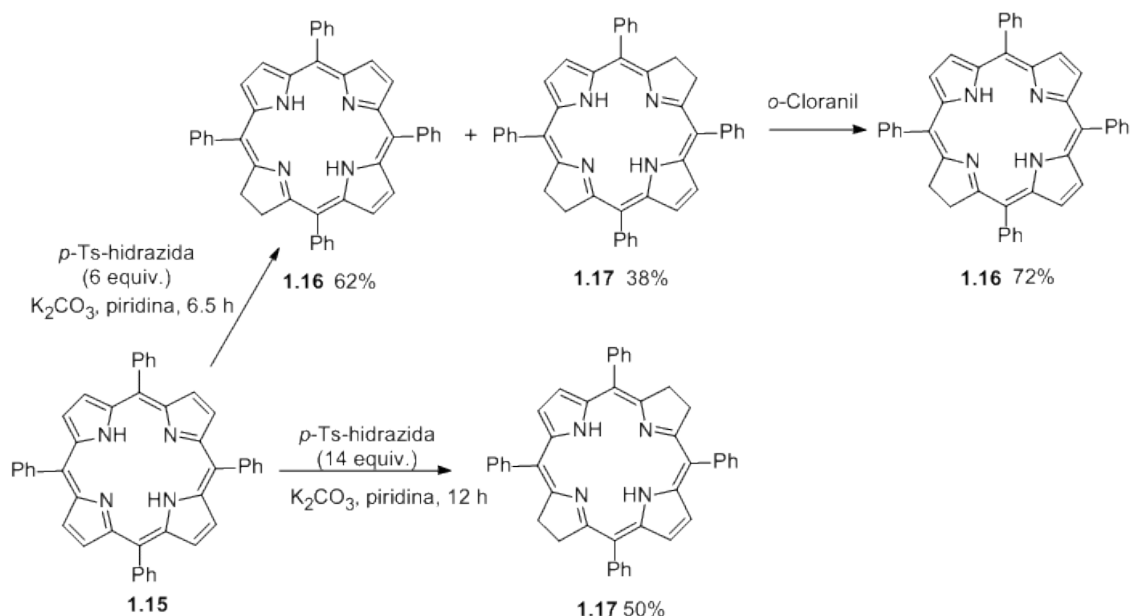
**Figura 1.10.** Espectro de UV-Visível da porfirina e dos seus derivados: clorina e bacterioclorina [Adaptado da referência: 44].

Vários são os métodos que existem para a obtenção de clorinas e bacterioclorinas. Os principais métodos baseiam-se na síntese total, na derivatização de porfirinas e na modificação de clorinas ou bacterioclorinas naturais.<sup>77</sup> Alguns exemplos para a obtenção de compostos hidroporfirínicos através da derivatização de porfirinas serão apresentados.

### 1.2.2.1. Redução de porfirinas

A transformação de porfirinas nas respectivas clorinas pode ser realizada com *p*-toluenossulfonil-hidrazida na presença de uma base, tal como descreveu Whitlock.

A reação de 5,10,15,20-tetrafenilporfirina com *p*-toluenossulfonil-hidrazida utiliza como solvente piridina, em refluxo, e carbonato de potássio como base, formando-se uma mistura de clorina **1.16** e bacterioclorina **1.17**. De modo a oxidar a bacterioclorina **1.17** à respectiva clorina **1.16** utiliza-se o *o*-cloranil, sendo o rendimento desta reação de 72%. Quando se pretende obter apenas a bacterioclorina **1.17** utiliza-se um excesso do precursor da diimida, obtendo-se esta com um rendimento de 50% (Esquema 1.5).<sup>78</sup>



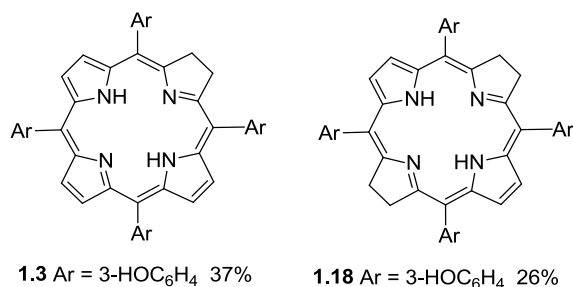
**Esquema 1.5.** Representação da via sintética para a obtenção da clorina **1.16** e da bacterioclorina **1.17**.

Utilizando o mesmo método, Bonnet e seus colaboradores descreveram a síntese do princípio ativo do fotossensibilizador Foscan<sup>®</sup>, uma *meso*-tetra-hidroxfenilclorina (**1.3**), com um rendimento de 37%. Juntamente com esta obtinham a bacterioclorina correspondente **1.18**, com um rendimento de 26% (Figura 1.11).<sup>79</sup>

Esta estratégia sintética apresenta como desvantagem a utilização de grande quantidade de solvente e de base, conduzindo a inconvenientes a nível ambiental.

De modo a contornar estas desvantagens, Pereira e seus investigadores, em 2010, adaptando o método descrito anteriormente, descreveram a síntese de bacterioclorinas, através da redução de porfirinas com diimida, na ausência de solvente e de base.<sup>80</sup> Outro

grupo de investigação, no mesmo ano, descreveu a síntese de hidroporfirinas sob irradiação de micro-ondas, baseando-se no método de Whitlock.<sup>81</sup>



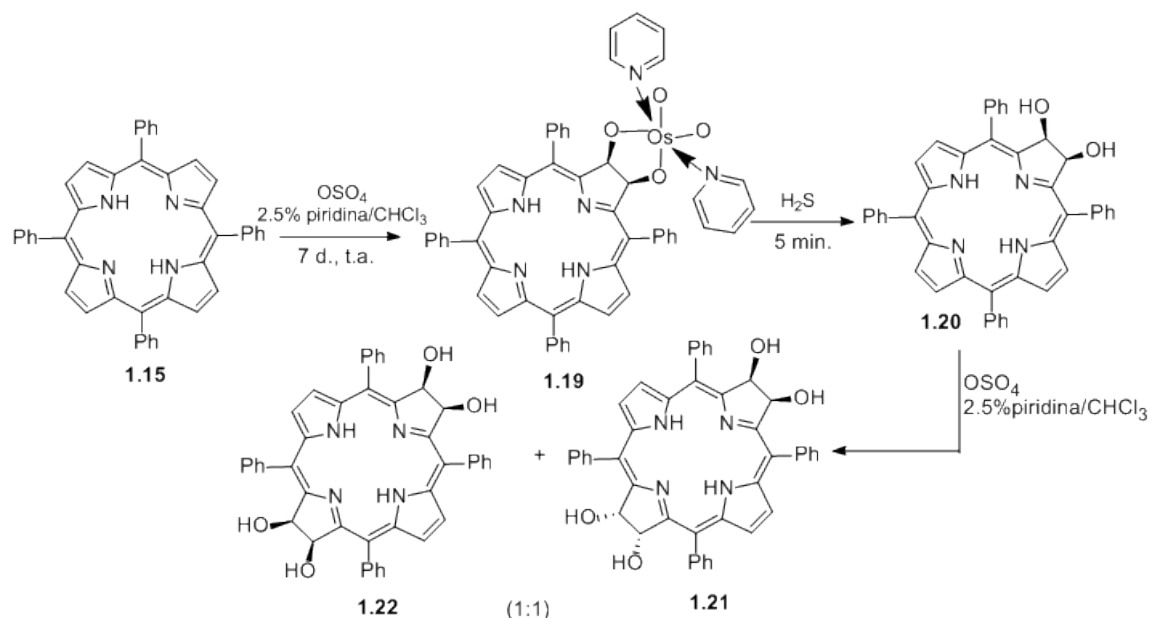
**Figura 1.11.** Foscan® **1.3** e a bacterioclorina correspondente **1.18**.

### 1.2.2.2. Oxidação de porfirinas

Em 1995 foi descrita a oxidação de porfirinas *meso*-substituídas com tetróxido de ósmio (OsO<sub>4</sub>) para a formação de hidroporfirinas.

Uma quantidade estequiométrica de OsO<sub>4</sub> foi adicionada à TPP **1.15** formando-se dióis nas posições β-pirrólicas. A formação da 2,3-*cis*-dihidroxi-*meso*-tetrafenilclorina (**1.20**) ocorreu com um rendimento de 50%. Partindo da clorina di-hidroxilada **1.20** foi possível obter dois isómeros de tetra-hidroxibacterioclorina **1.21** e **1.22**, na razão de 1:1 (Esquema 1.6).<sup>82,83</sup>

O longo tempo de reação (7 dias) e a necessidade de utilização de reagentes caros e perigosos, como o OsO<sub>4</sub>, tem contribuído para que este método de preparação de hidroporfirinas seja substituído por outros.<sup>84</sup>



**Esquema 1.6.** Oxidação da TPP **1.15** resultando na formação da respetiva clorina **1.20** e bacterioclorinas **1.21** e **1.22**.

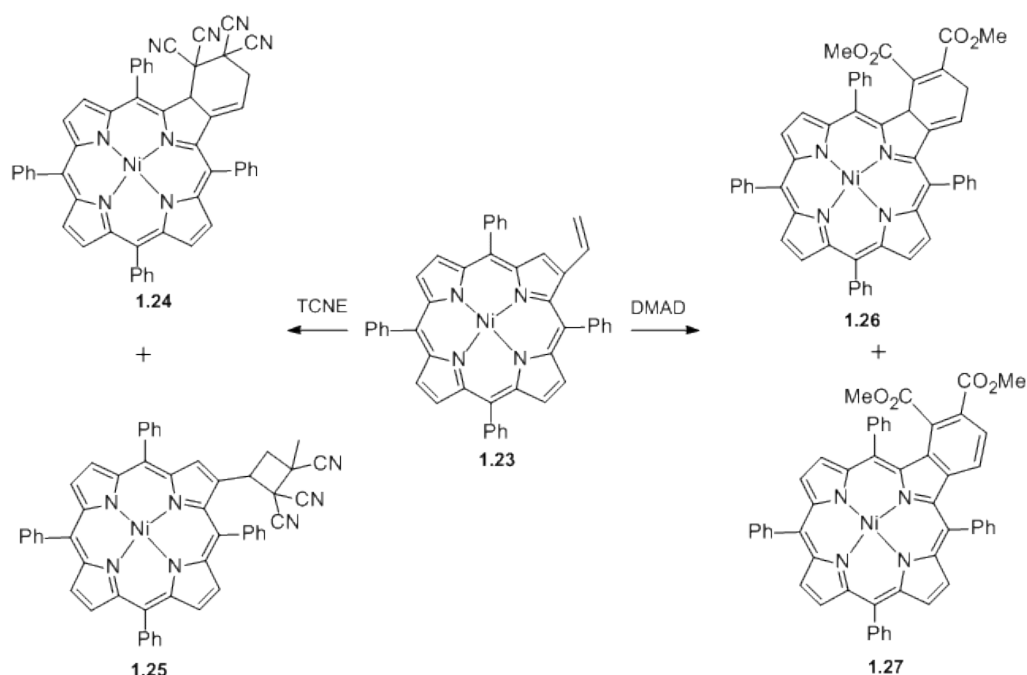
### 1.2.2.3. Reações de cicloadição

O interesse na síntese de clorinas e bacterioclorinas estáveis que não envolvesse vários passos permitiu o desenvolvimento de métodos alternativos à redução e à oxidação. Surgiram assim as reações de cicloadição envolvendo as unidades pirrólicas das porfirinas, como uma alternativa bastante promissora para a obtenção de hidroporfirinas.

#### 1.2.2.3.1. Reação de Diels-Alder

Porfirinas substituídas com grupos vinilo nas posições  $\beta$ -pirrólicas podem atuar como dienófilos em reações de Diels-Alder.

Os primeiros trabalhos foram publicados em 1996, onde a *meso*-porfirina substituída complexada com níquel **1.23** reagiu com os dienófilos tetracianoetileno (TCNE) e acetilenoedicarboxilato de dimetilo (DMAD). Para além de se obterem os produtos desejados, as clorinas **1.24** e **1.26**, havia a formação em ambas as reações dos produtos secundários indesejados **1.25** e **1.27**. A reação com o TCNE culminou no aparecimento do produto **1.24**, o qual resultou de uma cicloadição [4+2] e do composto **1.25**, através de uma cicloadição [2+2]. A reação com o segundo dienófilo (DMAD) foi mais seletiva, formando-se a clorina **1.26** e o produto secundário **1.27**, resultante da sua oxidação. (Esquema 1.7).<sup>85</sup>



**Esquema 1.7.** Cicloadições de *meso*-porfirina substituída com grupo vinilo e complexadas com níquel. A reação de Diels-Alder culmina na formação das clorinas **1.24** e **1.26**.

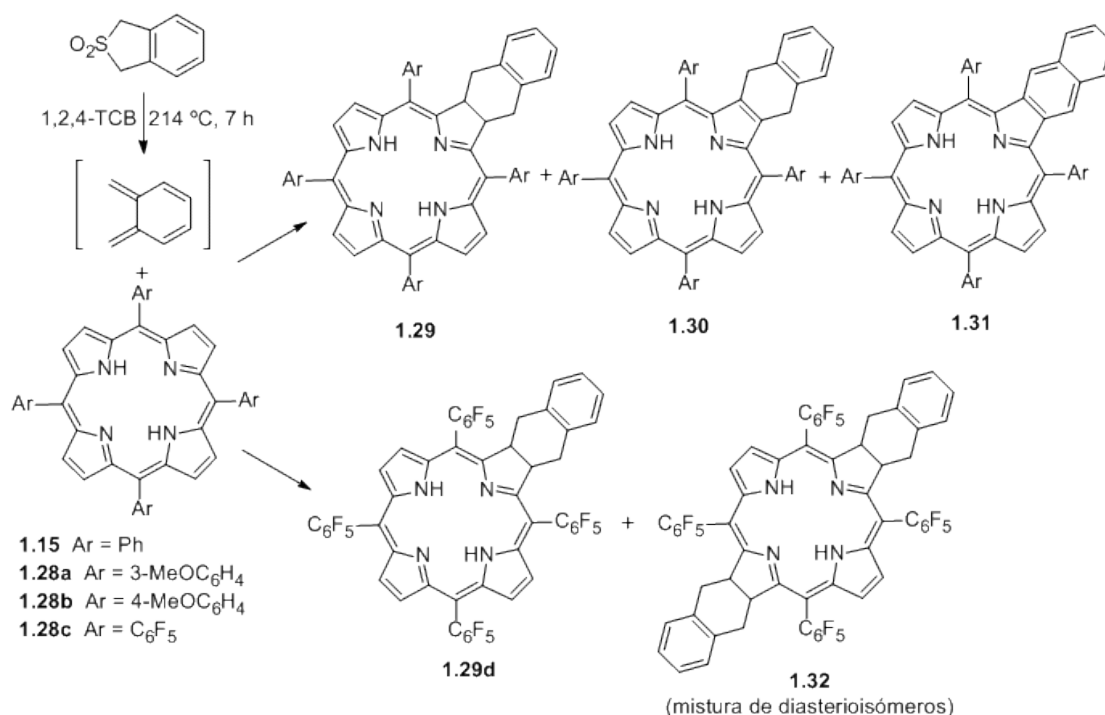
A partir de 1997, Cavaleiro e seus investigadores descreveram a participação de porfirinas como dienófilos em reações de Diels-Alder.

As *meso*-tetra-arilporfirinas **1.15-1.28c** ao reagirem com o dieno reativo, *o*-benzoquinodimetano, em refluxo, de 1,2,4-triclorobenzeno, formaram as clorinas **1.29a-**

**1.29d**, via cicloadição [4+2]. Juntamente com as clorinas obtiveram as porfirinas **1.30** e **1.31**, resultantes da sua oxidação. A clorina **1.29a** foi obtida com um rendimento de 26% (Esquema 1.8).<sup>86</sup>

Quando usaram a 5,10,15,20-tetraquis(pentafluorofenil)porfirina (**1.28c**) observaram a formação de três produtos, a clorina **1.29d** e uma mistura de diastereoisómeros da bacterioclorina **1.32** (Esquema 1.8).<sup>86</sup>

Utilizando este método, Cavaleiro e seus investigadores procederam à síntese de diversas clorinas, no entanto, obtinham em certos casos bacterioclorinas e/ou porfirinas (resultantes da oxidação das clorinas) como produtos secundários. Deste modo adquiriam uma mistura de compostos que eram muito difíceis de separar por cromatografia.<sup>86,87</sup>



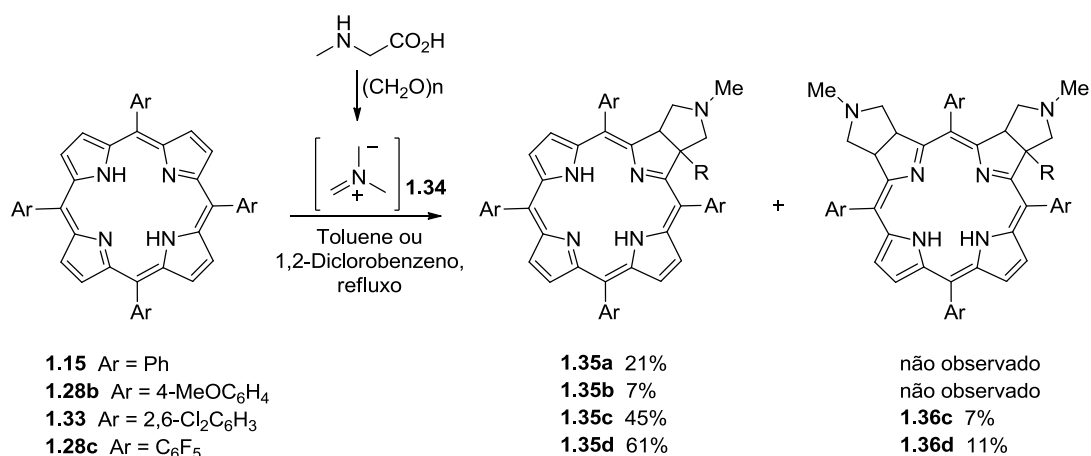
**Esquema 1.8.** Reação de Diels-Alder para a formação das clorinas **1.29a-d**.

### 1.2.2.3.2. Reação de cicloadição 1,3-dipolar

As porfirinas podem participar também em reações de cicloadição 1,3-dipolar como dipolarófilos, podendo reagir com vários 1,3-dipolos, como iletos azometino, nitronas, diazoalcanos e iletos carbonílicos originando clorinas.

Em 1999, Cavaleiro e os seus investigadores publicaram o primeiro estudo da reatividade de porfirinas *meso*-substituídas **1.15-1.33** com iletos de azometino, gerados *in situ*, através da reação de paraformaldeído e sarcosina. Neste estudo mostrou-se que as porfirinas contendo grupos arilo com substituintes atratores de eletrões, como as porfirinas **1.28c** e **1.33**, demonstraram maior reatividade com o dipolo **1.34**, obtendo-se as respetivas clorinas **1.35c** e **1.35d** com melhores rendimentos. No entanto, nestes casos houve a formação de isobacterioclorinas **1.36c** e **1.36d** como produtos secundários (Esquema 1.9).<sup>88</sup>

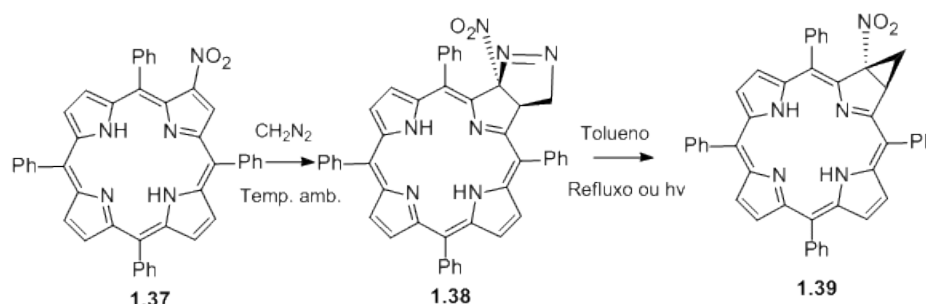
É importante referir que após a formação da clorina **1.35a** e fazendo-a reagir com um excesso do dipolo **1.34**, obtém-se uma mistura de diastereoisómeros de bacterioclorina e de isobacterioclorina.<sup>88</sup>



**Esquema 1.9.** Reação de cicloadição 1,3- dipolar de porfirinas com iletos de azometino.

As reações de cicloadição 1,3-dipolar são efetivamente um método de síntese de anéis heterocíclicos de cinco membros, razão pela qual têm sido aplicadas com sucesso para a formação de hidroporfirinas.

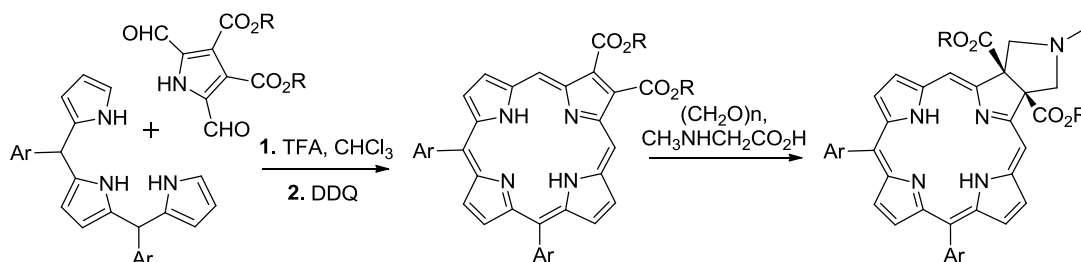
A reação da porfirina **1.37** com diazometano e, subsequente extrusão de azoto, originou a clorina fundida com um anel de ciclopropano **1.39** (Esquema 1.10).<sup>89,90</sup> A presença de um grupo nitro na posição  $\beta$  possibilitou a preparação da hidroporfirina **1.39**, prevenindo reações subsequentes.



**Esquema 1.10.** Reação da porfirina **1.37** com diazometano para obtenção da clorina **1.39**.

Gryko Gazowski, em 2005, encontrou uma solução para os problemas mencionados anteriormente, sobre regioselectividade e estabilidade. Este investigador propôs a utilização de dois grupos atratores de elétrons em posições viciniais no perímetro das porfirinas **1.40**, permitindo a formação seletiva das clorinas **1.41**, via cicloadição 1,3-dipolar. Este procedimento apesar de apresentar um rendimento global baixo, de aproximadamente 3%, permitiu a formação de clorinas que apresentaram uma elevada estabilidade devido à presença de dois átomos de carbono quaternários (Esquema 1.11).<sup>91</sup>

É importante salientar que a porfirina **1.40** foi formada a partir de dois fragmentos, através de uma cicloadição [3+1].

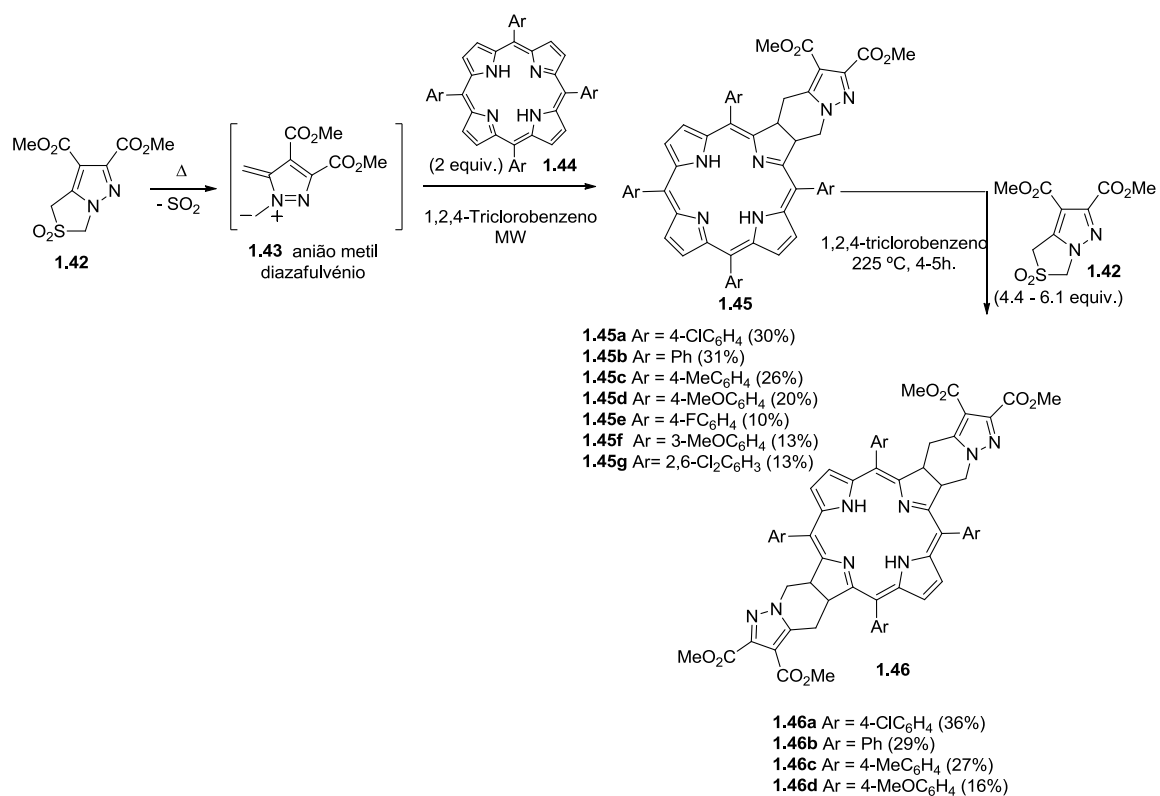


**Esquema 1.11.** Cicloadição 1,3 dipolar para a formação das clorinas **1.41**.

### 1.2.2.3.3. Reação de cicloadição 1,7-dipolar

Pinho e Melo e seus colaboradores desenvolveram um processo sintético que minimiza alguns dos problemas mencionados anteriormente, preparando hidroporfirinas bastante estáveis, através da cicloadição 1,7-dipolar ou  $[8\pi+2\pi]$  do anião metil diazafulvênio **1.43** com porfirinas. A reação de *meso*-tetraarilporfirinas **1.44** com o dipolo **1.43**, gerado por extrusão térmica de SO<sub>2</sub> a partir de 2,2-dioxo-6,7-dimetil-1*H*,3*H*-pirazolo[1,5-*c*][1,3]tiazole-6,7-dicarboxilato (**1.42**), originou as clorinas fundidas com o sistema 4,5,6,7-tetrahidropirazolo[1,5-*a*]piridina **1.45a-1.45g**, de forma seletiva. Após a obtenção das clorinas foi possível formar as bacterioclorinas correspondentes **1.46a-1.46d**, de forma regio- e estereosseletiva, utilizando para tal um excesso da sulfona **1.42** (Esquema 1.12). A síntese das bacterioclorinas foi realizada em refluxo, de triclorobenzeno, e durante 4-5 horas. Depois da formação das bacterioclorinas **1.46**, houve a recuperação de uma parte da clorina de partida, o que indica a estabilidade deste macrociclo.<sup>92,93</sup>

Com esta estratégia formaram-se clorinas e bacterioclorinas estáveis e de uma forma seletiva, com anéis heterocíclicos possuindo grupos atratores de elétrons junto aos anéis reduzidos. Nesta metodologia sintética não morosa, as hidroporfirinas foram obtidas com rendimentos razoáveis. Além disso, neste processo sintético a formação das clorinas apresentou melhores rendimentos quando a reação foi realizada utilizando-se a tecnologia de micro-ondas (250 °C e durante 20 minutos). Por exemplo, a clorina **1.45a** foi obtida com um rendimento de 30%, no entanto, quando a reação foi realizada através de aquecimento convencional (6 horas, refluxo de 1,2,4-triclorobenzeno) esta apresentou um rendimento menor (22%).<sup>93</sup>



**Esquema 1.12.** Cicloadição 1,7-dipolar para a obtenção das clorinas **1.45a-1.45g** e bacterioclorinas **1.46a-1.46d**.



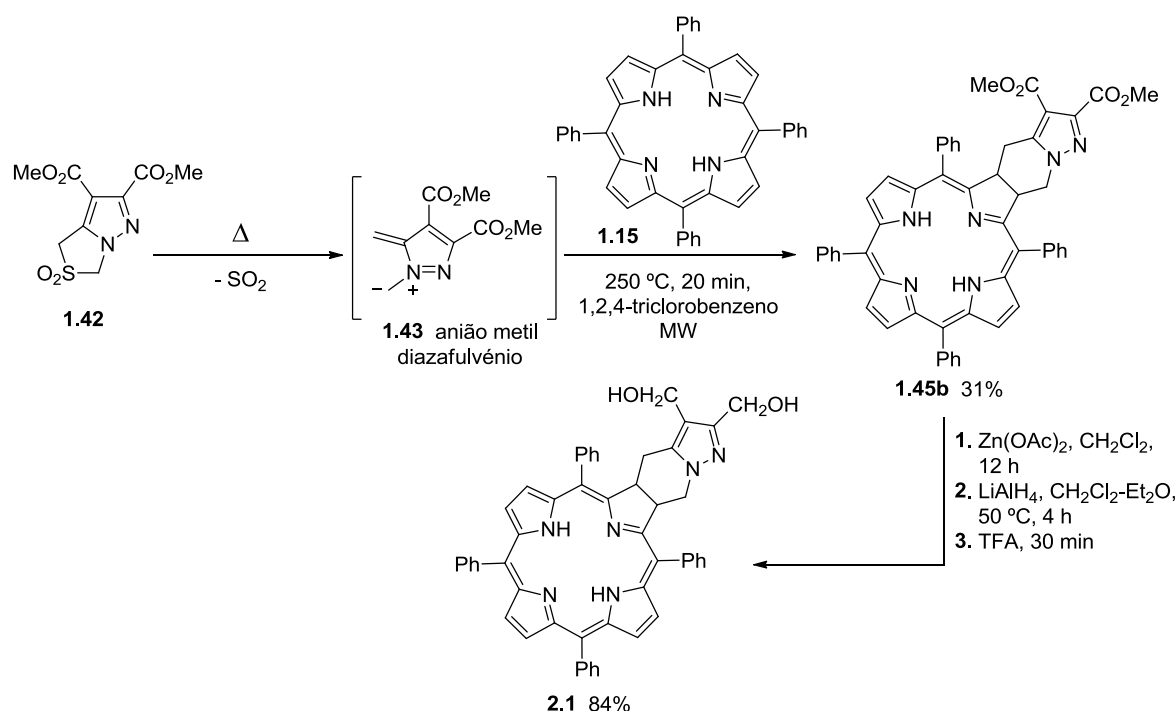
## **CAPÍTULO 2 – RESULTADOS E DISCUSSÃO**



## 2.1. Objetivos

Nos dias de hoje os investigadores têm-se dedicado à investigação e desenvolvimento de terapias que permitam a eliminação das células cancerígenas de uma forma mais seletiva, havendo a minimização ou mesmo eliminação dos efeitos secundários, inerentes às terapias convencionais. A PDT, tal como já mencionado no subcapítulo 1.1 desta tese, surge como uma modalidade terapêutica bastante promissora para o tratamento de doenças oncológicas. Um dos componentes mais importantes desta terapia é o PS, o qual poderá ser uma porfirina ou um derivado da mesma. As clorinas e bacterioclorinas são muito utilizados em PDT devido às razões citadas no subcapítulo 1.2. Contudo a síntese destes compostos apresenta algumas limitações, devido à formação de produtos secundários indesejados.

Pinho e Melo e seus investigadores desenvolveram uma metodologia sintética que permitiu a obtenção de clorinas e bacterioclorinas estáveis e de forma seletiva, minimizando a formação de produtos indesejados, tal como referido no subcapítulo 1.2 (Esquema 1.12). Estes investigadores dedicaram-se à síntese de diversas tetraarilclorinas e bacterioclorinas com diferentes grupos nas posições *meso*.<sup>92,93</sup> A clorina **1.45b** e o seu derivado hidrófilo **2.1** (Esquema 2.1), preparado através da redução dos dois grupos ésteres aos respetivos álcoois, foram avaliados *in vitro*.<sup>94</sup>



Esquema 2.1 Síntese das *meso*-tetraarilclorinas **1.45b** e **2.1**.

A atividade *in vitro* das *meso*-tetraarilclorinas diéster **1.45b** e di-hidroxilada **2.1**, foi avaliada em duas linhas celulares do melanoma humano, na A375 (melanócito) e na C32 (amelanócito). Verificou-se que existe uma grande diferença na atividade citotóxica entre as clorinas diéster **1.45b** e di-hidroxilada **2.1** nas duas linhas celulares, sendo a citotoxicidade apresentada pela clorina **2.1** bastante superior à da clorina **1.45b** (Tabela 2.1). Esta última

apresentou valores de IC<sub>50</sub> (concentração necessária para reduzir a atividade das células tumorais em 50%) de 1.85 µM e 0.78 µM nas células A375 e C32, respetivamente. O derivado di-hidroxilado **2.1** apresentou valores de IC<sub>50</sub> menores em ambas as linhas celulares. Na linha celular C32, o valor de IC<sub>50</sub> foi de 231 nM e o valor de IC<sub>50</sub> para a linha A375 foi de 31 nM. Deste modo, percebe-se facilmente que a clorina **2.1** é mais eficiente que a clorina **1.45b** e apresenta uma maior citotoxicidade para as células tumorais A375.<sup>94</sup>

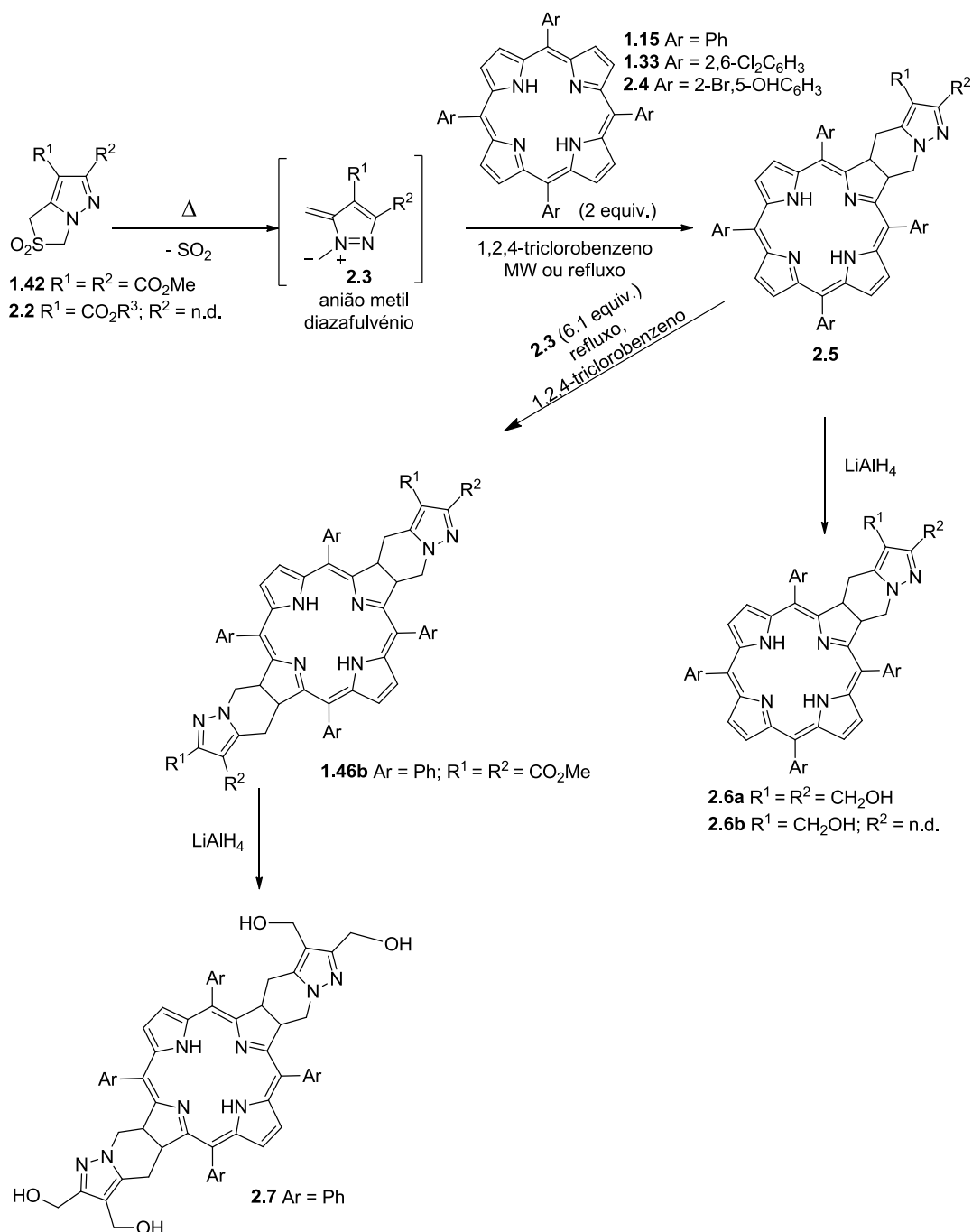
**Tabela 2.1** Valores de IC<sub>50</sub> das clorinas **1.45b** e **2.1** nas linhas celulares humanas do melanoma.

Clorina	IC <sub>50</sub>	
	A375	C32
<b>1.45b</b>	1.85 µM	0.78 µM
<b>2.1</b>	31 nM	231 nM

Estes estudos revelaram que as pequenas diferenças estruturais entre as clorinas **1.45b** e **2.1**, culminaram numa diferença considerável na citotoxicidade. Este aumento da citotoxicidade do derivado hidrofílico estará relacionado com sua maior captação nas linhas celulares (a clorina **2.1** é cerca de dez vezes mais captada que a clorina **1.45b**). No subcapítulo 1.1 da presente tese vimos que um dos fatores que contribuí para a maior eficiência da PDT é a acumulação do PS nas células tumorais.

Em melanomas fortemente pigmentados com melanina (melanóticos) o tratamento com PDT apresenta algumas limitações, devido à competição entre a melanina e o fotossensibilizador na absorção da radiação na “janela terapêutica” (650-850 nm).<sup>36</sup> No entanto, a eficiência da clorina **2.1**, que absorve a um  $\lambda = 651$  nm, foi superior na linha celular de cancro do melanoma melanócito (A375).<sup>94</sup> Deste modo a clorina **2.1** surge como um bom candidato para utilização em PDT para o tratamento do cancro do melanoma com forte pigmentação.

Perante estes resultados bastantes promissores há a necessidade de desenvolver novos derivados de *meso*-tetraarilclorinas e bacterioclorinas, através do método de Pinho e Melo<sup>92,93</sup>, os quais serão abordados neste trabalho. Assim iremos explorar a síntese das clorinas fundidas com o anel 4,5,6,7-tetra-hidropirazolo[1,5-*a*]piridina funcionalizadas com grupos ésteres **2.5**, a partir da reação de diferentes aniões metil diazafulvénio **2.3** com as *meso*-tetraarilporfirinas **1.15**, **1.33** e **2.4** (Esquema 2.2). As porfirinas **1.33** e **2.4** serão utilizadas para a obtenção de clorinas uma vez que, alguns estudos demonstram que di-hidroporfirinas contendo halogénios nas posições *orto* dos anéis fenílicos apresentam um aumento significativo do rendimento quântico de oxigénio singuleto, consequência do aumento do cruzamento intersistemas (devido ao efeito do átomo pesado).<sup>95</sup> Deste modo poderá haver um aumento da eficiência dos fotossensibilizadores em PDT. Adicionalmente utilizaremos a porfirina **2.4** porque derivados porfirínicos contendo grupos hidroxilos nas posições *meta* dos anéis fenílicos são bons fotossensibilizadores, como é o caso do Foscan®.<sup>96</sup> Por outro lado, é importante referir que a porfirina **2.4** apresentou resultados bastante positivos *in vitro* e *in vivo*, para ser utilizada como fotossensibilizador em PDT para o tratamento do cancro do melanoma e do adenocarcinoma colorretal.<sup>97</sup>



**Esquema 2.2.** Estratégia sintética para a preparação das clorinas **2.5** e **2.6** e das bacterioclorinas **1.46b** e **2.7**.

Após a formação das clorinas **2.5**, os seus grupos ésteres serão reduzidos a álcoois, dando origem às clorinas hidroxiladas **2.6**. Assim haverá um aumento da hidrofiliidade e, deste modo, uma possível melhor captação destas nas células tumorais (tal como aconteceu com a clorina **2.1**).

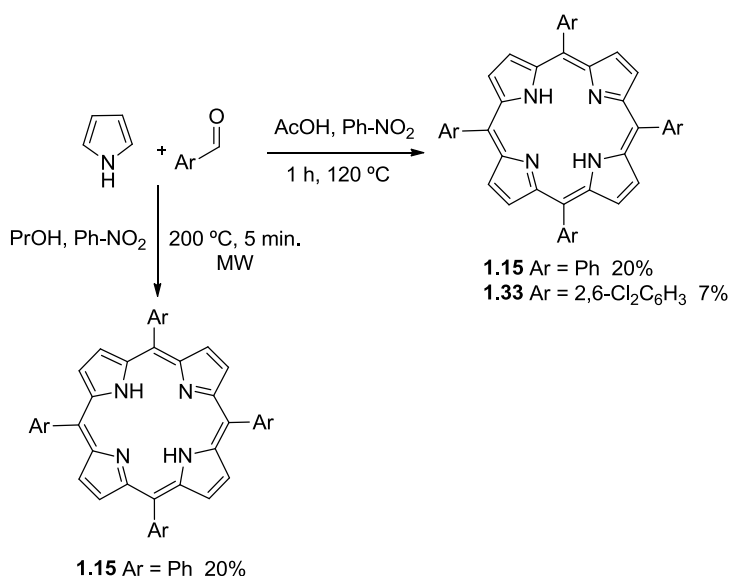
Vimos no subcapítulo 1.2 que as bacterioclorinas absorvem a um comprimento de onda maior que os das clorinas (Figura 1.10, subcapítulo 1.2). Absorvem no infravermelho próximo ( $\sim 730 \text{ nm}$ ), havendo por isso, a redução do efeito competitivo de absorção de luz por parte da melanina (Figura 1.1, subcapítulo 1.1). A síntese da bacterioclorina **1.46b** e a redução

dos seus quatro grupos éster a álcoois, originando o derivado hidrofílico **2.7** será também explorada neste trabalho.

Após a síntese destas novas clorinas e bacterioclorina será necessário proceder a estudos preliminares das características fotofísica das mesmas, com o objetivo de percebermos se estas cumprem alguns dos requisitos básicos para poderem ser utilizadas como fotossensibilizadores em PDT.

## 2.2. Reação de aniões metil diazafulvénio com porfirinas para obtenção de clorinas e bacterioclorina

Com o objetivo de obter novos derivados de *meso*-tetraarilclorinas e de um novo derivado de bacterioclorina, através da reação de aniões metil diazafulvénio com porfirinas, iniciámos o trabalho experimental com a síntese destas últimas. Duas das 5,10,15,20-tetraarilporfirinas foram preparadas a partir do método de Rocha Gonsalves (Esquema 2.3).<sup>71</sup> Adicionou-se o pirrole a uma mistura que contém o aldeído pretendido, ácido acético e nitrobenzeno, em refluxo, a 120 °C. As porfirinas **1.15** e **1.33** foram obtidas com rendimentos próximos dos mencionados na literatura.<sup>71,72</sup> No caso da porfirina **1.15** foi também utilizada a tecnologia de micro-ondas para a obtenção da mesma, com um rendimento igual ao do método convencional (20%).<sup>73</sup> Para a porfirina **1.33** não se utilizou este método alternativo, uma vez que, o rendimento descrito na literatura (4%) era inferior ao obtido pelo método convencional.



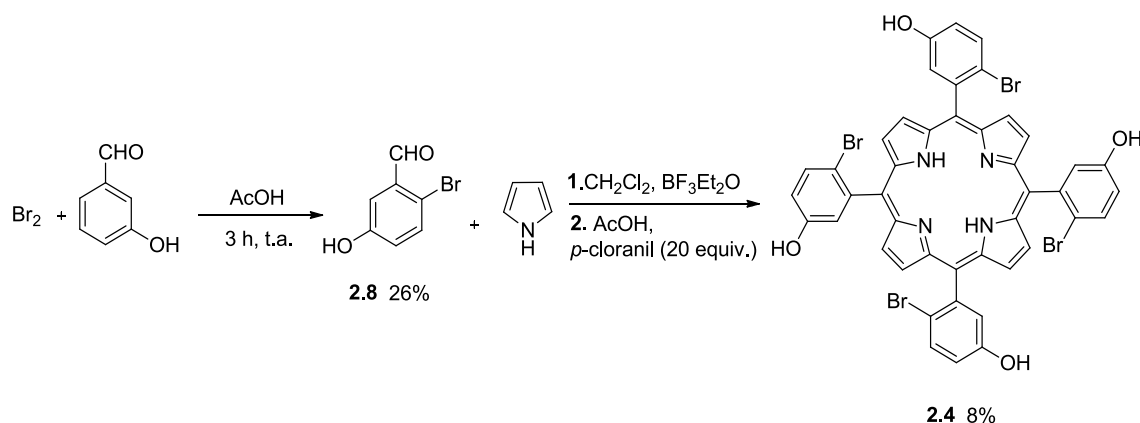
**Esquema 2.3.** Síntese das 5,10,15,20-tetraarilporfirinas **1.15** e **1.33**.

Para a obtenção da porfirina **2.4** foi necessário sintetizar previamente o aldeído correspondente **2.8**, de acordo com um procedimento da literatura (Esquema 2.4).<sup>98</sup> O aldeído **2.8** foi preparado através da reação do bromo com uma mistura de 3-hidroxibenzaldeído em ácido acético glacial, à temperatura ambiente e com duração de 3 horas. Este foi obtido com um rendimento de 26%, valor inferior ao mencionado na literatura (68%).

À mistura do aldeído **2.8** e pirrole em diclorometano adicionou-se trifluoroboroeterato e uma pequena quantidade de etanol. Deixou-se reagir durante 12 horas, na ausência de luz, obtendo-se o porfirinogénio o qual foi posteriormente convertido na porfirina **2.4**. Para oxidar o porfirinogénio e obter a porfirina pretendida, utilizou-se o agente oxidante *p*-cloranil (2,3,5,6-tetracloro-1,4-benzoquinona) em excesso (20 equivalentes) e controlou-se a oxidação por UV-Vis. A porfirina **2.4**, após purificação por

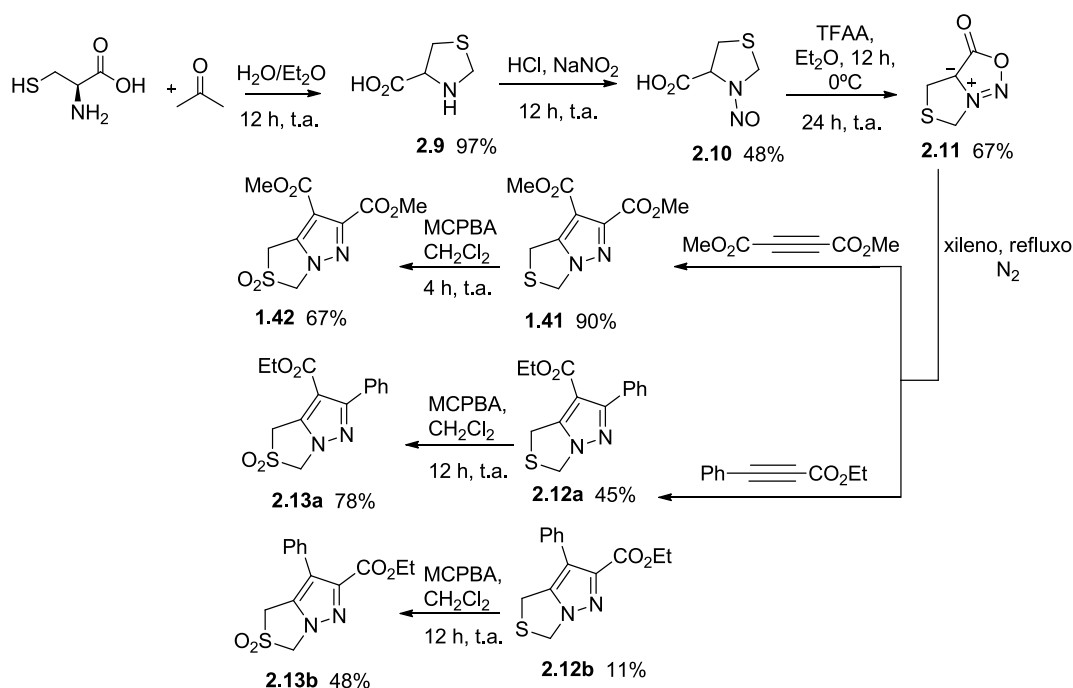
cromatografia em coluna, foi obtida com um rendimento de 8%, próximo do descrito na literatura.<sup>96</sup>

No procedimento da literatura a oxidação do porfirinogénio é realizada com peróxido de hidrogénio (30%) no entanto, e após diversas tentativas não conseguimos concretizar esta. Por este motivo utilizamos o *p*-cloranil que apresenta um maior poder oxidante.



**Esquema 2.4.** Bromação do aldeído e posterior condensação com pirrole para obtenção da porfirina **2.4**.

Após a preparação das porfirinas pretendidas procedemos à síntese dos 2,2-dioxo-1*H*,3*H*-pirazolo[1,5-*c*][1,3]tiazoles **1.42**, **2.13a** e **2.13b**, precursores dos aniões metil diazafulvénio. A estratégia sintética utilizada para a obtenção destes encontra-se representada no esquema 2.5. Começámos por preparar o ácido 1,3-tizolidina-4-carboxílico (**2.9**), por reação de *L*-cisteína com formaldeído, à temperatura ambiente e durante 12 horas, obtendo-se este com um rendimento de 97%.<sup>99</sup>

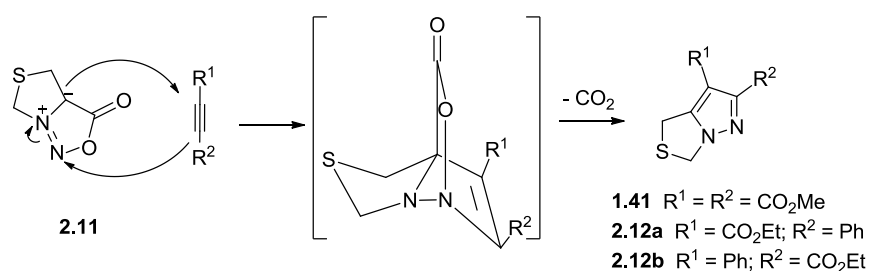


**Esquema 2.5.** Síntese dos 2,2-dioxo-1*H*,3*H*-pirazolo[1,5-*c*][1,3]tiazoles **1.42**, **2.13a** e **2.13b**.



O composto **2.9** foi nitrosado com nitrito de sódio na presença de HCl, à temperatura ambiente, o que culminou na obtenção do ácido *N*-nitroso-tiazolidina-4-carboxílico (**2.10**) com um rendimento de 48%. Posteriormente fez-se reagir a tiazolidina nitrosada **2.10** com o anidrido trifluoroacético (TFAA), durante 6 horas à temperatura de 0 °C, seguidas de mais 24 horas à temperatura ambiente. O dipolo **2.11** foi obtido com um rendimento de 67%, próximo do descrito na literatura (65%).<sup>100</sup>

A espécie dipolar **2.11** reagiu com o acetilenodicarboxilato de dimetilo (DMAD) em refluxo, a 140 °C e em atmosfera inerte de N<sub>2</sub> durante 3 horas, originando o produto **1.41**, com um rendimento de 90%, mais elevado do que o mencionado na literatura (77%).<sup>100</sup> Esta reação consistiu numa cicloadição [4π+2π] ou 1,3-dipolar, formando-se um cicloaducto que posteriormente perde CO<sub>2</sub>, dando origem ao 1*H*,3*H*-pirazolo[1,5-*c*][1,3]tiazoles-6,7-dicarboxilato de dimetilo (**1.41**) (Esquema 2.6).

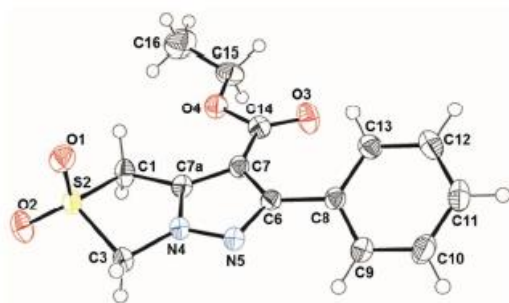


**Esquema 2.6.** Cicloadição [4π+2π] ou 1,3-dipolar, formando-se os pirazolo-tiazoles **1.41**, **2.12a** e **2.12b**.

Seguindo-se a mesma estratégia foram preparados os 1*H*,3*H*-pirazolo[1,5-*c*][1,3]tiazoles **2.12a** e **2.12b**, nunca descritos anteriormente literatura.<sup>101</sup> Neste caso o dipolo **2.11** reagiu com o fenilpropiolato de etilo (EPP), durante 12 horas, sendo que se obtêm dois regioisómeros **2.12a** e **2.12b**. Tal como tinha acontecido no caso do pirazolo-tiazole **1.41**, a reação da espécie dipolar **2.11** com o EPP consistiu numa cicloadição 1,3 dipolar que culminou no aparecimento dos pirazolo-tiazoles **2.12a** e **2.12b**, de forma regioseletiva. (Esquema 2.6). Depois de serem purificados por cromatografia em coluna, os regioisómeros **2.12a** e **2.12b** foram obtidos com um rendimento de 45% e 11%, respetivamente.

Os compostos **1.41**, **2.12a** e **2.12b** foram oxidados, à temperatura ambiente, utilizando-se ácido 3-cloroperoxibenzóico (MCPBA), originando as sulfonas **1.42**, **2.13a** e **2.13b**, respetivamente. Estas foram obtidas com rendimentos que variam entre os 48% e os 78%.

A estrutura molecular do composto 2,2-dioxo-6-fenil-1*H*,3*H*-pirazolo[1,5-*c*][1,3]tiazole-7-carboxilato de etilo (**2.13a**) foi estabelecida por cristalografia de raios-X (Figura 2.1). A sulfona **2.13a** é constituída por um 1*H*,3*H*-pirazolo[1,5-*c*][1,3]tiazole com um derivado carboxilato de etilo na posição C7 e um substituinte fenilo na posição C6 do anel fundido, comprovando a regioseletividade da cicloadição dipolar anterior.



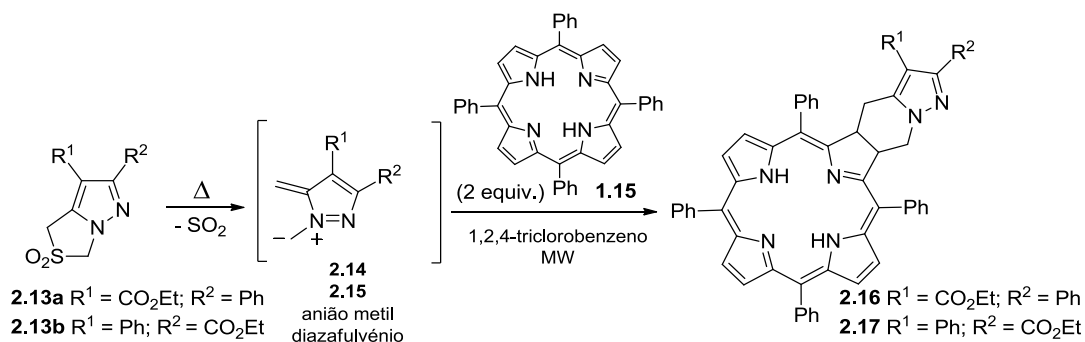
**Figura 2.1.** Estrutura determinada por cristalografia de raios-X do 2,2-dioxo-6-fenil-1*H*,3*H*-pirazolo[1,5-*c*][1,3]tiazole-7-carboxilato de etilo (**2.13a**).

Pinho e Melo e seus investigadores demonstraram que o 2,2-dioxo-1*H*,3*H*-pirazolo[1,5-*c*]tiazole **1.41** reagiu com diferentes porfirinas permitindo a formação seletiva de clorinas bastante estáveis, não havendo a formação de produtos indesejados (Esquema 1.12, subcapítulo 1.2).<sup>92,93</sup> Estes investigadores provaram que após a formação da clorina com grupos ésteres é possível a redução destes aos respetivos grupos hidroxilos (Esquema 2.1).<sup>94</sup>

Com o objetivo de sintetizarmos novos derivados de *meso*-tetraarilclorinas, exploramos a reatividade das sulfonas **2.13a** e **2.13b** com a TPP **1.15**, em diferentes condições reacionais (Tabela 2.2). Iniciámos este estudo pela realização da reação entre a sulfona **2.13a** e a porfirina **1.15**, a 200 °C, durante 10 minutos, utilizando a tecnologia de micro-ondas e 1,2,4-triclorobenzeno como solvente. Obteve-se a clorina **2.16** com um rendimento de 13% e recuperou-se 82% da porfirina de partida **1.15** (Entrada 1). Modificando o tempo reacional para 20 minutos, a hidroporfirina **2.16** foi obtida com um rendimento maior (20%) e recuperou-se menos porfirina de partida (49%) (Entrada 2). A uma temperatura de 250 °C e durante 10 minutos, a clorina **2.16** apresentou um rendimento de 35% e recuperou-se 59% da TPP **1.15** (Entrada 3). O melhor rendimento para a preparação da hidroporfirina **2.16** foi de 39% e ocorreu quando a reação foi realizada a uma temperatura de 250 °C e durante 20 minutos, tendo-se recuperado 53% da porfirina de partida (Entrada 4). Nestas condições, a síntese da hidroporfirina **2.16** apresentou um rendimento superior ao descrito na literatura para a clorina **1.45b** (31%) (Esquema 1.12, subcapítulo 1.2).<sup>92,93</sup>

Verificámos que o aumento da temperatura levou a um aumento do rendimento do produto e que recuperámos sempre porfirina de partida a qual pode ser reutilizada.

**Tabela 2.2.** Reação das sulfonas **2.13a** e **2.13b** com a TPP **1.15** para a obtenção das clorinas **2.16** e **2.17**.

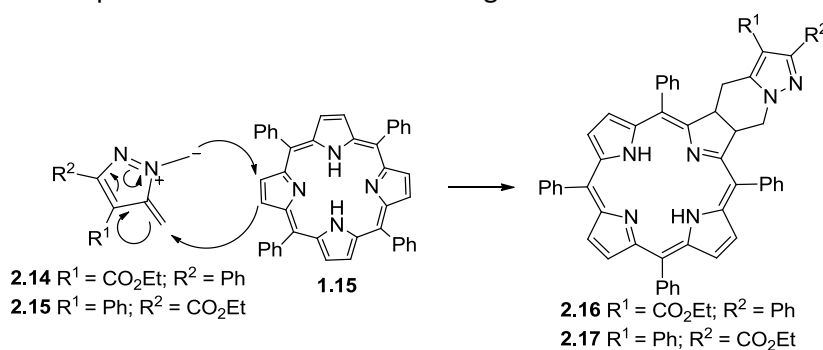


Entrada	Sulfona	Condições reacionais	Rendimento (%)	Porfina recuperada (%)
1	<b>2.13a</b>	200 °C, 10 minutos	<b>2.16</b> , 13	82
2	<b>2.13a</b>	200 °C, 20 minutos	<b>2.16</b> , 20	49
3	<b>2.13a</b>	250 °C, 10 minutos	<b>2.16</b> , 35	59
4	<b>2.13a</b>	250 °C, 20 minutos	<b>2.16</b> , 39	53
5	<b>2.13b</b>	250 °C, 20 minutos	<b>2.17</b> , 0.8[a]	73

[a] isolada com um derivado oxidado

Depois de otimizadas as condições reacionais para a formação da clorina fundida com o anel 4,5,6,7-tetra-hidropirazolo[1,5-*a*]piridina **2.16**, realizámos a reação entre a sulfona **2.13b** e a TPP **1.15**, nas condições em que a clorina **2.16** apresentou melhor rendimento (250 °C, 20 minutos). Nestas condições a hidroporfirina **2.17** foi obtida com um rendimento de 0.8% e recuperou-se 73% da porfina de partida **1.15**. No entanto, a sulfona **2.13b** levou à formação de uma clorina a qual se encontrava contaminada com um derivado oxidado, o qual não conseguimos identificar.

As clorinas **2.16** e **2.17** foram obtidas de forma seletiva. As sulfonas **2.13a** e **2.13b** após a extrusão térmica do grupo SO<sub>2</sub>, dando origem aos respetivos aniões metil diazafulvênio **2.14** e **2.15**, reagiram com a TPP **1.15**, via cicloadição 1,7-dipolar ou cicloadição [8π+2π],<sup>92,93</sup> formando-se as respetivas clorinas (Esquema 2.7). A seletividade obtida está de acordo com o que foi observado por Pinho e Melo e seus investigadores.<sup>92,93</sup>



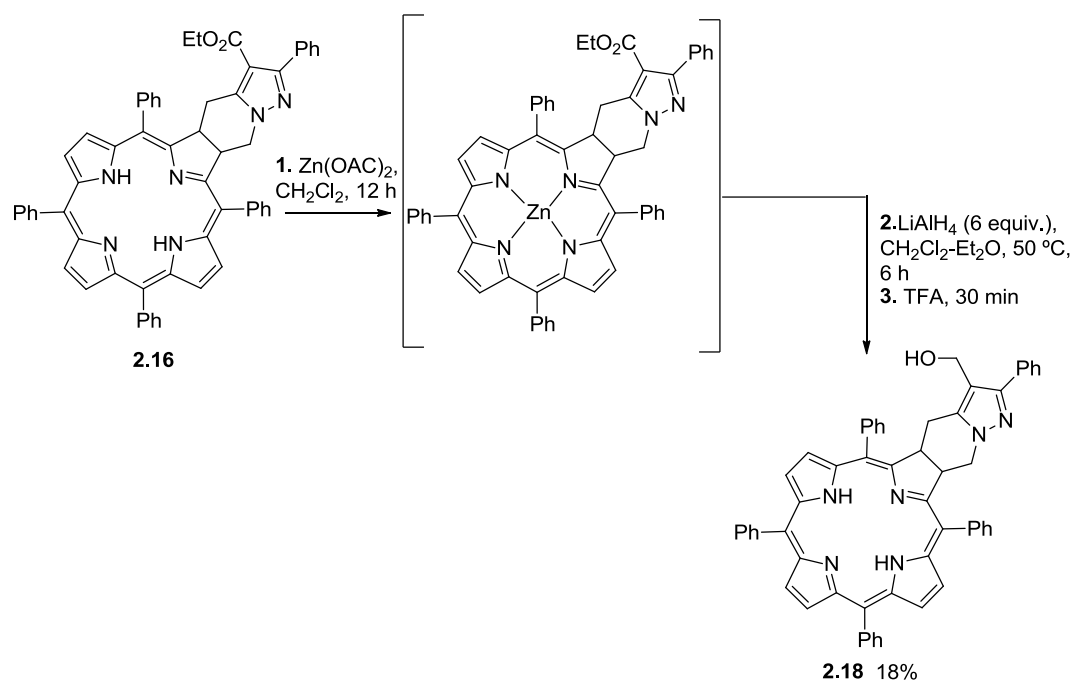
**Esquema 2.7.** Cicloadição [8π+2π] ou 1,7-dipolar do aniões metil diazafulvênio **2.14** e **2.15** com *meso*-tetrafenilporfina (**1.15**), originando as clorina **2.16** e **2.17**.

Um dos nossos objetivos era a síntese de uma clorina que possuísse apenas um grupo hidroxilo para depois procedermos à comparação desta com a clorina di-hidroxilada **2.1**, em termos de rendimento, características fotofísicas e atividade *in vitro*.

Após a síntese das clorinas **2.16** e **2.17** decidimos apenas reduzir a clorina **2.16** uma vez que, esta foi obtida com um rendimento e com um grau de pureza superiores. Por outro lado, acreditamos que a pequena diferença estrutural entre ambas não resultará em grandes alterações na atividade *in vitro*.

A preparação da clorina mono-hidroxilada **2.18** foi realizada seguindo-se o procedimento presente na literatura para formação da clorina di-hidroxilada **2.1** (Esquema 2.8).<sup>94</sup> Para a redução da hidroporfirina **2.16** utilizamos um excesso de LiAlH<sub>4</sub> (6 equivalentes), no entanto, a clorina foi previamente metalada com zinco para evitar a possibilidade de metalação com o alumínio, proveniente de LiAlH<sub>4</sub>. Após a metalação, a qual foi controlada por UV-Vis (a banda do 650 nm deslocou-se para 620 nm), a redução do grupo éster foi realizada em refluxo, a 50 °C e durante 6 horas. A reação foi controlada por cromatografia em camada fina (TLC, do inglês *Thin Layer Chromatography*). De seguida ocorreu a destruição do hidreto em excesso, com água e acetato de etilo, durante 16 horas. Por fim, a metaloclorina foi desmetalada com TFA obtendo-se a clorina **2.18** com um rendimento global de 18%, após purificação por cromatografia em coluna.

Desta forma verificámos que a clorina mono-hidroxilada **2.18** foi obtida com um rendimento inferior ao da clorina di-hidroxilada **2.1** (84%) (Esquema 2.1),<sup>94</sup> apesar de o tempo reacional ter sido maior (6 horas).



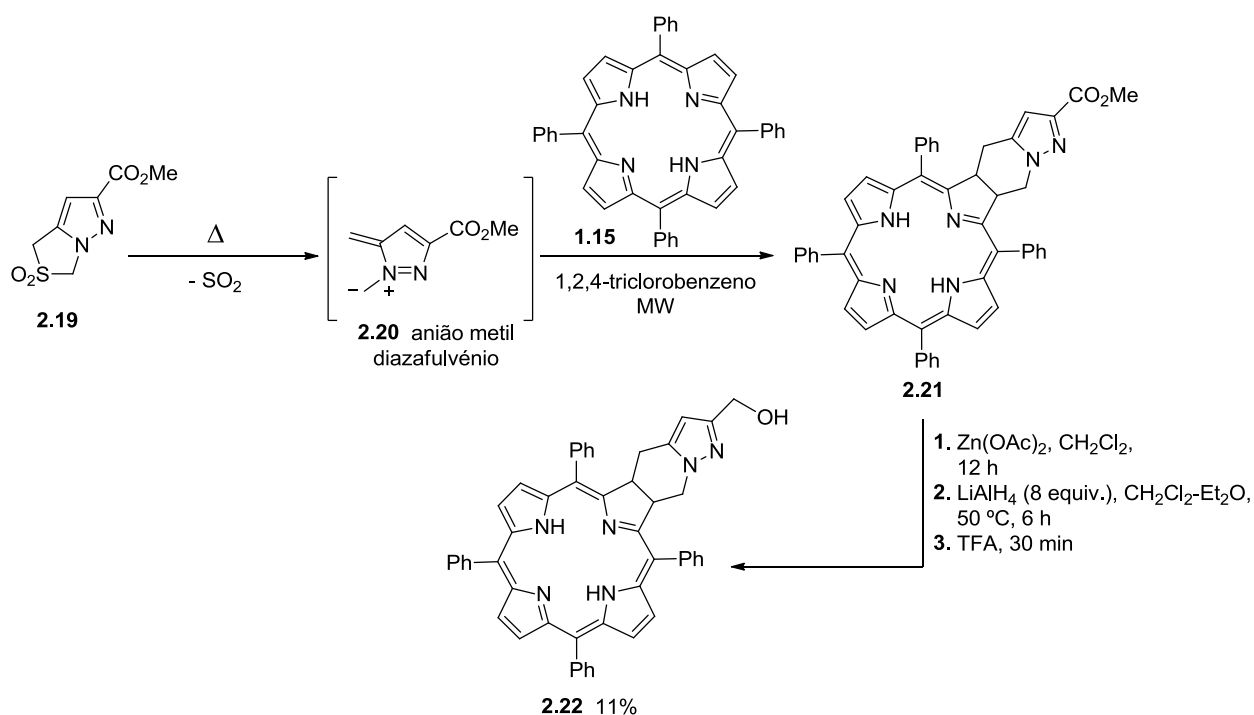
**Esquema 2.8.** Formação da hidroporfirina **2.18** proveniente da clorina **2.16**.

De modo a obtermos mais informações sobre a relação estrutura-atividade, decidimos preparar uma nova clorina mono-álcool, que não apresentasse outros substituintes no anel fundido para além do grupo hidroxilo, para compreendermos se o substituinte fenilo presente na clorina **2.18**, terá alguma influência na atividade *in vitro*.

Decidimos sintetizar a clorina mono-éster **2.21** partindo de uma sulfona diferente.<sup>101</sup> Posteriormente fizemos a sua redução para a obtenção da clorina mono-álcool **2.22**.

Inicialmente fizemos reagir a porfirina **1.15** com a sulfona **2.19**, em diferentes condições reacionais, para a formação da clorina mono-éster **2.21** (Tabela 2.3). A clorina **2.21** foi obtida com o rendimento mais baixo (10%) quando se realizou a reação a 200 °C e durante 10 minutos (Entrada 1), tendo-se recuperado uma grande parte da porfirina **1.15** (89%). O rendimento mais elevado (41%) verificou-se quando aumentámos a temperatura para 250 °C e o tempo para 20 minutos. Nestas condições recuperou-se 54% da porfirina de partida.

**Tabela 2.3.** Formação da clorina **2.21** e redução do grupo éster para a obtenção do derivado hidroxilado **2.22**.



Entrada	Condições reacionais	Rendimento da clorina(%) <sup>[a]</sup>	Porfirina recuperada (%)
1	200 °C, 10 minutos	10	89
2	200 °C, 20 minutos	16	61
3	250 °C, 10 minutos	34	65
4	250 °C, 20 minutos	41	54

[a] isolada com um derivado oxidado

Tal como tinha acontecido no caso da clorina **2.16**, verificou-se que o aumento da temperatura levou a um aumento do rendimento do produto e que recuperámos sempre porfirina de partida a qual pode ser reutilizada.

Nas melhores condições reacionais, a clorina **2.21** apresentou um maior rendimento, em comparação com as clorinas **1.45b** (31%)<sup>92,93</sup> e **2.16** (39%). No entanto esta foi obtida com um grau de pureza inferior, pois encontrava-se contaminada com um derivado oxidado não identificado.

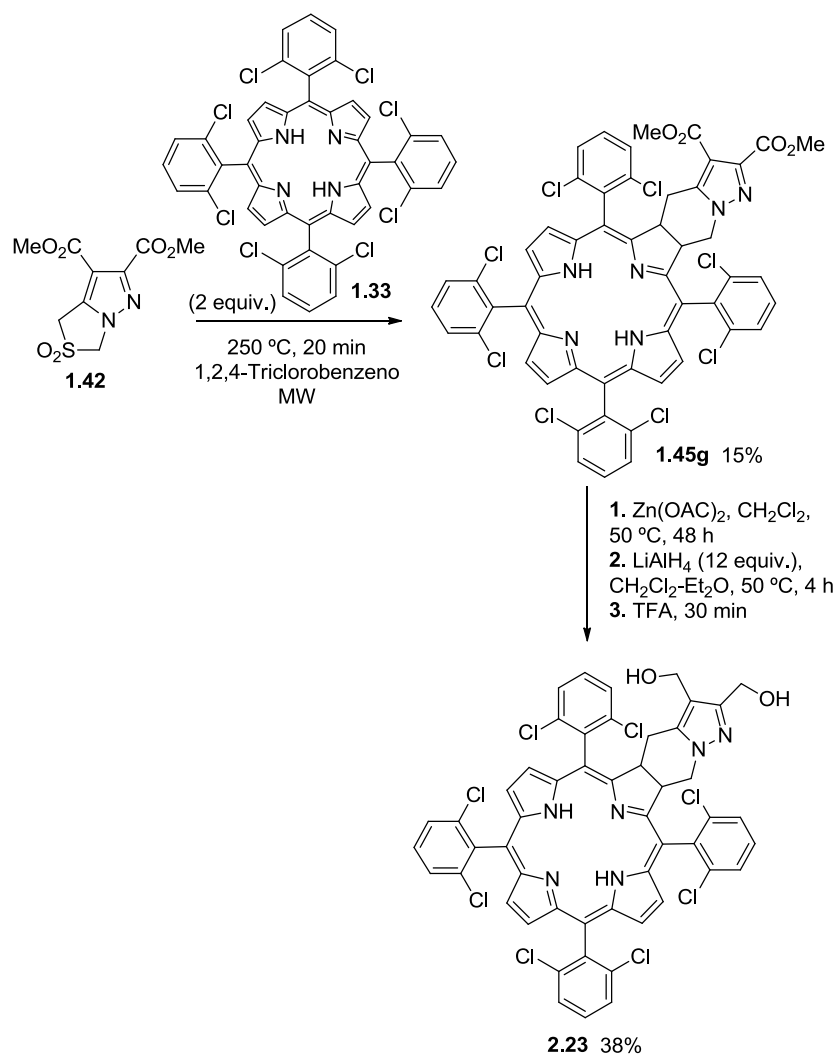
A clorina fundida com o anel 4,5,6,7-tetra-hidropirazolo[1,5-*a*]piridina **2.21** foi obtida de forma seletiva, através de uma cicloadição 1,7-dipolar, estando de acordo com a seletividade observada na formação das clorinas **2.16** e **2.17** (Esquema 2.7). A sulfona **2.19**, após a extrusão de SO<sub>2</sub>, formou o anião metil diazafulvénio correspondente **2.20**, o qual atuou como 1,7-dipolo em reação com a TPP **1.15**, originando a clorina **2.21**.

Apesar da clorina **2.21** não se encontrar totalmente pura, mesmo após a realização de cromatografia em coluna, decidimos prosseguir para a redução do grupo éster da mesma, formando-se a clorina mono-hidroxilada **2.22** (Tabela 2.3). O procedimento utilizado para a redução foi o descrito anteriormente,<sup>94</sup> mas neste caso foi necessários utilizar 8 equivalentes de LiAlH<sub>4</sub>. A evolução da reação foi controlada por TLC, sendo a clorina **2.22** obtida com um rendimento global, após purificação por cromatografia em coluna, de 11%. Este rendimento foi ligeiramente menor que o obtido na formação da clorina mono-hidroxilada **2.18** (18%).

Observámos que ambas as clorinas mono-hidroxiladas **2.18** e **2.22** foram obtidas com rendimentos inferiores ao da clorina dihidroxilada **2.1** (84%) (Esquema 2.1)<sup>94</sup>, apesar de o tempo reacional ter sido maior. Esta constatação sugere que a redução é mais eficiente em derivados contendo dois grupos ésteres.

Tal como referido no subcapítulo 2.1, as clorinas contendo halogénios nas posições *orto* dos anéis fenílicos têm despertado bastante interesse para a sua aplicação em PDT. Fizemos reagir a porfirina **1.33** com a sulfona **1.42** (Esquema 2.9) de acordo com procedimento presente literatura.<sup>92,93</sup> A clorina **1.45g** (Esquema 1.12, subcapítulo 1.2) foi obtida com um rendimento de 15%, próximo do descrito na literatura (13%) e recuperou-se 45% da porfirina de partida **1.33**.

Posteriormente procedemos à redução dos grupos ésteres da mesma, o que culminou na formação da clorina **2.23** (Esquema 2.9). Para a preparação da clorina **2.23** baseamo-nos no procedimento que temos vindo a aplicar para a redução dos grupos ésteres a álcoois.<sup>94</sup> Começámos por metalar a clorina **1.45g** à temperatura ambiente mas, ao fim de 12 horas percebemos que esta apresentava apenas uma pequena fração metalada (controlo por UV-Vis). Perante isto foi necessário realizar a metalação a uma temperatura de 50 °C e durante 48 horas. No entanto havia sempre uma pequena percentagem de clorina **1.45g** que não metalava, o que poderá ser devido ao facto dos cloros serem grupos bastante volumosos. Após a metalação, os grupos ésteres da clorina **1.45g** foram reduzidos aos respetivos álcoois, utilizando-se 12 equivalentes de LiAlH<sub>4</sub>, tendo a reação uma duração de 4 horas (controlo por TLC). O produto **2.23** foi obtido com um rendimento global de 38%, após purificação por cromatografia em coluna.



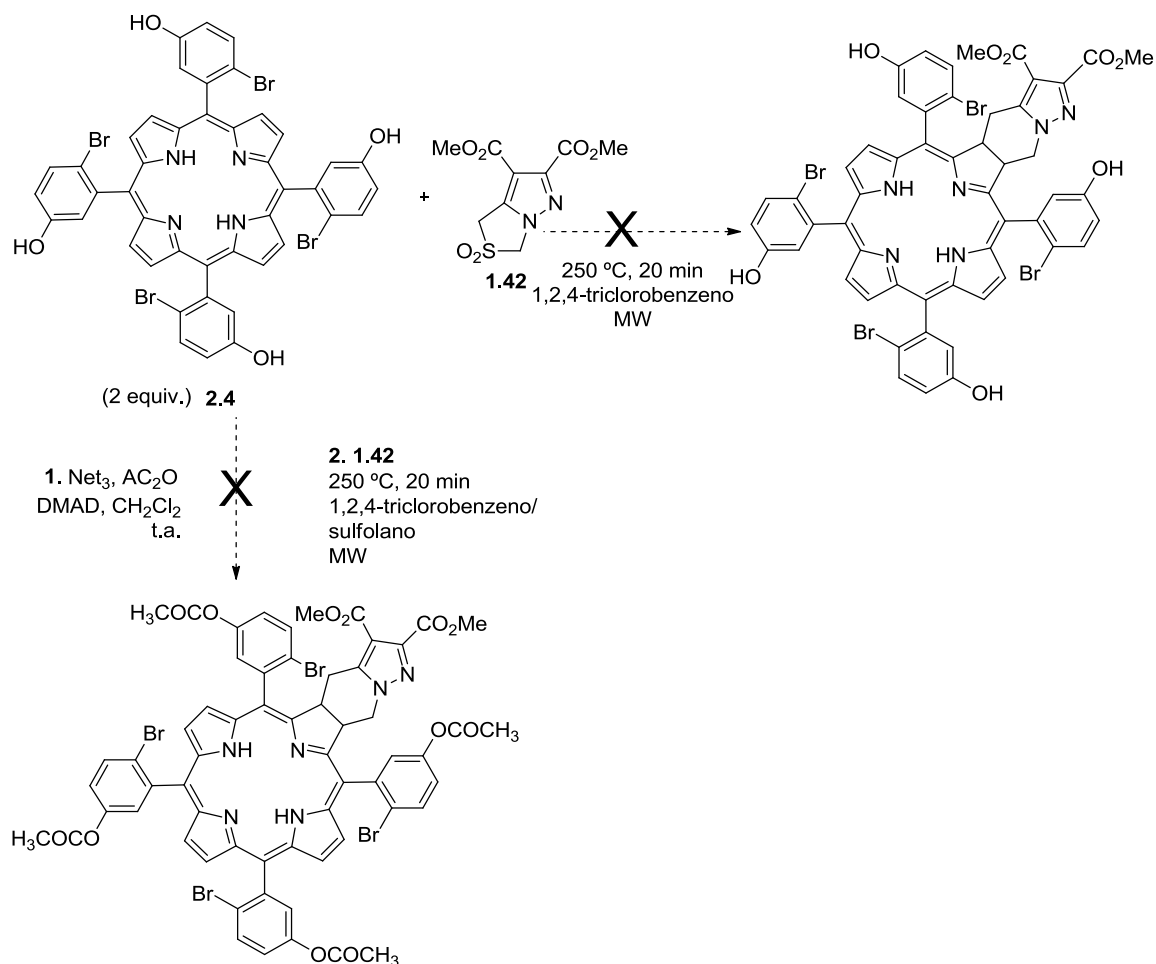
**Esquema 2.9.** Síntese da clorina **1.45g** e posterior redução dos dois grupos ésteres, formando-se o derivado di-hidroxilado **2.23**.

Observámos que a clorina **2.23** apresentou um rendimento superior ao das clorinas mono-hidroxiladas **2.18** e **2.22**, sugerindo que a redução é mais eficiente nos compostos que contêm dois grupos ésteres, tal como constatado anteriormente. No entanto, o seu rendimento é inferior ao da clorina **2.1** (84%)<sup>94</sup> (Esquema 2.1), o que, será devido ao facto da metalacção não ter sido totalmente completa.

Tínhamos como objetivo explorar a síntese de uma nova clorina, a partir da porfirina **2.4**. As razões para a utilização desta porfirina foram citadas no subcapítulo 2.1 e prendem-se com o facto de ela conter grupos hidroxilos nas posições *meta* e halogénios nas posições *orto* dos anéis fenílicos.

Numa primeira abordagem fizemos reagir a porfirina **2.4** com a sulfona **1.42**, de acordo com as condições otimizadas presentes na literatura para esta sulfona<sup>92,93</sup> (Esquema 2.10). Após o término da reacção vimos que a porfirina **2.4** não era solúvel em triclorobenzeno, não havendo evidências da formação da clorina pretendida. Com o intuito de contornar este problema decidimos acetilar os grupos hidroxilos da porfirina **2.4**, com anidrido acético. Para tal, dissolvemos a porfirina **2.4** em diclorometano, adicionámos uma quantidade catalítica de DMAP (4-dimetilaminopiridina), um excesso de trietilamina (19.6 equivalentes) e de anidrido

acético (10 equivalentes). Controlámos a reação por TLC ao fim de 3 horas e esta apresentava-se completa. De seguida fizemos reagir a porfirina com os grupos hidroxilos acetilados e a sulfona **1.42**, no entanto esta continuava a não ser solúvel em triclorobenzeno, não havendo a formação do produto pretendido.

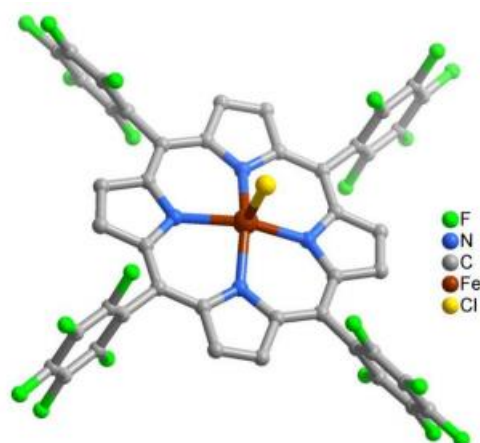


**Esquema 2.10.** Diferentes tentativas para a reação da porfirina **2.4** com a sulfona **1.42**.

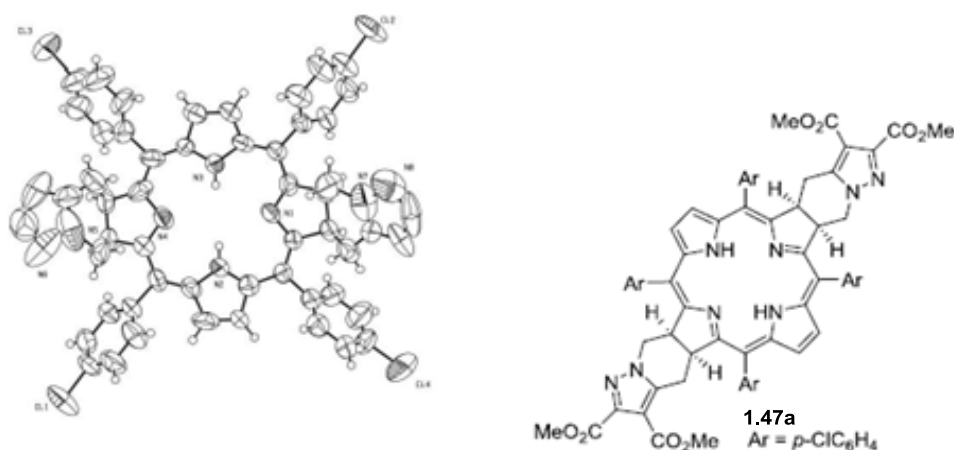
Para tentar contornar este problema de solubilidade decidimos utilizar um solvente mais polar, o sulfolano. A porfirina contendo os grupos hidroxilos acetilados foi solúvel neste solvente no entanto continuou a não ser observada a formação do produto desejado. O que poderá ter acontecido devido à acetilação ter sido incompleta uma vez que, esta reação foi controlada apenas por TLC.

Apesar de os bromos serem grupos bastante volumosos, os substituintes arílicos não seriam coplanares com o anel porfirínico, não havendo assim, evidências de impedimento estérico. Deste modo esta não será a causa para a não ocorrência da reação. Ao analisarmos as figuras **2.2**<sup>102</sup> e **2.3**<sup>103</sup> podemos comprovar o que foi referido anteriormente. Os substituintes arílicos que contêm flúores não ficam no mesmo plano do anel porfirínico (figura 2.2), não afetando a formação do cicloaduto pretendido - o anel 4,5,6,7-tetra-hidropirazolo[1,5-*a*]piridina (figura 2.3).





**Figura 2.2.** Estrutura da metaloporfirina [FeCl(TPFPP)] determinada por cristalografia de raios-X [Adaptado da referência: 102].



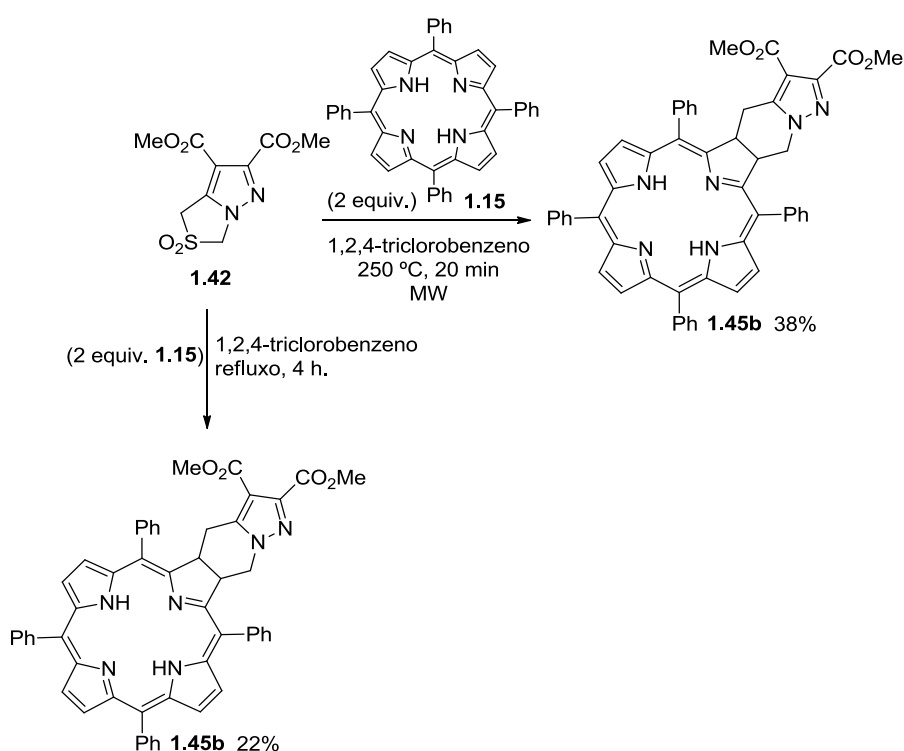
**Figura 2.3.** Estrutura da bacterioclorina **1.47a** determinada por cristalografia de raios-X [Adaptado da referência: 103].

No futuro será necessário investir mais tempo de modo a explorarmos a melhor estratégia para a obtenção da clorina pretendida.

Será necessário testar a reação da porfirina **2.4** com a sulfona **1.42** utilizando o sulfolano como solvente. Posteriormente se esta estratégia não resultar, a otimização da acetilação dos grupos hidroxilos da porfirina será crucial. A porfirina com os grupos hidroxilos acetilados irá posteriormente reagir com a sulfona **1.42**, utilizando-se como solvente o sulfolano. Caso esta alternativa falhe, uma possível alternativa será a complexação da porfirina **2.4** com níquel, de modo a direcionar a reação posterior com a sulfona **1.42** para as posições  $\beta$ -pirrólicas do macrocilo porfirínico.<sup>104</sup> Esta estratégia foi utilizada por Cavaleiro e seus investigadores que antes de procederem à formilação via reação de Vilsmeier das posições  $\beta$ -pirrólicas das porfirinas, complexaram o macrociclo com níquel. Isto conduziu à ativação da posição em que os investigadores pretendiam que ocorresse a formilação e, deste modo a um aumento da seletividade e minimização da formação de produtos secundários.<sup>104</sup>

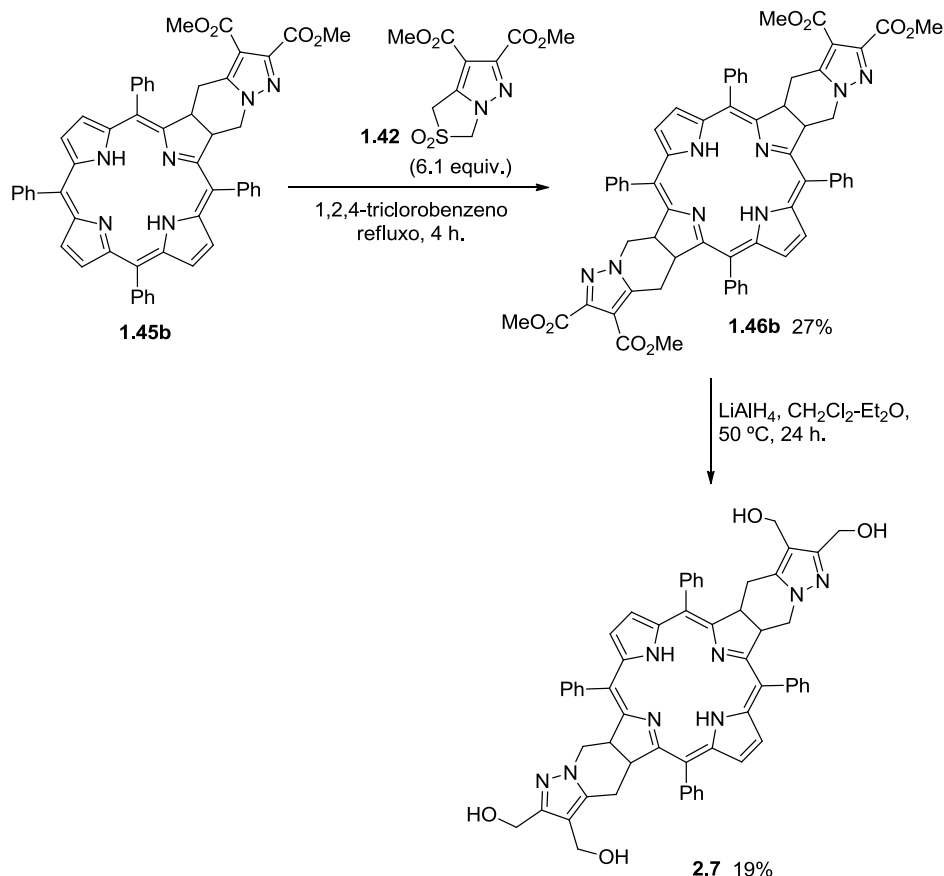
Devido às características das bacterioclorinas, referidas no subcapítulo 1.2, estas tornam-se compostos bastante atrativos para aplicação em PDT. Decidimos explorar a síntese da bacterioclorina tetra-hidroxilada **2.7**.

Começámos por sintetizar a clorina **1.45b** (Esquema 1.12, subcapítulo 1.2)<sup>92,93</sup> explorando dois métodos de síntese (Esquema 2.11). Esta foi obtida através da reação da sulfona **1.42** com a TPP **1.15**, em tecnologia de micro-ondas, a uma temperatura de 250 °C e durante 20 minutos, com um rendimento de 30%, bastante próximo do descrito na literatura (31%).<sup>92,93</sup> O outro método utilizado para a obtenção desta clorina baseou-se na reação da sulfona **1.42** com a porfirina **1.15** em refluxo, a 250 °C, durante 4 horas e em atmosfera inerte de N<sub>2</sub>. Através do método convencional a clorina **1.45b** foi preparada com um rendimento um pouco inferior, de 22%. Em ambos os métodos recuperou-se porfirina de partida (55% e 61%, respetivamente).



**Esquema 2.11.** Duas estratégias para a síntese da clorina **1.45b**.

Após a formação da clorina **1.45b** esta foi colocada em solução de 1,2,4-triclorobenzeno com um excesso de sulfona **1.42** (6.1 equivalentes), em refluxo, a 230 °C, durante 4 horas sob atmosfera inerte de N<sub>2</sub>.<sup>92,93</sup> A formação da bacterioclorina **1.46b** (Esquema 2.12) foi controlada por UV-Vis (desaparecimento da banda de 650 nm, característica da clorina de partida), tendo-se obtido esta com um rendimento de 27%, ligeiramente inferior ao descrito na literatura (29%)<sup>92,93</sup>. Recuperou-se 14% da clorina de partida o que é uma indicação da estabilidade deste macrociclo.



**Esquema 2.12.** Formação da bacterioclorina **1.46b** seguida da redução para obtenção da bacterioclorina tetra-hidroxilada **2.7**.

Depois de formada a bacterioclorina **1.46b** procedemos à redução dos quatro grupos ésteres de modo a aumentar a sua hidrofiliicidade e a sua possível captação nas células. A redução foi realizada adaptando-se o procedimento que utilizámos para a formação das clorinas **2.1**, **2.18** e **2.22**.<sup>94</sup> Como não se verificou a complexação da bacterioclorina com o zinco, prosseguimos para a redução da mesma utilizando 24 equivalentes LiAlH<sub>4</sub>, em refluxo, a 50 °C e durante 24 horas (controlo por TLC). Após o término da reação obtivemos uma mistura de bacterioclorina mono, di, tri e tetra-hidroxilada, sendo que, após purificação por cromatografia em coluna, a bacterioclorina **2.7** foi obtida com um rendimento global de 19%.



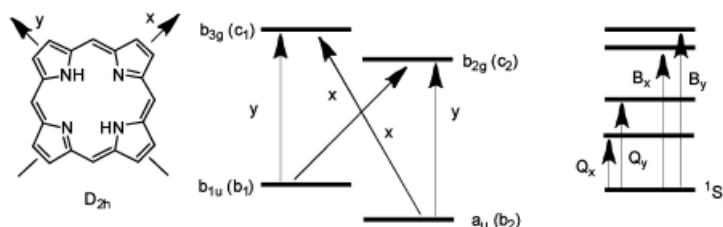
## 2.3. Estudos preliminares das características fotofísicas

### 2.3.1. Espectroscopia de absorção Ultravioleta-Visível

Tal como mencionado no subcapítulo 1.2, o espectro de absorção UV-Vis característico de uma porfirina de base livre (não metalada), destaca-se pela existência de uma banda com um coeficiente de absorvidade molar muito elevado, que se situa no intervalo dos 400-450 nm, designada de Soret (ou banda B), seguida de quatro bandas de baixa intensidade na região compreendida entre os 500 e os 700 nm, designadas de bandas Q. A principal modificação no espectro de UV-Vis das clorinas e bacterioclorinas, em comparação com as porfirinas, é a presença uma banda de absorção mais intensa, a aproximadamente 650 e 730 nm, respetivamente (Figura 1.10, subcapítulo 1.2).

Os espectros de absorção das porfirinas e hidroporfirinas foram interpretados por vários autores<sup>105,106</sup> mas o modelo teórico proposto por Gouterman, denominado de modelo das quatro orbitais,<sup>107-109</sup> tem prevalecido até hoje. Este modelo interpreta os espectros de absorção de porfirinas tendo em atenção as transições eletrónicas entre duas orbitais ocupadas de maior energia (HOMO) e duas orbitais desocupadas de menor energia (LUMO). As duas orbitais HOMO são designadas de  $b_1$  e  $b_2$  e apresentam simetria  $a_{2u}$  e  $a_{1u}$ . Por sua vez, as orbitais LUMO são denominadas por de  $c_1$  e  $c_2$ , apresentando simetria  $e_g$ .

As cinco bandas observadas no espectro de absorção das porfirinas podem ser explicadas, segundo Gouterman, arbitrando-se um sistema de eixos cartesianos  $x$  e  $y$  sobre a estrutura do macrociclo tetrapirrólico, podendo ocorrer as transições  $B_x$ ,  $B_y$ ,  $Q_x$  e  $Q_y$  (Figura 2.4).



**Figura 2.4.** Sistema de eixos cartesianos para o estudo de porfirinas de base livre ( $D_{2h}$ ) e representação das orbitais e transições eletrónicas entre o estado fundamental e o estado excitado, segundo o modelo de Gouterman [Adaptado da referência 109].

Como demonstra a figura 2.4, as transições entre as orbitais  $b_1 \rightarrow C_1$  e  $b_1 \rightarrow C_2$ , originam respetivamente as bandas  $Q_y$  e  $Q_x$ , as quais se caracterizam por uma baixa energia e intensidade. Por outro lado, as bandas  $B_x$  e  $B_y$ , de maior energia e intensidade, correspondem às transições  $b_2 \rightarrow c_1$  e  $b_2 \rightarrow c_2$ . As transições entre o nível vibracional zero do estado fundamental para o nível vibracional zero do estado excitado, originam bandas que podem ser representadas por  $B_x(0,0)$ ,  $B_y(0,0)$ ,  $Q_x(0,0)$  e  $Q_y(0,0)$ . As bandas  $Q_x(1,0)$  e  $Q_y(1,0)$ , associadas às transições  $Q_x(0,0)$  e  $Q_y(0,0)$ , estão relacionadas com transições eletrónicas para um nível vibracional superior.

Num espectro de absorção de um composto porfirínico de base livre observa-se um par de bandas  $Q_x$  em comprimentos de onda maiores, um par de bandas  $Q_y$  em comprimentos de

onda menores e uma banda bastante intensa (banda Soret), a qual se encontra relacionada com o par de transições  $B_x$  e  $B_y$ .

A redução das porfirinas originando clorinas e bacterioclorinas, conduz a uma distorção do macrociclo e, conseqüente diminuição da simetria. As orbitais HOMO e LUMO são afetadas, nomeadamente  $b_2$  e  $c_1$ , provocando uma variação das suas energias. A diminuição da diferença energética entre estas orbitais, nas hidroporfirinas, é responsável pelo desvio da banda de maior comprimento de onda ( $Q_x$ ).<sup>110</sup>

### 2.3.2. Espectroscopia de fluorescência

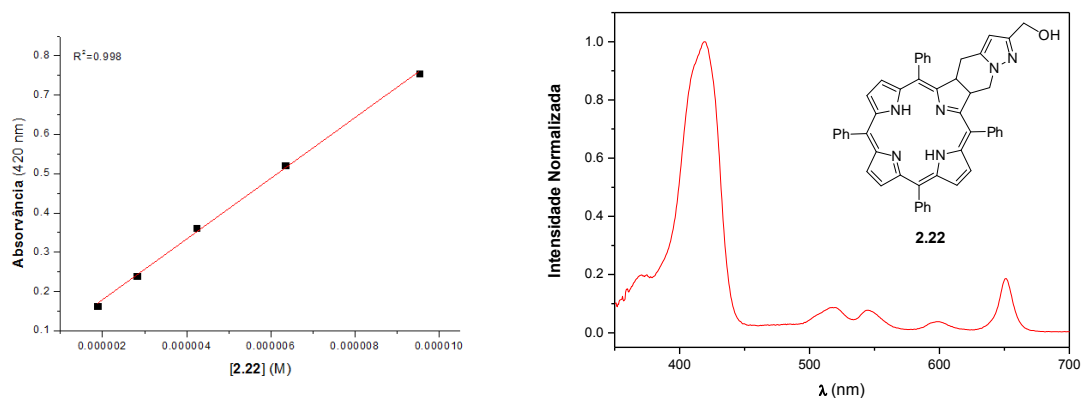
Vimos no subcapítulo 1.1, que após a absorção de luz por parte de um fotossensibilizador podem ocorrer processos radiativos e não radiativos (Figura 1.2). As porfirinas após a excitação do estado singuleto fundamental ( $S_0$ ) para o estado excitado singuleto ( $S_1$ ), podem regressar ao estado fundamental, através da dissipação de energia na forma de luz (fluorescência) ou através de cruzamento intersistemas passar para o estado tripleto ( $T_1$ ). Esta transição caso ocorra por emissão de fluorescência é realizada entre o nível vibracional mais baixo do estado excitado  $S_1$  para o nível vibracional mais baixo do estado fundamental  $S_0$ , originando uma banda  $Q(0,0)$ . Esta banda no espectro de fluorescência é identificada como a banda de maior energia e apresenta-se como imagem no espelho da banda de menor energia no espectro de absorção.<sup>111</sup> As transições que se verificam para níveis vibracionais superiores do estado eletrónico fundamental dão origem a bandas designadas por  $Q(0,n)$ , onde  $n$  representa o estado vibracional do estado fundamental para o qual se dá a transição ( $n=0,1,2,\dots$ ).

Iniciámos os estudos fotofísicos pela preparação das soluções dos novos derivados de clorinas em tolueno ou em metanol (dependendo da solubilidade dos compostos), com concentrações entre  $1 \times 10^{-5}$  e  $1 \times 10^{-7}$  M.

Um aspeto fotofísico importante para caracterizar estes compostos é o cálculo do valor do coeficiente de absorvidade molar para cada banda do espectro de absorção, através da lei de Beer-Lambert ( $A=\epsilon lc$ , onde  $A$  é a absorvância,  $\epsilon$  é o coeficiente de absorvidade molar,  $l$  é o caminho ótico percorrido pela luz e  $c$  é a concentração da solução). Através da aplicação desta lei representou-se num gráfico a absorção em função da concentração e, a partir do declive da reta ajustada determinou-se o valor do  $\epsilon$  para cada uma das quatro bandas (três bandas  $Q$  e uma Soret). Na figura 2.5, apresenta-se um exemplo da reta utilizada na determinação do  $\epsilon$  para a banda  $B(0,0)$  da clorina **2.22** e o espectro de absorção da mesma. Todos os valores de  $\epsilon$  foram determinados de igual modo e apresentam-se na tabela 2.4. Os espectros de absorção das restantes clorinas preparadas neste trabalho encontram-se na figura 2.6.

No intervalo de concentrações utilizado ( $1 \times 10^{-5}$  e  $1 \times 10^{-7}$  M) não verificámos qualquer desvio à lei de Beer-Lambert, o que nos indica que os compostos não têm tendência para formar agregados.

Apesar das clorinas **2.17** e **2.21** terem sido isoladas com uma impureza dedicimos estimar os seus valores de  $\epsilon$ .

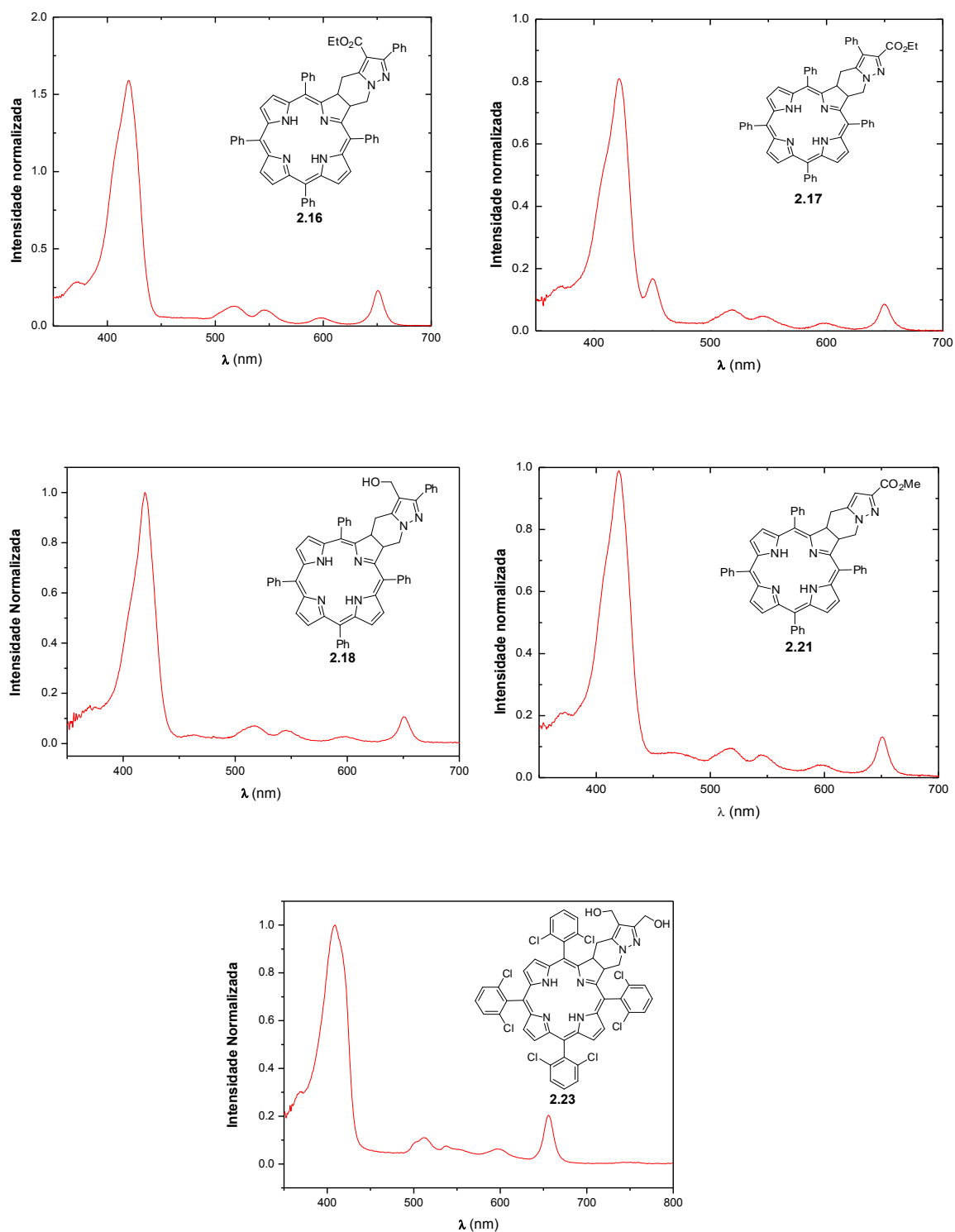


**Figura 2.5.** Gráfico da absorvância em função da concentração para a banda B(0,0) ( $\lambda = 419$  nm) da clorina **2.22** e o seu espectro de absorção UV-Vis.

**Tabela 2.4.** Comprimento de onda do máximo de absorção de cada banda e coeficiente de absorvidade molar correspondente, das clorinas sintetizadas, bem como da clorinas **1.45g** presente na literatura.

Clorina	Absorção $\lambda_{\max}$ [nm] ( $\epsilon$ [M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> ])				
	B(0,0)	Q <sub>y</sub> (1,0)	Q <sub>y</sub> (0,0)	Q <sub>x</sub> (1,0)	Q <sub>x</sub> (0,0)
<b>2.16<sup>a</sup></b>	419	518	547	599	650
	(1.0x10 <sup>5</sup> )	(1.5x10 <sup>4</sup> )	(1.2x10 <sup>4</sup> )	(6.0x10 <sup>3</sup> )	(2.7x10 <sup>4</sup> )
<b>2.17<sup>a</sup></b>	421	516	546	595	650
	(4.2x10 <sup>4</sup> )	(5.6x10 <sup>3</sup> )	(4.1x10 <sup>3</sup> )	(2.2x10 <sup>3</sup> )	(7.8x10 <sup>3</sup> )
<b>2.18<sup>a</sup></b>	419	516	546	597	650
	(2.2x10 <sup>5</sup> )	(2.5x10 <sup>4</sup> )	(1.9x10 <sup>4</sup> )	(1.0x10 <sup>3</sup> )	(3.6x10 <sup>4</sup> )
<b>2.21<sup>a</sup></b>	420	517	547	596	650
	(7.3x10 <sup>4</sup> )	(8.5x10 <sup>3</sup> )	(6.0x10 <sup>3</sup> )	(3.3x10 <sup>3</sup> )	(1.3x10 <sup>4</sup> )
<b>2.22<sup>a</sup></b>	420	517	544	598	651
	(6.6x10 <sup>4</sup> )	(6.4x10 <sup>3</sup> )	(5.6x10 <sup>3</sup> )	(2.7x10 <sup>3</sup> )	(1.3x10 <sup>4</sup> )
<b>1.45g<sup>93</sup></b>	417	513	538	601	655
	(1.9x10 <sup>5</sup> )	(2.7x10 <sup>4</sup> )	(1.7x10 <sup>4</sup> )	(1.6x10 <sup>4</sup> )	(4.1x10 <sup>4</sup> )
<b>2.23<sup>b</sup></b>	409	512	537	597	656
	(1.8x10 <sup>5</sup> )	(2.2x10 <sup>4</sup> )	(1.1x10 <sup>4</sup> )	(1.1x10 <sup>4</sup> )	(3.1x10 <sup>4</sup> )

O solvente utilizado para o cálculo dos coeficientes de absorvidade molar foi: <sup>a</sup>tolueno ou <sup>b</sup>metanol



**Figura 2.6.** Espectros de absorção UV-Vis das clorinas preparadas neste trabalho.

As clorinas sintetizadas neste trabalho apresentam espectros de absorção UV-Vis semelhantes e característicos deste tipo de compostos, onde há a presença de uma banda Soret e de quatro bandas Q (Figura 2.6). A última banda Q surge a 650 nm, exceto na clorina **2.23** onde esta banda apresenta um ligeiro desvio de 6 nm, para o vermelho, o qual poderá ser significativo em relação à penetração da luz nos tecidos (Figura 1.6, subcápítulo 1.2).



No entanto, nos espectros das clorinas **2.17** e **2.21** há a presença de uma banda a 450 nm, a qual não é característica deste tipo de compostos. Esta banda poderá estar relacionada com o facto de estas hidroporfirinas terem sido isolados com um derivado oxidado, não identificado.

Tanto os coeficientes de absorvidade molar calculados como estimados para a última banda Q variam entre 7800-36000 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>, sendo maiores que os apresentados pelas outras bandas Q, o que é característico deste tipo de compostos. Estes valores são superiores ao apresentado pela porfirina **1.15**, onde o  $\epsilon$  a 650 nm é de 5000 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> (diclorometano)<sup>103</sup>, o que seria de esperar uma vez que, os nossos compostos são do tipo clorina. O valor do  $\epsilon$  a 650 nm para o fotossensibilizador Foscan®, que se trata de uma clorina, é de 29600 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> (metanol).<sup>103</sup> A clorina fenil-éster **2.16** apresenta um valor de  $\epsilon$  muito próximo do mencionado anteriormente para o fotossensibilizador que se encontra no mercado e as clorinas mono-álcool **2.18** e di-álcool **2.23** apresentam um valor superior. As outras clorinas sintetizadas apresentam valores inferiores (Tabela 2.4).

Não existem diferenças evidentes na absorção por parte das clorinas contendo grupos ésteres e das clorinas hidroxiladas, tal como se tinha verificado para o caso da clorina di-éster **1.45b** e da hidroporfirina di-álcool **2.1**.<sup>94</sup>

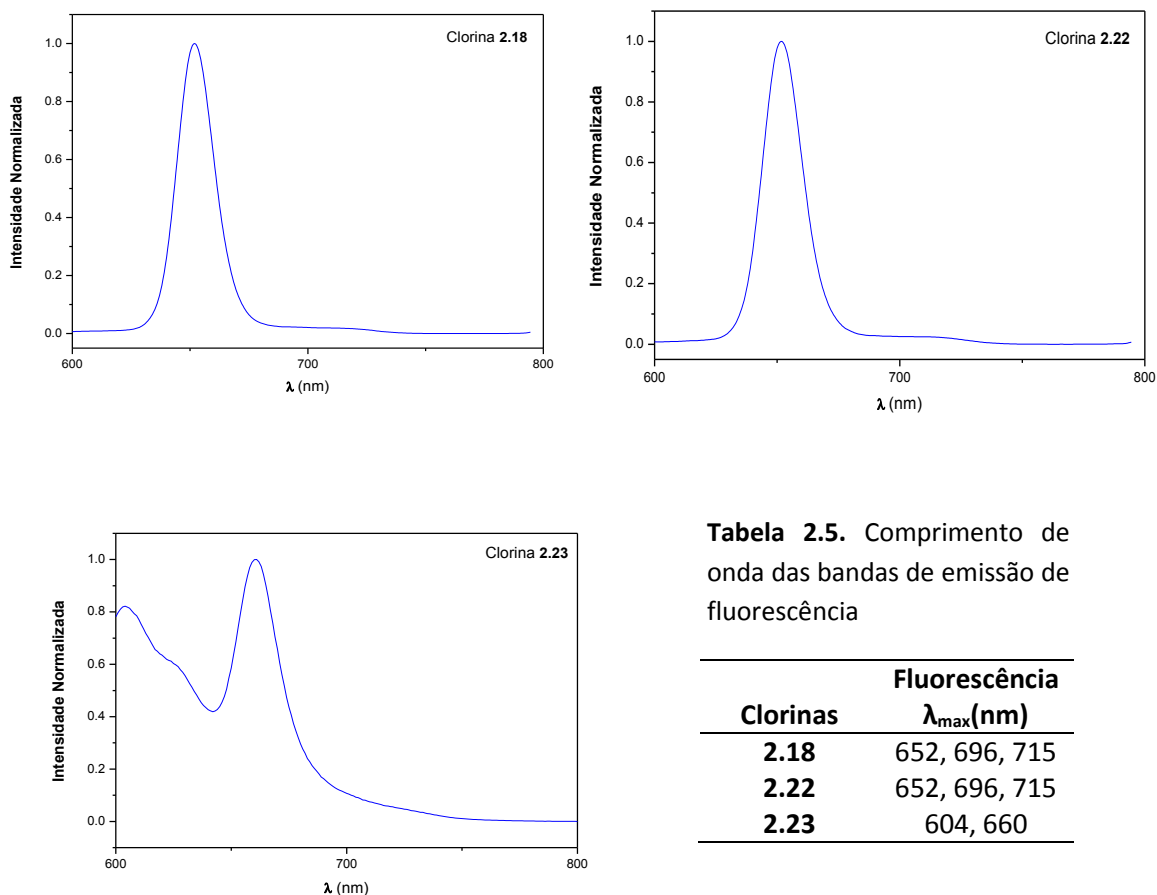
Os espectros de fluorescência dos derivados hidroxilados **2.18**, **2.22** e **2.23** foram determinados uma vez que, e tal como referido anteriormente nesta tese, clorinas contendo grupos hidroxilos demonstram maior potencial para serem utilizadas como fotossensibilizadores, relativamente às clorinas contendo grupos ésteres.<sup>94</sup>

Os espectros de fluorescência foram obtidos utilizando soluções de concentração 1x10<sup>-7</sup> M, em tolueno (clorinas **2.18** e **2.22**) ou metanol (composto **2.23**).

Os espectros de emissão de fluorescência das hidroporfirinas **2.18** e **2.22** apresentam três bandas com máximos em 652, 696 e 715, sendo que, o espectro da hidroporfirina **2.1** exhibe duas bandas em 604 e 660 nm (Tabela 2.5 e Figura 2.7).

Os espectros de fluorescência típicos de clorinas apresentam geralmente duas bandas atribuídas às emissões Q(0,0) e Q(0,1).

A clorina **2.22** é a única que apresenta um espectro deste tipo, exibindo uma banda a menores comprimentos de onda e de elevada intensidade, atribuída à transição Q(0,0), sendo a banda adjacente de menor intensidade atribuída à transição Q(0,1). É importante referir que este espectro de fluorescência foi obtido após purificação adicional através da realização de cromatografia em placas preparativas.



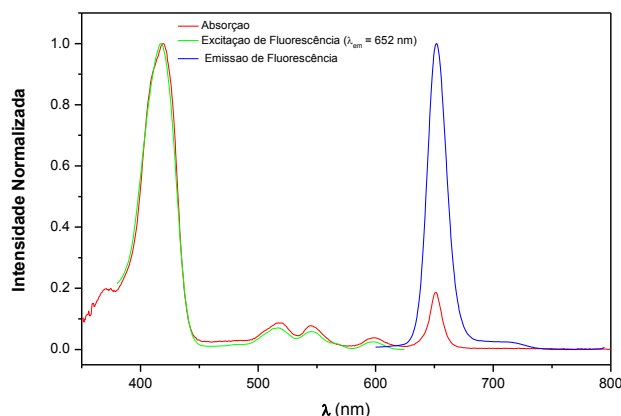
**Tabela 2.5.** Comprimento de onda das bandas de emissão de fluorescência

Clorinas	Fluorescência
	$\lambda_{\max}(\text{nm})$
<b>2.18</b>	652, 696, 715
<b>2.22</b>	652, 696, 715
<b>2.23</b>	604, 660

**Figura 2.7.** Espectros de emissão de fluorescências das clorinas hidroxiladas **2.18**, **2.22** e **2.23**.

Inicialmente quando fomos determinar o espectro de emissão de fluorescência da clorina mono-álcool **2.22** esta apresentava três bandas. A banda dos 696 nm não é característica deste tipo de compostos e, para confirmarmos se se tratava de uma impureza determinámos o espectro de excitação de fluorescência utilizando como comprimento de emissão 696 nm. Este espectro não mostrou correspondência com o espectro de absorção, na zona dos 450 nm, o que corrobora a impureza do composto. Esta poderia ser devida há presença de um derivado oxidado da clorina **2.22**, o qual absorvia a 450 nm e emitia a 696 nm. Esta contaminação também era visível no espectro de excitação de fluorescência utilizando como comprimento de onda de emissão 652 nm.

Após a purificação do composto através da realização de placas preparativas, voltamos a repetir o espectro de emissão de fluorescência o qual, apresenta duas bandas em 652 e 715 nm (Figura 2.8). O espectro de excitação de fluorescência referente à banda de emissão máxima apresenta correspondência com o espectro de absorção, o que confirma a origem dos fótons de emissão e a pureza da hidroporfirina **2.22**.



**Figura 2.8.** Espectros de absorção de UV-Vis, de emissão e de excitação de fluorescência da clorina **2.22**. Os espectros foram normalizados utilizando o Software *Origin 8*.

Verificamos que a clorina mono-hidroxiada **2.22** apresenta algumas das características apropriadas para a utilização como fotossensibilizador em PDT, absorve na “janela terapêutica”, é estável, tem estrutura química definida. No futuro será necessário concluir os estudos fotofísicos (calcular os rendimentos quânticos de fluorescência, de formação do estado tripleto e de oxigênio singuleto) bem como determinar outras características relevantes para a sua possível utilização como fotossensibilizador.

Os espectros de emissão de fluorescência das clorinas fenil-álcool **2.18** e di-hidroxiada **2.23** apresentam bandas a 696 e a 604 nm, respectivamente, que não são características deste tipo de compostos.

No caso da hidroporfirina **2.18**, mesmo após a realização de uma purificação adicional por cromatografia em placas preparativas, a banda dos 696 nm estava presente no espectro de emissão (Anexos, figura VI). Esta banda corresponde a uma impureza, com características de absorção similares à impureza detetada no composto **2.22**, antes da sua purificação.

No espectro de emissão da clorina **2.23** há a presença de uma banda a 604 nm (Anexos, figura VII), a qual corresponde a uma impureza não identificada que absorve numa zona em comum com o nosso composto (400-600 nm).

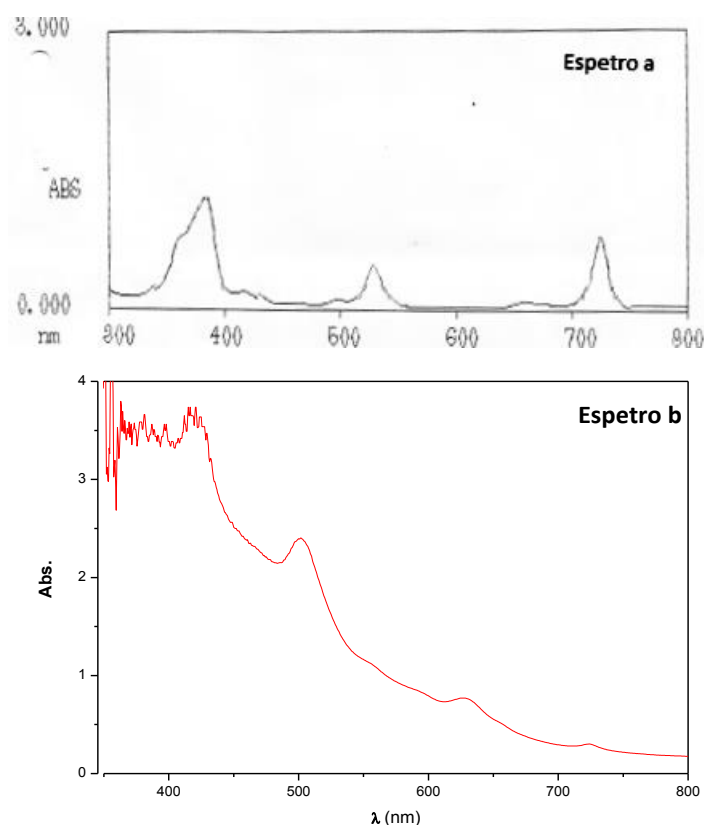
Deste modo os coeficientes de absorvidade molar apresentados anteriormente, na tabela 2.4, para as clorinas **2.18** e **2.23** correspondem a valores estimados.

Perante esta situação, no futuro, será necessário investir na purificação destas clorinas, sobretudo da hidroporfirina **2.23**, a qual apresenta características bastante atrativas, devido às razões já referidas anteriormente para compostos porfirínicos contendo halogénios nas posições *orto* dos anéis fenílicos (Subcapítulo 2.1). Por outro lado, verificamos que esta clorina absorve a um comprimento de onda superior relativamente às outras clorinas analisadas neste trabalho.

Tínhamos como objetivo caracterizar do ponto de vista fotofísico a bacterioclorina tetra-hidroxilada **2.7**, a qual apresenta no seu espectro de absorção bandas com máximos em 383, 526 e 727 nm.

O espectro de absorção do protudo **2.7** após purificação por cromatografia em coluna encontra-se na figura 2.10 a. Após um mês determinámos o espectro de absorção de uma solução deste em metanol, o qual está representado na figura 2.10 b.

Percebemos facilmente que no espectro b, a banda a 727 nm diminuiu drasticamente de intensidade e que não se encontravam presentes as bandas a 383 e a 526 nm, características das bacterioclorinas. Havendo a presença de bandas a 396, 420, 503 e 627 nm.



**Figura 2.10.** Espectros de absorção UV-Vis da bacterioclorina **2.7 a)** após purificação **b)** após um mês da purificação. Os espectros a e b foram determinados através dos espectrofotômetros Hitachi U-2001 e Shimadzu UV-2100, respetivamente.

Passado uma semana voltamos a repetir a determinação do espectro de absorção UV-Vis utilizando a solução de bacterioclorina preparada anteriormente, não havendo evidência da banda a 727 nm. Verificamos que a bacterioclorina hidroxilada **2.7** não é estável em solução, à temperatura ambiente e protegida da luz.

Com o intuito de percebermos se esta degradação acontecia apenas em solução, determinámos o espectro de absorção da bacterioclorina que se encontrava armazenada na forma sólida, à temperatura ambiente e protegida da luz. No entanto deparamo-nos com a inexistência da banda a 727 nm.

Constatamos assim que a bacterioclorina não é estável o que nos surpreendeu visto que, a bacterioclorina contendo quatro grupos ésteres, precursora desta, apresentou uma

estabilidade elevada, o que foi comprovado por Pinho e Melo e seus investigadores.<sup>93</sup> Perante este resultado inesperado, no futuro, será crucial repetir a síntese da bacterioclorina **2.7** e armazená-la em diferentes condições (temperatura, luz, oxigénio, azoto), para percebermos a origem da instabilidade.



## **CAPÍTULO 3 – CONCLUSÃO E PERSPETIVAS FUTURAS**





Pinho e Melo e os seus investigadores desenvolveram uma metodologia sintética que permitiu a preparação seletiva de clorinas e bacterioclorinas estáveis.<sup>92,93</sup> Estas foram obtidas através da reação de aniões metil diazafulvénio com porfirinas.

Os estudos *in vitro* de algumas destas clorinas mostraram que elas poderão ser utilizadas como fotossensibilizadores em PDT, contra as células de cancro do melanoma. Estes resultados positivos justificam estudos adicionais para obter novos derivados de clorinas e bacterioclorinas, tendo sido este o objetivo principal deste projeto de Mestrado.

Para a preparação dos compostos pretendidos, fizemos reagir diferentes aniões metil diazafulvénio com diferentes porfirinas, havendo a formação das hidroporfirinas de uma forma seletiva, através de uma cicloadição 1,7-dipolar ou cicloadição  $[8\pi+2\pi]$ . Dois dos aniões metil diazafulvénio preparados neste trabalho, nunca tinham sido descritos anteriormente na literatura.

Foram preparadas diferentes clorinas fundidas com o anel 4,5,6,7-tetra-hidropirazolo[1,5-*a*]piridina funcionalizadas com um ou dois grupos ésteres (Esquema 2.13). Estas foram obtidas com rendimentos que variam entre 1-41%, nas condições reacionais otimizadas (250 °C, 20 min). De modo a aumentar a hidrofiliidade das clorinas e a sua possível aplicação em PDT, os grupos ésteres foram reduzidos a álcoois. As clorinas contendo grupos hidroxilados apresentaram rendimentos que variam entre 11-38% (Esquema 2.13), sendo que, a hidroporfirina di-hidroxilada contendo cloros nos seus grupos arilos apresentou o melhor rendimento. Esta constatação sugere que a redução é mais eficiente em derivados contendo dois grupos ésteres.

Após a preparação das clorinas procedemos à realização de estudos preliminares das características fotofísicas das mesmas. Os espetros de absorção UV-Vis demonstraram que as hidroporfirinas sintetizadas apresentam uma banda intensa por volta dos 650 nm, na designada “janela terapêutica”. A clorina di-álcool contendo os seus grupos arilos substituídos com cloros é caracterizada por absorver a um comprimento de onda maior, o que poderá ser vantajoso, visto que o comprimento de onda determina a profundidade de penetração da luz nos tecidos.

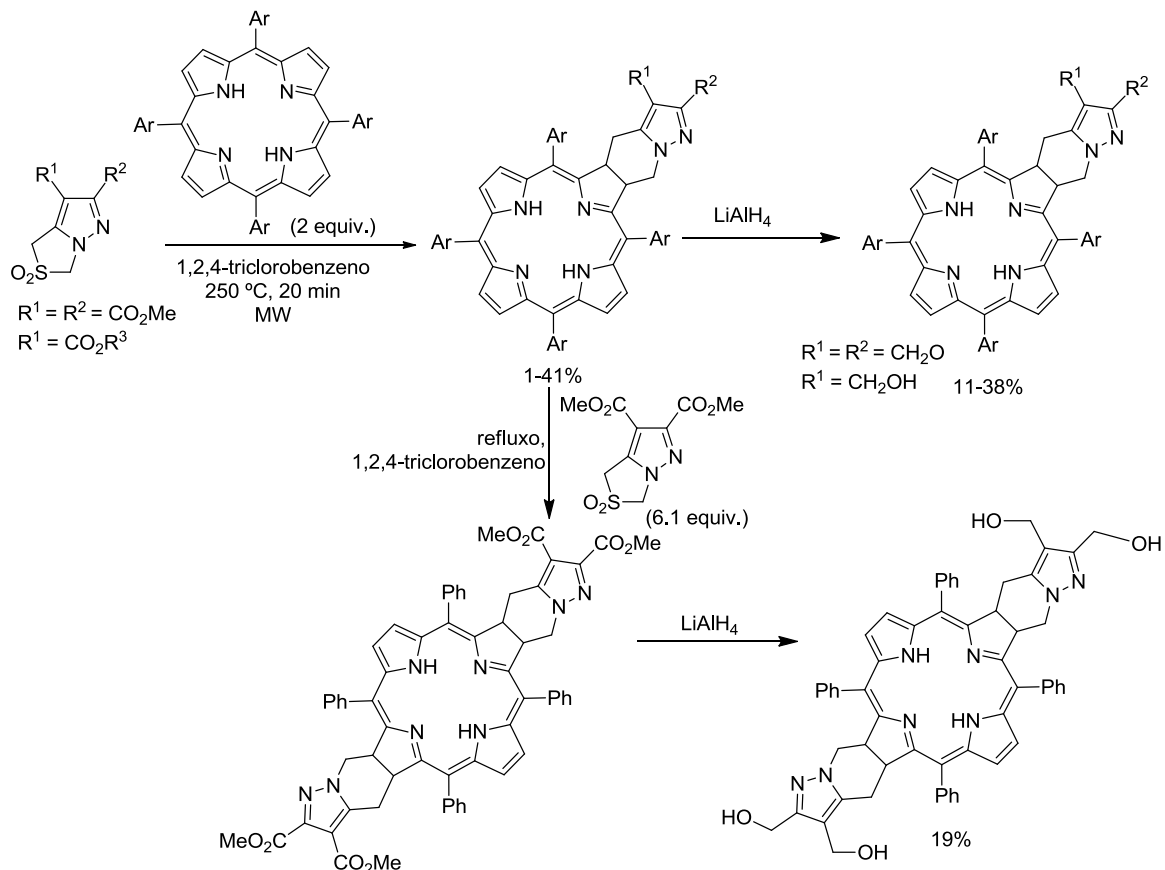
Não existem diferenças evidentes na absorção por parte das clorinas contendo grupos ésteres e das clorinas hidroxiladas.

Estudos de fluorescência foram efetuados apenas para os derivados hidroxilados uma vez que, as clorinas contendo grupos hidroxilos demonstraram maior potencial para serem utilizadas como fotossensibilizadores, relativamente às clorinas funcionalizadas com grupos ésteres.<sup>94</sup>

A clorina que apresenta apenas como substituinte um grupo hidroxilo cumpre alguns dos requisitos de um bom fotossensibilizador: é estável; é pura, o que foi comprovado pela determinação dos espetros de fluorescência; absorve na “janela terapêutica”. No futuro será necessário concluir os estudos fotofísicos (calcular os rendimentos quânticos de fluorescência, de formação do estado tripleto e de oxigénio singuleto) bem como determinar outras características relevantes para a sua possível utilização como fotossensibilizador em PDT.

Relativamente às outras clorinas hidroxiladas será crucial investir na otimização da sua purificação.

Exploramos a síntese de uma bacterioclorina contendo quatro grupos hidroxilos, sendo esta obtida com um rendimento global de 19% (Esquema 2.13). No entanto, quando fomos estudar algumas das suas características fotofísicas fomos surpreendidos com a instabilidade da mesma. Para tentar perceber a origem desta instabilidade, no futuro iremos alterar as suas condições de armazenamento.



**Esquema 2.13.** Compostos preparados neste trabalho.

## **CAPÍTULO 4 – PARTE EXPERIMENTAL**



## 4.1. Aparelhagem utilizada

### Pontos de Fusão

Os pontos de fusão foram determinados num microscópio de placa aquecida Leitz Wetzlar modelo 799 e os seus valores não são corrigidos.

### Espetroscopia de infravermelho

Os espectros de infravermelho foram obtidos num espectrómetro Nicolet 6700 FTIR. Foram utilizadas pastilhas de KBr.

### Espetroscopia de ressonância magnética nuclear

Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$ ) foram obtidos nos espectrómetros Bruker Avance III, operando a 400 MHz ( $^1\text{H}$ ) e a 100 MHz ( $^{13}\text{C}$ ). O solvente utilizado foi clorofórmio deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ), exceto nos casos indicados. Os valores dos desvios químicos são apresentados em ppm relativamente ao padrão interno tetrametilsilano (TMS) e os valores das constantes de acoplamento ( $J$ ) são expressos em Hz.

### Espetrometria de massa

Os espectros de massa foram obtidos num espectrómetro de massa Bruker FTMS APEXIII, com ionização por electrospray (ESI) ou HP 6890 Plus, com ionização por impacto eletrónico (EI).

### Micro-ondas

As reações realizadas com irradiação por micro-ondas foram efetuadas num aparelho da marca Discover S-Class da CEM Focused Synthesis System.

### Difração de Raios-X

A análise estrutural por difração de raios-X foi efetuada num difratómetro Enraf-Nonius CAD-4.

### Cromatografia

Nas reações cuja evolução foi acompanhada por cromatografia em camada fina, utilizaram-se placas de sílica 60 F<sub>254</sub> em suporte de alumínio fornecidas pela Merck. A maior parte dos compostos foi purificada por cromatografia em coluna de sílica, usando gel de sílica 60 (0.040-0.063 mm) fornecida pela Merck, Macherey-Nagel ou Fluka.

### Espetroscopia de absorção no Ultravioleta-Visível

Algumas reações foram controladas por espectroscopia de absorção na região do UV-Vis, utilizando o espectrofotómetro Hitachi U-2001.

## 4.2. Solventes e Reagentes

### Acetato de Etilo

Foi refluxado durante 3 horas na presença de carbonato de potássio e de seguida destilado.

### Diclorometano

Foi refluxado na presença de cloreto de cálcio durante 3 horas, destilado e guardado sobre peneiros moleculares 4 Å.

### Etanol e metanol

Foram aquecidos a refluxo durante 2 horas com magnésio (5 g/l) na presença de palhetas de iodo (0.5 g/l), seguindo-se a destilação a partir do alcóxido de sódio e guardados sobre peneiros moleculares 3 Å.

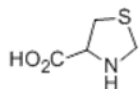
### Éter etílico e hexano

Foram refluxados na presença de fios de sódio, utilizando benzofenona como indicador, destilados e guardados sobre peneiros moleculares 4 Å.

Todos os outros solventes e reagentes foram fornecidos pela Aldrich, Merck ou Fluka e utilizados diretamente, sem qualquer tipo de purificação adicional.

### 4.3. Síntese dos compostos

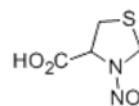
#### 4.3.1. Síntese dos precursores dos aniões metil diazafulvénio



Ácido 1,3-tiazolidina-4-carboxílico **2.9**

O composto **2.9** foi preparado de acordo com um procedimento presente na literatura, com ligeiras alterações.<sup>99</sup>

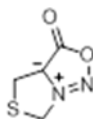
A uma solução de L-cisteína (124 mmol) em água (125 mL) adiciona-se uma solução de formaldeído (124 mmol) em etanol (94 mL). Deixa-se a mistura reacional em agitação magnética, durante a noite, à temperatura ambiente. Filtra-se o precipitado obtido e lava-se com éter etílico. Deixa-se secar sob vácuo, sendo o composto **2.9** obtido como um sólido de cor branca, com rendimento de 97%. RMN <sup>1</sup>H δ (CD<sub>3</sub>OD) = 4.38 (d, *J* = 9.6, 1H), 4.22 (d, *J* = 9.6, 1H), 3.72-3.75 (m, 1H), 2.99-3.02 (m, 2H) ppm.



Ácido 3-nitroso-1,3-tiazolidina-4-carboxílico **2.10**

O composto **2.10** foi preparado com base num procedimento presente na literatura, com algumas alterações.<sup>100</sup>

Adiciona-se lentamente HCl concentrado (37%) a uma suspensão de ácido 1,3-tiazolidina-4-carboxílico (120 mmol) em H<sub>2</sub>O (83 mL) até à completa dissolução da suspensão. De seguida, adiciona-se gota a gota uma solução de nitrito de sódio (180 mmol) em H<sub>2</sub>O (83 mL). Depois da adição estar completa observa-se a libertação de um gás (N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>), de cor avermelhada, e a mistura passa de uma cor avermelhada para amarelada. Deixa-se em agitação magnética, durante 12 horas, à temperatura ambiente. Posteriormente a mistura é extraída com acetato de etilo (3 x 100mL). A fase orgânica recuperada é seca com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, sendo o solvente evaporado e forma-se um óleo que precipita com éter de petróleo. Por fim filtra-se e deixa-se secar sob vácuo. Obtém-se o composto **2.10** como um sólido de cor amarela, com rendimento de 48%. A amostra apresenta dois isómeros rotacionais na razão (60:40). *Isómero maioritário*: RMN <sup>1</sup>H δ = 4.95 (t, *J* = 7.1 Hz, 1H), 4.88 (d, *J* = 11.7 Hz, 1H), 4.49 (d, *J* = 11.7 Hz, 1H), 3.48-3.30 (m, 2H) ppm. *Isómero minoritário*: RMN <sup>1</sup>H δ = 5.85 (t, *J* = 4.4 Hz, 1H), 5.67 (d, *J* = 10.4 Hz, 1H), 5.28 (d, *J* = 10.4 Hz, 1H), 3.30-3.48 (m, 2H) ppm.



4*H*,6*H*-tiazolo[3,4-*c*][1,2,3]oxadiazol-7-íolo-3-olato **2.11**

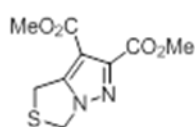
O composto **2.11** foi preparado de acordo com um procedimento presente na literatura.<sup>100</sup>

Anidrido trifluoroacético (40 mmol) é lentamente adicionado a uma suspensão de ácido 3-nitroso-1,3-tiazolidina-4-carboxílico (40 mmol) em éter etílico seco (410 mL). A reação é mantida a 0 °C durante 6 horas e depois é deixada reagir, durante 24 horas, à temperatura ambiente. Após este tempo, filtra-se o sólido que se encontra em suspensão. Evapora-se o filtrado e neutraliza-se o ácido com uma solução saturada de NaHCO<sub>3</sub>. De seguida extrai-se com acetato de etilo (3 x 100 mL), sendo a fase orgânica recuperada e seca com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Evapora-se o solvente e forma-se um óleo que precipita com éter etílico. O precipitado é filtrado e é seco sob vácuo. Os dois sólidos de cor amarela (obtidos por filtração e por extração) são o composto **2.11**, que apresenta um rendimento de 67%. RMN  $^1\text{H}$   $\delta$  = 5.42 (t,  $J$  = 1.8, 2H), 4.04 (t,  $J$  = 1.7, 2H) ppm.

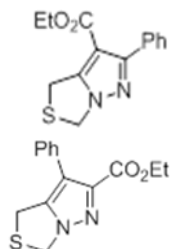
### Procedimento geral para a síntese dos *1H,3H*-pirazolo[1,5-*c*][1,3]tiazoles

A síntese dos *1H,3H*-pirazolo[1,5-*c*][1,3]tiazoles foi realizada de acordo com um procedimento presente na literatura, fazendo algumas alterações.<sup>100</sup> Uma solução de *4H,6H*-tiazolo[3,4-*c*][1,2,3]oxadiazol-7-*io*-3-olato (40 mmol) e dipolarófilo (1.6 equiv., 64 mmol) em xileno (34 mL) é colocada em refluxo, a 140 °C, sob atmosfera inerte de  $\text{N}_2$ , durante o tempo necessário para que a reação esteja completa (controlar por TLC). Posteriormente evapora-se o solvente e os produtos são isolados por cromatografia em coluna.



*1H,3H*-pirazolo[1,5-*c*][1,3]tiazole-6,7-dicarboxilato **1.41**<sup>100</sup>

O dipolarófilo utilizado é o acetilenodicarboxilato de dimetilo e a reação demora 3 horas. O composto **1.41** é purificado por cromatografia em coluna [hexano/acetato de etilo (2:1) e acetato de etilo], sendo obtido como um sólido branco, com um rendimento de 90%. RMN  $^1\text{H}$   $\delta$  = 5.25 (t,  $J$  = 2.0, 2H), 4.31 (t,  $J$  = 2.0, 2H), 3.96 (s, 3H), 3.86 (s, 3H) ppm.



6-fenil-*1H,3H*-pirazolo[1,5-*c*][1,3]tiazole-7-carboxilato de etilo **2.12a** e 7-fenil-*1H,3H*-pirazolo[1,5-*c*][1,3]tiazole-6-carboxilato de etilo **2.12b**

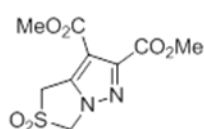
O dipolarófilo utilizado é o fenilpropiolato de etilo e a reação demora 12 horas. Os compostos **2.12a** e **2.12b** são purificados por cromatografia em coluna [hexano/acetato de etilo (3:1)]. Obtém-se por ordem de eluição: i) 6-fenil-*1H,3H*-pirazolo[1,5-*c*][1,3]tiazole-7-carboxilato de etilo **2.12a**, como um sólido branco, com um rendimento de 45%. p.f.: 80.8-81.4 °C (recristalização em metanol); IR (KBr): 1712, 1508, 1442, 1294, 1140  $\text{cm}^{-1}$ ; RMN  $^1\text{H}$   $\delta$  = 7.74-7.72 (m, 2H), 7.41-7.39 (m, 3H, Ph), 5.26 (s, 2H), 4.36 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 4.24 (q,  $J$  = 7.2 Hz, 2H,  $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 1.27 (t,  $J$  = 7.2 Hz, 3H,  $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ) ppm; RMN  $^{13}\text{C}$   $\delta$  = 162.7, 158.6, 149.4, 132.6, 129.2, 128.7, 127.8, 105.9, 60.2, 50.4, 29.3, 14.2 ppm. EMAR (ESI): 275.08434 ( $\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$  [ $\text{M}+\text{H}$ ] $^+$ , 275.08487); ii) 7-fenil-*1H,3H*-pirazolo[1,5-*c*][1,3]tiazole-6-carboxilato de etilo **2.12b**, como um sólido amarelo, com um rendimento de 11%. P.f.: 73.7-74.4 °C (recristalização em metanol); IR (KBr): 1724, 1458, 1365, 1300, 1178  $\text{cm}^{-1}$ ; RMN  $^1\text{H}$   $\delta$  = 7.40-7.33 (m, 5H, Ph), 5.30 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 4.33 (q,  $J$  = 7.2 Hz, 2H,  $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 4.11 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 1.31 (t,  $J$  = 7.2 Hz, 3H,  $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ) ppm; RMN  $^{13}\text{C}$   $\delta$  = 162.2, 144.7, 143.2, 131.4, 129.3, 128.1, 127.5, 119.5, 61.0, 50.3, 26.9, 14.2 ppm; EMAR (EI): 274.0777 ( $\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$  [ $\text{M}$ ] $^+$ , 274.0776).



### Procedimento geral para a síntese dos 2,2-dioxo-1*H*,3*H*-pirazolo[1,5-*c*][1,3]tiazoles

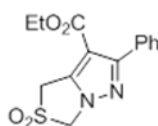
A síntese dos 2,2-dioxo-1*H*,3*H*-pirazolo[1,5-*c*][1,3]tiazoles foi realizada adaptando-se um procedimento presente na literatura.<sup>99</sup>

Dissolve-se o 1*H*,3*H*-pirazolo[1,5-*c*][1,3]tiazole (7.3 mmol) em diclorometano seco (104 mL) e adiciona-se aos poucos o ácido-3-cloroperoxibenzóico (77%) (4 equiv., 29.2 mmol), a 0 °C. Deixa-se em agitação magnética, à temperatura ambiente, durante o tempo necessário para que a oxidação seja completa (controlar por TLC). Em seguida, a mistura é lavada duas vezes com uma solução aquosa de bissulfito de sódio a 10% (m/v) (2 x 100 mL) e com uma solução aquosa de NaHCO<sub>3</sub> a 10% (m/v) (2 x 100 mL). A fase orgânica recuperada é seca com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, evapora-se o solvente e deixa-se secar sob vácuo.



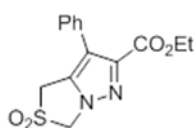
2,2-dioxo-1*H*,3*H*-pirazolo[1,5-*c*][1,3]tiazole-6,7-dicarboxilato de dimetilo  
**1.42**<sup>99</sup>

A oxidação demora 4 horas e obtém-se o composto **1.42** como um sólido branco, após recristalização com éter etílico, sendo obtido com um rendimento de 67%. RMN <sup>1</sup>H δ = 5.25 (s, 2H), 4.70 (s, 2H), 3.99 (s, 3H), 3.89 (s, 3H).



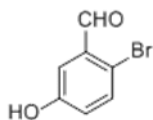
2,2-dioxo-6-fenil-1*H*,3*H*-pirazolo[1,5-*c*][1,3]tiazole-7-carboxilato de etilo  
**2.13a**

A oxidação demora 12 horas e obtém-se o composto **2.13a** como um sólido branco, com um rendimento de 78%. p.f.: 139.7-140.1 °C (recristalização em éter etílico) IR (KBr): 1704, 1475, 1346, 1169, 1133, 1109 cm<sup>-1</sup>; RMN <sup>1</sup>H δ = 7.73-7.71 (m, 2H, Ph), 7.44-7.43 (m, 3H, Ph), 5.25 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 4.72 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 4.26 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H, CO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.28 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H, CO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) ppm; RMN <sup>13</sup>C δ = 161.7, 156.3, 139.6, 131.2, 129.4, 129.3, 128.0, 109.3, 67.4, 60.8, 54.2, 14.2 ppm; EMAR (ESI): 305.0599 (C<sub>14</sub>H<sub>13</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S [M-H]<sup>+</sup>, 305.0596).



2,2-dioxo-7-fenil-1*H*,3*H*-pirazolo[1,5-*c*][1,3]tiazole-6-carboxilato de etilo  
**2.13b**

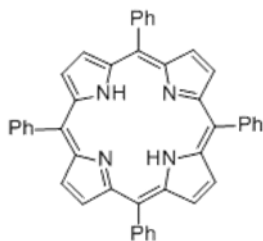
A oxidação demora 12 horas e obtém-se o composto **2.13b** como um sólido branco, com um rendimento de 48%. p.f.: 174.3-175.1 °C (recristalização em éter etílico); IR (KBr): 1733, 1338, 1180, 1157, 1128 cm<sup>-1</sup>; RMN <sup>1</sup>H δ = 7.43-7.35 (m, 5H, Ph), 5.31 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 4.48 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 4.35 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H, CO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.31 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H, CO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) ppm; RMN <sup>13</sup>C δ = 161.3, 143.3, 133.7, 129.9, 129.3, 128.4, 128.3, 122.9, 67.7, 61.5, 52.2, 14.1 ppm; EMAR (ESI): 329.05654 (C<sub>14</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>4</sub>S [M+Na]<sup>+</sup>, 329.05665).



### 2-Bromo-5-hidroxibenzaldeído **2.8**

A síntese do aldeído foi realizada tendo em conta um procedimento presente na literatura, com algumas alterações na recristalização do composto.<sup>98</sup> Adiciona-se lentamente a uma solução de 3-hidroxibenzaldeído (32 mmol) em ácido acético glacial (100 mL), bromo (0.87 mL), deixando-se reagir, à temperatura ambiente, durante 3 horas. Posteriormente é adicionada água e coloca-se a mistura no congelador durante 12 horas de modo a formar-se um precipitado, o qual, é posteriormente filtrado. Para recristalizar o produto, adiciona-se uma solução aquosa de NaOH a 10 % (m/v) de modo a correr a dissolução do mesmo e de seguida adiciona-se HCl a 10% (m/v) para se formar um precipitado, o qual é posteriormente filtrado. Deixa-se secar sob vácuo, sendo o composto **2.8** obtido como um sólido de cor amarela, com um rendimento de 26%. RMN <sup>1</sup>H δ = 10.3 (s, 1H), 7.5 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 7.4 (d, J = 3.0 Hz, 1H), 7.0 (dd, J = 8.7 e 3.0 Hz, 1H).

### 4.3.2 Síntese das porfirinas



### 5,10,15,20-tetrafenilporfirina **1.15**

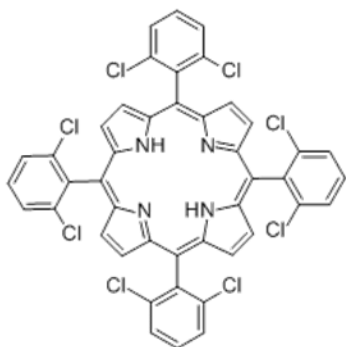
A síntese da porfirina foi realizada com base no método do nitrobenzeno descrito na literatura, com algumas alterações na precipitação do produto.<sup>71.72</sup>

A uma solução de benzaldeído (40 mmol) em ácido acético (140 mL) e nitrobenzeno (70 mL) em refluxo, a 120 °C, é adicionado o pirrole (40 mmol) e deixa-se em agitação magnética durante 1 hora. Posteriormente deixa-se a mistura arrefecer e adiciona-se metanol (20 mL). A porfirina obtida precipita no meio reacional e é filtrada e lavada com metanol. Seca-se o composto **1.15** sob vácuo, obtendo-se como um sólido de cor púrpura, com um rendimento 20%.

#### Método alternativo

A síntese da porfirina foi também realizada com base noutro método descrito na literatura.<sup>73</sup> A uma solução de benzaldeído (20 mmol) em ácido propiónico (2 mL) e nitrobenzeno (3 mL) é adicionado o pirrole (20 mmol). A reação realiza-se sob irradiação microondas, a 200 °C e durante 5 minutos. A mistura é deixada a arrefecer, forma-se um precipitado, o qual é filtrado e lavado com metanol. Seca-se o composto **1.15** sob vácuo e obtém-se como um sólido de cor púrpura, com um rendimento de 20%.

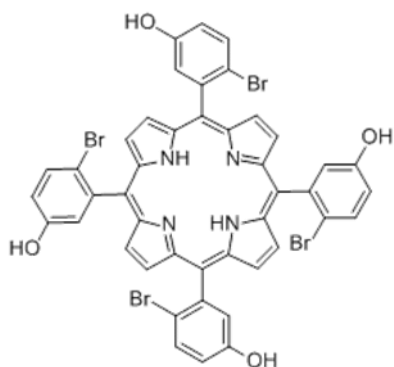
RMN <sup>1</sup>H δ = 8.87 (s, 8H, β-H pirrólico), 8.25-8.23 (m, 8H, Ar), 7.79-7.77 (m, 12H, Ar), -2.77 (s, 2H, NH) ppm.



#### 5,10,15,20-tetraakis(2,6-diclorofenil)porfirina **1.33**

A síntese da porfirina foi realizada com base no método do nitrobenzeno descrito na literatura, com ligeiras alterações na precipitação do produto.<sup>71,72</sup>

A uma solução de 2,6-diclorobenzaldeído (40 mmol) em ácido acético (140 mL) e nitrobenzeno (70 mL) em refluxo, a 120 °C, é adicionado o pirrole (40 mmol) e deixa-se em agitação magnética durante 1 hora. Posteriormente deixa-se a mistura arrefecer e adiciona-se metanol (20 mL). A porfirina obtida precipita no meio reacional e é filtrada e lavada com metanol. Seca-se o composto **1.33** sob vácuo e obtém-se como um sólido de cor púrpura, com um rendimento 7%. RMN <sup>1</sup>H δ = 8.56 (s, 8H, β-H pirrólico), 7.71-7.62 (m, 12H, Ar), -2.68 (s, 2H, NH) ppm.



#### 5,10,15,20-tetraakis((2-bromo-5-hidroxifenil)porfirina **2.4**

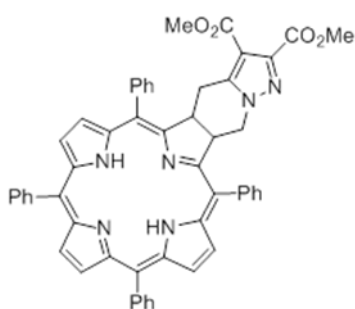
A porfirina **2.4** foi preparada com base num método descrito na literatura, com algumas alterações na oxidação e purificação do composto.<sup>96</sup>

Adiciona-se o aldeído 2-bromo-5-hidroxibenzaldeído (**2.9**) (5.0 mmol) e o pirrole (5.9 mmol) a diclorometano (500 mL), sendo a solução borbulhada com árgon, durante 30 minutos. Posteriormente é adicionada uma pequena quantidade de etanol e 10 µL de trifluoroboroeterato deixando-se reagir durante a noite, na ausência de luz. A reação é parada com a adição de trietilamina (0.025 mL). De modo a ocorrer a oxidação do porfirinogénio, adiciona-se ácido acético (60 mL) e 2,3,5,6-tetracloro-1,4-benzoquinona (20 equiv., 100 mmol) (controlar por UV-Vis o término da reação). Evapora-se os solventes e purifica-se o composto por cromatografia em coluna [acetato de etilo/hexano (2:3) e acetato de etilo]. A porfirina após recristalização com acetato de etilo/heptano é obtida como um sólido de cor púrpura, com um rendimento de 8%. RMN <sup>1</sup>H δ (CD<sub>3</sub>OD) = 8.8 (8H, s, β-H pirrólico), 7.86-7.82 (m, 4H, Ar), 7.55-7.73 (m, 4H, Ar), 7.20-7.30 (m, 4H, Ar) ppm.

### 4.3.3. Síntese das clorinas e bacterioclorina

#### Procedimento geral para a síntese das clorinas fundidas com o anel 4,5,6,7-tetrahidropirazolo[1,5-*a*]piridina

A síntese das clorinas foi realizada com base num método descrito na literatura.<sup>92,93</sup> Uma solução de sulfona (0.07 mmol) e porfirina (2 equiv., 0.14 mmol), em 1,2,4-triclorobenzeno (1 mL), é borbulhada com árgon, durante aproximadamente 10 minutos. A reação realiza-se sob irradiação microondas, a 250 °C e durante 20 minutos. Após o arrefecimento da mistura são adicionadas umas gotas de trietilamina à mesma. A clorina e a porfirina que não reagiu foram isoladas por cromatografia em coluna.



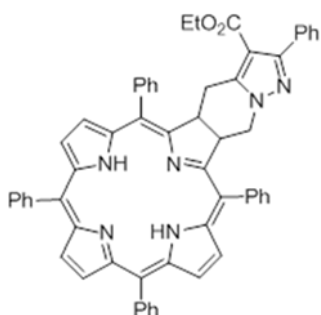
Clorina diéster fundida - 4,5,6,7-tetra-hidropirazolo[1,5-*a*]piridina **1.45b**<sup>92,93</sup>

Preparada a partir do 2,2-dioxo-1*H*,3*H*-pirazolo[1,5-*c*][1,3]tiazole-6,7-dicarboxilato de dimetilo (**1.42**) e da 5,10,15,20-tetrafenilporfirina (**1.15**). O composto **1.45b** é purificado por cromatografia em coluna [diclorometano e diclorometano/acetato de etilo (95:5)]. A clorina é obtida como um sólido de cor púrpura, com um rendimento de 30% e recupera-se 55% da porfirina de partida.

#### Método alternativo

A síntese da clorina também pode ser realizada através de um método convencional.<sup>92</sup> Uma solução de sulfona (0.07 mmol) e porfirina (2 equiv., 0.14 mmol), em 1,2,4-triclorobenzeno (1 mL), é borbulhada com argônio, durante aproximadamente 10 minutos. A reação é realizada em refluxo, a 250 °C, e durante 4 horas, sob atmosfera inerte de N<sub>2</sub>. Após o arrefecimento da mistura são adicionadas umas gotas de trietilamina à mesma. A clorina e a porfirina que não reagiu foram isoladas por cromatografia em coluna. A clorina é obtida com um rendimento de 22% e recupera-se 61% da porfirina de partida.

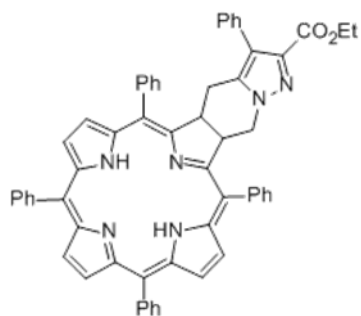
RMN <sup>1</sup>H δ = 8.60 (2 d, sobreposição de 2 dubletos, *J* = 5.5 Hz, 2H, β-H pirrólico), 8.43 (s, 2H, β-H pirrólico), 8.29 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H, β-H pirrólico), 8.26 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H, β-H pirrólico), 8.24-8.21 (m, 3H, Ar), 8.10-8.02 (m, 4H, Ar), 7.94-7.92 (m, 1H, Ar), 7.84-7.82 (m, 2H, Ar), 7.74-7.68 (m, 10H, Ar), 5.76-5.69 (m, 1H, β-H pirrólico reduzido), 5.43-5.36 (m, 1H, β-H pirrólico reduzido), 4.37 (dd, *J* = 13.6, 7.6 Hz, 1H, CH<sub>2</sub> do anel), 3.96 (dd, *J* = 13.6, 9.4 Hz, 1H, CH<sub>2</sub> do anel), 3.84 (s, 3H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.75 (s, 3H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.57 (dd, *J* = 15.9, 6.7 Hz, 1H, CH<sub>2</sub> do anel), 2.63 (dd, *J* = 15.9, 9.9 Hz, 1H, CH<sub>2</sub> do anel), -1.64 (s, 2H, NH) ppm;



Clorina éster fundida - 4,5,6,7-tetra-hidropirazolo[1,5-*a*]piridina **2.16**

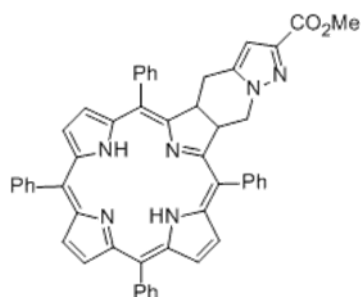
Preparada a partir do 2,2-dioxo-6-fenil-1*H*,3*H*-pirazolo[1,5-*c*][1,3]tiazole-7-carboxilato de etilo (**2.13a**) e da 5,10,15,20-tetrafenilporfirina (**1.15**). O composto **2.16** é purificado por cromatografia em coluna usando como eluente diclorometano. A clorina é obtida como um sólido de cor púrpura, com um rendimento de 39% e recupera-se 53% da porfirina de partida. p.f. > 300 °C (recristalização com diclorometano/metanol); IR (KBr): 3355, 3054, 2925, 1714, 1550, 1540, 1398, 1290, 1176, 1135, 1049, 958, 794, 750, 703 cm<sup>-1</sup>; RMN <sup>1</sup>H δ = 8.59 (2 d, sobreposição de 2 dubletos, *J* = 4.8 Hz, 2H, β-H pirrólico), 8.43 (s, 2H, β-H pirrólico), 8.29-8.25 (m, 4H, β-H pirrólico e Ar), 8.17-8.02 (m, 5H, Ar), 7.96-7.94 (m, 1H, Ar), 7.86-7.81 (m, 2H, Ar), 7.75-7.65 (m, 10H, Ar), 7.47-7.43 (m, 2H, Ar), 7.30-7.26 (m, 3H, Ar), 5.79-5.72 (m, 1H, β-H pirrólico reduzido), 5.46-5.40 (m, 1H, β-H pirrólico reduzido), 4.34 (dd, *J* = 13.4, 7.6 Hz, 1H, CH<sub>2</sub> do anel),

4.19-4.03 (m, 2H, CH<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.98 (dd,  $J = 13.4, 9.1$  Hz, 1H, CH<sub>2</sub> do anel), 3.72 (dd,  $J = 16.0, 6.9$  Hz, 1H, CH<sub>2</sub> do anel), 2.75 (dd,  $J = 16.0, 9.5$  Hz, 1H, CH<sub>2</sub> do anel), 1.15 (t,  $J = 7.0$  Hz, 1H, CH<sub>3</sub>, CO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), -1.59 (s, 2H, NH) ppm; RMN <sup>13</sup>C  $\delta = 165.3, 163.3, 162.6, 153.1, 152.9, 152.5, 144.1, 141.7, 141.6, 141.3, 141.1, 140.9, 135.6, 135.4, 135.0, 134.7, 134.3, 133.9, 133.0, 132.4, 132.4, 132.3, 132.0, 129.3, 128.7, 128.4, 128.2, 128.1, 128.0, 127.8, 127.7, 127.6, 127.5, 126.8, 124.4, 124.2, 123.4, 123.1, 112.6, 112.5, 107.9, 59.5, 48.7, 48.3, 45.5, 26.6, 14.4$  ppm; EMAR (ESI): 857.3568 (C<sub>58</sub>H<sub>45</sub>N<sub>6</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>, 857.3598); UV/Vis (tolueno):  $\lambda_{max}$  (log $\epsilon$ ) = 419 (5.01), 518 (4.17), 547 (4.08), 599 (3.78), 650 (4.44) nm.



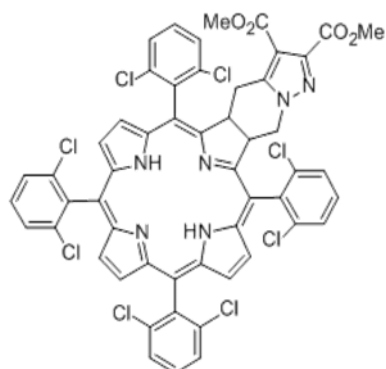
Clorina éster fundida - 4,5,6,7-tetra-hidropirazolo[1,5-*a*]piridina **2.17**

Preparada a partir do 2,2-dioxo-7-fenil-1*H*,3*H*-pirazolo[1,5-*c*][1,3]tiazole-6-carboxilato de etilo (**2.13b**) e da 5,10,15,20-tetrafenilporfirina (**1.15**). O composto **2.17** é purificado por cromatografia em coluna usando como eluente diclorometano. Obtém-se uma mistura de clorina com um derivado oxidado, como um sólido de cor púrpura. A mistura é obtida com um rendimento de 0.8% e recupera-se 73% da porfirina de partida. p.f. > 300 °C (recristalização com diclorometano/metanol); IR (KBr): 3471, 3392, 1718, 1469, 1455, 1442, 1178, 1115, 796, 701 cm<sup>-1</sup>; EMAR (ESI): 857.3562 (C<sub>58</sub>H<sub>45</sub>N<sub>6</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>, 857.3598); UV/Vis (tolueno):  $\lambda_{max}$  (log $\epsilon$ ) = 421 (4.62), 516 (3.74), 546 (3.61), 595 (3.34), 650 (3.89) nm.



Clorina éster fundida - 4,5,6,7-tetra-hidropirazolo[1,5-*a*]piridina **2.21**

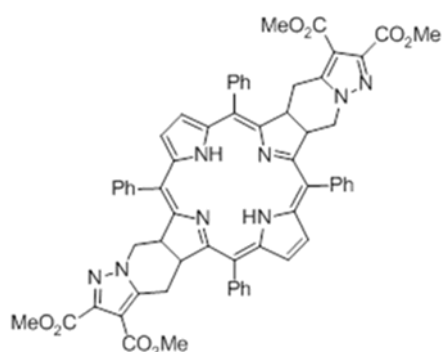
Preparada a partir do 2,2-dioxo-1*H*,3*H*-pirazolo[1,5-*c*][1,3]tiazole-6-carboxilato de metilo (**2.19**) e da 5,10,15,20-tetrafenilporfirina (**1.15**). O composto **2.21** é purificado por cromatografia em coluna usando como eluente diclorometano. Obtém-se uma mistura de clorina com um derivado oxidado, como um sólido de cor púrpura. A mistura é obtida com um rendimento de 41% e recupera-se 54% da porfirina de partida. p.f. > 300 °C (recristalização com diclorometano/metanol); IR (KBr): 1727, 1714, 1220, 703 cm<sup>-1</sup>; EMAR (ESI): 765.29725 (C<sub>51</sub>H<sub>37</sub>N<sub>6</sub>O<sub>2</sub> [M-H]<sup>+</sup>, 765.29720); UV/Vis (tolueno):  $\lambda_{max}$  (log $\epsilon$ ) = 420 (4.86), 517 (3.93), 547 (3.78), 596 (3.52), 650 (4.11) nm.



Clorina diéster fundida - 4,5,6,7-tetra-hidropirazolo[1,5-*a*]piridina **1.45g**<sup>92,93</sup>

Preparada a partir do 2,2-dioxo-1*H*,3*H*-pirazolo[1,5-*c*][1,3]tiazole-6,7-dicarboxilato de dimetilo (**1.42**) e da 5,10,15,20-tetraquis(2,6-diclorofenil)porfirina (**1.33**).

O composto **1.45g** é purificado por cromatografia em coluna [diclorometano e diclorometano/acetato de etilo (95:5)]. A clorina é obtida como um sólido de cor púrpura, com um rendimento de 15% e recupera-se 45% da porfirina de partida; RMN  $^1\text{H}$   $\delta$  = 8.48 (2 d, sobreposição de 2 dubletos,  $J$  = 5.6 Hz, 2H,  $\beta$ -H pirrólico), 8.29 (s, 2H,  $\beta$ -H pirrólico), 8.15 (d,  $J$  = 4.8 Hz, 1H,  $\beta$ -H pirrólico), 8.10 (d,  $J$  = 4.8 Hz, 1H,  $\beta$ -H pirrólico), 7.88-7.84 (m, 2H, Ar), 7.76-7.63 (m, 10H, Ar), 5.56-5.49 (m, 1H,  $\beta$ -H pirrólico reduzido), 5.1-4.97 (m, 1H,  $\beta$ -H pirrólico reduzido), 4.54 (dd,  $J$  = 13.4, 8.2 Hz, 1H,  $\text{CH}_2$  do anel), 4.32 (dd,  $J$  = 13.4, 10.8 Hz, 1H,  $\text{CH}_2$  do anel), 3.95 (s, 3H,  $\text{CO}_2\text{Me}$ ), 3.90 (dd,  $J$  = 15.6, 9.4 Hz, 1H,  $\text{CH}_2$  do anel), 3.84 (s, 3H,  $\text{CO}_2\text{Me}$ ), 2.91 (dd,  $J$  = 15.6, 11.4 Hz, 1H,  $\text{CH}_2$  do anel), -1.44 (s, 2H, NH) ppm.



Bacterioclorina fundida- 4,5,6,7-tetrahidropirazolo[1,5- $\alpha$ ]piridina **1.46b**<sup>92,93</sup>

A síntese da bacterioclorina é realizada com base num procedimento presente na literatura.<sup>92,93</sup> Uma solução de clorina (0.070 mmol), em triclorobenzene (3 mL), é borbulhada com argón, durante aproximadamente 10 minutos. Realiza-se a reação em refluxo, a 225 °C, em atmosfera inerte de  $\text{N}_2$ . À solução anterior, adiciona-se

pequenas porções e com intervalos de tempo de aproximadamente 1 hora, o 2,2-dioxo-6-etil-7-fenil-1*H*,3*H*-pirazolo[1,5-*c*][1,3]tiazol-6,7-dicarboxilato de dimetilo (**1.42**) (6.1 equiv., (0.42 mmol)). Controla-se a evolução da reação por espectroscopia de UV-Vis (desaparecimento da banda de 650 nm, banda característica da clorina). Após o arrefecimento da mistura adicionam-se umas gotas de trietilamina e a bacterioclorina é purificada por cromatografia em coluna [diclorometano/acetato de etilo (9:1)]. A bacterioclorina é obtida como um sólido de cor púrpura, com um rendimento de 27% e recupera-se 14% da clorina de partida RMN  $^1\text{H}$   $\delta$  = 8.17 (2 d, sobreposição de dois dubletos,  $J$  = 6.2 Hz, 2H,  $\beta$ -H pirrólico), 8.13 (2 d, sobreposição de dois dubletos,  $J$  = 6.2 Hz, 2H,  $\beta$ -H pirrólico), 8.1–7.90 (m, 8H), 7.84–7.77 (m, 4H), 7.72–7.62 (m, 8 H), 5.65–5.56 (m, 2H,  $\beta$ -H pirrólico reduzido), 5.38–5.30 (m, 2H,  $\beta$ -H pirrólico reduzido), 4.26 (dd,  $J$  = 13.7, 7.3 Hz, 1H,  $\text{CH}_2$  do anel), 4.24 (dd,  $J$  = 13.7, 7.3 Hz, 1H,  $\text{CH}_2$  do anel), 3.94 (dd,  $J$  = 13.7, 8.5 Hz, 1H,  $\text{CH}_2$  do anel), 3.89 (dd,  $J$  = 13.7, 8.5 Hz, 1H,  $\text{CH}_2$  do anel), 3.80 (s, 6H,  $\text{CO}_2\text{Me}$ ), 3.73 (s, 3H,  $\text{CO}_2\text{Me}$ ), 3.72 (s, 3H,  $\text{CO}_2\text{Me}$ ), 3.37 (dd,  $J$  = 15.9, 6.8 Hz, 1H,  $\text{CH}_2$  do anel), 3.35 (dd,  $J$  = 15.9, 6.8 Hz, 1 H,  $\text{CH}_2$  do anel), 2.71 (dd,  $J$  = 15.9, 8.9 Hz, 1H,  $\text{CH}_2$  do anel), 2.68 (dd,  $J$  = 15.9, 8.9 Hz, 1H,  $\text{CH}_2$  do anel), -1.66 e -1.71 (2 s, 2H, NH) ppm.

#### 4.3.4. Síntese dos derivados hidroxilados das clorinas e bacterioclorina

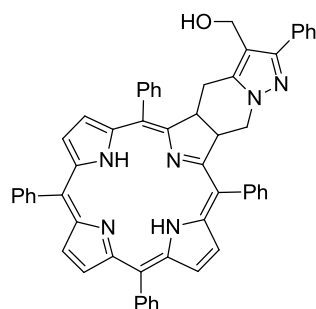
##### Procedimento geral para a redução dos grupos ésteres das clorinas fundidas com o anel 4,5,6,7-tetra-hidropirazolo[1,5- $\alpha$ ]piridina a álcoois

A síntese dos derivados hidroxilados foi realizada com base num procedimento descrito na literatura.<sup>94</sup>

a) *Metação*: A uma solução de clorina (0.056 mmol) em diclorometano (10 mL) adicionam-se umas gotas de trietilamina. À mistura anterior é adicionada uma solução de  $Zn(OAc)_2 \cdot 2H_2O$  (10 equiv., 0.560 mmol) em metanol (1 mL) e, deixa-se a reagir durante 12 horas, à temperatura ambiente, sob atmosfera inerte de  $N_2$ . A metação é controlada por espectroscopia de UV-Vis (a banda de 650 nm desloca-se para 620 nm). Evapora-se os solventes e deixa-se secar o composto sob vácuo. No dia seguinte, adiciona-se diclorometano e coloca-se a mistura no congelador, para que os sais de zinco em excesso precipitem. Posteriormente procede-se a uma filtração sobre celite, evapora-se o solvente e deixa-se secar a clorina metalada sob vácuo.

b) *Redução*: A uma suspensão de  $LiAlH_4$  (6 equiv., 0.336 mmol) em éter etílico seco (10 mL), a 0 °C, é adicionada através de um funil de adição, uma solução de clorina metalada em diclorometano (10 mL). Após a adição estar completa, a mistura é colocada a 50 °C, sob atmosfera inerte de  $N_2$ , deixando-se reagir durante o tempo necessário para que a reação esteja completa (controlar por TLC). A mistura é arrefecida num banho de gelo e é adicionado acetato de etilo (1 mL), água (0.5 mL) e uma solução aquosa NaOH a 10% (m/v) (0.5 mL). Deixa-se em agitação vigorosa durante 30 minutos e depois evaporam-se os solventes. Adiciona-se acetato de etilo (20 mL) e água (20 mL), deixando-se em agitação magnética, durante 16 horas, à temperatura ambiente, de modo a ocorrer a destruição completa do hidreto em excesso. De seguida procede-se a uma filtração sobre celite para que os sais de alumínio sejam removidos. As duas fases são separadas num funil de separação e a fase aquosa é extraída com acetato de etilo (3 x 100 mL). A fase orgânica recuperada é seca com  $Na_2SO_4$  e, posteriormente o solvente é evaporado e deixa-se secar sob vácuo. No dia seguinte, procede-se à desmetação da clorina e, para tal, adiciona-se TFA (1 mL) e deixa-se em agitação magnética, durante 30 minutos, a 0 °C. A mistura é neutralizada com uma solução saturada de  $NaHCO_3$  e extraída com acetato de etilo (3 x 100 mL). A fase orgânica recuperada é seca com  $Na_2SO_4$  e, posteriormente o solvente é evaporado e purifica-se o produto por cromatografia em coluna.

#### Clorina hidroxifundida-4,5,6,7-tetra-hidropirazolo[1,5-*a*]piridina **2.18**

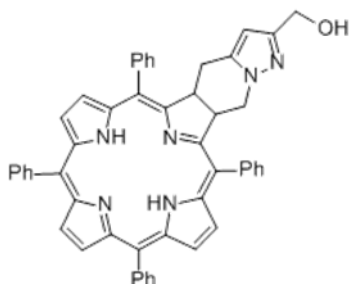


Preparada a partir da clorina **2.16** e a redução tem uma duração de 6 horas. O composto **2.18** é purificado por cromatografia em coluna [diclorometano/acetato de etilo (95:5)]. A clorina monoálcool é obtida como um sólido de cor púrpura, com um rendimento global de 18%. p.f. > 300° C (recristalização com diclorometano/ hexano); IR (KBr): 3445, 2961, 2924, 2853, 1553, 1442, 1398, 1261, 1095, 1029, 798, 703  $cm^{-1}$ ; RMN  $^1H$   $\delta$  = 8.61 (d,  $J$  = 4.8 Hz, 1H,  $\beta$ -H pirrólico), 8.58 (d,  $J$  = 4.8 Hz, 1H,  $\beta$ -H pirrólico),

8.43 (s, 2H,  $\beta$ -H pirrólico), 8.34 (d,  $J$  = 4.8 Hz, 1H,  $\beta$ -H pirrólico), 8.29-8.25 (m, 2H, 1H do  $\beta$ -H pirrólico e 1H Ar), 8.20-8.18 (m, 2H, Ar), 8.10-8.05 (m, 4H, Ar), 7.92-7.90 (m, 1H, Ar), 7.85-7.81 (m, 2H, Ar), 7.74-7.66 (m, 10H, Ar), 7.58-7.56 (m, 2H, Ar), 7.31-7.28 (m, 2H, Ar), 7.24-7.22 (m, 1H, Ar), 5.77-5.71 (m, 1H,  $\beta$ -H pirrólico reduzido), 5.38-5.32 (m, 1H,  $\beta$ -H pirrólico reduzido), 4.29-4.19 (m, 3H), 4.05 (dd,  $J$  = 13.4, 9.0 Hz, 1H), 3.03 (dd,  $J$  = 15.3, 6.3 Hz, 1H,  $CH_2$  do anel), 2.75 (dd,  $J$  = 15.3, 9.8 Hz, 1H,  $CH_2$  do anel), -1.61 (s, 2H, NH) ppm; EMAR (ESI): 815.3463

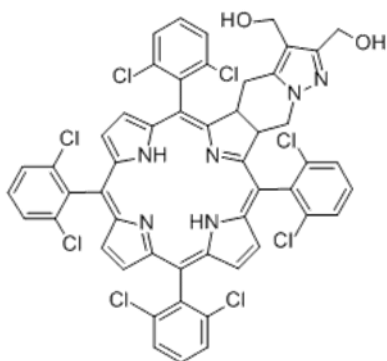
(C<sub>58</sub>H<sub>45</sub>N<sub>6</sub>O [M+H]<sup>+</sup>, 815.3493); UV/Vis (tolueno):  $\lambda_{max}$  (log $\epsilon$ ) = 419 (5.34), 516 (4.40), 546 (4.28), 597 (3.00), 650 (4.56) nm.

#### Clorina hidroxifundida-4,5,6,7-tetra-hidropirazolo[1,5-*a*]piridina **2.22**



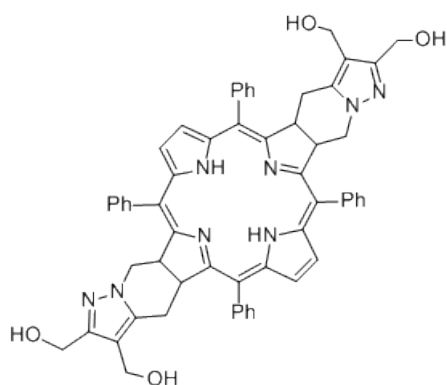
Preparada a partir da clorina **2.21** e a redução tem uma duração de 6 horas, utilizando-se 8 equivalentes de LiAlH<sub>4</sub>. O composto **2.22** é purificado por cromatografia em coluna [acetato de etilo/hexano (2:1)]. A clorina mono-álcool é obtida como um sólido de cor púrpura, com um rendimento global de 11%. p.f. > 300° C (recristalização com diclorometano/ hexano); IR (KBr): 3467, 3390, 1550, 1469, 1454, 1442, 1384, 1357, 794, 701 cm<sup>-1</sup>; RMN <sup>1</sup>H  $\delta$  = 8.60 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H,  $\beta$ -H pirrólico), 8.58 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H,  $\beta$ -H pirrólico), 8.43 (s, 2H,  $\beta$ -H pirrólico), 8.29 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H,  $\beta$ -H pirrólico), 8.27-8.24 (m, 2H, 1H,  $\beta$ -H pirrólico e 1H Ar), 8.19-8.17 (m, 2H, Ar), 8.10-8.01 (m, 4H, Ar), 7.96-7.91 (m, 1H, Ar), 7.86-7.79 (m, 3H, 2H Ar), 7.76-7.64 (m, 10H, Ar), 5.73-5.66 (m, 1H,  $\beta$ -H pirrólico reduzido), 5.39-5.33 (m, 1H,  $\beta$ -H pirrólico reduzido), 4.45 (s, 2H), 4.22 (dd, *J* = 13.6, 7.6 Hz, 1H), 3.95 (dd, *J* = 13.2, 8.8 Hz, 1H), 3.76-3.71 (m, 1H, OH), 2.98 (dd, *J* = 15.2, 6.8 Hz, 1H, CH<sub>2</sub> do anel), 2.56 (dd, *J* = 15.2, 9.6 Hz, 1H, CH<sub>2</sub> do anel), -1.63 (s, 2H, NH) ppm; EMAR (ESI): 739.31799 (C<sub>50</sub>H<sub>39</sub>N<sub>6</sub>O [M+H]<sup>+</sup>, 739.31754); UV/Vis (tolueno):  $\lambda_{max}$  (log $\epsilon$ ) = 420 (4.82), 517 (3.81), 544 (3.75), 598 (3.43), 651 (4.11) nm.

#### Clorina dihidroxifundida - 4,5,6,7-tetra-hidropirazolo[1,5-*a*]piridina **2.23**



Preparada a partir da clorina **1.45g**, a metalação tem uma duração de 48 horas em refluxo, a 50 °C, e a redução demora 4 horas sendo utilizados 12 equivalentes de LiAlH<sub>4</sub>. O composto **2.23** é purificado por cromatografia em coluna [diclorometano/acetato de etilo (95:5) e acetato de etilo/metanol (90:10)]. A clorina di-álcool é obtido como um sólido de cor púrpura, com um rendimento global de 38%. p.f. > 300° C (recristalização com acetato de etilo/hexano); IR (KBr): 3355, 2923, 1556, 1427, 1384, 1022, 798, 715 cm<sup>-1</sup>; RMN <sup>1</sup>H  $\delta$  = 8.48 (2 d, sobreposição de 2 dubletos, *J* = 5.6 Hz, 2H,  $\beta$ -H pirrólico), 8.28 (s, 2H,  $\beta$ -H pirrólico), 8.18 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H,  $\beta$ -H pirrólico), 8.12 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H,  $\beta$ -H pirrólico), 7.88-7.85 (m, 2H, Ar), 7.77-7.64 (m, 10H, Ar), 5.49-5.40 (m, 1H,  $\beta$ -H pirrólico reduzido), 5.07-5.00 (m, 1H,  $\beta$ -H pirrólico reduzido), 4.39 (m, 2H), 4.30 (m, 2H), 3.99 (sl, 1H, CH<sub>2</sub> do anel), 3.89 (sl, 1H, CH<sub>2</sub> do anel), 2.95 (sl, 1H, CH<sub>2</sub> do anel), 2.86 (sl, 1H, CH<sub>2</sub> do anel), -1.44 (s, 2H, NH) ppm; EMAR (ESI): 1041.01677 (C<sub>51</sub>H<sub>33</sub>Cl<sub>8</sub>N<sub>6</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>, 1041,01652); UV/Vis (metanol):  $\lambda_{max}$  (log $\epsilon$ ) = 409 (5.26), 512 (4.34), 537 (4.04), 597 (3.04), 656 (4.49).



Bacterioclorina tetrahidroxi fundida – 4,5,6,7-tetra-hidropirazolo[1,5-*a*]piridina **2.7**

Preparada a partir da bacterioclorina **1.46b** e não é necessário metalação. A redução tem uma duração de 24 horas sendo utilizados 24 equivalentes de  $\text{LiAlH}_4$ . O composto **2.7** é purificado por cromatografia em coluna [acetato de etilo/metanol (9:1) e diclorometano/etanol (2:1)]. A bacterioclorina tetra-hidroxi é obtido como um sólido de cor púrpura, com um rendimento global de 19%. p.f.  $> 300^\circ \text{C}$  (recristalização com acetato de etilo/hexano); IR (KBr): 3326, 1695, 1687, 1384, 1261,

1020, 701  $\text{cm}^{-1}$ ; RMN  $^1\text{H}$   $\delta = 7.94\text{-}7.83$  (m, 8H), 7.75-7.68 (m, 4H), 7.65-7.57 (m, 12H), 5.49-5.40 (m, 2H,  $\beta$ -H pirrólico reduzido), 5.30-5.23 (m, 2H,  $\beta$ -H pirrólico reduzido), 4.37-4.25 (m, 4H), 4.16-4.10 (m, 4H), 4.03-3.96 (m, 4H), 2.78-2.69 (m, 2H,  $\text{CH}_2$  do anel), 2.50-2.41 (m, 2H,  $\text{CH}_2$  do anel), -1.78 (s, 2H, NH) ppm; EMAR (ESI): 923.4007 ( $\text{C}_{58}\text{H}_{51}\text{N}_8\text{O}_4$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 923.4028).

#### 4.4. Estudos preliminares das propriedades fotofísicas

As clorinas **2.18** e **2.22** foram sujeitos a uma purificação adicional antes da realização dos estudos fotofísicos, através de placas preparativa, utilizando gel de sílica 60 (2-25 $\mu$ m) fornecida pela Sigma-Aldrich. Os eluentes aplicados foram iguais aos utilizados na cromatografia em coluna de cada um dos compostos.

A absorção de UV-Vis e a emissão de fluorescência foram obtidas, à temperatura ambiente, recorrendo aos espectrofotômetros Shimadzu UV-2100 e Horiba-Jobin Ivon-SPEX Fluorolog 3-22, respetivamente. As clorinas e a bacterioclorina foram dissolvidas em tolueno ou em metanol para a aquisição dos espectros de absorção e de fluorescência. Utilizaram-se células de quartzo de duas faces com 1 cm de percurso ótico e utilizou-se sempre como referência o solvente utilizado.

Os coeficientes de absorvidade molar foram calculados através da lei de Beer-Lambert, com soluções de concentração  $1 \times 10^{-5}$  a  $1 \times 10^{-7}$  M.

Os espectros de fluorescência foram obtidos utilizando soluções de concentração  $1 \times 10^{-7}$  M.

Utilizou-se o Software *Origin 8* para a análise dos resultados.

## **CAPÍTULO 5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**



- 1- Vera L. Almeida; Andrei Leitão; Luisa C. B. Reina; Carlos A. Montanari; Claudio Luis Donnici. *Quim. Nova* **2005**, *28*, 118-129.
- 2- Fernando J. Regateiro. *Manual de Genética Médica*. Editora Imprensa da Universidade de Coimbra, **2003**.
- 3- Raymond W. *Cancer Biology*. Oxford University Press: New York, **2007**.
- 4- John F. Thompson. *Basics of Oncology*. Springer: New York, **2009**.
- 5- John S. Bertram. *Molecular Aspects of Medicine*. **2000**, *21*, 167–223.
- 6- Harvey Lodish; Arnold Berk; S Lawrence Zipursky, Paul Matsudaira, David Baltimore; James Darnell. *Molecular Cell Biology*. W. H. Freeman: New York, **2000**.
- 7- <http://www.cancerresearchuk.org/cancer-info/cancerstats/keyfacts/worldwide/> (consultado no dia 15 de Novembro de 2014).
- 8- Ahmedin Jemal; Freddie Bray; Melissa M. Center; Jacques Ferlay; Elizabeth Ward; David Forman. *CA Cancer J. Clin.* **2011**, *61*, 69-90.
- 9- Siegel R; Naishadham D; Jemal A. *CA Cancer J. Clin* **2012**, *62*, 10-29.
- 10- Arménio Serra; Marta Pineiro; Nelson Pereira; António R. Gonsalves; Mafalda Laranjo; Margarida Abrantes; Filomena Botelho. *Oncol. Rev.* **2008**, *2*, 235–249.
- 11- Paul Charlesworth; T. George Truscott; David Kessel; Craig J. Medforth; Kevin M. Smith. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **1994**, *90*, 1073-1076.
- 12- Suneela Dhaneshwar; Kashmira Patil; Mrunal Bulbule; Vedang Kinjawadekar; Dhaval Joshi; Vineet Joshi. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* **2014**, *20*, 125-141.
- 13- Jonathan P. Celli; Bryan Q. Spring; Imran Rizvi; Conor L. Evans; Kimberley S. Samkoe; Sarika Verma; Brian W. Pogue; Tayyaba Hasan. *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 2795-2838.
- 14- A. Policard. *CR Soc. Biol.* **1924**, *91*, 1423-1424.
- 15- R.L. Lipson; E.J. Baldes. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **1961**, *42*, 623-629.
- 16- Thomas J. Dougherty; Jerome E. Kaufman; Abraham Goldfarb; Kenneth R. Weishaupt; Donn Boyle; Arnold Mittelman. *Cancer Res.* **1978**, *38*, 2628-2635.
- 17- A. Juarranz; P. Jaén; F.Sanz-Rodríguez; J. Cuevas J; S. González. *Clin. Transl. Oncol.* **2008**, *10*, 148–154.
- 18- Janice R. Perussi. *Quim. Nova* **2007**, *30*, 988-994.
- 19- Michael R. Hamblin; Giulio Jori. *Photochem. and Photobiol.* **2011**, *87*, 1479.
- 20- T. Hasan; B. Ortel; A. C. E. Morr; B. W. Pogue. *Cancer Medicine* **2003**, *40*, 605–622.
- 21- V.N. Reddy; K. Rekharani; G. Chandana; S. Sehwat. *Indian J. Dent. Advanc.* **2009**, *1*, 46-50.
- 22- E. Buytaert; M. Dewaele; P. Agostinis. *Biochim. Biophys. acta* **2007**, *1776*, 86–107.
- 23- S.B. Brown; E.A Brown; I.Walker. *Lancet Oncol.* **2004**, *5*, 497-508.
- 24- T. Kiesslich; B. Krammer; K. Plaetzer. *Curr. Med. Chem.* **2006**, *13*, 2189-2204.
- 25- T.J. Dougherty; C.J. Gomer; B.W. Henderson; G. Jori; D. Kessel; M. Korbelik; J. Moan; Q. Peng. *J. Natl. Cancer Inst.* **1998**, *90*, 889–905.
- 26- Barbara W. Henderson; Thomas J. Dougherty. *Photochem. Photobiol.* **1992**, *1*, 145–157.
- 27- Dennis E. J. G. J. Dolmans; Dai Fukumura; Rakesh K. Jain. *Nat. Rev. Cancer* **2003**, *3*, 380-387.
- 28- P. Mroz; A. Yaroslavsky; G. B Kharlwal; M. R Hamblin. *Cancers* **2011**, *3*, 2516-39.
- 29- Jens Osterloh; M. Graça H. Vicente. *J. Porphyrins Phthalocyanines* **2002**, *6*, 305–324.
- 30- Giulio Jori. *J Photochem. Photobiol.* **1996**, *36*, 87–93.
- 31- M. Triesscheijn; P. Baas; J. H. Schellens; F. A. Stewart. *Oncologist* **2006**, *11*, 1034-1044.
- 32- D. Fayer; M. Corbett; M. Heirs; D. Fox; A. Eastwood. *Health Technol. Assess.* **2010**, *14*, 1-288.
- 33- S. Feng; S. Chien. *Chem. Eng. sci.* **2003**, *58*, 4087-4114.

- 34- Mukund Seshadri. *Improving the efficacy and selectivity of photodynamic therapy-preclinical evaluation of a novel combination strategy for cancer*. Tese de Mestrado, The state university of New York, **2006**.
- 35- Leonard I. Grossweiner; Linda R. Jones. *The Science of Phototherapy: An introduction*. Springer: The Netherlands, **2005**.
- 36- Erhan I. Altinoğlu; James H. Adair. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* **2010**, *2*, 461-477.
- 37- C. H. Sibata; V. C. Colussi; N. L. Oleinick; T. J. Kinsella. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **2000**, *33*, 869-880.
- 38- Patrizia Agostinis; Kristian Berg; Keith A. Cengel; Thomas H. Foster; Albert W. Girotti; Sandra O. Gollnick; Stephen M. Hahn; Michael R. Hamblin; Asta Juzeniene; David Kessel; Mladen Korbelik; Johan Moan; Pawel Mroz; Dominika Nowis; Jacques Piette; Brian C. Wilson; Jakub Golab. *CA Cancer. J. Clin.* **2011**, *61*, 250–281.
- 39- Robertson CA; Evans DH; Abrahamse H. *J. Photochem. Photobiol.* **2009**, *96*, 1–8.
- 40- Raymond Bonnett. *Chemical Aspects of Photodynamic Therapy*. Gordon and Breach Science Publishers: Amesterdão, **2000**.
- 41- Emma S. Nyman; Paavo H. Hynninen. *J. Photochem. Photobiol. B.* **2004**, *73*, 1–28.
- 42- Asheesh Gupta; Pinar Avci; Magesh Sadasivam; Rakkiyappan Chandran; Nivaldo Parizotto; Daniela Vecchio; Wanessa C Antunes-Melo; Tianhong Dai; Long Y. Chiang; Michael R. Hamblin. *Biotechnol. Adv.* **2013**, *31*, 607–631.
- 43- S. Yano; S. Hirohara; M. Obata; Y. Hagiya; S. I. Ogura; A. Ikeda; H. Kataoka; M. Tanaka; T. Joh. *J. Photochem. Photobiol. C.* **2011**, *12*, 46–67.
- 44- Raymond Bonnet. *Chem. Soc. Rev.* **1995**, *24*, 19–33.
- 45- L. B. Josefsen; R. W. Boyle. *Met. based drugs* **2008**, *2008*, 276109.
- 46- Pawel Mroz; Angelika Szokalska; Mei X. Wu; Michael R. Hamblin. *PLoS ONE* **2010**, *5*.
- 47- Aisling E. O'Connor; William M. Gallagher; Annette T. Byrne. *Photochem. Photobiol.* **2009**, *85*: 1053–1074.
- 48- D. Wöhrle; A. Hirth; T. Bogdahn-Rai; G. Schnurpfeil; M. Shopova. *Russ. Chem. B+* **1998**, *47*, 807-816.
- 49- Martin J. Garland; Corona M. Cassidy; David Woolfson D; Ryan F. Donnelly RF. *Future Med. Chem.* **2009**, *1*, 667-691.
- 50- M. A. Calin; S. V. Parasca. *Optoelectron. Adv. Mat.* **2006**, *8*, 1173 – 1179.
- 51- M. A. Awan; S. A. Tarin. *Surgeon* **2006**, *4*, 231-236.
- 52- L. Via; S. Magno. *Curr. Med. Chem.* **2001**, *8*, 1405-1418.
- 53- Manivannan Ethirajan; Yihui Chen; Penny Joshi; Ravindra K. Pandey. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 340-362.
- 54- H. Fukuda; A. Casas; A. Batlle. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2005**, *37*, 272-276.
- 55- Xiang Zheng. *A comparative study of photosensitizers with and without carbohydrate moieties*. Tese de Doutorado, The state university of New York, **2006**.
- 56- Edyta Paszko; Carsten Ehrhardt; Mathias O. Senge; Dermot P. Kelleher; John V. Reynolds. *Photodiagn. Photodyn.* **2011**, *8*, 14-29.
- 57- Sabrina Oliveira; Raimond Heukers; Jirawas Sornkom; Robbert J. Kok; Paul M.P. van Bergen en Henegouwen. *J. Controll. Release* **2013**, *172*, 607–617.
- 58- Melissa J. Bovis; Josephine H. Woodhams; Marilena Loizidou; Dietrich Scheglamnn; Stephen G. Bown; Alexander J. MacRobert 2. *J. Controll. Release* **2012**, *157*, 196–205.
- 59- L. R. Milgrom. *The colours of Life: an Introduction to the Chemistry of Porphyrins and Related Compounds*. Oxford University Press: Oxford, **1997**.

- 60- Marta Pineiro; Arménio C. Serra; Teresa M. V. D. Pinho e Melo. *Synthetic Strategies to Chlorins and Bacteriochlorins*. Novapublishers, **2012**
- 61- Kevin M. Smith. *Porphyryns and Metalloporphyryns*. Elsevier: Amesterdão, **1975**.
- 62- J. A. Cowan. *Inorganic Biochemistr: an introduction*. Wiley-VCH: New York, **1997**.
- 63- P. Rothmund. *J. Am. Chem. Soc.* **1935**, *57*, 2010-2011.
- 64- P. Rothmund. *J. Am. Chem. Soc.* **1936**, *58*, 625-627.
- 65- P. Rothmund. *J. Am. Chem. Soc.* **1939**, *61*, 2912-2915.
- 66- P. Rothmund; A. R. Menotti. *J. Am. Chem. Soc.* **1941**, *63*, 267-270.
- 67- Jonathan S. Lindsey; Irwin C. Schreiman; Henry C. Hsu; Patrick C. Kearney; Anne M. Marguerettaz. *J. Org. Chem.* **1987**, *52*, 827-836.
- 68- Karl M. Kadish; Kevin M. Smith; Roger Guilard. *The Porphyrin Handbook: Synthesis and Organic Chemistry*. Academic Press: Nova Iorque, **2000**.
- 69- Sakthitharan Shanmugathan; Christine Edwards; Ross W. Boyle. *Tetrahedron* **2000**, *56*, 1025-1046.
- 70- A. M. d. A. R. Gonsalves; M. M. Pereira. *J. Het. Chem.* **1985**, *22*, 931-933.
- 71- A. M. d. A. R. Gonsalves; J. M. T. B. Varejão; M. M. Pereira. *J. Het. Chem.* **1991**, *28*, 635-640.
- 72- R. A. W. Johnstone; M. L. P. G. Nunes; M. M. Pereira; A. M. d. A. R. Gonsalves; A. C. Serra. *Heterocycles* **1996**, *43*, 1423-1437.
- 73- B. Nascimento; M. Pineiro; A. Gonsalves; A. Beja; J. Paixão. *J. Porphyrins Phthalocyanines* **2007**, *11*, 77-84.
- 74- Cesar A. Henriques; Sara M. A. Pinto; Gilberto L. B. Aquino; M. Pineiro; Mário J. F. Calvete; Mariette M. Pereira. *ChemSusChem*. **2014**, *7*, 2821 – 2824.
- 75- L. G. Arnaut. *Advances in Inorganic Chemistry*. R.S.G VanEldik, **2011**.
- 76- C. Muthiah; M. Taniguchi; H. J. Kim; I. Schmidt; H. L. Kee; D. Holten; D. F. Bocian; J. S. Lindsey, *J. S. Photochem. Photobiol.* **2007**, *83*, 1513-28
- 77- N. Sergeeva; Y. M. Shaker; E. M. Finnigan; T. McCabe; O. M. Senge. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 12454-12464.
- 78- H. W. Whitlock; R. Hanauer; M. Y. Oester; B. K. Bower. *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, *91*, 7485-7489.
- 79- R. Bonnett; R. D. White; U. J. Winfield; M. C. Berenbaum. *Biochem. J.* **1989**, *261*, 277-280.
- 80- Mariette M. Pereira; Carlos J.P. Monteiro; Ana V.C. Simões; Sara M.A. Pinto; Artur R. Abreu; Gonçalo F.F. Sá; Elsa F.F. Silva; Luís B. Rocha; Janusz M. Dabrowski; Sebastião J. Formosinho; Sérgio Simões; Luis G. Arnaut. *Tetrahedron* **2010**, *66*, 9545-9551.
- 81- Bruno F.O. Nascimento; António M.d'A. Rocha Gonsalves; Marta Pineiro. *Inorg. Chem. Commun.* **2010**, *13*, 395-398.
- 82- Christian Brückner; David Dolphin. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 3295-3298.
- 83- Christian Brückner; David Dolphin. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 9425-9428.
- 84- Mário J. F. Calvete; Ana. T. P. C. Gomes; Nuno M. M. Moura. *Rev. Virtual Quim.* **2009**, *1*, 92-103.
- 85- Maria A. F. Faustino; Maria G.P.M.S. Neves; Maria G.H. Vicente; Artur M.S. Silva; José A.S. Cavaleiro. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 3569-3570.
- 86- Augusto C. Tome; Paula S.S. Lacerda; Maria G. P. M. S. Neves; José A. S. Cavaleiro. *Chem. Commun.* **1997**, *13*, 1199-1200.
- 87- José A. S. Cavaleiro; Maria G. P. M. Neves; Augusto C. Tomé; Artur M. S. Silva; Maria A. F. Faustino; Paula S. Lacerda; Ana M. G. Silva. *J. Heterocycl. Chem.* **2000**, *37*, 527-534.
- 88- Ana M. G. Silva; Augusto C. Tomé; Maria G. P. M. S. Neves; Artur M. S. Silva; José A. S. Cavaleiro. *Chem. Commun.* **1999**, *17*, 1767-1768.

- 89- Ana M. G. Silva; Augusto C. Tomé; Maria G. P. M. S. Neves; José A. S. Cavaleiro. *Synlett* **2002**, 7, 1155-1157.
- 90- Angela Desjardins; Jeffery Flemming; Ethan D. Sternberga; David Dolphin. *Chem. Commun.* **2002**, 22, 2622-2623.
- 91- Daniel T. Gryko; Michał Gałęzowski. *Org. Lett.* **2005**, 7, 1749-1752.
- 92- Nelson A. M. Pereira; Arménio C. Serra; Teresa M. V. D. Pinho e Melo. *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 6539-6543;
- 93- Nelson A. M. Pereira; Sofia M. Fonseca; Arménio C. Serra; Teresa M. V. D. Pinho e Melo; Hugh D. Burrows. *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 3970-3979.
- 94- Nelson A. M. Pereira; Mafalda Laranjo; Marta Pineiro; Arménio C. Serra; Kathleen Santos; Ricardo Teixo; Ana Margarida Abrantes; Ana Cristina Gonçalves; Ana Bela Sarmento Ribeiro; João Casalta-Lopes; M. Filomena Botelho; Teresa M. V. D. Pinho e Melo. Artigo submetido.
- 95- Marta Pineiro; Mariette M. Pereira; A.M.d'A. Rocha Gonsalves; Luis G. Arnaut; Sebastião J. Formosinho. *Photochem Photobiol.* **2001**, 138, 147-157.
- 96- A.C. Serra; M. Pineiro; A.M.d'A. Rocha Gonsalves; M. Abrantes; M. Laranjo; A.C. Santos; M.F. Botelho. *Photochem Photobiol.* **2008**, 92, 59-65.
- 97- Mafalda Laranjo; Arménio C. Serra; Margarida Abrantes; Marta Pineiro; Ana C. Gonçalves; João Casalta-Lopes; Lina Carvalho; Ana B. Sarmento-Ribeiro; António Rocha-Gonsalves; Filomena Botelho. *Photodiagnosis Photodyn Ther* **2013**, 10, 51-61.
- 98- A. Matos Beja; J. A. Paixão; M. Ramos Silva; L. Alte da Veiga; A. M. d'A. Rocha Gonsalves; A. C. Serra. *Acta Cryst.* **2000**, C56, 354-355.
- 99- Oliver B. Sutcliffe; Richard C. Storr; Thomas L. Gilchrist; Paul Rafferty. *J. Chem. Soc.* **2001**, 1, 1795-1806.
- 100- Oliver B. Sutcliffe; Richard C. Storr; Thomas L. Gilchrist; Paul Rafferty. *Tetrahedron* **2000**, 56, 10011-10021.
- 101- Susana M. M. Lopes; Cátia F. O. Correia; Sandra C. C. Nunes; Nelson A. M. Pereira; Ana R. F. Ferreira; Emanuel P. Sousa; Clara S. B. Gomes; Jorge A. R. Salvador; Alberto A. C. C. Pais; Teresa M. V. D. Pinho e Melo. Artigo submetido.
- 102- António Aguiar, *Síntese de novos macrocilos porfirínicos para aplicação em catálise*. Dissertação de Mestrado, Universidade do Porto, **2014**.
- 103- Néilson António Melo Pereira, *Reacções de ciclo-adição na síntese de novos dipirrometanos e hidroporfirinas*. Tese de Doutoramento, Universidade de Coimbra, **2014**.
- 104- Vinícius Silveira Garcia. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, **2008**.
- 105- H.C. Longuet-Higgins; C.W. Rector; J.R. Platt. *J. Chem. Phys.* **1950**, 18, 1174-1181.
- 106- John R. Platt. *Chem. Phys.* **1950**, 18, 1168-1173.
- 107- Martin Gouterman. *J. Mol. Spectrosc.* **1961**, 6, 138-163.
- 108- Martin Gouterman. *Chem. Phys.* **1959**, 30, 1139-1161.
- 109- Victor N. Nemykin; Ryan G. Hadt. *J. Phys. Chem. A* **2010**, 114, 12062-12066.
- 110- Andreas B. J. Parusel; Stefan Grimme. *J. Porphyrins Phthalocyanines* **2001**, 5, 225-232.
- 111- Martin Gouterman. *Optical spectra and electronic structure of porphyrins and related rings em The Porphyrins*. Academic Press: New York, **1978**, 3, 1-165.



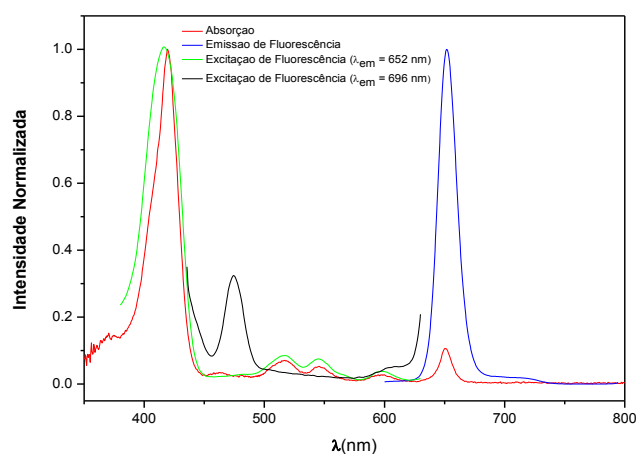
## **ANEXOS**



## Espetros de absorção UV-Vis e de emissão de fluorescência

A figura VI representa o espectro de emissão de fluorescência do composto **2.18**, o qual apresenta três bandas com máximos em 652, 696 e 715 nm. A banda dos 696 nm não é característica deste tipo de compostos e, de modo a confirmarmos se se tratava de uma impureza determinamos o espectro de excitação de fluorescência utilizando como comprimento de emissão 696 nm. Este espectro não mostrou correspondência com o espectro de absorção, na zona dos 450 nm, o que corrobora a impureza do composto. Esta poderá ser devida há presença de um derivado oxidado da clorina **2.18**, o qual absorve a 450 nm e emite a 696 nm.

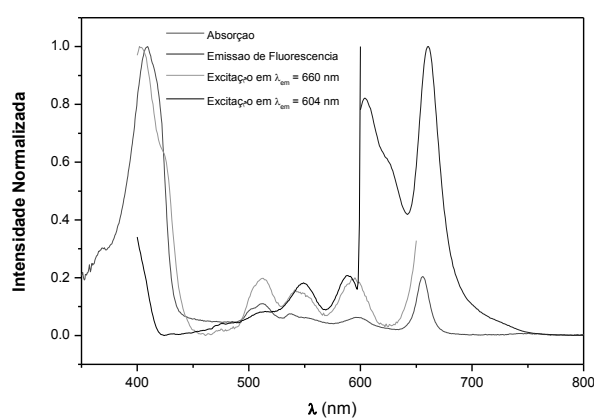
Esta contaminação também é visível no espectro de excitação de fluorescência com o comprimento de onda de emissão de 652 nm.



**Figura VI.** Espetros de absorção de UV-Vis, de emissão e de excitação de fluorescência da clorina **2.18**. Os espectros foram normalizados utilizando o Software *Origin 8*.

A figura VII representa o espectro de emissão de fluorescência da clorina **2.23**, o qual apresenta duas bandas com máximos em 604 nm e 660 nm. A primeira banda não é característica deste tipo de compostos e com o intuito de percebermos se correspondia a uma impureza determinamos o espectro de excitação de fluorescência utilizando como comprimento de emissão 660 nm. Este espectro não mostrou elevada correspondência com o espectro de absorção no intervalo de 400 a 600 nm, o que nos indica que o composto não se encontra puro e a impureza não identificada, absorve numa zona em comum com o nosso produto.

Esta contaminação também é visível no espectro de excitação de fluorescência com o comprimento de onda de emissão de 652 nm.



**Figura VII.** Espectros de absorção de UV-Vis, de emissão e de excitação de fluorescência da clorina **2.23**. Os espectros foram normalizados utilizando o Software *Origin 8*.



