



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Diana Margarida Pereira Gomes

SÍNTESE DE LIGANDOS NITROGENADOS E
COMPLEXOS METÁLICOS COM
POTENCIALIDADE PARA IMAGIOLOGIA MÉDICA

Dissertação no âmbito do mestrado em Química Medicinal orientada pela Professora Doutora Maria Miguéns Pereira, co-orientada pela Doutora Sara Pinto e apresentada ao Departamento de Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra

Setembro de 2019

Faculdade de Ciências e Tecnologia
da Universidade de Coimbra

SÍNTESE DE LIGANDOS NITROGENADOS E
COMPLEXOS METÁLICOS COM
POTENCIALIDADE PARA IMAGIOLOGIA
MÉDICA

Diana Margarida Pereira Gomes

VOLUME 1

Dissertação no âmbito do mestrado em Química Medicinal orientada pela Professora Doutora Maria Miguéns Pereira, co-orientada pela Doutora Sara Pinto e apresentada ao Departamento de Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra

Setembro 2019

Agradecimentos

No fim de mais um ciclo, que me permitiu adquirir novos conhecimentos, desenvolver as minhas capacidades e crescer como pessoa, é com muita satisfação que agradeço a todas as pessoas que fizeram parte deste percurso e estiveram sempre ao meu lado.

À minha orientadora, Doutora Mariette Pereira, agradeço a possibilidade de desenvolver o trabalho apresentado nesta dissertação no seu grupo de investigação, toda a orientação científica, disponibilidade, apoio e sabedoria que foram fundamentais.

À minha co-orientadora, Doutora Sara Pinto, um obrigada por toda disponibilidade, ajuda e orientação, pela paciência e incentivos quando nem tudo parecia fácil.

Aos meus colegas do laboratório de Catálise & Química Fina, obrigada por me terem acolhido, pelo auxílio prestado sempre que necessário e por todos os bons momentos passados.

Agradeço ainda aos diferentes grupos do Departamento de Química da Universidade de Coimbra que me possibilitaram de algum modo completar o meu trabalho: Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear, em especial ao Pedro, ao Grupo Colling pela liofilização dos compostos e ao grupo de Fotoquímica e Espectroscopia Molecular.

Porque os “amigos são a família que a vida nos permite escolher”, é com o coração cheio de orgulho que vos agradeço por tudo. Aos “Millennials Or Z Generation” pela união que permaneceu nestes últimos cinco anos e por todos os momentos passados. Aos “Cinco” que me proporcionaram as melhores recordações que levo de Coimbra, mas em especial, um enorme agradecimento à Patricia Portelinha que desde o primeiro dia esteve sempre ao meu lado, obrigada por todo o companheirismo, todas as gargalhadas e lágrimas, todas as conversas, paciência e apoio, sem ti não teria sido a mesma coisa. À minha madrinha, Márcia Campos, que foi uma excelente escolha, o teu exemplo, apoio, conselhos e incentivo foram cruciais para chegar aqui. À Rafaela, à Tatiana e ao Ivo, por tudo o que aturaram quando as coisas não estiveram tão bem, um obrigada pelo apoio incondicional, todas as mensagens de força e incentivo, todos os conselhos e todos os bons momentos. Ao Ricardo por todos os bons momentos e por toda a paciência que teve

comigo. A estes pilares que me sustentam, um obrigada do tamanho do mundo por terem a paciência de me aturarem e estarem sempre ao meu lado.

Por fim, agradeço às pessoas que estão comigo desde sempre e fizeram de mim o que sou hoje, a minha família. Em especial, quero agradecer à minha avó materna por toda a ajuda e preocupação. Aos meus pais agradeço todo o apoio incondicional nas decisões tomadas, por acreditarem em mim e não me deixarem desistir, por serem o meu porto de abrigo e por confiarem em mim. Finalmente, ao meu irmão, que muitas vezes parece mais crescido que eu, obrigada por todas as brincadeiras, doideiras e conversas, és o meu orgulho!!

Índice

| | Pág. |
|--|------|
| Abreviaturas | i |
| Resumo | vii |
| Abstract | ix |
| Nomenclatura | xi |
| | |
| Capítulo 1: Introdução | 1 |
| 1.1 Imagiologia Médica | 1 |
| 1.2 Síntese de Derivados do Cicleno | 3 |
| 1.3 Síntese de <i>meso</i> -arilporfirinas | 7 |
| 1.4 Síntese de Complexos de Salen | 13 |
| 1.5 Síntese de Agentes de Contraste Bimodais | 17 |
| Objetivos | 24 |
| 1.6 Referências | 26 |
| | |
| Capítulo 2: Síntese de Ligandos Nitrogenados | 31 |
| 2.1 Síntese do DO3A-N- α -aminopropionato e complexos | 31 |
| 2.2 Síntese de Porphirinas e seus complexos | 36 |
| 2.3 Síntese de Complexos de Salen | 50 |
| 2.4 Síntese de Potenciais Agentes de Contraste Bimodais | 58 |
| 2.5 Conclusão | 63 |
| 2.6 Referências | 65 |
| | |
| Capítulo 3: Experimental | 67 |
| 3.1 Solventes e Reagentes | 67 |
| 3.2 Técnicas e Instrumentação | 68 |
| 3.3 Síntese e Caracterização dos Compostos | 72 |
| 3.3.1 Síntese do DO3A-N- α -aminopropionato | 72 |
| 3.3.2 Síntese de <i>meso</i> -arilporfirinas e complexos | 76 |
| 3.3.3 Síntese de Complexos de Salen | 80 |
| 3.3.4 Síntese de Potenciais Agentes de Contraste Bimodais | 81 |
| 3.4 Referências | 83 |

Abreviaturas/ Fórmulas/ Símbolos

| | |
|--|--|
| ϵ | Coefficiente de Absorção Molar |
| η | Rendimento |
| λ | Comprimento de Onda |
| δ | Desvio Químico |
| Φ_F | Rendimento Quântico de Fluorescência |
| (Boc) ₂ O | di- <i>tert</i> -butildicarbonato |
| ¹ H-MRI | Imagiologia de Ressonância Magnética de ¹ H |
| ¹ H-RMN | Ressonância Magnética Nuclear de Protão |
| ¹³ C-RMN | Ressonância Magnética Nuclear de Carbono |
| ¹⁹ F-RMN | Ressonância Magnética Nuclear de Flúor |
| ¹⁸ F-FDG | 18-Fluorodesoxiglucose |
| ¹⁹ F-MRI | Imagiologia de Ressonância Magnética de ¹⁹ F |
| Boc | <i>tert</i> -butiloxicarbonilo |
| Boc-SerOMe | Éster metílico de N-(<i>tert</i> -butiloxicarbonil)-L-serina |
| Boc ₂ - Δ -AlaOMe | Éster metílico de N,N-bis-(<i>tert</i> -butoxicarbonil)- didesidro alanina |
| BtOH | Hidroxibenzotriazole |
| CDCl ₃ | Clorofórmio Deuterado |
| CH ₂ Cl ₂ | Diclorometano |
| CH ₃ I | Iodometano |
| CHCl ₃ | Clorofórmio |
| Ciclono | 1,4,7,10-tetraazaciclododecano |
| CT | Tomografia Computadorizada (do inglês: “ <i>computed tomography</i> ”) |
| CuCl ₂ | Cloreto de Cobre (II) |
| Cu(NO ₃) ₂ | Nitrato de Cobre (II) |
| Cu(OAc) ₂ •H ₂ O | Acetato de Cobre (II) monohidratado |
| d | duplete |
| D ₂ O | Água deuterada |
| DARA | Anticorpo Daratumumab |

| | |
|--|--|
| DCC | N, N'-diciclohexilcarbodiimida |
| DCM | Diclorometano |
| dd | duplo duplete |
| DDQ | 2,3-dicloro-5,6-dicianobenzoquinona |
| DIPEA | N,N-Diisopropiletilamina |
| DMAP | 4-dimetilaminopiridina |
| DMF | N,N-dimetilformamida |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| DOTA | 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético |
| DO3A | 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7-triacético |
| DO3A-benz | tribenzil-2,2',2''-(10-(2-amino-3-metoxi-3-oxopropil)-1,4,7,10-tetraaza-ciclododecano-1,4,7-triil)triacetato |
| DTPA | Ácido pentético |
| EDC | 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida |
| ESI | Ionização por “electrospray” (do inglês “ <i>electrospray ionization</i> ”) |
| FA | Ácido Fólico (do inglês: “ <i>folic acid</i> ”) |
| FDA | do inglês “food and drug administration” |
| FI | Imagiologia de Fluorescência (do inglês: “ <i>fluorescence imaging</i> ”) |
| FI | Isotiocianato Fluoresceína (do inglês: “ <i>fluorescein isothiocyanate</i> ”) |
| FR | Recetores de Folato (do inglês: “ <i>folate receptors</i> ”) |
| Gd(NO ₃) ₃ | Nitrato de Gadolínio (III) |
| Gd(NO ₃) ₃ •5H ₂ O | Nitrato de Gadolínio (III) pentahidratado |
| H ₂ | Hidrogénio |
| H ₂ O | Água |
| HCl | Ácido Clorídrico |
| ICNAS | Instituto de Ciências Nucleares Aplicadas à Saúde |

| | |
|---------------------------------------|---|
| IUPAC | União Internacional de Química Pura e Aplicada (do inglês: “ <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i> ”) |
| <i>J</i> | Constante de acoplamento |
| K ₂ CO ₃ | Carbonato de Potássio |
| KHSO ₄ | Bissulfato de Potássio |
| LuCl ₃ | Cloreto de Lutécio (III) |
| m | multiplete |
| [M] ⁺ | Ião Molecular |
| m/z | Razão massa/carga |
| MALDI-TOF | Ionização/Desorção de Matriz Assistida por Laser (do inglês “ <i>Matrix Assisted Laser Desorption/ Ionization</i> ”) |
| MeCN | Acetonitrilo |
| MeOH | Metanol |
| MM | Mioma Múltiplo |
| Mn(II)-TPP- <i>o</i> -F | 5,10,15,20-Tetraquis(2-fluorofenil)porfirinato de manganésio (II) |
| Mn(II)-TPP- <i>p</i> -CF ₃ | 5,10,15,20-tetraquis(4-trifluorometilfenil)porfirinato de manganésio (II) |
| MRI | Imagiologia de Ressonância Magnética (do inglês: “ <i>magnetic resonance imaging</i> ”) |
| MS | Espetroscopia de Massa |
| NaCl | Cloreto de Sódio |
| NaY | Zéolito de NaY |
| NaHCO ₃ | Bicarbonato de Sódio |
| NaOH | Hidróxido de Sódio |
| N-Boc ₂ -Δ-AlaOMe | éster metílico de N,N-bis-(<i>tert</i> -butoxicarbonil)-didesidro alanina |
| NH ₄ OAc | Acetato de Amónia |
| NOESY | Espetroscopia de efeito nuclear Overhauser (do inglês: “ <i>Nuclear Overhauser effect spectroscopy</i> ”) |
| Pd/C | Paládio/Carvão |

| | |
|--------------------------------|--|
| PET | Tomografia por Emissão de Positrões (do inglês: “ <i>positron emission tomography</i> ”) |
| pH | Potencial Hidrogenóico |
| ppm | Partes por Milhão |
| RMN | Ressonância Magnética Nuclear |
| RP-HPLC | Cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (do inglês: “ <i>reversed-phase high-performance liquid chromatography</i> ”) |
| s | singuleto |
| Zn(II)Salen | N,N-bis((-2-hidroxi-benzilideno)amino)benzoato de zinco(II) |
| Zn(II)Salen-F | N,N-bis((4-fluoro-2-hidroxi-benzilideno)amino)benzoato de zinco(II) |
| SPECT | Tomografia Computacional de Emissão de Fóton Único (do inglês: “ <i>single-photon emission computed tomography</i> ”) |
| SQ | Sulfato de Quinino |
| t | triplete |
| t _{1/2} | Tempo de meia vida |
| T1 | Tempo de relaxação longitudinal |
| TDFPP-COOH | 5-(4-carboxifenil)-10,15,20-tris(2,6-difluorofenil)porfirina |
| TFA | Ácido Trifluoroacético |
| TPP- <i>o</i> -F | 5,10,15,20- <i>tetraquis</i> (2-fluorofenil)porfirina |
| THF | Tetrahidrofurano |
| TLC | Cromatografia de camada Fina (do inglês: “ <i>thin layer chromatography</i> ”) |
| TPP | 5,10,15,20-tetrafenilporfirina |
| TPP- <i>p</i> -CF ₃ | 5,10,15,20-tetra(4-trifluorometilfenil)porfirina |
| UV-Vis | Ultravioleta-Visível |
| Zn(II)Salen | N,N-bis((-2-hidroxi-benzilideno)amino)benzoato de zinco (II) |

Zn(II)Salen-F

N,N-bis((4-fluoro-2-hidroxibenzilideno)amino)

benzoato de zinco (II)

Zn(OAc)₂•2H₂O

Acetato de Zinco (II) dihidratado

Resumo

O trabalho apresentado nesta dissertação centrou-se na síntese de ligandos nitrogenados, mais concretamente de derivados de cicleno, derivados fluorados de porfirinas, salens e respetivos complexos metálicos, para potencial aplicação como agentes de contraste em imagiologia médica.

Salienta-se ainda a síntese de duas novas díades, TDFPP-COOH-DO3A-benz e Zn(II)Salen-DO3A-benz, baseadas nos ligandos previamente sintetizados, para o desenvolvimento de moléculas com potencialidade de sondas bimodais.

No capítulo 1 encontra-se descrita uma revisão bibliográfica dos métodos de síntese dos diferentes compostos nitrogenados assim como das suas diversas aplicações como agentes de contraste para imagiologia médica.

No capítulo 2 apresenta-se e discute-se os resultados da síntese de todos os ligandos nitrogenados e respetivos complexos metálicos e as caracterizações estruturais selecionadas. Iniciou-se o presente trabalho com a síntese de um ligando derivado do cicleno. Após a realização de várias etapas de síntese obteve-se o composto tribenzil-2,2',2''-(10-(2-amino-3-metoxi-3-oxopropil)-1,4,7,10-tetraaza-ciclododecano-1,4,7-triil)triacetato (DO3A-benz), com um rendimento de 83%. Seguidamente, procedeu-se à síntese de três porfirinas: 5-(4-carboxifenil)-10,15,20-*tris*(2,6-difluorofenil)porfirina (TDFPP-COOH), 5,10,15,20-*tetraquis*(2-fluorofenil)porfirina (TPP-*o*-F) e 5,10,15,20-*tetraquis*(4-trifluorometilfenil)porfirina (TPP-*p*-CF₃), e respetivos complexos metálicos. Sintetizaram-se ainda dois complexos de salen: *N,N*-bis((-2-hidroxibenzilideno)amino)benzoato de zinco(II) (Zn(II)Salen) e *N,N*-bis((4-fluoro-2-hidroxibenzilideno)amino)benzoato de zinco(II) (Zn(II)Salen-F) com rendimentos de 71% e 97%, respetivamente. O trabalho culminou com a síntese de duas díades resultantes da ligação covalente do DO3A-benz com a porfirina TDFPP-COOH e com o complexo de salen Zn(II)Salen para as quais se obteve um rendimento de produtos isolados de 16% e 15%, respetivamente.

No capítulo 3 apresentam-se detalhadamente os procedimentos experimentais de todas as sínteses apresentadas no capítulo 2 bem como a caracterização química completa de todos os compostos sintetizados no decorrer do trabalho (¹H-RMN, ¹⁹F-RMN, espectrometria de massa e espectroscopia de absorção UV-Vis).

Abstract

The work presented in this dissertation aimed to develop the synthesis of nitrogen ligands, in particular, of cyclen derivatives, fluorinated derivatives of porphyrins and salens, along with their corresponding metal complexes for potential application as contrast agents in medical imaging.

Moreover, we investigated the synthesis of the two new dyads TDFPP-COOH-DO3A-benz and Zn(II)Salen-DO3A-benz, based on the ligands previously synthesized, for the development of potential bimodal probes.

In chapter 1, we describe a literature review about the synthesis method of different nitrogen compounds as our applications as contrast agent in medical imaging.

The chapter 2 presents and discusses the synthetic results of all nitrogen ligands and corresponding metal complexes and structural characterizations selected. The present work started with the cyclen derivative synthesis. After several steps we obtained the tribenzyl 2,2',2''-(10-(2-amino-3-methoxy-3-oxopropyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7-triyl)triacetate (DO3A-benz) in 83% yields. Then, we proceeded with the synthesis of three porphyrins: 5-(4-carboxyphenyl)-10,15,20-*tris*(2,6-difluorophenyl)porphyrin (TDFPP-COOH), 5,10,15,20-*tetraquis*(2-fluorophenyl)porphyrin (TPP-*o*-F) and 5,10,15,20-*tetraquis*(4-trifluoromethylphenyl)porphyrin (TPP-*p*-CF₃), and their corresponding metal complexes. We further synthesized two more salen complexes: *N,N*-bis((-2-hydroxybenzylidene)amino)benzoate zinc(II) (Zn(II)Salen) and *N,N*-bis((4-fluoro-2-hydroxybenzylidene)amino)benzoate zinc(II) (Zn(II)Salen-F) in 71% and 97% yields, respectively. The works culminated with the synthesis of two dyads, resulting of the covalent linking of DO3A-benz with porphyrin TDFPP-COOH and with salen complex Zn(II)Salen, which were obtained in isolated yields of 16% e 15%, respectively.

In chapter 3, we thoroughly presented the experimental procedures of all synthesis described in chapter 2 as well as all the chemical characterization of synthesized compounds (¹H-RMN, ¹⁹F-RMN, mass spectroscopy and UV-Vis absorption).

Nomenclatura

Os macrociclos tetrapirrólicos podem ser classificados segundo dois sistemas de nomenclatura designados de nomenclatura de Fischer¹ e nomenclatura IUPAC² (*International Union of Pure and Applied Chemistry*).

Segundo Fischer o anel porfirínico (Figura 1) é classificado segundo as pontes metilénicas interpirrólicas denominadas posições *meso* que são designadas pelas letras gregas α , β , γ , δ , e segundo as posições periféricas intituladas de β -pirrólicas numeradas de 1 a 8. Contudo, este sistema tornou-se insuficiente com o crescente desenvolvimento destes compostos levando ao aparecimento de um novo sistema de nomenclatura regulamentado pela IUPAC onde todos os carbonos do macrociclo tetrapirrólico são numerados sequencialmente de 1 a 20 e os átomos de nitrogénio pirrólicos de 21 a 24 (Figura 1). Nesta dissertação ambas as nomenclaturas serão adotadas.

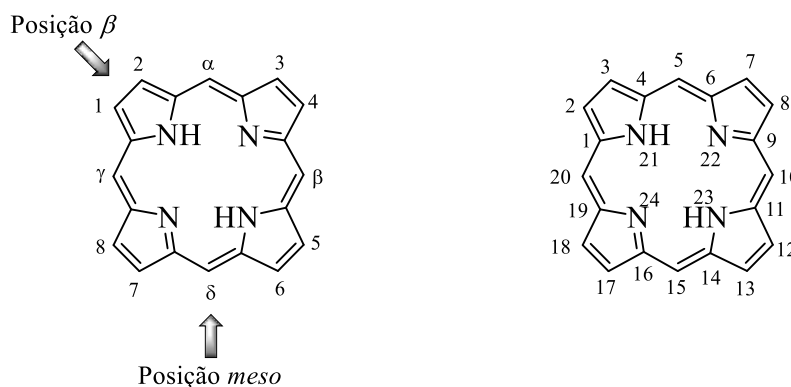


Figura 1: Numeração dos macrociclos tetrapirrólicos segundo a nomenclatura de Fischer e IUPAC, respetivamente.

Por sua vez, para os complexos de salen também se seguiu a nomenclatura IUPAC³ que se encontra-se exemplificada na figura 2.

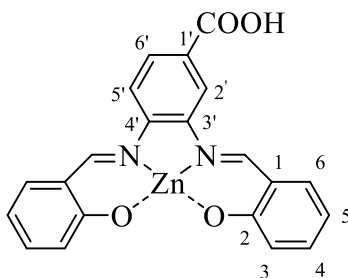


Figura 2: Numeração dos complexos de salen segundo a nomenclatura IUPAC.

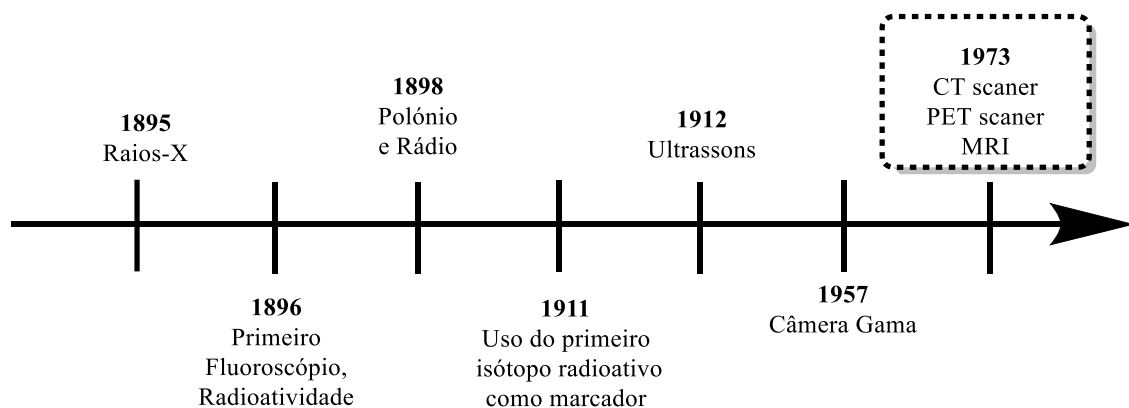
1. Fischer, H.; Orth, H., *Die Chemie des Pyrrols*. Akad. Verlagsges, Leipzig: 1934; Vol. 1.
2. Moss, G. P., Nomenclature of Tetrapyrroles. *Pure Appl. Chem.* **1987**, 59, 779-832.
3. Spu, I., *Guia IUPAC Para a Nomenclatura de Compostos Orgânicos*. 2005; Vol. 1.

Capítulo 1

Introdução

1.1 Imagiologia Médica

A Imagiologia Médica pode ser definida como sendo uma área que envolve a utilização de várias tecnologias não invasivas para criar imagens distintas do interior do corpo humano, com o intuito de permitir o diagnóstico precoce de diferentes patologias, como por exemplo, doenças oncológicas, doenças neurodegenerativas, doenças cardiovasculares, esclerose múltipla,^{1,2,3} entre outras. Apesar dos primeiros avanços para o desenvolvimento desta área terem surgido nos finais do século XIX com uma sucessão de novas descobertas como os raios-X por *Wilhelm Conrad Roentgen*, em 1895, ou o fenómeno de radioatividade por *Antoine Henri Becquerel*, em 1896, apenas na década de 1970 ocorreu a grande evolução com o surgimento de novas técnicas imagiológicas (Esquema 1.1).⁴



Esquema 1.1: Cronologia da evolução das descobertas que deram origem à imagiologia médica

De acordo com a literatura existe uma série de modalidades de imagiologia médica, sendo algumas já amplamente utilizadas na clínica. Estas podem ser classificadas de acordo com o tipo de informação que fornecem (estrutural ou funcional)⁵, o tipo de energia que utilizam para a criação da imagem e ainda pela resolução espacial que permitem obter (macroscópica ou microscópica).⁶ De entre as várias modalidades pode salientar-se a tomografia computadorizada (CT, do inglês: “*computed tomography*”), a radiografia de raios-X, imagiologia de tomografia por emissão de positrões (PET do inglês: “*positron emission tomography*”), imagiologia de ressonância magnética nuclear (MRI do inglês: “*magnetic resonance imaging*”), imagiologia de ressonância magnética nuclear de flúor (¹⁹F-MRI), imagiologia de fluorescência (FI do inglês: “*fluorescence imaging*”) (Figura 1.1).^{2, 7} Contudo para esta dissertação apenas nos focaremos na imagiologia de tomografia por emissão de positrões (PET)⁸⁻¹³, imagiologia de ressonância magnética nuclear de flúor (¹⁹F-MRI)¹⁴⁻²² e imagiologia de fluorescência (FI)²³⁻²⁷.

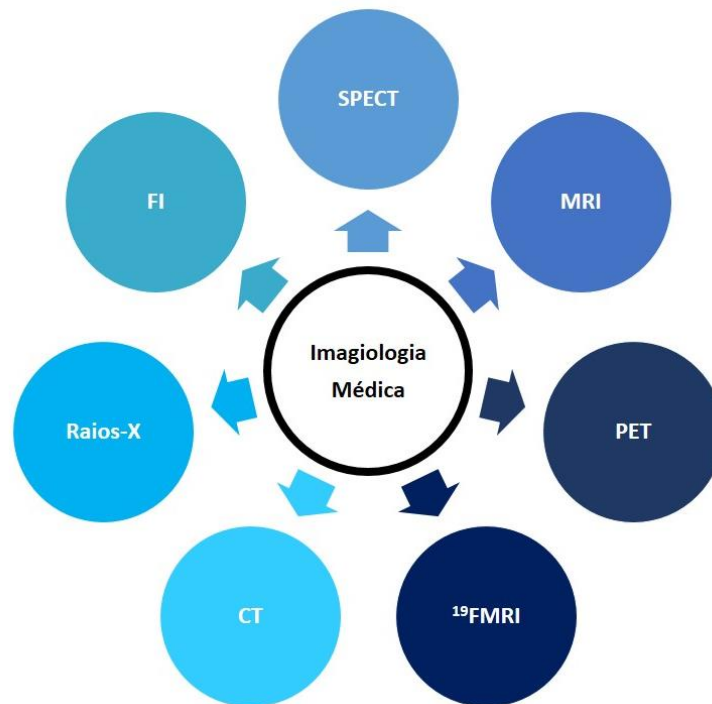


Figura 1.1: Diferentes técnicas de imagiologia médica

Em algumas destas modalidades de imagem médica, nomeadamente em PET ou MRI, é essencial a utilização de uma substância capaz de interagir com as estruturas ou fluidos no corpo. Consequentemente, a formação da imagem depende do tipo de interação que ocorre com o organismo, por exemplo por absorção de radiação eletromagnética (MRI) ou por emissão de positrões (PET).²⁸

O trabalho apresentado envolve o desenvolvimento de ligandos nitrogenados, especificamente derivados do cicleno, porfirinas, complexos de salen e ainda potenciais estruturas bimodais constituídas por esses ligandos com capacidade para funcionarem como agentes de contraste para aplicação em imagiologia médica. Neste sentido, nas próximas secções irá efetuar-se uma breve revisão bibliográfica acerca destes ligandos e da sua aplicação como agentes de contraste em imagiologia médica.

1.2 Síntese de derivados do cicleno

Nas últimas décadas, uma das famílias de compostos orgânicos nitrogenados mais utilizada na área da medicina, em especial em imagiologia médica é baseada em estruturas cíclicas e acíclicas multidentadas (Figura 1.2). Contudo, no presente trabalho irá dar-se ênfase às estruturas cíclicas uma vez que é sabido que estas formam quelatos com diferentes metais de transição e lantanídeos mais estáveis.²⁹⁻³²

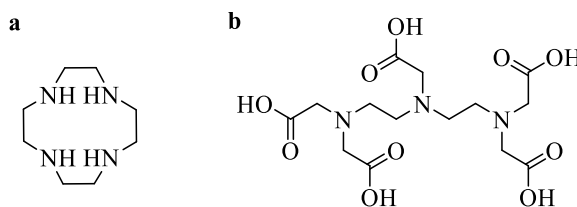


Figura 1.2: Estrutura do cicleno (a) e do DTPA (b)

Em 1976, *Stetter*³³ derivatizou pela primeira vez a estrutura do 1,4,7,10-tetraazaciclododecano (comumente conhecido por cicleno) efetuando tetra-alkilação dos átomos de nitrogénio do cicleno com diferentes tipos de ácidos haloacéticos, dando origem ao ligando conhecido como DOTA (1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético, Figura 1.3).³² Tal como foi referido anteriormente, este tem capacidade de formar quelatos bastante estáveis com diferentes metais e lantanídeos (lutécio (Lu), európio (Eu) e gadolínio (Gd)) como foi verificado nos anos 80 por *Bryden*³⁴ e *Desreux*³⁵.²⁹ De referir, que o desenvolvimento e posteriores estudos efetuados do Gd-DOTA, atualmente denominado de Dotarem, é considerado um marco histórico na imagiologia por ressonância magnética nuclear (MRI), uma vez que foi o primeiro agente de contraste cíclico testado *in vivo* e aprovado para utilização clínica.^{29,36,37}

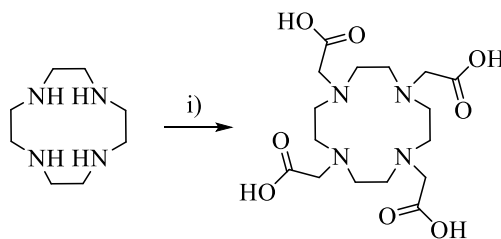


Figura 1.3: Síntese do DOTA: i) XCH_2COOH ($X = Cl, Br, I$), DIPEA ou K_2CO_3 , MeCN ou DMF

Atualmente, várias alterações estruturais do ligando DOTA têm sido propostas na literatura como por exemplo a apresentada por *Geraldes*³⁸, em 2009, que introduziu um braço α -aminopropionato (DO3A-N- α -aminopropionato) (Figura 1.4), que induz compressão estérea à volta do local de ligação das moléculas de água coordenadas com o metal, aumentando a sua velocidade de permuta. Para além disso, a presença do grupo terminal amina no braço propionato permite a posterior ligação a outras moléculas.

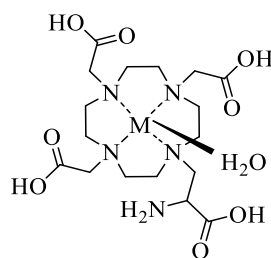


Figura 1.4: Estrutura do DO3A-N- α -aminopropionato

A capacidade destes ligandos baseados em cicleno formarem complexos com diferentes metais também tem sido explorada para o desenvolvimento de agentes de contraste radiomarcados para aplicação em tomografia de emissão de positrões (PET) e tomografia computacional de emissão de fóton único (SPECT).^{37,39,40}

Nesta dissertação, o objetivo da utilização deste tipo de ligando era para efetuar radiomarcagem com ^{64}Cu e por isso, neste sentido seguidamente irá apresentar-se a pesquisa bibliográfica referente à síntese destes complexos nos últimos três anos.

O ^{64}Cu tem despertado interesse em medicina nuclear principalmente devido ao seu tempo de semi-vida longo ($t_{1/2} = 12,7$ horas), que o torna atrativo para PET comparativamente com outros radioisótopos, como por exemplo, o ^{68}Ga ($t_{1/2} = 68$ minutos), ^{18}F ($t_{1/2} = 110$ minutos) e ^{11}C ($t_{1/2} = 20,4$ minutos). É ainda caracterizado pela boa disponibilidade comercial e elevada resolução espacial comparativamente com o ^{18}F .⁴¹⁻⁴⁴

Em 2017, *Henriksen*⁴⁵ desenvolveu lipossomas com DOTA-DSPE (Figura 1.5) radiomarcado com ^{64}Cu , encontrando-se à superfície ou encapsulados dentro do lipossoma. Após efetuar estudos de estabilidade, biodistribuição e excreção em ratos *BALB/c* verificou que apesar da biodistribuição ser similar em ambos, no caso em que o ligando radiomarcado se encontrava à superfície a sua eliminação da corrente sanguínea era ligeiramente mais rápida comparativamente com a do ligando encapsulado ($17,2 \pm 2,9$ horas vs $20,3 \pm 1,2$ horas).

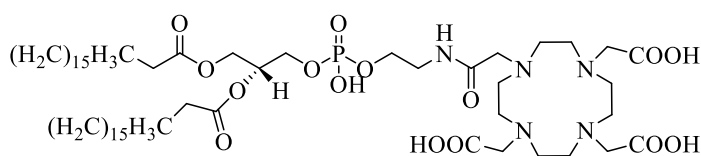


Figura 1.5: Estrutura do DOTA-DSPE

Em 2018, *Pichiorri e Colcher*⁴⁶ desenvolveram um bioconjugado constituído pelo anticorpo daratumumab, DARA, e o quelato DOTA que foi radiomarcado com ⁶⁴Cu obtendo-se o ⁶⁴Cu-DOTA-DARA. O anticorpo DARA é conhecido por ter a capacidade de detetar células do mieloma múltiplo (MM), tendo-se verificado que em comparação com a 18-Fluorodesoxiglucose (¹⁸F-FDG), o ⁶⁴Cu-DOTA-DARA permitiu a obtenção de uma maior resolução de imagem e especificidade para a deteção destas células.

*Muller*⁴² sintetizou dois ligandos de albumina radiomarcados com ⁶⁴Cu, um com um quelato DOTA (PSMA-ALB-56) (Figura 1.6) e outro com um quelato NODAGA (PSMA-ALB-89), e realizou estudos *in vitro* e *in vivo* comparando os dois. Inicialmente preparou uma solução dos ligandos em água mili-Q, contendo acetato de sódio e HCl e procedeu à complexação com ⁶⁴Cu numa mistura de acetato de sódio/HCl (pH = 5) incubando a 95°C durante 15 minutos. Os ligandos radiomarcados foram purificados recorrendo a cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (RP-HPLC, do inglês “*reversed-phase high-performance liquid chromatography*”). Ratinhos contendo células tumorais *PC-3 PIP* e *PC-3 Flu* foram injetados com os ligandos ⁶⁴Cu-PSMA-ALB-56 e ⁶⁴Cu-PSMA-ALB-89. Os autores observaram que o primeiro tinha uma maior acumulação de radioatividade no fígado enquanto que o segundo apresentava uma maior acumulação no tumor.

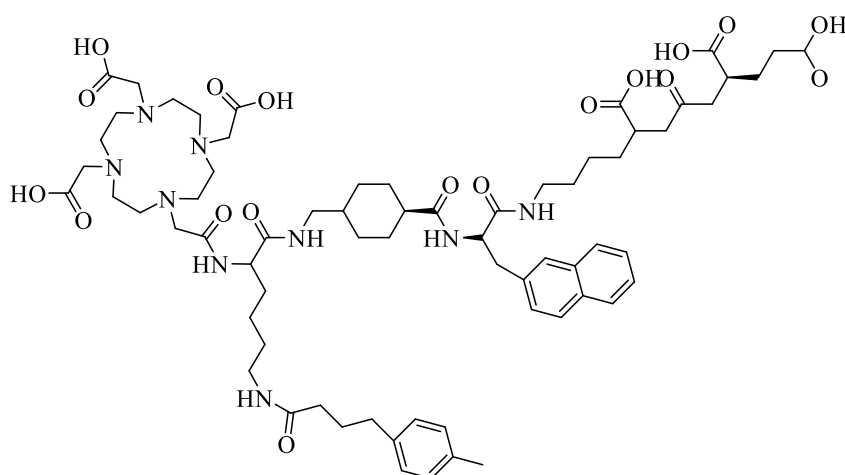


Figura 1.6: Estrutura do PSMA-ALB-56

Chen⁴⁴ reportou a síntese de um composto radiomarcado com ^{64}Cu com base na estrutura de um dendrímero com um substituinte de ácido fólico (FA do inglês: “*folic acid*”) com afinidade para tumores com recetores de folato (FR do inglês: “*folate receptors*”). Deste modo utilizaram um dendrímero poli(amidoamina) (G5) com um terminal amina e, inicialmente, procederam à sua modulação sequencial com isotiocianato fluoresceína (FI do inglês: “*fluorescein isothiocyanate*”) e ácido fólico (FA), obtendo FA-FI-G5.NH₂. Seguidamente, acoplaram o DOTA-NHS usando como solvente DMSO colocando a reação sob agitação vigorosa durante 24 horas. De modo a obter o DOTA-FA-FI-G5.NHAc (Figura 1.7) os grupos aminos foram convertidos em grupos acetil reagindo com anidrido acético numa solução aquosa na presença de trietilamina sob agitação vigorosa durante 24 horas. Por fim, efetuaram a radiomarcagem com ^{64}Cu misturando uma solução de [^{64}Cu]Cu(OAc)₂ com uma solução de DOTA-FA-FI-G5.NHAc dissolvida em NH₄OAc (pH = 5.5) ficando a 45°C durante 30 minutos. Com os estudos preliminares efetuados, recorrendo a microPET, observaram que este dendrímero modificado apresentava especificidade para células cancerígenas com recetores folato sobreexpressos.

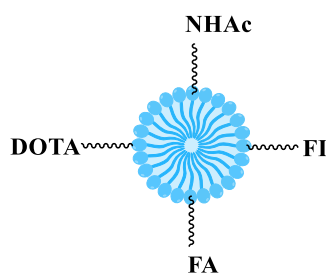


Figura 1.7: Estrutura do DOTA-FA-FI-G5.NHAc

1.3 Síntese de *meso*-arilporfirinas

Os macrociclos tetrapirrólicos são uma classe de compostos heterocíclicos nitrogenados de origem natural com importantes papéis na vida humana, como por exemplo no transporte de oxigénio no sangue pelo grupo *Heme* presente na hemoglobina e em reações de oxidação catalítica desencadeadas por enzimas: peroxidases e catalases.⁴⁷ A sua aplicação crescente em medicina, nomeadamente no desenvolvimento de agentes de

contraste para imagiologia médica,^{2,48-51} contribuiu significativamente para a modulação estrutural e melhoria dos respetivos métodos de síntese de porfirinas (Figura 1.8).

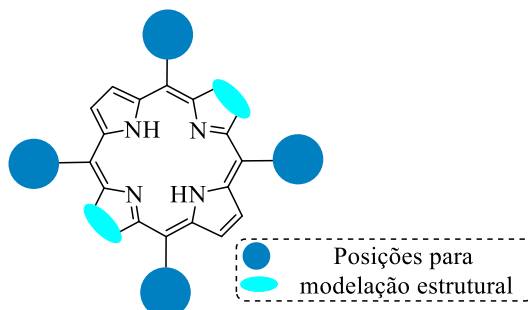
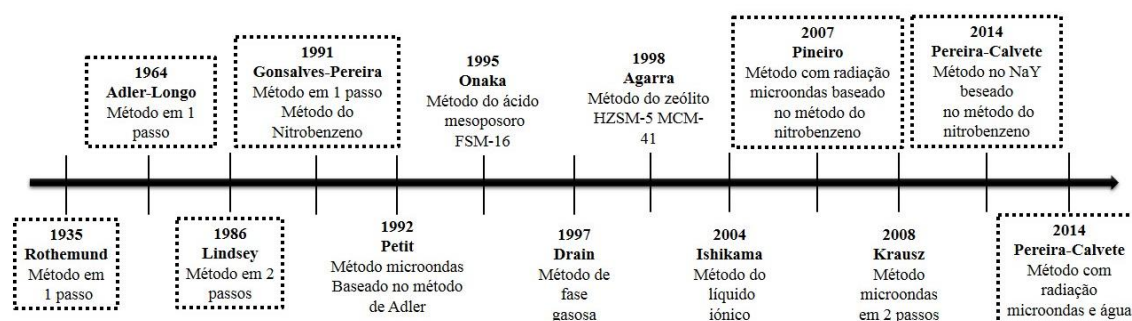


Figura 1.8: Estrutura geral de uma porfirina e posições possíveis para modulação estrutural nas posições *meso* e β -pirrólicas

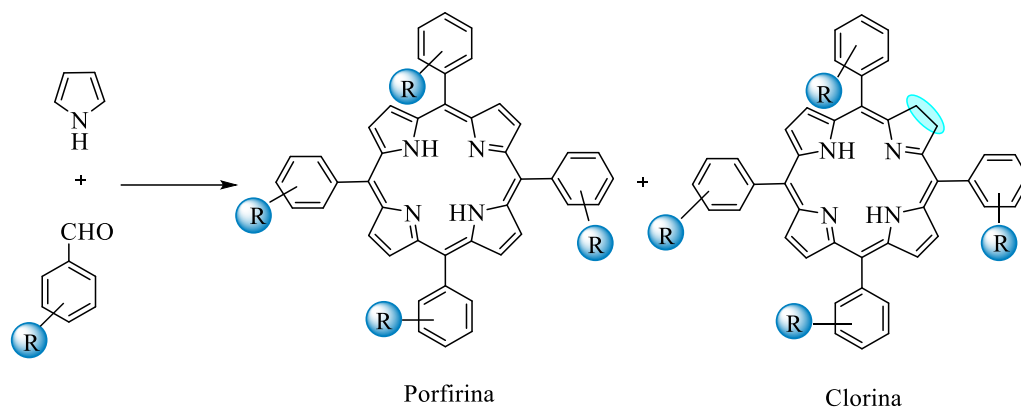
No esquema 1.2 apresentam-se alguns dos métodos de referência na síntese de *meso*-arilporfirinas. Nesta secção não apresentamos uma pesquisa exaustiva de síntese de *meso*-arilporfirinas, cingindo-nos apenas aos principais métodos de síntese publicados na literatura.



Esquema 1.2: Evolução cronológica no desenvolvimento de métodos sintéticos para obtenção de *meso*-arilporfirinas^[adaptado de ref.52]

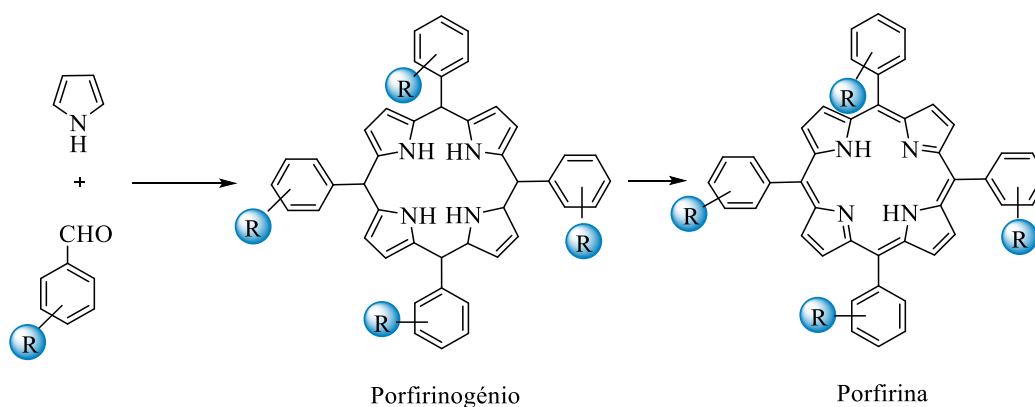
O primeiro método de síntese de *meso*-arilporfirinas surgiu, em 1935, quando Rothemund⁵³ obteve uma porfirina simétrica através da condensação de pirrole com benzaldeído, utilizando como solvente piridina, sob atmosfera inerte. Este método, apesar de ser pioneiro, apresentava como principal limitação a obtenção de vários materiais poliméricos obtendo-se por isso baixo rendimento de porfirina e sempre com contaminação de clorina. Posteriormente, Adler e Longo⁵⁴ introduziram algumas alterações ao método

anterior, como por exemplo, a utilização de ácido propiónico, como solvente, e a oxidação por exposição ao ar, o que permitiu melhorar o rendimento de síntese de várias porfirinas, apesar de existir sempre a mesma contaminação com as respectivas clorinas (Esquema 1.3).



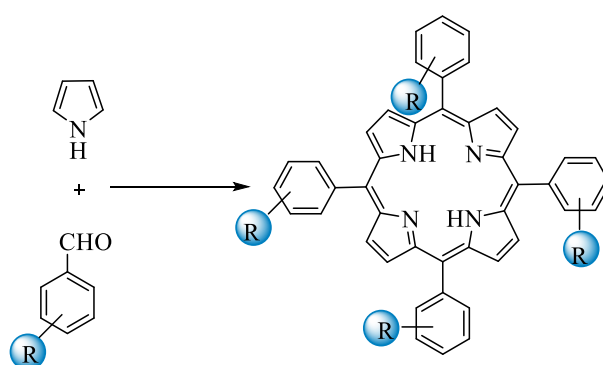
Esquema 1.3: Método de síntese de porfirinas desenvolvido por *Adler e Longo*⁵⁴

Mais tarde, *Pereira*⁵⁵ e *Lindsey*⁵⁶ desenvolveram o denominado método de síntese em dois passos, onde foi possível obter várias *meso*-arilporfirinas substituídas através da condensação do pirrolo com o correspondente aldeído ou acetal, numa solução altamente diluída de um solvente clorado, à temperatura ambiente e sob atmosfera inerte, obtendo-se o porfirinogénio. Seguidamente, a oxidação a porfirina é efetuada recorrendo a quinonas, nomeadamente a 2,3-dicloro-5,6-dicianobenzoquinona (DDQ) (Esquema 1.4). Este método tem como principais desvantagens a utilização de um oxidante dispendioso e o uso de um elevado volume de solvente clorado.



Esquema 1.4: Método de síntese de porfirinas desenvolvido por *Lindsey*⁵⁶

Em 1991, *Pereira*⁵⁷ propôs um novo método de síntese de porfirinas, em que num só passo, ocorre a formação do porfirinogénio e a concomitante oxidação a porfirina (Esquema 1.5). Neste caso, utiliza-se uma mistura de ácido acético ou ácido propiónico e nitrobenzeno à qual se junta o pirrole e o correspondente aldeído. Este método demonstrou ser bastante eficiente, nomeadamente na obtenção de porfirinas com halogénios nas posições *orto* dos anéis fenílicos e além disso permite, em geral, obter as porfirinas diretamente do meio reacional, originando cristais com elevada pureza e com contaminação de clorina negligenciável.⁵⁸

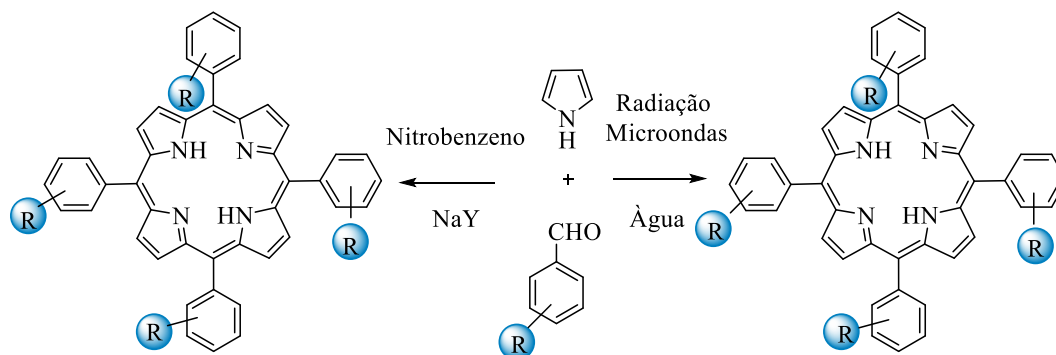


Esquema 1.5: Método de síntese de porfirinas desenvolvido por *Pereira*⁵⁷

Nas últimas décadas tem-se verificado um crescente interesse na procura de métodos mais sustentáveis de síntese de porfirinas. Assim, em 2007, *Pineiro*⁵⁹ desenvolveu uma metodologia baseada no método do nitrobenzeno⁵⁸, que envolve a utilização de radiação de micro-ondas. Com esta metodologia foi possível reduzir o tempo de reação para a obtenção de algumas porfirinas, nomeadamente a *meso*-tetrafenilporfirina, e também foi possível sintetizar complexos metálicos utilizando um tempo reacional bastante inferior comparativamente aos métodos tradicionais de complexação de porfirinas.⁶⁰

Em 2014, e com o intuito de melhorar o rendimento reacional das *meso*-arilporfirinas halogenadas *Pereira*⁶¹ propôs uma alteração ao método do nitrobenzeno através da introdução de um catalisador sólido (NaY) capaz de atuar como ácido de Lewis na ativação do aldeído e assim melhorar o processo de condensação com o pirrole, com consequente aumento do rendimento final de porfirina. Salienta-se ainda que o catalisador sólido pode ser reutilizado no final do processo (Esquema 1.6). Nesse ano, o mesmo grupo publicou uma *via* sintética sustentável⁶² para obter *meso*-arilporfirinas que envolve água como

solvente e oxidante quando submetido a irradiação com micro-ondas. Neste caso, a água por irradiação com micro-ondas atua simultaneamente como solvente, catalisador, e oxidante evitando por isso a necessidade de utilizar solventes, catalisadores e oxidantes dispendiosos e tóxicos.



Esquema 1.6: Métodos de síntese de porfirinas desenvolvidos por Pereira⁶¹

Existe um interesse crescente no desenvolvimento de porfirinas para aplicação em medicina, nomeadamente como agentes de contraste para imagiologia médica. Este elevado interesse prende-se com o fato deste tipo de compostos possuir uma série de características físico-químicas, nomeadamente a elevada capacidade de formar complexos estáveis com diferentes metais de transição incluindo os lantanídeos que permitem a sua potencial aplicação em, por exemplo, imagiologia por emissão de positrões (PET) ou imagiologia por ressonância magnética nuclear (MRI).^{2,63-72} Além disso, a possibilidade de modular a sua estrutura permite também a obtenção de derivados porfirínicos contendo átomos de flúor, halogénio que possui propriedades adequadas como por exemplo spin nuclear adequado, para a sua potencial utilização como agente de contraste em imagiologia por ressonância magnética de flúor-19 (¹⁹F-MRI).⁷³⁻⁷⁶

Um dos objetivos fulcrais desta dissertação consiste no desenvolvimento de novos agentes de contraste baseados em porfirinas, nomeadamente porfirinas fluoradas para potencial aplicação em ¹⁹F-MRI. Deste modo, efetuámos uma pesquisa sistemática de porfirinas fluoradas com potencial aplicação em imagiologia de ¹⁹F-MRI. Da revisão bibliográfica efetuada encontramos apenas dois exemplos onde porfirinas fluoradas foram utilizadas nesta técnica imagiológica. Em 2001, Songca⁷³ sintetizou meso-tetra(hidroxifenil)porfirinas fluoradas (Figura 1.9a) recorrendo ao método do nitrobenzeno

e avaliou a sua capacidade de internalização, retenção e localização tumoral, comparando imagens de ratos *BALB/c* com tumor e sem tumor, adquiridas recorrendo a ^{19}F -MRI.

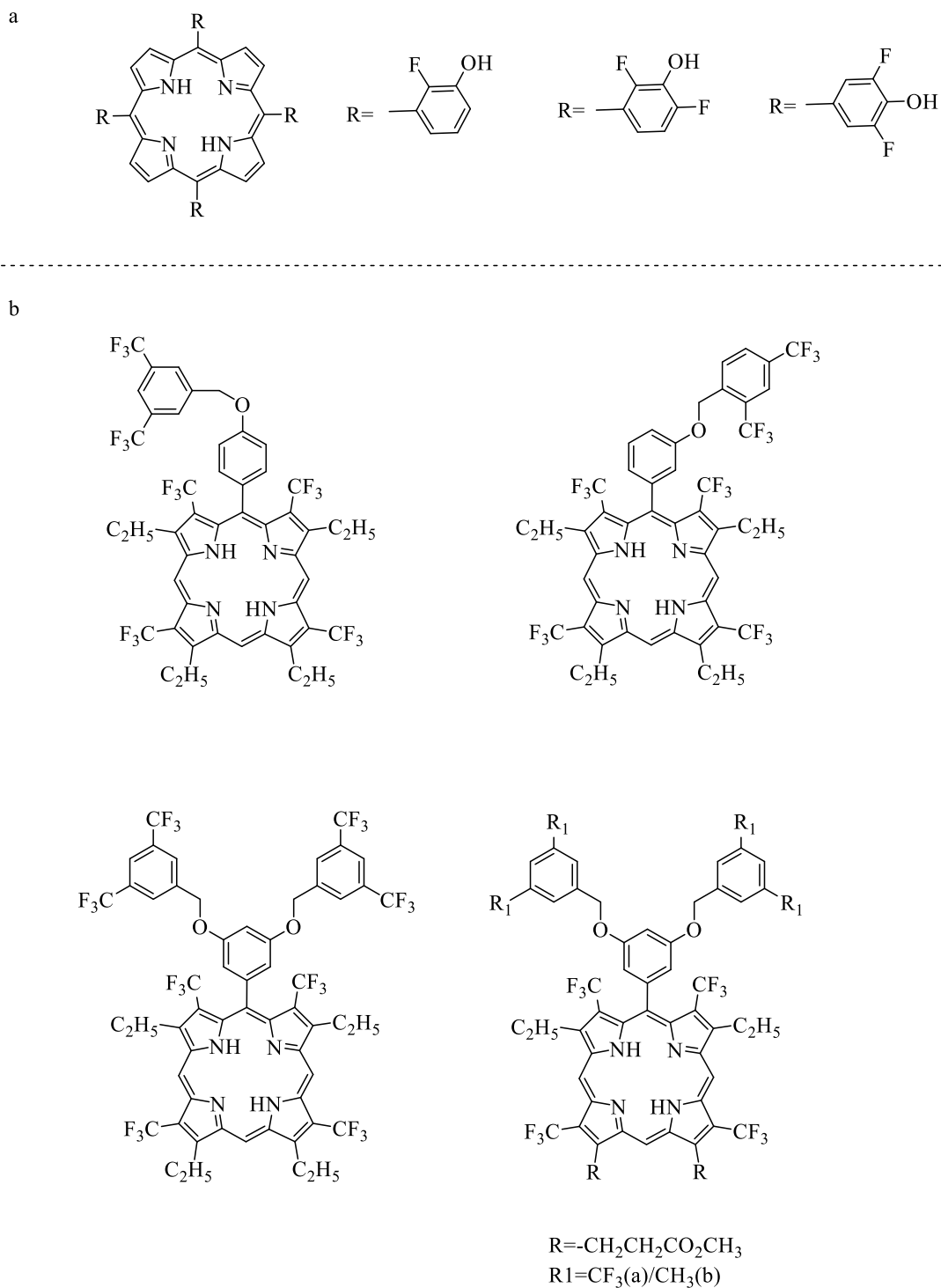


Figura 1.9: Estrutura de porfirinas fluoradas sintetizadas por Songca⁷³ (a) e Pandey e Kadish⁷⁵

(b)

Por sua vez, *Pandey e Kadish*⁷⁵ efectuaram a síntese de porfirinas contendo seis ou doze átomos flúor, pelo método de *MacDonald*⁷⁷, partindo de 3 derivados do pirrole diferentes (Figura 1.9b). Realizaram a respetiva caracterização fotofísica e electroquímica, determinaram a localização celular, fotosensibilidade e o uptake tumoral. Recorrendo à técnica de ¹⁹F-MRI avaliaram a sua localização celular adquirindo imagens de ratos *C3H/HeJ* com tumores RIF implantados no pé e compararam com imagens adquiridas utilizando rodamina-123 e observaram que as porfirinas fluoradas tal como a rodamina-123 tinham localização preferencial na mitocôndria.

1.4 Síntese de Complexos de Salen

Uma outra família de ligandos nitrogenados também promissora para o desenvolvimento de potenciais agentes de contraste tem como estrutura base complexos metálicos de bases de Schiff, incluindo iminas (complexos de salen) (Figura 1.10).

Os primeiros exemplos da síntese de iminas foram reportados por *Hugo Schiff*,⁷⁸ em 1864, quando efetuou a condensação de uma amina primária com um aldeído, originando azometinos que posteriormente foram denominados de bases de Schiff, em homenagem ao cientista. Contudo, considera-se que o desenvolvimento deste tipo de compostos apenas teve um importante avanço quando *Pfeiffer*,⁷⁹ em 1933, sintetizou uma série de compostos e os respetivos complexos metálicos (Ni, Cu, Fe, Mn) juntando dois equivalentes de salicilaldeído ou derivados de salicilaldeído com um equivalente de diamina, originando um sistema tetradentado [O,N,N,O] *bis*-base de Schiff, denominado de salen (*sal* – derivado de salicilaldeído e *en* da etilenodiamina).⁸⁰

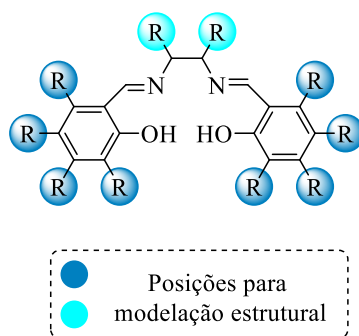


Figura 1.10: Estrutura base dos complexos de salen e posições possíveis para modulação estrutural da amina e aldeído

As propriedades deste tipo de compostos, nomeadamente, baixo custo, fácil preparação, boa estabilidade e fácil alteração estrutural permitem também modular as suas propriedades fotofísicas e de biodisponibilidade, através da introdução de diferentes grupos funcionais tanto na diamina como no aldeído, (Figura 1.10).⁸¹⁻⁸⁴ Além disso, salienta-se o facto dos ligandos de salen após desprotonação, serem capazes de formar complexos bastante estáveis com vários metais, com diferentes estados de oxidação, números de coordenação e geometrias^{83, 85}

Em comparação com os macrociclos tetrapirrólicos, os complexos de salen têm recebido menos atenção para aplicação como agentes de contraste em imagiologia médica. De facto, após revisão bibliográfica da sua aplicação em imagiologia médica, encontramos apenas dois artigos do mesmo autor^{86,87} onde complexos de ferro(II) de salen (Figura 1.11) foram avaliados para potencial aplicação como agente de contraste de MRI. O autor descreveu a acumulação do complexo de Fe(II)salen em dois tumores diferentes, próstata e melanoma, injetados na perna e cauda, respetivamente, de ratos *BALB/c*. Em ambos os tumores a administração apenas do complexo de Fe(II)salen demonstrou atividade anti-tumoral *per se*, porém esta atividade revelou ser superior com a aplicação de magnetização. Para além disso, os autores, devido ao magnetismo do ferro, conseguiram avaliar a acumulação do Fe(II)salen no tumor.^{86,88}

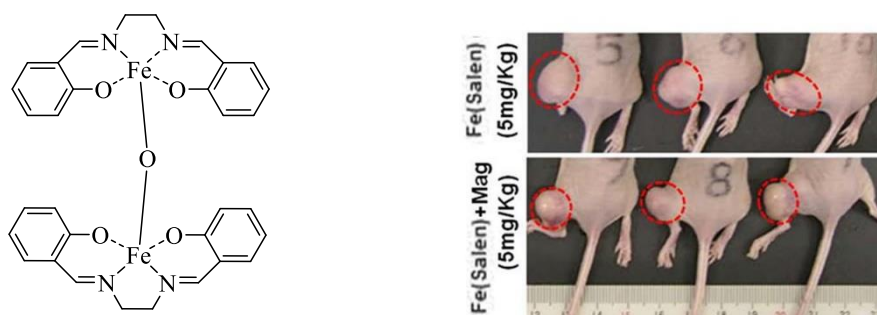
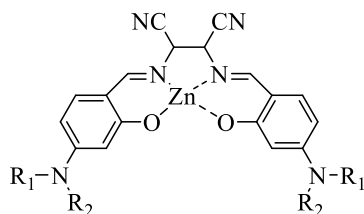


Figura 1.11: Estrutura do Fe(salen) desenvolvido por *Ishikawa*⁸⁶ e avaliação do tumor com e sem aplicação de magnetização

A potencial aplicação de complexos de salen em imagiologia de fluorescência como agentes de contraste intracelulares, contrariamente ao MRI, tem sido mais desenvolvida nos últimos anos.⁸⁸ Na literatura existem vários exemplos envolvendo complexos de salen com diferentes metais d^6 , como Ir, Ru e Re⁸⁹ e d^8 como a Pt^{90,91}. Contudo e para evitar eventuais problemas de toxicidade associados aos metais pesados, nos últimos anos a utilização de zinco, tem mostrado ser bastante promissora.⁹² *Zhang*⁹² reportou, em 2011, uma nova classe de complexos de Zn(II) de salen incorporando grupos lipofílicos e catiónicos (Figura 1.12a) onde condensou o *cis*-diaminomaleonitrilo (um equivalente) e o 2-hidroxi-4-(dialquilamino)benzaldeído (dois equivalentes) na presença de Zn(OAc)₂·2H₂O (um equivalente) em etanol (50 mL). Determinou os rendimentos quânticos de fluorescência em DMSO destes complexos metálicos de Zn(II) e obteve valores compreendidos entre 0,34 e 0,69 dependendo da sua estrutura (Figura 1.12, L₉ e L₇, respetivamente).

Mais tarde, o mesmo autor⁸¹ de forma a avaliar a influência entre a estrutura do salen e as respetivas propriedades fotofísicas e biológicas, sintetizou uma nova série de complexos de salen em que conjugou diferentes diaminas (incluindo diaminas aromáticas com substituintes) e diferentes aldeídos (substituídos na posição 4), tendo concluído através de estudos teóricos e experimentais que alterações dos estados eletrónicos do grupo diamina induziam alterações nas propriedades fotofísicas, nomeadamente no rendimento quântico de fluorescência e no tempo de vida de fluorescência, e alterações nos substituintes ligados ao nitrogénio na posição 4 do salicilaldeído (Figura 1.12b) influenciavam a lipofilicidade e a localização subcelular. Os complexos foram sintetizados através da mistura de um equivalente de diamina para dois equivalentes de aldeído na

presença de um equivalente de acetato de zinco utilizando como solvente etanol em refluxo, tendo obtido rendimentos entre 17% e 94%.



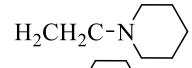
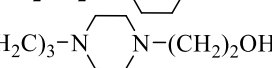
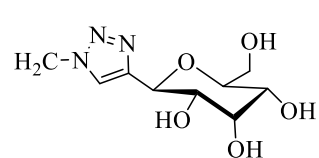
| | R_1 | R_2 | R_1 | R_2 |
|-----------------|--|---|-----------------|---|
| a | | | | |
| L ₁ | CH ₂ CH ₃ | CH ₂ CH ₃ | L ₆ | CH ₃ |
| L ₂ | CH ₃ | CH ₃ | L ₇ | CH ₃ |
| L ₃ | CH ₂ COOC ₂ H ₅ | CH ₂ COOC ₂ H ₅ | L ₈ | CH ₃ |
| L ₄ | | -(CH ₂) ₄ - | L ₉ | CH ₃ |
| L ₅ | CH ₃ | C ₁₄ H ₂₉ | L ₁₀ | CH ₃ |
| | | | | |
| b | | | | |
| L ₁₁ | CH ₂ C≡CH | CH ₂ C≡CH | L ₁₄ | CH ₃ |
| L ₁₂ | CH ₃ | H ₂ CH ₂ C-N  | | |
| L ₁₃ | CH ₃ | (H ₂ C) ₃ -N  N-(CH ₂) ₂ OH | L ₁₅ | CH ₃ |
| | | | | |
| | | | |  |

Figura 1.12: Estruturas dos complexos de zinco (II) de salen desenvolvidos por Zhang^{81,92}

Uma área de bastante interesse em que complexos de zinco (II) de salen têm sido estudados é a área dos agentes de contraste responsivos.⁹³⁻⁹⁹ Em 2012, Zhang⁹³ introduziu grupos tioéter nas posições 3,3' do aldeído. Inicialmente, começou por sintetizar o aldeído (1,2,3,4-tetrahidro-4-metil-6-carboxialdeído-7-metoxi-1,4-benzotiazina) recorrendo a vários passos. Seguidamente, procedeu à sua condensação com a diamina (2,3-diaminomaleonitrilo) na presença de Zn(OAc)₂•2H₂O, obtendo um rendimento de 86%. Verificou que os grupos tioéter eram capazes de suprimir a fluorescência e que quando irradiados sofriam oxidação originando grupos sulfóxidos restaurando a fluorescência.

No trabalho apresentado nesta dissertação desenvolvemos métodos de síntese de ligandos derivados do cicleno, *meso*-arilporfirinas fluoradas e complexos de zinco(II) salen para potencial aplicação em imagiologia médica e ainda de díades contendo esses ligandos para desenvolvimento de agentes de contraste bimodais.

Na secção seguinte apresentamos uma pesquisa bibliográfica dos desenvolvimentos recentes de agentes de contraste bimodais envolvendo as classes de compostos com interesse para este trabalho.

1.5 Síntese de agentes de contraste bimodais

Cada técnica de imagiologia médica utilizada individualmente apresenta muitas limitações, nomeadamente, resolução espacial, sensibilidade e rapidez na obtenção de imagens,¹⁰⁰⁻¹⁰⁶ pelo que o desenvolvimento de agentes de contraste bimodais é um tópico de interesse crescente e é também um dos objetivos deste trabalho.

Nas últimas duas décadas começaram a surgir na literatura científica exemplos de agentes de contraste bimodais para utilização simultânea em mais do que uma técnica, nomeadamente, PET/MRI, FI/MRI, PET/FI, cuja pesquisa bibliográfica envolvendo combinações com macrociclos tetrapirrólicos, complexos de salen e ciclenos, se apresenta em seguida.

O primeiro exemplo de um agente bimodal centrado na estrutura de uma metaloporfirina surgiu em 2011, quando Gros¹⁰⁷ desenvolveu um agente quelante bimodal, denominado H₃(DO3A-AM)-H₂(porfirina) resultante da ligação covalente entre uma porfirina com substituintes nas posições *meso* e nas posições beta-pirrólicas a um derivado do DOTA. Inicialmente, começou pela síntese da porfirina não simétrica que inclui na sua estrutura um grupo amina e, posteriormente procedeu ao seu acoplamento ao DOTA-(*tris-tert*-butilester) seguindo-se da desproteção deste obtendo, por fim a H₃(DO3A-AM)-H₂(porfirina) (Figura 1.13). Com o objetivo de obter um complexo bimetalico, num primeiro passo os autores procederam à complexação do DO3A com sal de gadolínio (III), Gd(NO₃)₃, a 50°C durante 12 horas. Em seguida, complexaram a porfirina com sal de cobre (II), Cu(NO₃)₂, a 50°C, durante 2 horas, utilizando DMSO como solvente. O complexo demonstrou boa estabilidade em meio aquoso a pH fisiológico, não se tendo observado

descomplexação nem do gadolínio nem do cobre. Verificou-se ainda que a relaxividade entre o composto complexado com cobre ($4,15 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$) e o não complexado ($3,85 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$) a 300 MHz não sofreu alterações.^{2,100,107}

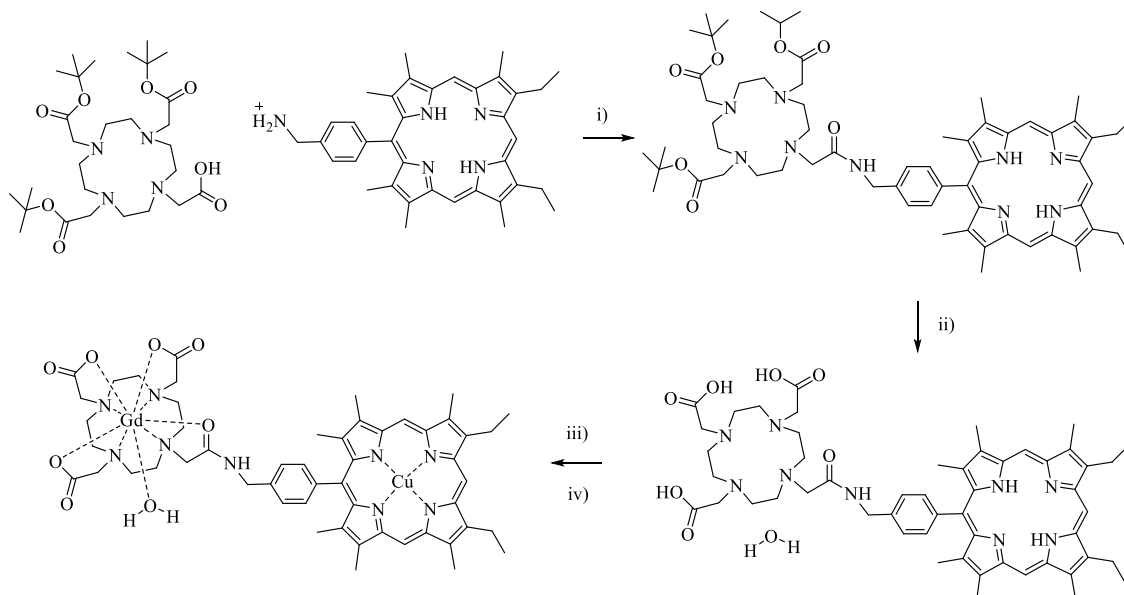


Figura 1.13: Agente de contraste bimodal desenvolvido por Gros¹⁰⁷: i) EDC, BtOH, DMF, 24h, temperatura ambiente; ii) DCM, TFA, 24h, temperatura ambiente; iii) $\text{Gd}(\text{NO}_3)_3$, H_2O ; NaOH (pH=6.7), 12h, 50°C; iv) $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$, DMSO, 2h, 50°C

Em 2013, *Banerjee*¹⁰⁸ descreveu a síntese de um potencial agente de contraste bimodal, cuja estrutura se apresenta na figura 1.14. Após obtenção da porfirina não simétrica de partida pelo método do nitrobenzeno e de forma a introduzir um grupo amina na estrutura fizeram reagir o grupo hidroxilo livre da porfirina com N-Boc-3-bromopropilamina. Seguidamente, efetuaram a desproteção do Boc com vista a obter o grupo funcional amina livre para acoplarem posteriormente com o *p*-NCS-benzil-DOTA, após desproteção por hidrólise dos grupos éster. Por fim, realizaram a radiomarcagem com ^{177}Lu ($t_{1/2}=6,73$ dias)¹⁰⁸ e ^{90}Y ($t_{1/2}=28,8$ dias)¹⁰⁹ utilizando pH 5, temperatura entre 60-70°C durante 1 hora. O complexo obtido é solúvel em água e foi testado em ratos *Swiss* com fibrossarcoma tendo-se verificado uma boa internalização no tumor e boa retenção no músculo com eliminação por *via* renal.¹⁰⁸

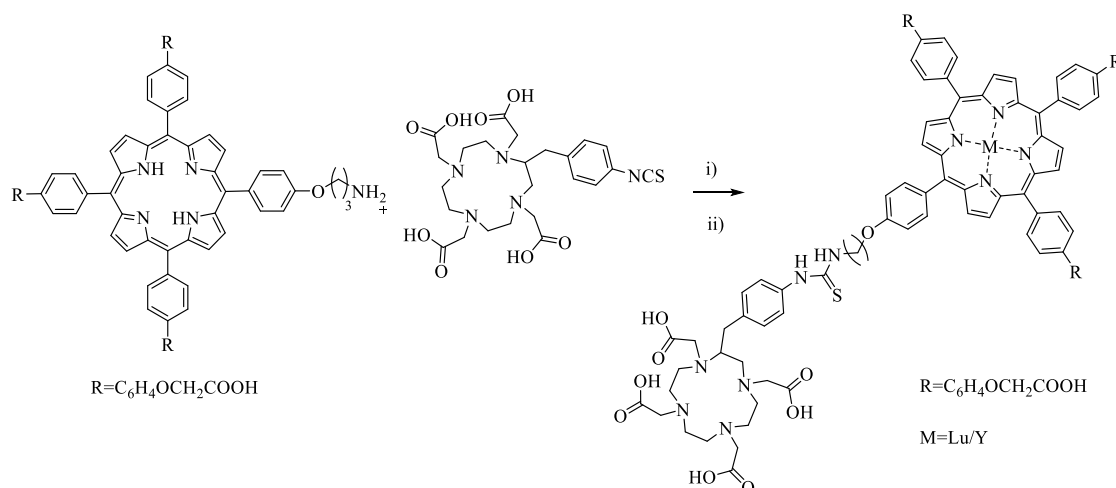
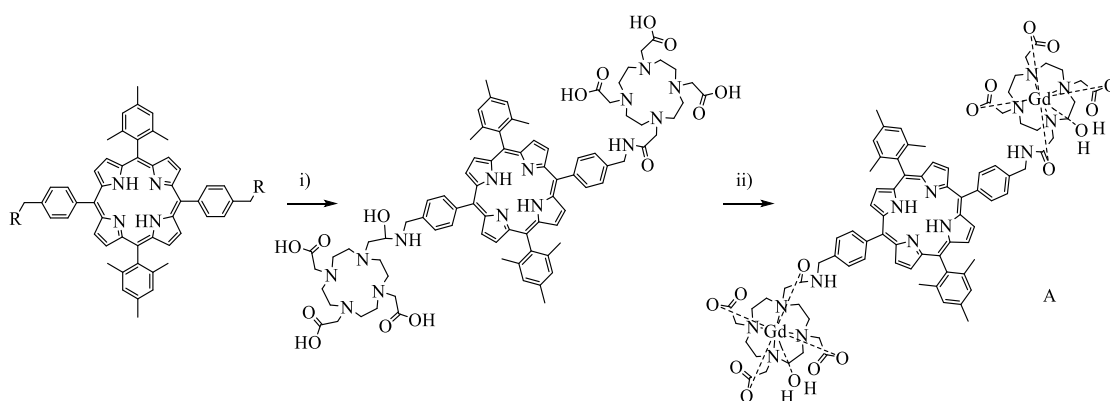


Figura 1.14: Agente de contraste bimodal desenvolvido por *Banerjee*¹⁰⁸: i) MeCN, H₂O, KOH, 48h, temperatura ambiente; ii) ¹⁷⁷LuCl₃/⁹⁰YCl₃ (pH=5), 1h, 60-70°C

*Gros*¹ publicou quatro exemplos de compostos bimodais tendo por base uma porfirina conjugada com grupos DO3A através de ligações amida (Figura 1.15). As reações de acoplamento foram realizadas à temperatura ambiente com duração entre 1 a 3 horas seguindo-se de desproteção em TFA/CH₂Cl₂ durante 24 horas à temperatura ambiente. Por fim, primeiro procedeu à complexação do ligando DOTA com Gd(NO₃)₃•5H₂O, a pH=7, durante 12 horas a uma temperatura de 50°C e seguidamente para os compostos C e D procedeu à complexação da porfirina com Cu(NO₃)₂, durante 3 horas, a 50°C. Para os compostos C e D da figura 3 os testes realizados não indicaram citotoxicidade e revelaram valores de relaxividade da mesma magnitude dos anteriormente publicados¹⁰⁷ sem interferência da presença do cobre na porfirina. Os estudos *in vivo* de MRI em ratinhos com tumores demonstraram uma favorável eliminação da corrente sanguínea.^{1,100}



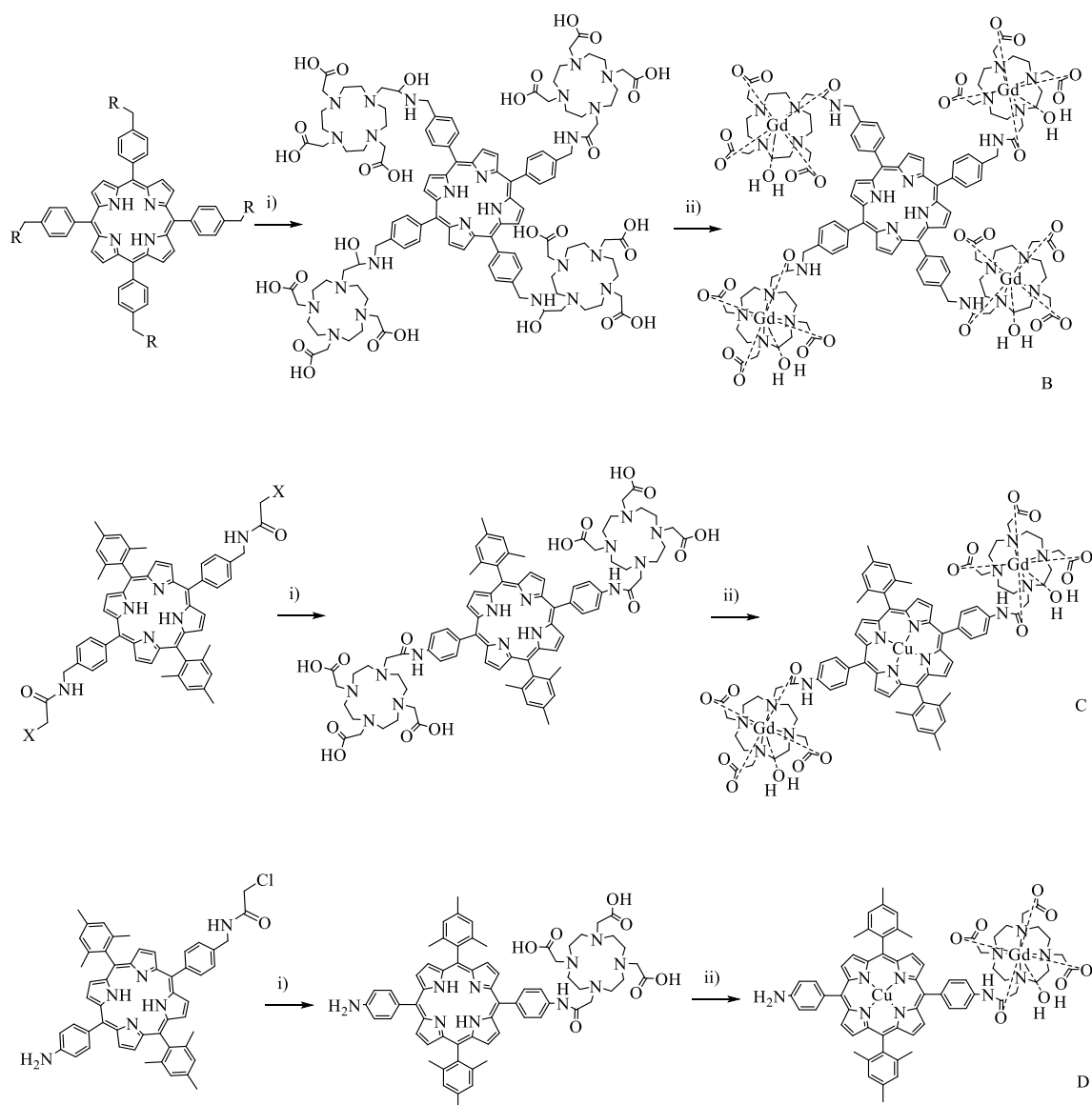


Figura 1.15: Agentes de contrastes desenvolvidos por Gros¹: Produto A e B: i) DOTA-tris(*t*Bu)NHS, $CHCl_3$, MeOH, 3h, temperatura ambiente; TFA em CH_2Cl_2 , 24h, temperatura ambiente; ii) $Gd(NO_3)_3 \cdot 5H_2O$, NaOH (pH=7), 12h, 50°C; Produto C e D: i) DOTA*t*Bu, K_2CO_3 , DMF, 1 ou 2h, temperatura ambiente; TFA em CH_2Cl_2 , 24h, temperatura ambiente; ii) $Gd(NO_3)_3 \cdot 5H_2O$, NaOH (pH=7), 12h, 50°C; $Cu(NO_3)_2$, 3h, 50°C

Em 2014, Zhang¹¹⁰ desenvolveram por reações de “click chemistry” dois compostos (Figura 1.16). Inicialmente, procederam à obtenção do zinco(II)tetrapentafluorofenilporfolactol que, posteriormente foi acoplado com Gd(III)-DOTA e Gd(III)-DO3A, respetivamente, ambos agentes de MRI. A reação foi realizada na presença de dois equivalentes de $Cu(OAc)_2 \cdot H_2O$, cinco equivalentes de ascorbato de sódio

e dois equivalentes de L-histidina numa mistura de 1:1 de álcool *tert*-butil e água. Em todos os testes realizados os autores observaram uma elevada absorção na zona do infra-vermelho, elevados valores de relaxividade, $18,5 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ e $18,8 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (0,5 T, 37°C), respetivamente (comparativamente com Gd-DTPA: $4,5 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, 0,5 T, 37°C), baixa toxicidade no escuro ($1,52 \pm 0,097 \mu\text{M}$ e $1,73 \pm 0,13 \mu\text{M}$) e boa fototoxicidade em células *HeLa*.^{49,100,110}

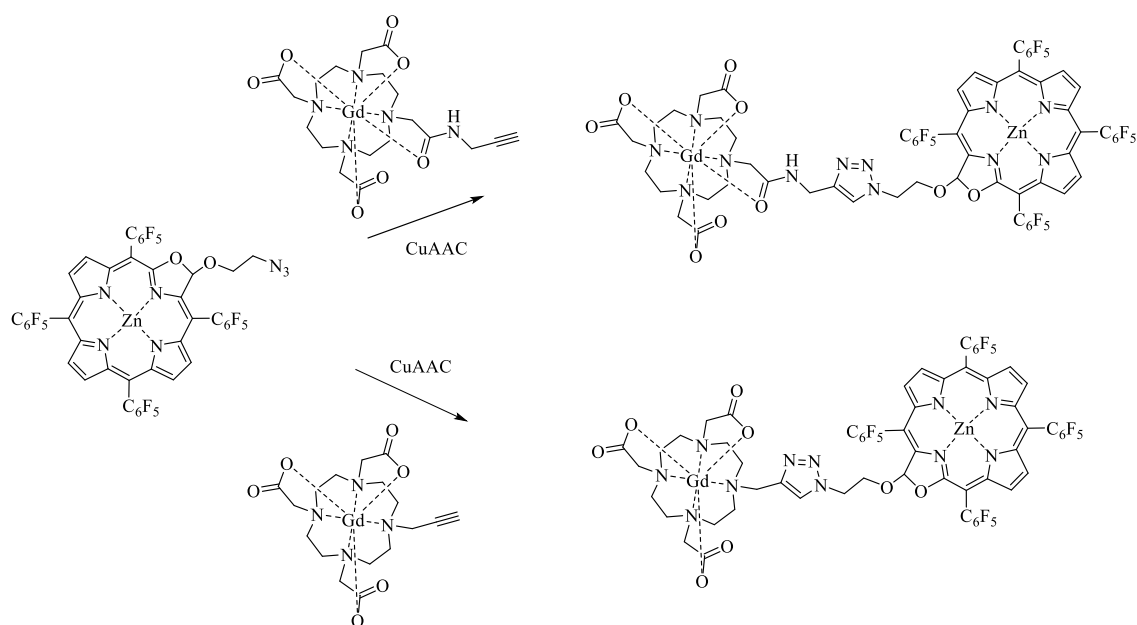


Figura 1.16: Agentes de contrastes desenvolvidos por Zhang¹¹⁰

No ano seguinte, Das¹¹¹ e colaboradores descreveu a síntese baseando-se no método do nitrobenzeno de um derivado de uma porfirina catiónica não simétrica, 5-carboximetilenoifenil-10,15,20-tri(*p*-N-metilpiridil)porfirina que acoplaram com *p*-NH₂-benzil-DOTA, numa reação em dois passos, inicialmente com a hidrólise da porfirina à temperatura ambiente durante 48 horas, seguindo-se o acoplamento também à temperatura ambiente durante 24 horas. O conjugado porfirina-*p*-NH₂-benzil-DOTA foi posteriormente radiomarcado com o radioisótopo ¹⁷⁷Lu ($t_{1/2}=6,73$ dias) a pH = 5, a uma temperatura de 80°C , durante 1 hora, (Figura 1.17). Este agente bimodal foi testado *in vivo* em ratos *Swiss* com tumor de fibrossarcoma. Observaram uma rápida acumulação no tumor, 30 minutos após administração, no entanto devido à hidrofílicidade a sua retenção é reduzida, sofrendo eliminação por *via* renal 3 horas após a injeção.¹¹¹

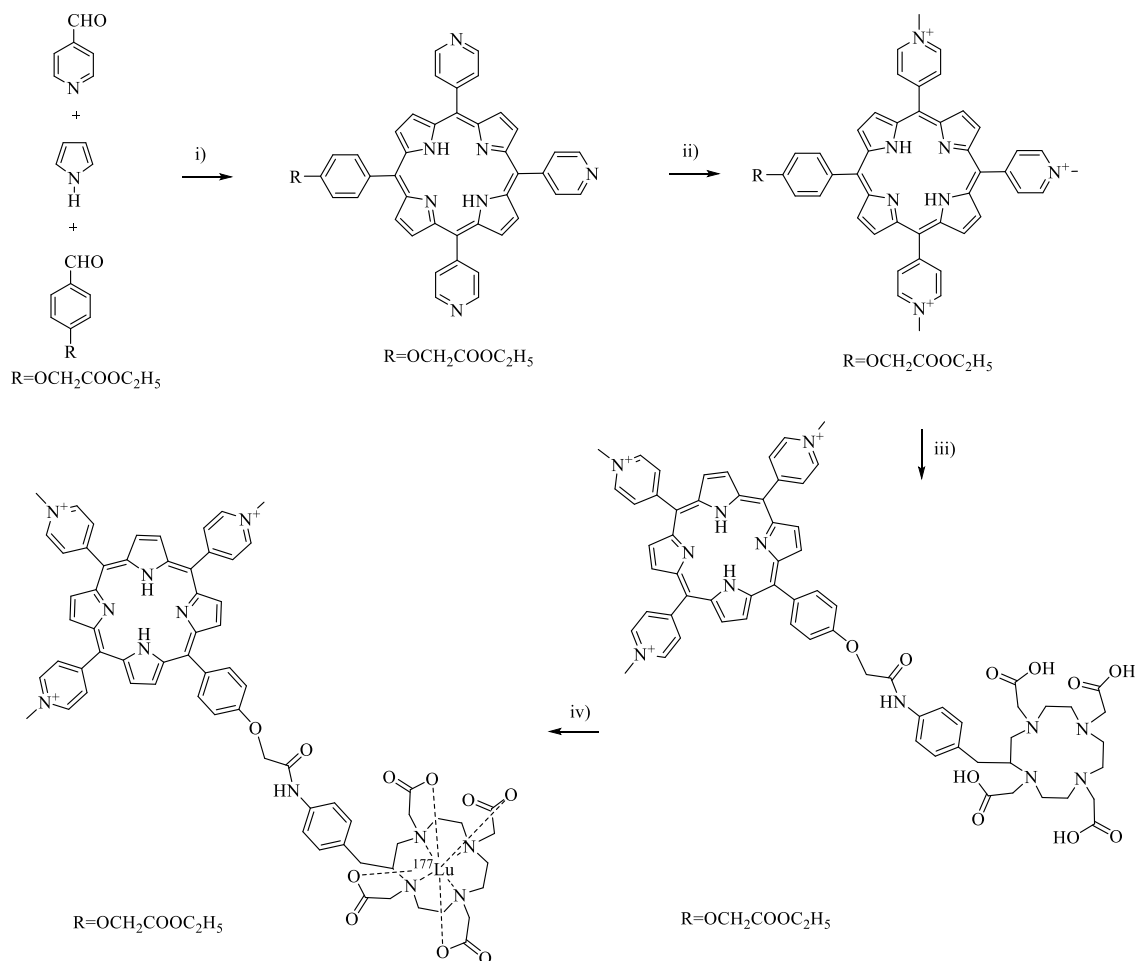


Figura 1.17: Agente de contraste desenvolvido por *Das*¹¹¹: i) Nitrobenzeno, ácido propiónico, 2h, refluxo; ii) CH_3I , 48h, temperatura ambiente; iii) NaOH, 48h, temperatura ambiente; *p*- NH_2 -benzil-DOTA, NaOH, 24h, temperatura ambiente; iv) $^{177}\text{LuCl}_3$, acetato de amónia (pH=5), 1h, 80°C

Mais recentemente, *Das*¹¹², descreveu um outro agente bimodal constituído pela 5,10,15,20-tetraquis(*p*-carboximethileneoxifenil)porfirina obtida tal como a anterior baseando-se no método do nitrobenzeno que, posteriormente, foi acoplada ao *p*- NH_2 -benzil-DOTA, numa reação à temperatura ambiente durante 48 horas. Contudo, neste trabalho o autor procedeu à radiomarcagem do complexo com o radioisótopo ^{68}Ga ($t_{1/2}=68$ minutos), numa reação com $^{68}\text{GaCl}_3$, a 100°C, a pH = 4 durante 20 minutos (Figura 1.18). O complexo apresentou um coeficiente de partição de valor $-1,89 \pm 0,15$, o que indica que este tem natureza hidrofílica, e também boa estabilidade em sangue humano e boa farmacocinética avaliada em ratos *Swiss* com fibrossarcoma.¹¹²

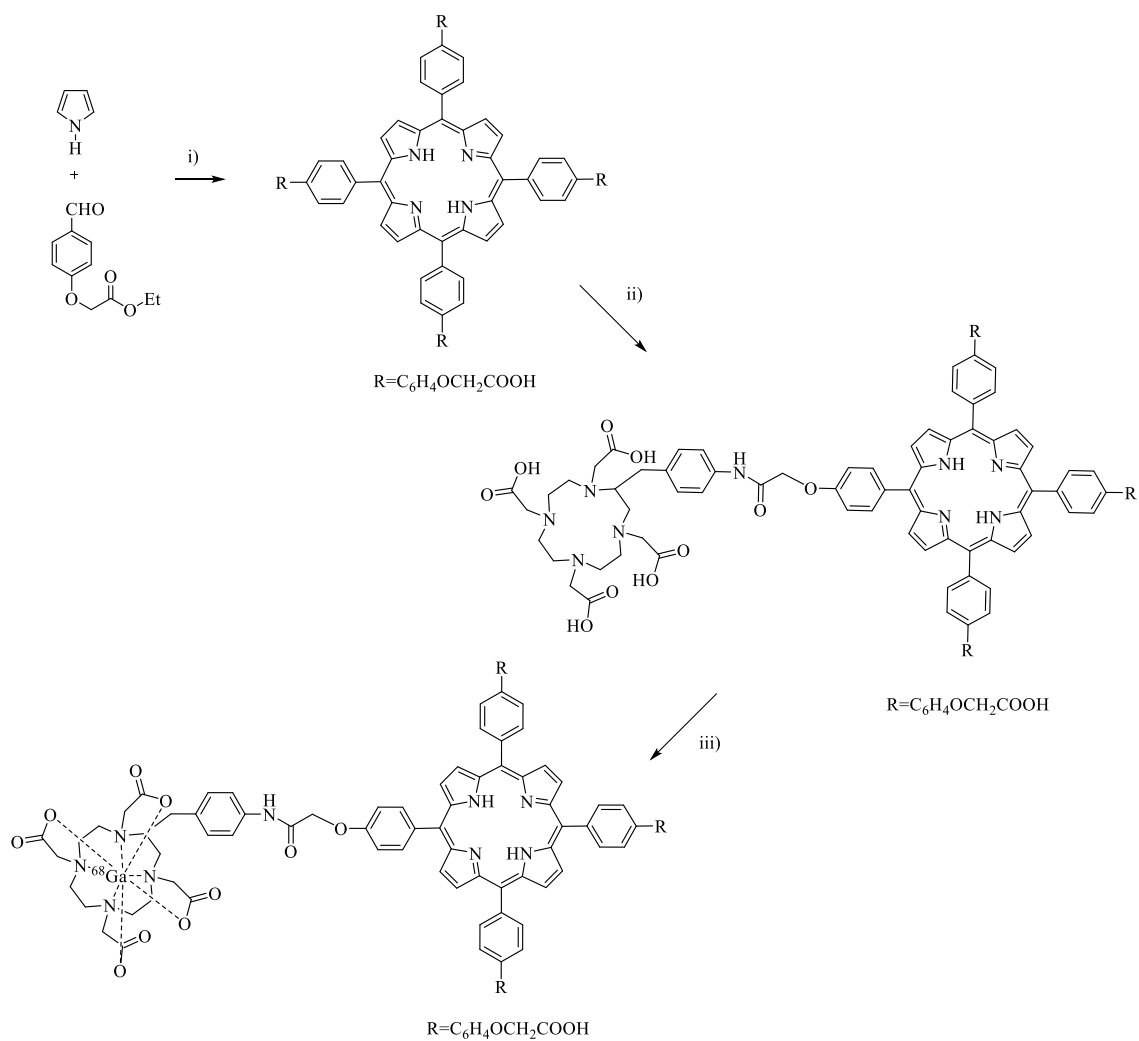


Figura 1.18: Agente de contraste desenvolvido por *Das*¹¹²: i) Nitrobenzeno, ácido propiônico, 2h, refluxo; ii) NaOH, 48h, 25°C; *p*-NH₂-benzil-DOTA, NaOH, 48h, 25°C; iii) $^{68}\text{GaCl}_3$, acetato de sódio (pH=4), 20 min, 100°C

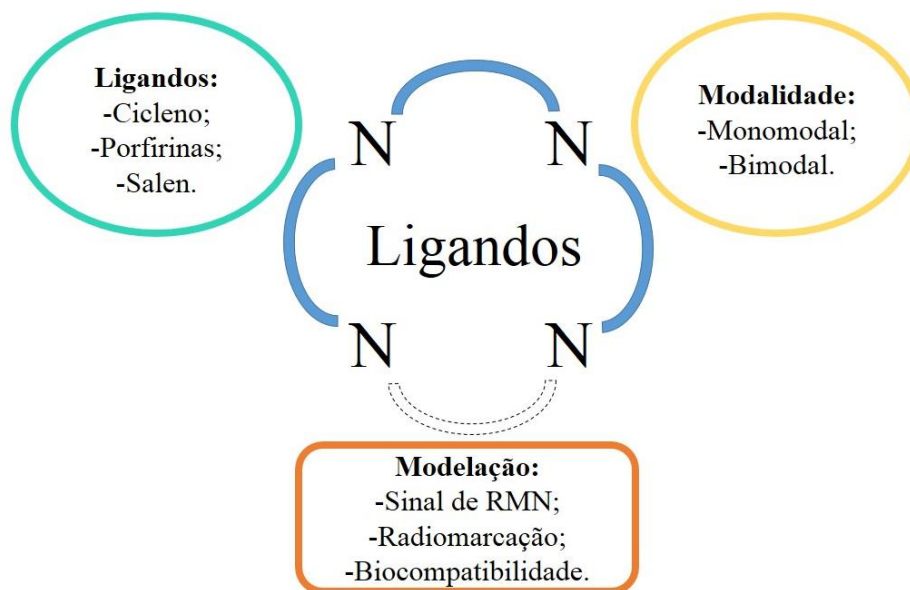
Objetivos

Atualmente existem vários exemplos na literatura de potenciais agentes de contraste monomodais, capazes de atuar numa modalidade de imagiologia específica. Cada modalidade tem vantagens e desvantagens e a utilização de agentes de contraste bimodais capazes de atuar em duas técnicas diferentes apresenta-se como uma solução bastante promissora para o diagnóstico precoce de patologias. Isto deve-se ao facto de uma entidade química única poder ser utilizada em duas técnicas diferentes, permitindo a junção das características e deste modo aumentar a eficiência do diagnóstico pelo fornecimento de imagens com melhor precisão e resolução, e assim obter, informações moleculares e fisiológicas anatómicas dos tecidos com elevada sensibilidade e resolução espacial facilitando, posteriormente, o tratamento das doenças.

Neste sentido os objetivos centrais desta dissertação foram a síntese de ligandos nitrogenados, nomeadamente derivados de cicleno e derivados fluorados de porfirinas e salen, incluindo os respetivos complexos metálicos para potencial aplicação em imagiologia médica e também a síntese de novas estruturas com potencial bimodalidade (FI-PET e ^{19}F -MRI-PET) baseadas nesses ligandos.

Como objetivos específicos salientamos:

- i) Sintetizar e caraterizar um ligando derivado do cicleno e respetivo complexo de cobre;
- ii) Sintetizar e caraterizar *meso*-arilporfirinas fluoradas e os respetivos complexos metálicos de manganês;
- iii) Modelar, sintetizar e caraterizar complexos de salen potencialmente biocompatíveis;
- iv) Sintetizar e caraterizar moléculas mistas com potencial bimodalidade em imagiologia médica.



Esquema 1.7: Proposta de trabalho para esta dissertação.

1.6 Referências

- (1) Eggenspiller, A.; Michelin, C.; Desbois, N.; Richard, P.; Barbe, J.-M.; Denat, F.; Licon, C.; Gaidon, C.; Sayeh, A.; Choquet, P.; Gros, C. P. *Eur J Org Chem* **2013**, *29*, 6629.
- (2) Calvete, M. J. F.; Simões, A. V. C.; Henriques, C. A.; Pinto, S. M. A.; Pereira, M. M. *Curr Org Synth* **2014**, *11*, 127.
- (3) Rudin, M.; Weissleder, R. *Nat Rev Drug Discov* **2003**, *2*, 123.
- (4) Sauter, A. W.; Wehr, H. F.; Kolb, A.; Judenhofer, M. S.; Pichler, B. J. *Trends Mol Med* **2010**, *16*, 508.
- (5) Rieffel, J.; Chitgupi, U.; Lovell, J. F. *Small* **2015**, *11*, 4445.
- (6) Weissleder, R.; Pittet, M. J. *Nature* **2008**, *452*, 580.
- (7) Ntziachristos, V.; Ripoll, J.; Wang, L. V.; Weissleder, R. *Nat Biotechnol* **2005**, *23*, 313.
- (8) Cassidy, P. J.; Radda, G. K. *J R Soc Interface* **2005**, *2*, 133.
- (9) Fazaali, Y.; Jalilian, A. R.; Amini, M. M.; Rahiminejad-kisomi, A.; Rajabifar, S.; Bolourinovin, F.; Moradkhani, S. *J Radioanal Nucl Ch* **2011**, *288*, 17.
- (10) O'Farrell, A. C.; Shnyder, S. D.; Marston, G.; Coletta, P. L.; Gill, J. H. *Br J Pharmacol* **2013**, *169*, 719.
- (11) Simões, A. V. C. *Síntese de macrociclos tetrapirrólicos fluorados*; Universidade de Coimbra, 2014.
- (12) Snyder, S. E.; Kilbourn, M. R. In *Handbook of Radiopharmaceuticals: Radiochemistry and Applications*; Wiley, Ed. 2003; Vol. 1, p 195.
- (13) Xi, L.; Jiang, H. *Wires Nanomed Nanobi* **2016**, *8*, 46.
- (14) Chapelin, F.; Capitini, C. M.; Ahrens, E. T. *J Immunother Cancer* **2018**, *6*, 105.
- (15) Chen, J.; Lanza, G. M.; Wickline, S. A. *Wires Nanomed Nanobi* **2010**, *2*, 431.
- (16) Fox, M. S.; Gaudet, J. M.; Foster, P. J. *Magn Reson Insights* **2015**, *8*, 53.
- (17) Jiang, Z. X.; Liu, X.; Jeong, E. K.; Yu, Y. B. *Angew Chem Int Ed Engl* **2009**, *48*, 4755.
- (18) Knight, J. C.; Edwards, P. G.; Paisey, S. J. *RSC Advances* **2011**, *1*, 1415.
- (19) Peterson, K. L.; Srivastava, K.; Pierre, V. C. *Front Chem* **2018**, *6*, 160.
- (20) Ruiz-Cabello, J.; Barnett, B. P.; Bottomley, P. A.; Bulte, J. W. *NMR Biomed* **2011**, *24*, 114.
- (21) Schmieder, A. H.; Caruthers, S. D.; Keupp, J.; Wickline, S. A.; Lanza, G. M. *Engineering (Beijing)* **2015**, *1*, 475.
- (22) Senanayake, P. K.; Kenwright, A. M.; Parker, D.; van der Hoorn, S. K. *Chem Commun (Camb)* **2007**, *28*, 2923.
- (23) Chi, C.; Du, Y.; Ye, J.; Kou, D.; Qiu, J.; Wang, J.; Tian, J.; Chen, X. *Theranostics* **2014**, *4*, 1072.
- (24) Hussain, T.; Nguyen, Q. T. *Adv Drug Deliv Rev* **2014**, *66*, 90.
- (25) Lee, S. Y.; Jeon, S. I.; Jung, S.; Chung, I. J.; Ahn, C. H. *Adv Drug Deliv Rev* **2014**, *76*, 60.
- (26) Liu, Y.; Yu, G.; Tian, M.; Zhang, H. *Contrast Media Mol Imaging* **2011**, *6*, 169.
- (27) Qian, X.; Xu, Z. *Chem Soc Rev* **2015**, *44*, 4487.
- (28) Simal, C. J. R. *Rev Med Minas Gerais* **2011**, *21*, 289.
- (29) Chilla, S. N. M.; Henoumont, C.; Elst, L. V.; Muller, R. N.; Laurent, S. *Israel J Chem* **2017**, *57*, 800.
- (30) Li, M.; Meares, C. F. *Bioconjugate Chem.* **1993**, *4*, 275.
- (31) León-Rodríguez, L. M. D.; Kovacs, Z. *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 391.
- (32) Rashid, H. U.; Martines, M. A. U.; Jorge, J.; de Moraes, P. M.; Umar, M. N.; Khan, K.; Rehman, H. U. *Bioorg Med Chem* **2016**, *24*, 5663.
- (33) Stetter, H.; Frank, W. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1976**, *15*, 686.

- (34) Bryden, C. C.; Reilley, C. N.; Desreux, J. F. *Anal. Chem.* **1981**, *53*, 1418.
- (35) Spirlet, M.; Rebizant, J.; Desreux, J. F.; Loncin, M. *Inorg. Chem.* **1984**, *23*, 359.
- (36) Magerstadt, M.; Gansow, O. A.; Brechibel, M. W.; Colcher, D.; Balter, L.; Knop, R. H.; Girton, M. E.; Naegel, M. *Magnet Reson Med* **1986**, *3*, 808.
- (37) Brown, M. A.; Brossard, T.; Rotsch, D. A. *Inorg Chim Acta* **2018**, *482*, 118.
- (38) Ferreira, M. F.; Martins, A. F.; Martins, J. A.; Ferreira, P. M.; Toth, E.; Geraldès, C. F. *Chem Commun (Camb)* **2009**, *42*, 6475.
- (39) Calce, E.; Monfregola, L.; De Luca, S. *Int J Pept Res Ther* **2013**, *19*, 199.
- (40) Deshpande, S. V.; DeNardo, S. J.; Kukis, D. L.; Moi, M. K.; McCall, M. J.; DeNardo, G. L.; Meares, C. F. *J Nucl Med* **1990**, *31*, 473.
- (41) Xie, Q.; Zhu, H.; Wang, F.; Meng, X.; Ren, Q.; Xia, C.; Yang, Z. *Molecules* **2017**, *22*, 641.
- (42) Umbricht, C. A.; Benesova, M.; Hasler, R.; Schibli, R.; van der Meulen, N. P.; Muller, C. *Mol Pharm* **2018**, *15*, 5556.
- (43) Rylova, S. N.; Stoykow, C.; Del Pozzo, L.; Abiraj, K.; Tamma, M. L.; Kiefer, Y.; Fani, M.; Maecke, H. R. *PLoS One* **2018**, *13*, e0195802.
- (44) Ma, W.; Fu, F.; Zhu, J.; Huang, R.; Zhu, Y.; Liu, Z.; Wang, J.; Conti, P. S.; Shi, X.; Chen, K. *Nanoscale* **2018**, *10*, 6113.
- (45) Jensen, A. I.; Severin, G. W.; Hansen, A. E.; Fliedner, F. P.; Eliassen, R.; Parhamifar, L.; Kjaer, A.; Andresen, T. L.; Henriksen, J. R. *J Control Release* **2018**, *269*, 100.
- (46) Caserta, E.; Chea, J.; Minnix, M.; Viola, D.; Vonderfecht, S.; Yazaki, P.; Crow, D.; Khalife, J.; Sanchez, J. F.; Palmer, J. M.; Hui, S.; Carlesso, N.; Keats, J.; Kim, Y.; Buettner, R.; Marcucci, G.; Rosen, S.; Shively, J.; Colcher, D.; Krishnan, A.; Pichiorri, F. *Blood* **2018**, *131*, 741.
- (47) Groves, J. T. *J. Porphyr Phthalocya* **2000**, *4*, 350.
- (48) Zhang, Y.; Lovell, J. F. *Theranostics* **2012**, *2*, 905.
- (49) Calvete, M. J. F.; Pinto, S. M. A.; Pereira, M. M.; Geraldès, C. F. G. C. *Coordin Chem Rev* **2017**, *333*, 82.
- (50) Zheng, W.; Shan, N.; Yu, L.; Wang, X. *Dyes Pigments* **2008**, *77*, 153.
- (51) Pinto, S. M. A.; Calvete, M. J. F.; Ghica, M. E.; Soler, S.; Gallardo, I.; Pallier, A.; Laranjo, M. B.; Cardoso, A. M. S.; Castro, M.; Brett, C. M. A.; Pereira, M. M.; Toth, E.; Geraldès, C. *Dalton Trans* **2019**, *48*, 3249.
- (52) Pereira, M. M.; Dias, L. D.; Calvete, M. J. F. *ACS Catal.* **2018**, *8*, 10784.
- (53) Rothmund, P. *J. Am. Chem. Soc.* **1935**, *57*, 2010.
- (54) Adler, A. D.; Longo, F. R.; Finarelli, J. D.; Goldmacher, J.; Assour, J.; Korsakoff, L. *J. Org. Chem.* **1967**, *32*, 476.
- (55) Gonçalves, A. M. d. A. R.; Pereira, M. M. *Heterocycles* **1985**, *22*, 931.
- (56) Wagner, R. W.; Lawrence, D. S.; Lindsey, J. S. *Tetrahedron Lett* **1987**, *28*, 3069.
- (57) Gonçalves, A. M. d. A. R.; Varejão, J. M. T. B.; Pereira, M. M. *J. Heterocyclic Chem.* **1991**, *28*, 635.
- (58) Johnstone, R. A. W.; Nunes, M. L. P. G.; Pereira, M. M.; Gonçalves, A. M. d. A. R.; Serra, A. C. *Heterocycles* **1996**, *43*, 1423.
- (59) Nascimento, B. F. O.; Pineiro, M.; Gonsalves, A. M. d. A. R.; Silva, M. R.; Beja, A. M.; Paixão, J. A. *J. Porphyr Phthalocya* **2007**, *11*, 77.
- (60) Buchler, J. W.; Dreher, C.; Kiinzel, F. M. In *Metal Complexes with Tetrapyrrole Ligands III*; Springer, Ed. 1978; Vol. 1, p 1.
- (61) Silva, M.; Fernandes, A.; Bebiano, S. S.; Calvete, M. J.; Ribeiro, M. F.; Burrows, H. D.; Pereira, M. M. *Chem Commun (Camb)* **2014**, *50*, 6571.
- (62) Henriques, C. A.; Pinto, S. M.; Aquino, G. L.; Pineiro, M.; Calvete, M. J.; Pereira, M. M. *ChemSusChem* **2014**, *7*, 2821.
- (63) Imran, M.; Ramzan, M.; Qureshi, A. K.; Khan, M. A.; Tariq, M. *Biosensors (Basel)* **2018**, *8*, 95.

- (64) Zhang, X.; Lovejoy, K. S.; Jasanoff, A.; Lippard, S. J. *PNAS* **2007**, *104*, 10780.
- (65) Lee, T.; Zhang, X. A.; Dhar, S.; Faas, H.; Lippard, S. J.; Jasanoff, A. *Chem Biol* **2010**, *17*, 665.
- (66) Bhadwal, M.; Das, T.; Dev Sarma, H.; Banerjee, S. *Mol Imaging Biol* **2014**, *17*, 111.
- (67) Schmitt, J.; Jenni, S.; Sour, A.; Heitz, V.; Bolze, F.; Pallier, A.; Bonnet, C. S.; Toth, E.; Ventura, B. *Bioconjug Chem* **2018**, *29*, 3726.
- (68) Calvete, M. J. F.; Pinto, S. M.; Abrunhosa, A. J.; Pereira, M. M. In *Advances in Medicine and Biology*; Nova Science Publishers, Inc.: 2016; Vol. 108, p 217.
- (69) Simões, A. V. C.; Pinto, S. M. A.; Calvete, M. J. F.; Gomes, C. M. F.; Ferreira, N. C.; Castelo-Branco, M.; Llop, J.; Pereira, M. M.; Abrunhosa, A. J. *RSC Advances* **2015**, *5*, 99540.
- (70) Aguilar-Ortiz, E.; Jalilian, A. R.; Avila-Rodriguez, M. A. *Medchemcomm* **2018**, *9*, 1577.
- (71) Shi, J.; Liu, T. W. B.; Chen, J.; Green, D.; Jaffray, D.; Wilson, B. C.; Wang, F.; Zheng, G. *Theranostics* **2011**, *1*, 363.
- (72) Waghorn, P. A. *J Labelled Comp Radiopharm* **2014**, *57*, 304.
- (73) Songca, S. P. *J Pharm Pharmacol* **2001**, *53*, 1469.
- (74) Grancho, J. C. P.; Pereira, M. M.; Miguel, M. d. G.; Gonsalves, A. M. R.; Burrows, H. D. *Photochem Photobiol* **2002**, *75* 2, 249.
- (75) Pandey, S. K.; Gryshuk, A. L.; Graham, A.; Ohkubo, K.; Fukuzumi, S.; Dobhal, M. P.; Zheng, G.; Ou, Z.; Zhan, R.; Kadish, K. M.; Oseroff, A.; Ramaprasade, S.; Pandeya, R. K. *Tetrahedron* **2003**, *59*, 10059.
- (76) Goslinski, T.; Piskorz, J. *J Photoch Photobio C* **2011**, *12*, 304.
- (77) Arsenaulte, G. P.; Bullock, E.; MacDonald, S. F. *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, *82*, 4384.
- (78) Schiff, H. *Liebigs Ann Chem* **1864**.
- (79) Pfeiffer, P.; Breith, E.; Liibbe, E.; Tsumaki, T. *Liebigs Ann Chem* **1933**, *503*, 84.
- (80) Zhou, L.; Cai, P.; Feng, Y.; Cheng, J.; Xiang, H.; Liu, J.; Wu, D.; Zhou, X. *Anal Chim Acta* **2012**, *735*, 96.
- (81) Xie, D.; Jing, J.; Cai, Y.-B.; Tang, J.; Chen, J.-J.; Zhang, J.-L. *Chem Sci* **2014**, *5*, 2318.
- (82) Cheng, J.; Li, Y.; Sun, R.; Liu, J.; Gou, F.; Zhou, X.; Xiang, H.; Liu, J. *J Mater Chem C* **2015**, *3*, 11099.
- (83) Erxleben, A. *Inorg Chim Acta* **2018**, *472*, 40.
- (84) Shen, G.; Gou, F.; Cheng, J.; Zhang, X.; Zhou, X.; Xiang, H. *RSC Advances* **2017**, *7*, 40640.
- (85) Nworie, F. S. *Journal of Analytical & Pharmaceutical Research* **2016**, *3*, 00076.
- (86) Eguchi, H.; Umemura, M.; Kurotani, R.; Fukumura, H.; Sato, I.; Kim, J. H.; Hoshino, Y.; Lee, J.; Amemiya, N.; Sato, M.; Hirata, K.; Singh, D. J.; Masuda, T.; Yamamoto, M.; Urano, T.; Yoshida, K.; Tanigaki, K.; Yamamoto, M.; Sato, M.; Inoue, S.; Aoki, I.; Ishikawa, Y. *Sci Rep* **2015**, *5*, 9194.
- (87) Kim, J.-H.; Eguchi, H.; Umemura, M.; Sato, I.; Yamada, S.; Hoshino, Y.; Masuda, T.; Aoki, I.; Sakurai, K.; Yamamoto, M.; Ishikawa, Y. *NPG Asia Materials* **2017**, *9*, e367.
- (88) Yin, H.-Y.; Tang, J.; Zhang, J.-L. *Eur J Inorg Chem* **2017**, *2017*, 5085.
- (89) Fernandez-Moreira, V.; Thorp-Greenwood, F. L.; Coogan, M. P. *Chem Commun (Camb)* **2010**, *46*, 186.
- (90) Wu, P.; Wong, E. L.; Ma, D. L.; Tong, G. S.; Ng, K. M.; Che, C. M. *Chemistry* **2009**, *15*, 3652.
- (91) Koo, C. K.; So, L. K.; Wong, K. L.; Ho, Y. M.; Lam, Y. W.; Lam, M. H.; Cheah, K. W.; Cheng, C. C.; Kwok, W. M. *Chemistry* **2010**, *16*, 3942.
- (92) Hai, Y.; Chen, J. J.; Zhao, P.; Lv, H.; Yu, Y.; Xu, P.; Zhang, J. L. *Chem Commun (Camb)* **2011**, *47*, 2435.
- (93) Jing, J.; Chen, J.-J.; Hai, Y.; Zhan, J.; Xu, P.; Zhang, J.-L. *Chem Sci* **2012**, *3*, 3315.
- (94) Jing, J.; Zhang, J.-L. *Chem Sci* **2013**, *4*, 2947.

- (95) Tang, J.; Zhang, M.; Yin, H. Y.; Jing, J.; Xie, D.; Xu, P.; Zhang, J. L. *Chem Commun (Camb)* **2016**, 52, 11583.
- (96) Chen, J.-J.; Jing, J.; Chang, H.; Rong, Y.; Hai, Y.; Tang, J.; Zhang, J.-L.; Xu, P. *Autophagy* **2014**, 9, 894.
- (97) Tang, J.; Xie, D.; Yin, H. Y.; Jing, J.; Zhang, J. L. *Org Biomol Chem* **2016**, 14, 3360.
- (98) Lai, J.; Ke, X.-S.; Tang, J.; Zhang, J.-L. *Chinese Chem Lett* **2015**, 26, 937.
- (99) Tang, J.; Cai, Y. B.; Jing, J.; Zhang, J. L. *Chem Sci* **2015**, 6, 2389.
- (100) Bryden, F.; Boyle, R. W. In *Advances in Inorganic Chemistry*; Press, A., Ed. 2016; Vol. 68, p 141.
- (101) Cunha, L.; Horvath, I.; Ferreira, S.; Lemos, J.; Costa, P.; Vieira, D.; Veres, D. S.; Szigeti, K.; Summavielle, T.; Mathe, D.; Metello, L. F. *Mol Diagn Ther* **2014**, 18, 153.
- (102) de Rosales, R. T. *J Labelled Comp Radiopharm* **2014**, 57, 298.
- (103) Kiani, A.; Esquevin, A.; Lepareur, N.; Bourguet, P.; Le Jeune, F.; Gauvrit, J. *Contrast Media Mol Imaging* **2016**, 11, 92.
- (104) Ranyuk, E.; Lebel, R.; Berube-Lauziere, Y.; Klarskov, K.; Lecomte, R.; van Lier, J. E.; Guerin, B. *Bioconjug Chem* **2013**, 24, 1624.
- (105) Rosticher, C.; Viana, B.; Fortin, M. A.; Lagueux, J.; Faucher, L.; Chanéac, C. *RSC Advances* **2016**, 6, 55472.
- (106) Sandland, J.; Malatesti, N.; Boyle, R. *Photodiagnosis Photodyn Ther* **2018**, 23, 281.
- (107) Gros, C. P.; Eggenspiller, A.; Nonat, A.; Barbe, J.-M.; Denat, F. *Med. Chem. Commun.* **2011**, 2, 119.
- (108) Bhadwal, M.; Mittal, S.; Das, T.; Sarma, H. D.; Chakraborty, S.; Banerjee, S.; Pillai, M. R. A. *Q J Nucl Med Mol Imaging* **2013**, 57, 224.
- (109) Mittal, S.; Bhadwal, M.; Das, T.; Sarma, H. D.; Chakravarty, R.; Dash, A.; Banerjee, S.; Pillai, M. R. *Cancer Biother Radiopharm* **2013**, 28, 651.
- (110) Ke, X.-S.; Tang, J.; Yang, Z.-S.; Zhang, J.-L. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines* **2014**, 18, 950.
- (111) Guleria, M.; Das, T.; Sarma, H. D.; Banerjee, S. *J Radioanal Nucl Ch* **2015**, 307, 1537.
- (112) Guleria, M.; Das, T.; Amirdhanayagam, J.; Sarma, H. D.; Dash, A. *Cancer Biother Radiopharm* **2018**, 33, 8.

Capítulo 2

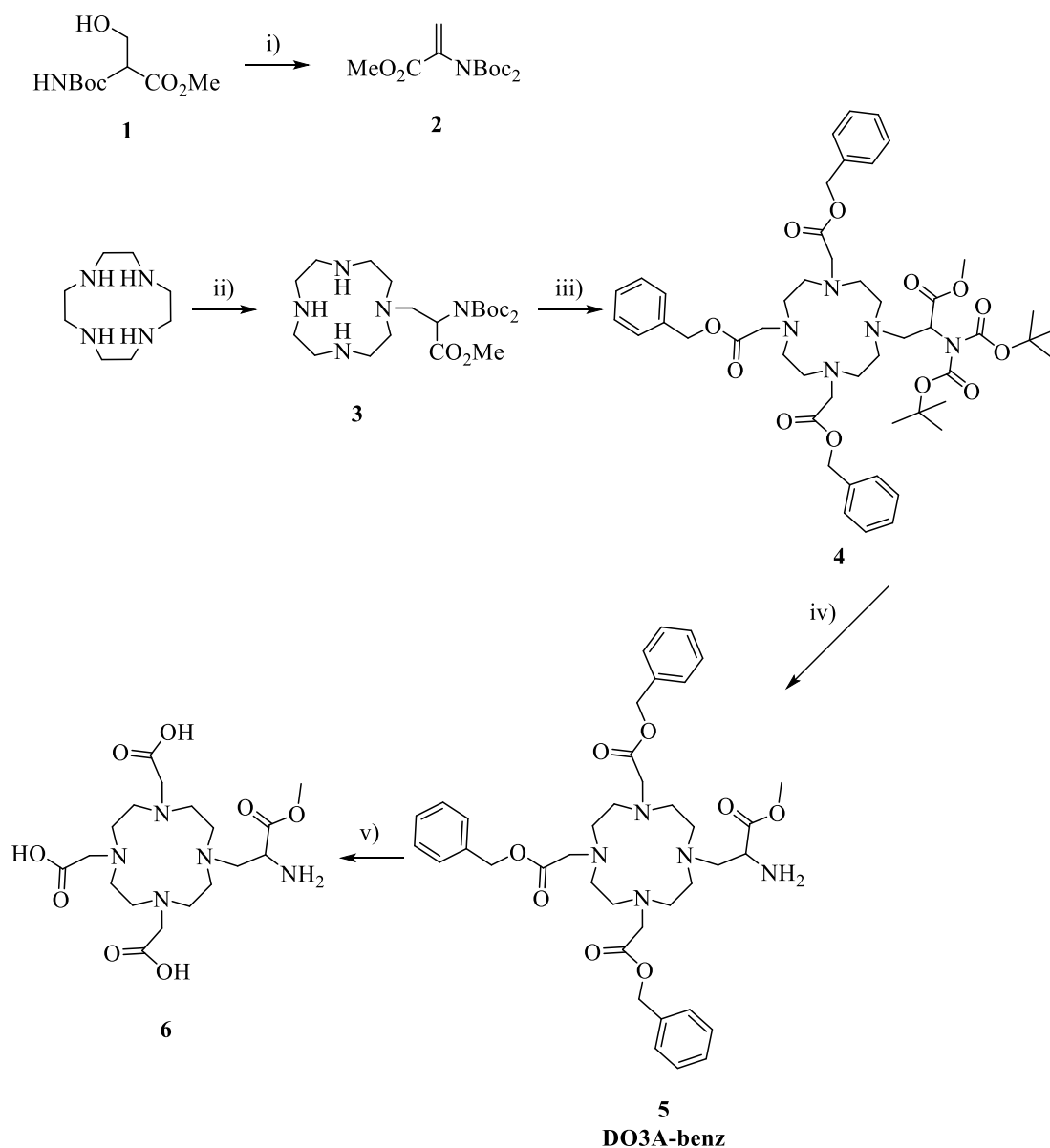
Síntese de Ligandos Nitrogenados

2.1. Síntese do DO₃A-*N*- α -aminopropionato e complexos

De acordo com a revisão bibliográfica efetuada, uma das famílias de compostos orgânicos nitrogenados mais utilizada como agentes de contraste é baseada em estruturas cíclicas multidentadas, nomeadamente no cicleno. Para esta finalidade é necessário que estes cumpram determinados requisitos, nomeadamente apresentarem elevada estabilidade e conterem grupos funcionais terminais para acoplamento com outras moléculas, como por exemplo péptidos e anticorpos, ou ainda, recetores celulares de tecidos-alvo.

Deste modo, pretendeu-se sintetizar o DO₃A-*N*- α -aminopropionato um agente quelante com as propriedades referidas anteriormente. Este possui na sua estrutura um grupo amina livre que o torna um bom nucleófilo possibilitando a sua ligação a outras moléculas, nomeadamente para o presente estudo, porfirinas e complexos de salen com grupos terminais carboxilo, apresentados na secção 2.2 e 2.3.

Para a obtenção deste agente é necessário inicialmente efetuar a síntese do braço α -aminopropionato (esquema 2.1) através de uma reação de desidratação do Boc-SerOMe¹. Numa experiência modelo, adicionou-se a uma solução em acetonitrilo contendo éster metílico de *N*-(*tert*-butiloxicarbonil)-*L*-serina, Boc-SerOMe (**1**), o reagente di-*tert*-butildicarbonato, (Boc)₂O, e o catalisador 4-dimetilaminopiridina, DMAP. A mistura reacional manteve-se em agitação durante 24 horas, à temperatura ambiente. A reação foi controlada por TLC e após o *términus* realizaram-se várias extrações obtendo-se o composto **2**, éster metílico de *N,N*-bis-(*tert*-butoxicarbonil)-didesidro alanina, Boc₂- Δ -AlaOMe, com um rendimento de 79%.



Esquema 2.1: Síntese do DO₃A-*N*-α-aminopropionato. Reagentes e condições reacionais: i) $(\text{Boc})_2\text{O}$, DMAP, MeCN, 24 horas, temperatura ambiente, $\eta=79\%$; ii) $\text{Boc}_2\text{-}\Delta\text{-AlaOMe}$, K_2CO_3 , MeCN, 24 horas, temperatura ambiente, $\eta=77\%$; iii) benzilbromo acetato, K_2CO_3 , MeCN, 6 horas, temperatura ambiente, $\eta=71\%$; iv) ácido trifluoroacético (TFA) (10%) em CH_2Cl_2 , 24 horas, temperatura ambiente, $\eta=83\%$; v) Pd/C, H_2 , 80°C, 10 bar, 24 horas, $\eta=77\%$

Seguidamente, realizou-se uma adição de *Michael* do composto **2** ao cicleno, utilizando um excesso deste (1,5 equivalentes) com vista a maximizar o rendimento do produto mono-alquilado, utilizou-se K_2CO_3 como base, e acetonitrilo como solvente. A reação permaneceu à temperatura ambiente sob agitação vigorosa durante 24 horas. Após terminada a reação filtrou-se a base e evaporou-se o solvente. A purificação do crude obtido

foi efetuada recorrendo a cromatografia *flash* utilizando como eluente diclorometano-etanol-amónia-água (50:50:1:1). Por fim, evaporou-se o solvente e obteve-se o produto **3** com um rendimento de 77%. A respetiva caracterização encontra-se descrita no capítulo 3 e está de acordo com a literatura².

Para evitar a hidrólise dos grupos éster, na síntese do composto **4** efetuou-se uma alquilação utilizando bromoacetato de benzilo. Assim, juntou-se a uma amostra do composto **3**, 4 equivalentes de bromoacetato de benzilo, 6 equivalentes de K₂CO₃, utilizando acetonitrilo como solvente. A reação permaneceu à temperatura ambiente durante 24 horas. O meio reacional foi controlado por TLC e após se ter observado o consumo do reagente de partida, filtrou-se a base e evaporou-se o solvente. O crude obtido foi purificado por cromatografia em coluna de gel de sílica utilizando inicialmente como eluente diclorometano (100%), seguido de um gradiente diclorometano:etanol (50:50) e terminando com 100% de etanol. Evaporou-se o solvente e obteve-se o composto **4** com um rendimento de 71%.

De modo a comprovar a alquilação do composto **3** após purificação do crude da reação efetuou-se a sua caracterização recorrendo a espectroscopia de ¹H-RMN (Figura 2.1). Os dados obtidos confirmam a alquilação, dado que é possível visualizar um multipeto por volta dos 7,33 ppm, na zona aromática, atribuídos aos prótons dos grupos benzilo, e ainda um multipeto de 5,04-5,18 ppm atribuído aos prótons do -CH₂ adjacentes ao grupo benzilo. Para além destes, é de referir o sinal alargado entre 2,33-3,80 ppm atribuído aos prótons do anel do cicleno, dos grupos -CH₂ adjacentes ao anel cicleno, do grupo -CH₃, e ainda o próton do carbono terciário -CH. Por fim, observou-se ainda o multipeto característico dos grupos -CH₃ do grupo protetor Boc a 1,47 ppm (Figura 2.1).

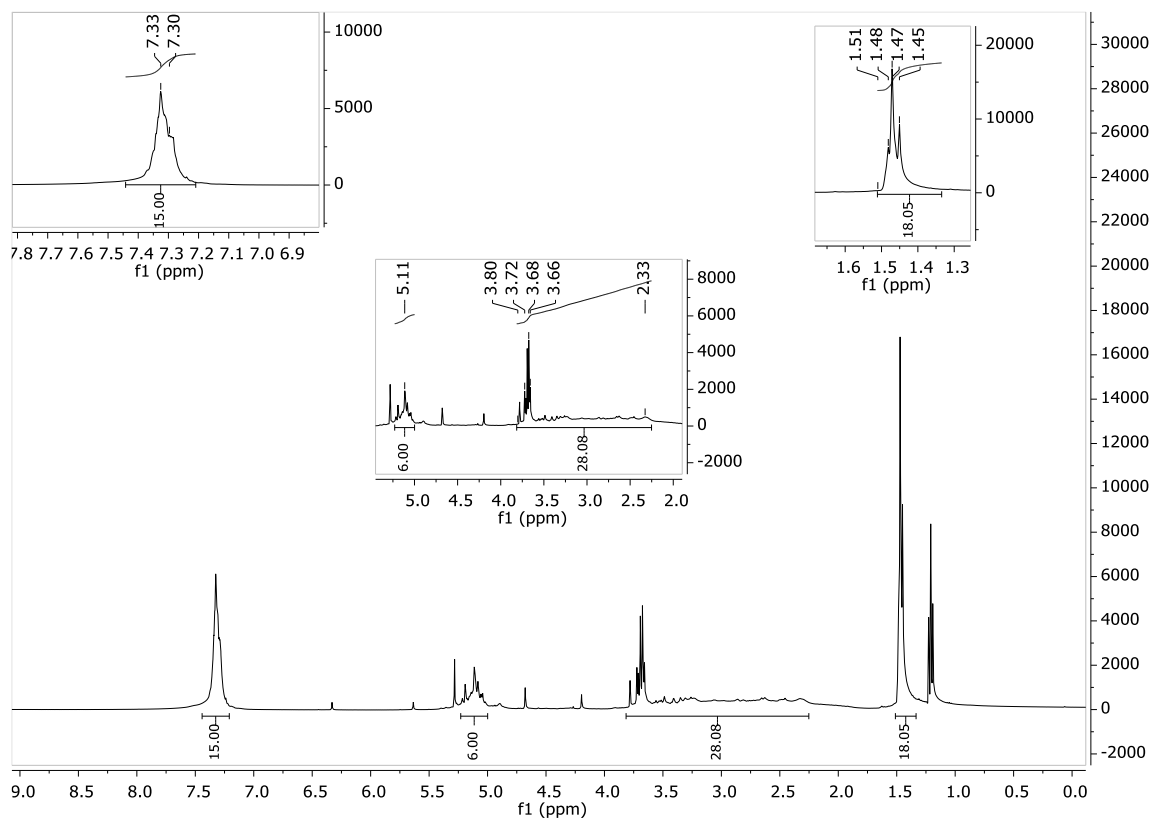


Figura 2.1: Espectro de ^1H -RMN do composto **4**, em CDCl_3 , com ampliações das regiões mais relevantes

Após obtenção e caracterização do produto **4** alquilado (Esquema 2.1) procedeu-se à desproteção seletiva do grupo protetor *tert*-butoxicarbonilo (Boc) de modo a obter o composto **e** com o grupo amina livre. Para tal, dissolveu-se o composto **4** numa mistura de diclorometano e 10% de TFA. Colocou-se a reação em agitação vigorosa à temperatura ambiente, durante 24 horas. Evaporou-se o solvente e o composto obtido foi submetido a várias lavagens (dissolução seguida de evaporação) com diclorometano de modo a retirar o ácido. Após evaporação final do solvente, o produto foi seco sob vácuo, tendo-se obtido o produto **5**, DO3A-benz, com um rendimento de 83%.

Pelos dados espectroscópicos obtidos e presentes na figura 2.2 comprovamos a desproteção seletiva do grupo Boc pela ausência do multiplete característico da ressonância dos prótons dos grupos $-\text{CH}_3$ a 1,47 ppm.

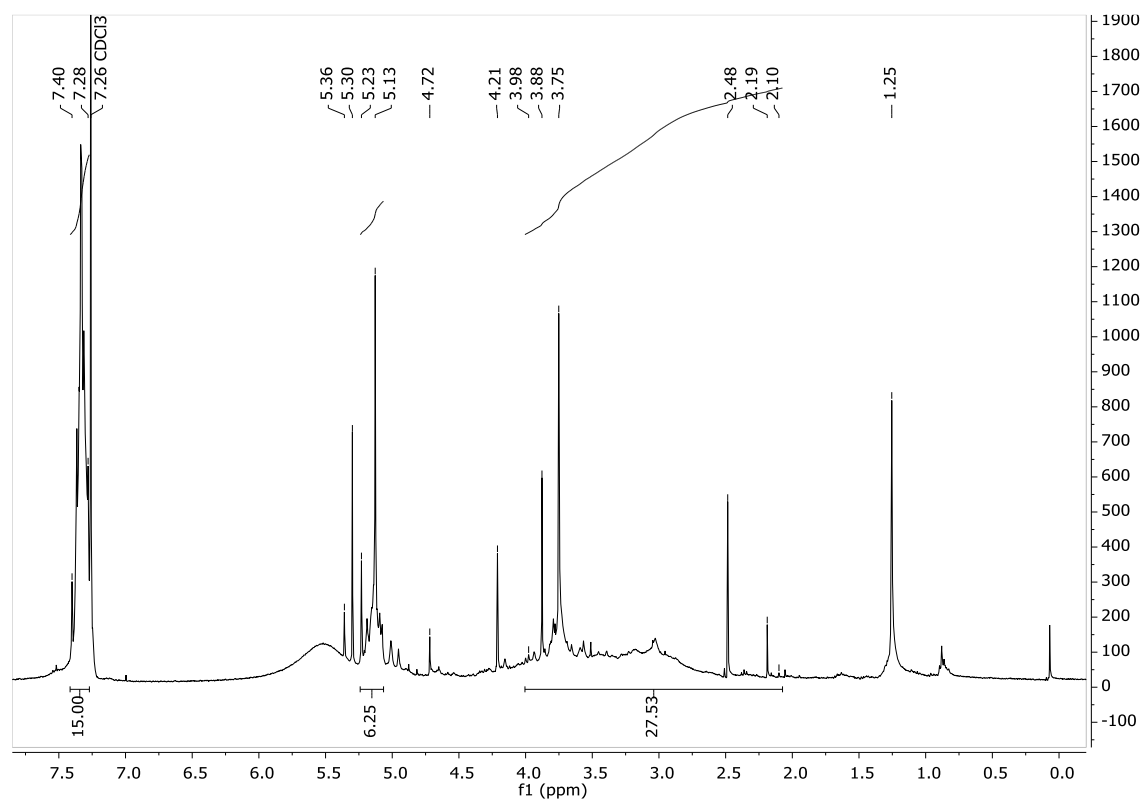


Figura 2.2: Espectro de ^1H -RMN do composto **5**, em CDCl_3

Com o objetivo de obter o ligando totalmente desprotegido, colocou-se no reator uma amostra do composto **5** à qual se adicionou o catalisador Pd/C (5%), previamente dissolvidos em tolueno. Seguidamente, efetuou-se o desarejamento do reator e adicionou-se H_2 , ficando a reação sob uma pressão de 10 bar a 80°C , com agitação, durante 48 horas. Após arrefecimento, decantou-se o tolueno e analisando por TLC o líquido, não se detetou a presença de reagentes de partida. Seguidamente, dissolveu-se o sólido no tubo do reator em água e filtrou-se a solução removendo o catalisador. A amostra foi liofilizada obtendo o composto **6**, totalmente desprotegido, com um rendimento de 77%. Efetuou-se a respetiva caracterização estrutural, que se encontra no capítulo 3, e que se encontra de acordo com a literatura².

Um dos objetivos deste trabalho era a síntese de potenciais agentes de contraste bimodais envolvendo unidades de porfirina e complexos de salen e o cicleno derivatizado, cuja síntese foi descrita anteriormente. Tal como foi referido no capítulo 1, o ^{64}Cu tem despertado interesse em medicina nuclear principalmente devido ao seu tempo de semi-vida longo ($t_{1/2} = 12.7$ horas), que o torna atrativo para PET comparativamente com outros radioisótopos. Deste modo, em ambos os casos, a ideia era efetuar a radiomarcagem do

ciclono derivatizado com ^{64}Cu para aplicação em PET, em colaboração com o grupo do Prof. Rafael Rosales - King's College London, Londres e Prof. Antero Abrunhosa - ICNAS. Assim sendo, como trabalho preliminar efetuou-se a complexação a frio do ligando com CuCl_2 , dissolvidos em DMF. Colocou-se a reação a uma temperatura de 40°C durante 30 minutos (condições de tempo e temperatura utilizadas tipicamente para radiomarcção deste tipo de ligandos) e após o *terminus* da reação evaporou-se o solvente. A quantificação da quantidade de cobre presente na amostra está a ser efetuada no laboratório central de análise da Universidade de Aveiro.

2.2 Síntese de *meso*-arilporfirinas e seus complexos

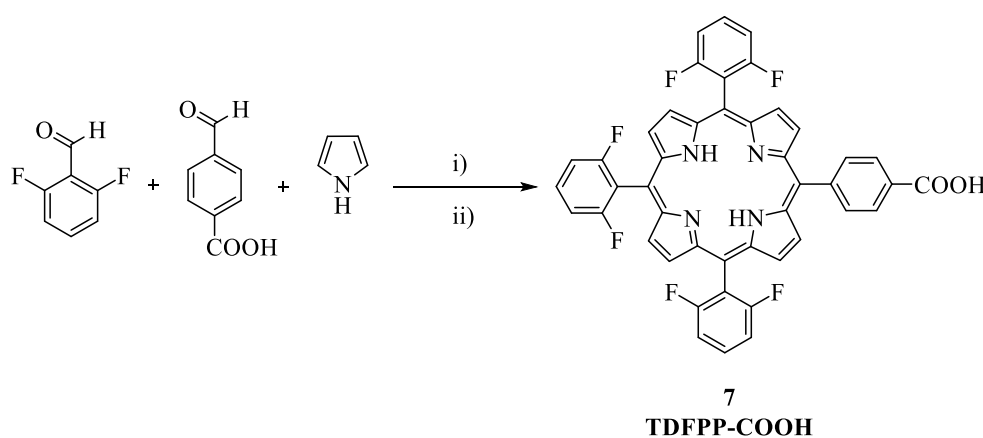
2.2.1 Síntese de *meso*-arilporfirinas

Tal como foi referido no capítulo 1, a crescente aplicação das porfirinas em medicina teve um papel crucial para o seu desenvolvimento, nomeadamente na sua modulação estrutural e melhoria dos seus métodos de síntese. Dos principais métodos de síntese apresentados no capítulo 1, para a síntese das *meso*-arilporfirinas apresentadas nesta dissertação foram selecionados dois métodos: o método do nitrobenzeno (Método A)³ e o método do NaY (Método B)⁴. Nesta dissertação, pretendeu-se também desenvolver potenciais agentes de contraste fluorados de base livre e complexados com manganês para potencial aplicação em ^{19}F -MRI.

Inicialmente, começou-se por sintetizar a porfirina não simétrica 5-(4-carboxifenil)-10,15,20-*tris*(2,6-difluorofenil)porfirina (TDFPP-COOH), recorrendo ao método do nitrobenzeno, juntando o 4-carboxibenzaldeído e o 2,6-difluorobenzaldeído, nas respetivas proporções, dissolvidos em nitrobenzeno e ácido acético (Esquema 2.2). Colocou-se a reação em refluxo a 140°C e a adição do pirrole foi executada gota a gota, numa quantidade equimolar à quantidade de aldeídos. Após concluída a reação e arrefecimento da mesma, procedeu-se a uma destilação a pressão reduzida. Para isolamento e purificação do produto foi necessário realizar duas colunas cromatográficas. Para tal, inicialmente, realizou-se uma cromatografia em coluna de gel de sílica com aplicação a seco, utilizando-se como

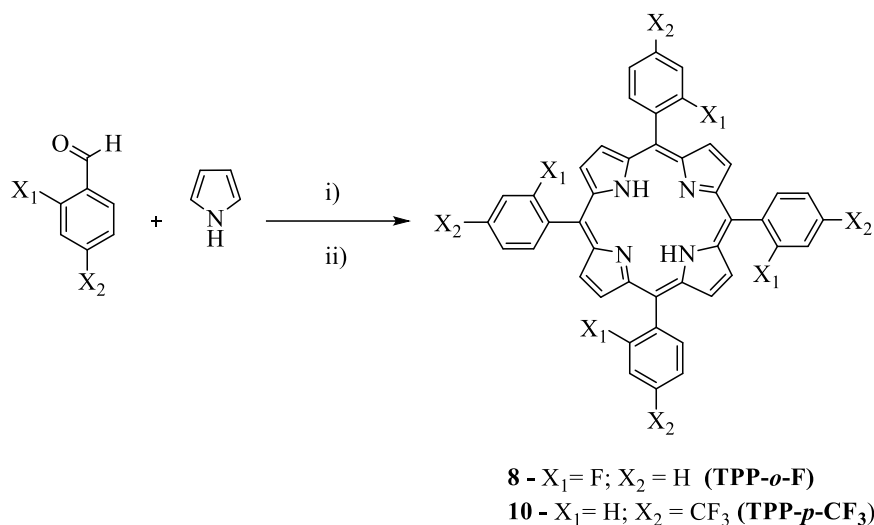
eluente *n*-hexano com vista a retirar o nitrobenzeno ainda presente. Seguidamente, com o objetivo de obter a porfirina pura aumentou-se gradualmente a polaridade do eluente começando com diclorometano e terminando com etanol. Após evaporação observou-se por TLC que a porfirina pretendida ainda estava impura e por isso realizou-se nova coluna cromatográfica de gel de sílica, iniciando-se a eluição com diclorometano e, posteriormente, aumentando gradualmente a polaridade do eluente com etanol. Por fim, evaporou-se o solvente obtendo-se o rendimento presente de 5% (Tabela 2.1.).

Para comparação e pretendendo otimizar as condições de reação, esta porfirina foi também sintetizada recorrendo ao método do NaY, sendo que comparativamente ao método do nitrobenzeno, as principais diferenças são a introdução do zeólito e o aumento do tempo reacional para 2 horas (Esquema 2.2). Além disso, após terminada a reação foi efetuada a filtração do zeólito e a concomitante lavagem deste com THF e diclorometano. A purificação foi efetuada da mesma forma que para método do nitrobenzeno, sendo que se obteve neste caso um rendimento de 7%, ligeiramente superior ao obtido para o método anterior (Tabela 2.1).



Esquema 2.2: Síntese da porfirina TDFPP-COOH. Reagentes e condições reacionais: i) Nitrobenzeno/Ácido acético, 1 hora, 140°C; ii) Nitrobenzeno/Ácido acético, NaY, 2 horas, 140°C

Seguidamente, recorrendo aos mesmos dois métodos sintéticos, sintetizaram-se a 5,10,15,20-*tetra*quis(2-fluorofenil)porfirina (TPP-*o*-F) e a 5,10,15,20-*tetra*(4-trifluorometilfenil)porfirina (TPP-*p*-CF₃) (Esquema 2.3). Em ambos os casos foi possível precipitar a porfirina diretamente do meio reacional adicionando metanol, tendo-se obtido após filtração um rendimento de 18% e 30% para a TPP-*o*-F e 10% e 19% para a TPP-*p*-CF₃ (Tabela 2.1.).



Esquema 2.3: Síntese das porfirinas TPP-*o*-F e TPP-*p*-CF₃. Reagentes e condições reacionais: i) Nitrobenzeno/Ácido acético, 1 hora, 140°C; ii) Nitrobenzeno/Ácido acético, NaY, 2 horas, 140°C

Na tabela seguinte apresentam-se os rendimentos obtidos para as diferentes porfirinas e para os respetivos métodos de síntese.

| Porfirina | Rendimento (%) | |
|---|----------------|----------|
| | Método A | Método B |
| 7 - TDFPP-COOH | 5 | 7 |
| 8 - TPP-<i>o</i>-F | 18 | 30 |
| 10 - TPP-<i>p</i>-CF₃ | 10 | 19 |

Tabela 2.1: Rendimentos obtidos na síntese de *meso*-arilporfirinas: **Método A**- Nitrobenzeno; **Método B** - NaY

Tal como referido anteriormente, o método B difere do método A pela adição do zeólito NaY e pelo aumento do tempo de reação de 1 hora para 2 horas. Analisando a tabela podemos observar que ocorreu um aumento do rendimento quando se adicionou o NaY, o que é concordante com o referido no artigo de *Pereira e Calvete*⁴, onde o NaY atua como ácido de Lewis ativando de forma mais eficiente o grupo carbonilo do aldeído, tornando-o mais suscetível ao ataque do pirrole.

Todas as porfirinas sintetizadas foram caracterizadas por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de próton e de flúor, ¹H-RMN e ¹⁹F-RMN, e espetrometria de massa. A

título de exemplo, seguidamente apresentam-se os espectros de RMN obtidos para a porfirina **7**, TDFPP-COOH (Figura 2.3 e 2.4).

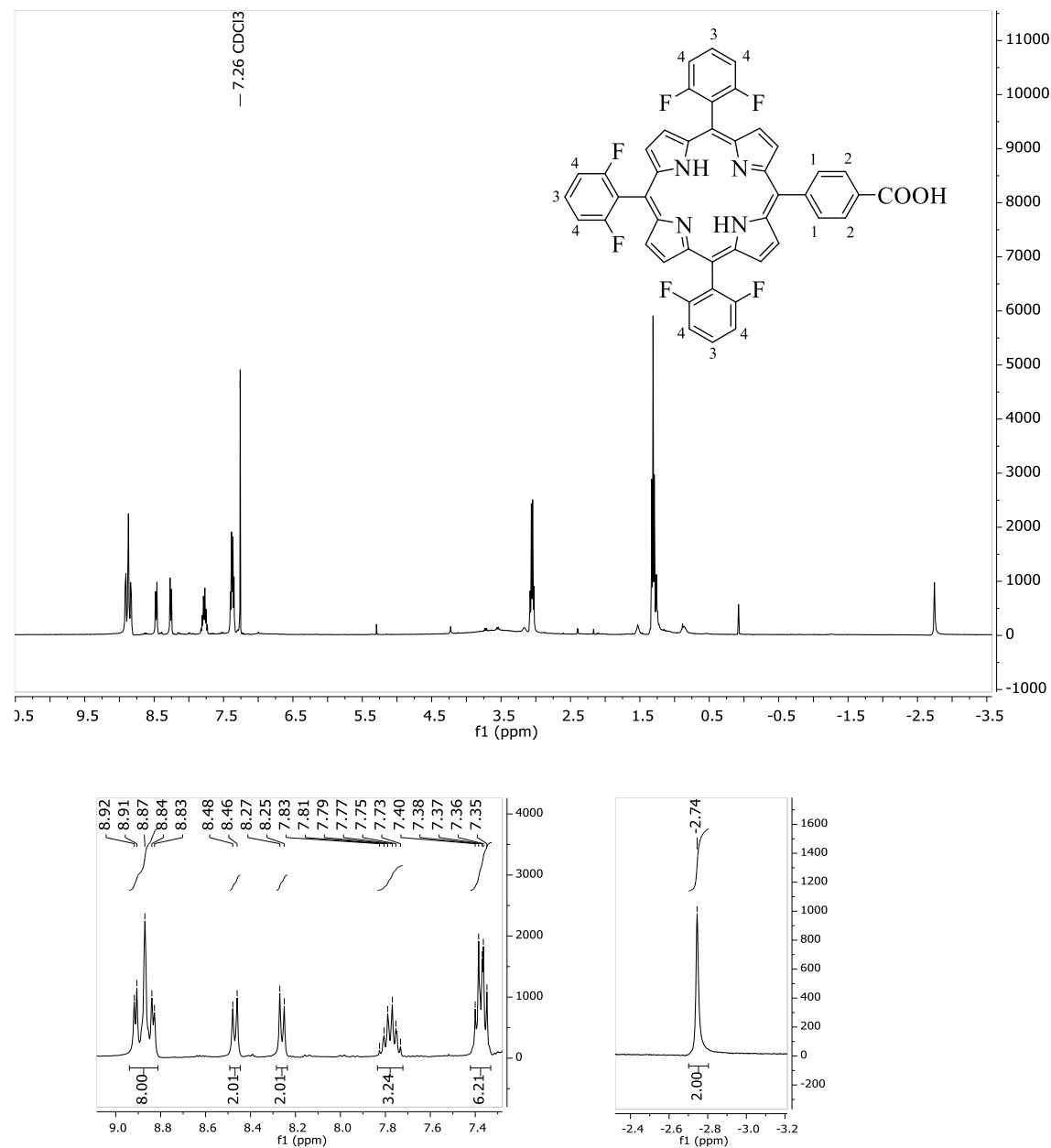


Figura 2.3: Espectro de ^1H -RMN da porfirina **7**, TDFPP-COOH, em CDCl_3 , e ampliações

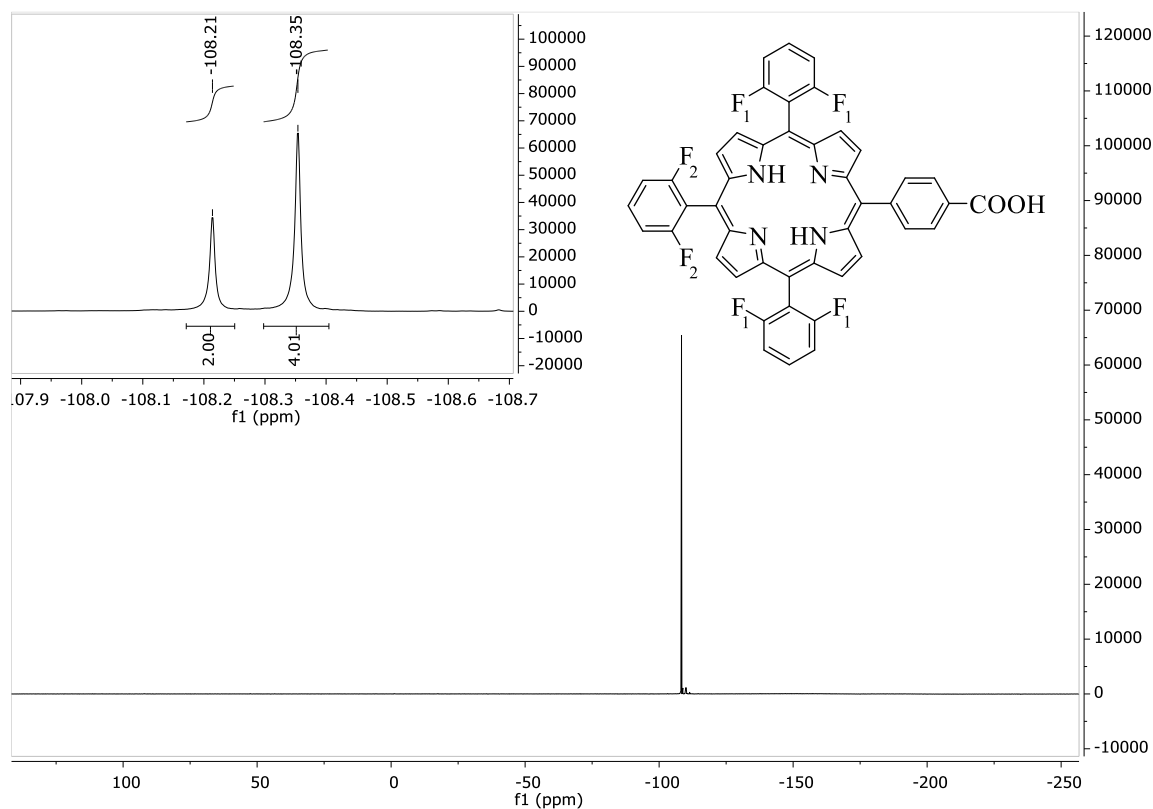


Figura 2.4: Espectro de ^{19}F -RMN da porfirina **7**, TDFPP-COOH, em CDCl_3 , e ampliação

Da análise do espectro de ^1H -RMN do composto **7** apresentado na figura 2.3, observa-se a presença de seis sinais: um multipletto entre 8,83 e 8,92 ppm; dois dupletos a 8,47 e 8,26 ppm; um multipletto entre 7,73 e 7,83 ppm; um multipletto de 7,35 a 7,40 ppm; e um singuleto a -2,74 ppm. O multipletto entre 8,83 a 8,92 ppm e o singuleto a -2,74 ppm encontram-se para desvios químicos típicos dos prótons β -pirrólicos e N-H internos da porfirina, respetivamente. Os outros quatro sinais foram atribuídos aos prótons dos grupos fenilo nas posições *meso*, sendo os dois dupletos referentes aos átomos de hidrogénio das posições *orto* e *meta* do grupo fenilo (H_1 e H_2) contendo o grupo carboxílico. Por outro lado, o multipletto entre 7,73 e 7,83 ppm corresponde aos átomos de hidrogénio em posição *para* dos grupos fenilo fluorados (H_3) e o multipletto de 7,35 a 7,40 ppm foi atribuído ao desvio químico dos átomos de hidrogénio em posição *meta* dos grupos fenilo fluorados (H_4). No que se refere ao espectro de ^{19}F -RMN (Figura 2.4), observou-se a presença de dois picos em forma de singuletos a -108,21 e -108,35 ppm, atribuídos aos átomos de flúor F_2 e F_1 , respetivamente.

Para complementar os estudos de caracterização anteriormente apresentados efetuou-se também a determinação de alguns parâmetros fotofísicos das porfirinas sintetizadas.

As porfirinas apresentam um espectro de absorção UV-Vis característico dado à sua capacidade de absorver radiação na zona do UV-Visível pelo facto de possuírem um sistema deslocalizado de eletrões π . Deste modo, o espectro de absorção UV-Vis de uma porfirina de base livre distingue-se pela existência de uma banda com elevado coeficiente de absorvidade molar (ϵ) próxima dos 400 nm, normalmente entre 400 a 450 nm, denominada de banda B ou Soret, seguida de quatro bandas de mais baixa intensidade localizadas entre os 500 e os 700 nm designadas de bandas Q, segundo a terminologia descrita por Platt⁵.

A interpretação dos espectros peculiares deste tipo de compostos baseia-se nas transições eletrónicas entre orbitais moleculares, transições essas denominadas de B_x , B_y , Q_x e Q_y (Figura 2.5).

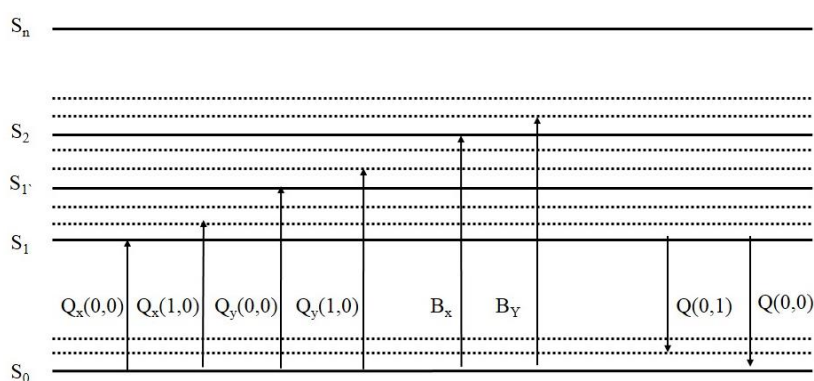


Figura 2.5: Diagrama representativo das transições dos espectros de UV-Vis das porfirinas

Segundo esta teoria, o espectro deveria apresentar duas bandas B, no entanto, este facto não se observa uma vez que a diferença de energia entre as transições B_x e B_y é baixa levando ao aparecimento de uma única banda, ligeiramente alargada.⁶ Por outro lado, a intensidade das quatro bandas Q varia de acordo com os grupos substituintes presentes no macrociclo, o que levou Stern⁷ a propor uma classificação dos espectros de absorção de acordo com esta intensidade relativa. Esta classificação compreende quatro tipos: *etio*, *rhodo*, *oxorhodo* e *filo*.

De forma a adquirir os espectros de UV-Vis das porfirinas sintetizadas, prepararam-se soluções das porfirinas em THF ou tolueno, com concentrações de cerca 10^{-6} M (Figura 2.6). Observou-se que todas as porfirinas têm um espectro de UV-Vis do tipo *etio*.

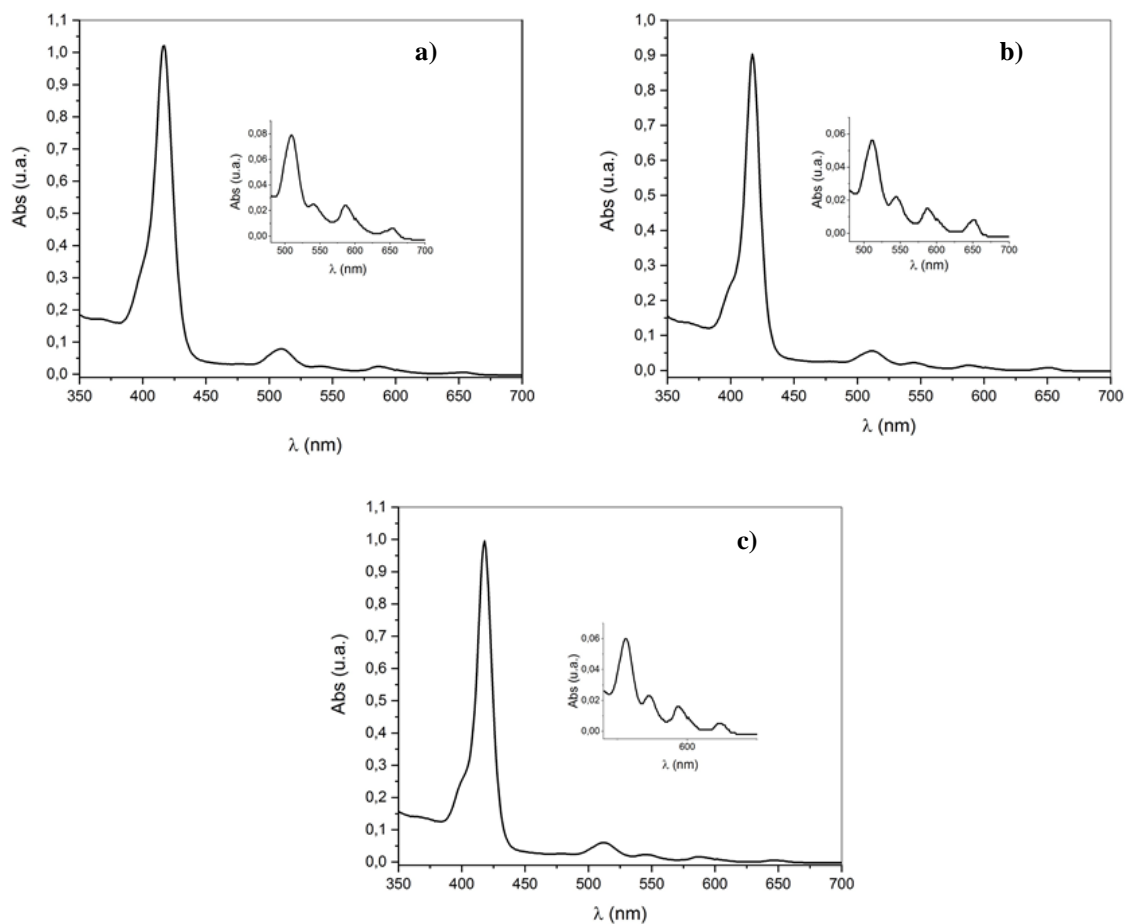


Figura 2.6: Espectros de absorção UV-Vis das *meso*-arilporfirinas sintetizadas: a) TDFPPCOOH em THF; b) TPP-*o*-F em tolueno; c) TPP-*p*-CF₃ em tolueno

A lei de *Beer-Lambert* indica a dependência logarítmica entre a intensidade de luz incidente numa amostra (I_0) e a intensidade de luz transmitida por esta (I). Além disso, relaciona a fração de luz incidente absorvida, num determinado comprimento de onda (λ), com o coeficiente de absorção molar (ϵ em $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$), com a concentração da amostra (c em M) e com o comprimento do percurso ótico (l em cm), como se encontra na equação seguinte.⁸

$$A(\lambda) = \log \frac{I_0}{I} = \varepsilon(\lambda)lc \leftrightarrow \varepsilon(\lambda) = \frac{A(\lambda)}{lc}$$

Equação 1

Recorrendo a esta lei, e fixando o comprimento do percurso ótico em 1 cm, determinaram-se os coeficientes de absorção molar de cada composto. Para tal, prepararam-se várias soluções com concentrações entre 10^{-6} e 10^{-7} M, em THF, para a porfirina **7**, TDFPP-COOH, e em tolueno para as porfirinas **8** e **10**, TPP-*o*-F e TPP-*p*-CF₃. Seguidamente, efetuou-se a representação gráfica da absorvância máxima para cada banda em função da concentração das soluções previamente preparada e, por fim procedeu-se ao ajuste linear dos pontos obtidos. Por sua vez, o declive da reta obtido no ajuste corresponde ao coeficiente de absorção molar para cada banda em análise.

Na figura 2.7 encontra-se como exemplo a representação gráfica da absorvância em função da concentração para a banda Soret ($\lambda = 412$ nm) da porfirina **7**, TDFPP-COOH, em THF.

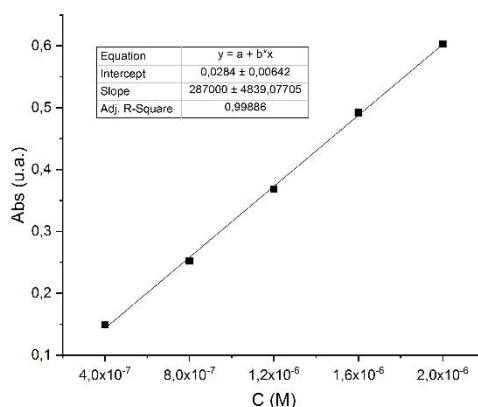


Figura 2.7: Absorvância em função da concentração para a banda Soret ($\lambda = 412$ nm) da porfirina **7**, TDFPP-COOH, em THF

Na tabela 2.2 apresentam-se os coeficientes de absorção molar obtidos pelo procedimento descrito acima. Todos apresentaram uma boa correlação ($R^2 = 0,99886$) indicando que na gama de concentrações utilizadas não se observaram desvios à lei de Beer-Lambert e que conseqüentemente não ocorreu agregação.⁹ Para além disso, os valores obtidos encontram-se de acordo com os ε encontrados na literatura para a TPP-*o*-F e TPP-*p*-CF₃.^{10,11}

| Porfirina | Absorção λ (nm) / ϵ ($M^{-1}cm^{-1}$) | | | | |
|--|--|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| | B(0,0) | Q _y (1,0) | Q _y (0,0) | Q _x (1,0) | Q _x (0,0) |
| 7 - TDFPP-COOH | 412 | 507,5 | 538 | 585 | 652 |
| em THF | $2,9 \times 10^5$ | $1,8 \times 10^4$ | $5,4 \times 10^3$ | $7,3 \times 10^3$ | $3,0 \times 10^3$ |
| 8 - TPP- <i>o</i> -F | 417 | 512 | 545 | 588 | 652 |
| em tolueno | $5,0 \times 10^5$ | $2,4 \times 10^4$ | $7,6 \times 10^3$ | $6,9 \times 10^3$ | $6,0 \times 10^3$ |
| 10 - TPP- <i>p</i> -CF ₃ | 418 | 512,5 | 546,5 | 588 | 646 |
| em tolueno | $1,8 \times 10^5$ | $9,3 \times 10^3$ | $7,9 \times 10^3$ | $7,0 \times 10^3$ | $4,0 \times 10^3$ |

Tabela 2.2: Dados espectroscópicos das *meso*-arilporfirinas

Uma molécula que se encontra no seu estado fundamental S_0 tem a capacidade de absorver radiação e transitar para estados eletrônicos de maior energia S_n , estados excitados. Porém, estes estados são instáveis e a molécula perde facilmente o excesso de energia, decaindo novamente para o estado fundamental através de fenômenos radiativos dos quais salientamos a fluorescência.¹²

Com o objetivo de obter mais um parâmetro fotofísico, uma vez que esta porfirina ainda não foi caracterizada, determinou-se ainda o rendimento quântico de fluorescência (Φ). Neste sentido, adquiriu-se o espectro de emissão de fluorescência da porfirina **7**, TDFPP-COOH em tolueno, observando-se duas bandas de emissão a 656 nm e 714 nm (Figura 2.8). De notar, que não foram efetuados os espectros de fluorescência nem a determinação do rendimento quântico de fluorescência para as porfirinas **8** e **10**, TPP-*o*-F e TPP-*p*-CF₃, uma vez que o intuito da utilização destas era especificamente como agentes de contraste de ¹⁹F MRI, e ambas já são amplamente conhecidas na literatura¹¹.

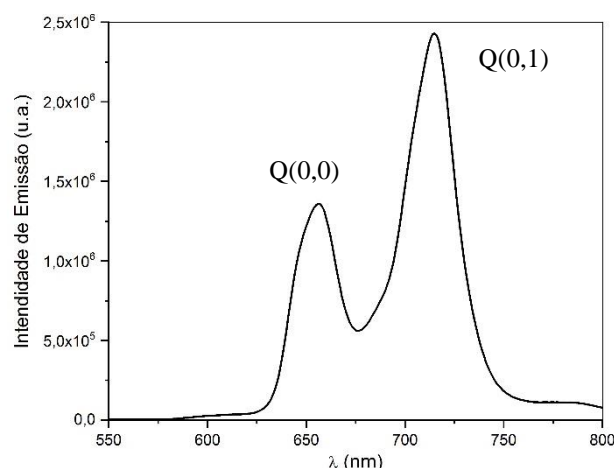


Figura 2.8: Espectros de emissão da *meso*-arilporfirina sintetizada **7**, TDFPP-COOH em tolueno

Seguidamente efetuou-se a determinação do rendimento quântico de fluorescência da porfirina **7**, TDFPP-COOH, recorrendo ao método proposto por *Parker*¹³ onde o espectro de fluorescência da amostra em estudo é comparado com o de uma referência com propriedades fotofísicas conhecidas, recorrendo posteriormente à equação 2.

$$\Phi F(\text{amostra}) = \frac{\text{Área (amostra)}}{\text{Área (ref.)}} * \frac{\text{Abs (ref.)}}{\text{Abs (amostra)}} * \frac{\eta^2(\text{amostra})}{\eta^2(\text{ref.})} * \Phi F(\text{ref.})$$

Equação 2

Em que: área refere-se à integração do espectro de emissão, Abs à absorvância correspondente ao comprimento de onda de excitação e η ao índice de refração do solvente no qual a amostra e a referência se encontram dissolvidos, podendo este termo ser anulado quando o solvente utilizado é o mesmo.

No caso da porfirina em estudo utilizou-se como referência a 5,10,15,20-tetrafenilporfirina (TPP) dissolvida em tolueno cujo rendimento quântico de fluorescência é $\phi_F=0,11$ ¹⁴. Prepararam-se soluções da referência e da porfirina, de forma a apresentarem no espectro de absorção UV-visível uma absorvância de aproximadamente 0,2 para a banda Soret. Procedeu-se ao desarejamento das mesmas e em seguida, registaram-se os respetivos espectros de emissão excitando no comprimento de onda selecionado, $\lambda=419$ nm. Para esta

porfirina obteve-se um $\phi_F = 0,07$ o que está de acordo com o que está descrito na literatura para outras porfirinas fluoradas.^{15,16}

2.2.2 Síntese de complexos metálicos

Após síntese e caracterização das *meso*-arilporfirinas procedeu-se à sua complexação com diferentes metais.

Uma vez que se pretendia obter um agente de contraste bimodal envolvendo a porfirina para ^{19}F -MRI e o derivado do cicleno sintetizado e apresentado na secção 2.1, como entidade para radiomarcagem com ^{64}Cu , decidiu-se simular também a complexação a frio da porfirina com CuCl_2 , utilizando as condições de radiomarcagem (tempo e temperatura) utilizadas tipicamente para os derivados do cicleno, para comprovar que nestas condições não se forma o complexo de porfirina. Assim sendo, realizou-se a complexação da porfirina **7**, TDFPP-COOH, com CuCl_2 a 40°C , durante 30 minutos e controlou-se a reação por UV-Vis. Da análise do espectro de absorção UV-Vis ao longo do tempo pôde-se observar que este não sofreu alteração indicando que não ocorreu complexação. Este fato, juntando ao resultado obtido com o derivado do cicleno, é uma indicação positiva que quando se efetuar a radiomarcagem com ^{64}Cu do potencial agente de contraste bimodal, a marcação vai ser preferencialmente no derivado do cicleno.

Tal como referido anteriormente, pretendia-se também obter potenciais agentes de contraste para ^{19}F -MRI. Comparativamente com o ^1H -MRI esta técnica apresenta como principal vantagem o facto de existir no corpo humano concentrações de flúor abaixo dos 10^{-6} M e deste modo o sinal observado na imagem ser resultante apenas do agente de contraste. Contudo, apresenta como principal desvantagem o facto de o flúor ter uma velocidade de relaxação longitudinal lenta (entre $0,5$ e 1 s^{-1}) o que implica elevado um tempo de aquisição. De forma a ultrapassar esta desvantagem, na literatura começaram a aparecer exemplos de estruturas fluoradas contendo átomos paramagnéticos, que por interação com o flúor ou grupos perfluorados, reduzem o respetivo T_1 de 1 s para 10 ms permitindo uma aquisição mais rápida por unidade de tempo.¹⁷⁻²⁰

As porfirinas **8** e **10**, TPP-*o*-F e TPP-*p*-CF₃, apresentam sinais bem definidos no espectro de ^{19}F -RMN, um multipletto entre $-111,74$ a $-110,95$ no caso da primeira e um singuleto a $-62,07$ no caso da segunda. Com o objetivo de avaliar o efeito da presença do

metal paramagnético no respetivo espectro de flúor efetuou-se a complexação de ambas as porfirinas com manganês. Assim, em ambos os casos utilizou-se acetato de manganês (II), DMF como solvente e uma temperatura de 80°C. O controlo das reações foi efetuado por espectroscopia de UV-Vis (Figura 2.9) e após purificação obteve-se um rendimento de 86% para a Mn(III)-TPP-*o*-F, metaloporfirina **9**, e de 85% para a Mn(III)-TPP-*p*-CF₃, metaloporfirina **11**.

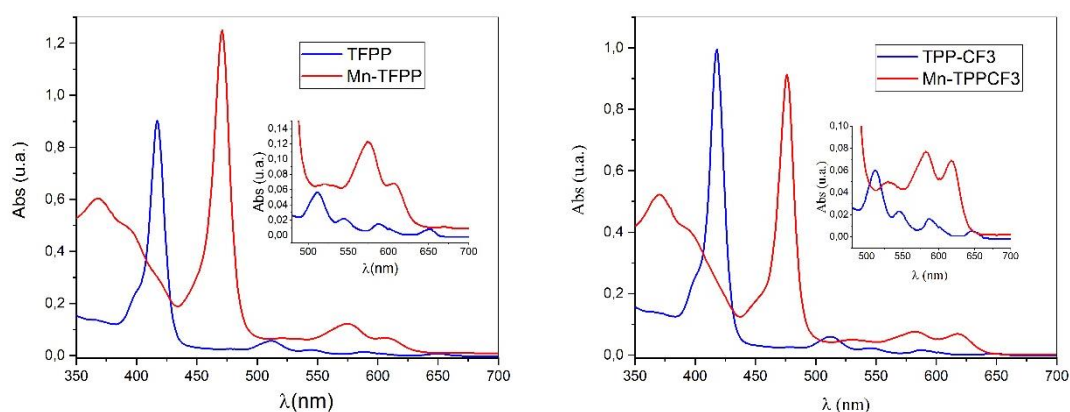


Figura 2.9: Espectros de absorção UV-Vis e ampliação das Bandas Q das *meso*-arilporfirinas **8** e **10**, TPP-*o*-F e TPP-*p*-CF₃ (a azul) e respetivos complexos de Mn(II) (a vermelho)

De forma a avaliar o efeito da presença do átomo de manganês no espectro de ¹⁹F RMN efetuou-se a respetiva aquisição em clorofórmio deuterado. Na figura 2.10 e 2.11 apresentam-se os espectros obtidos comparativamente aos da correspondente porfirina de base livre.

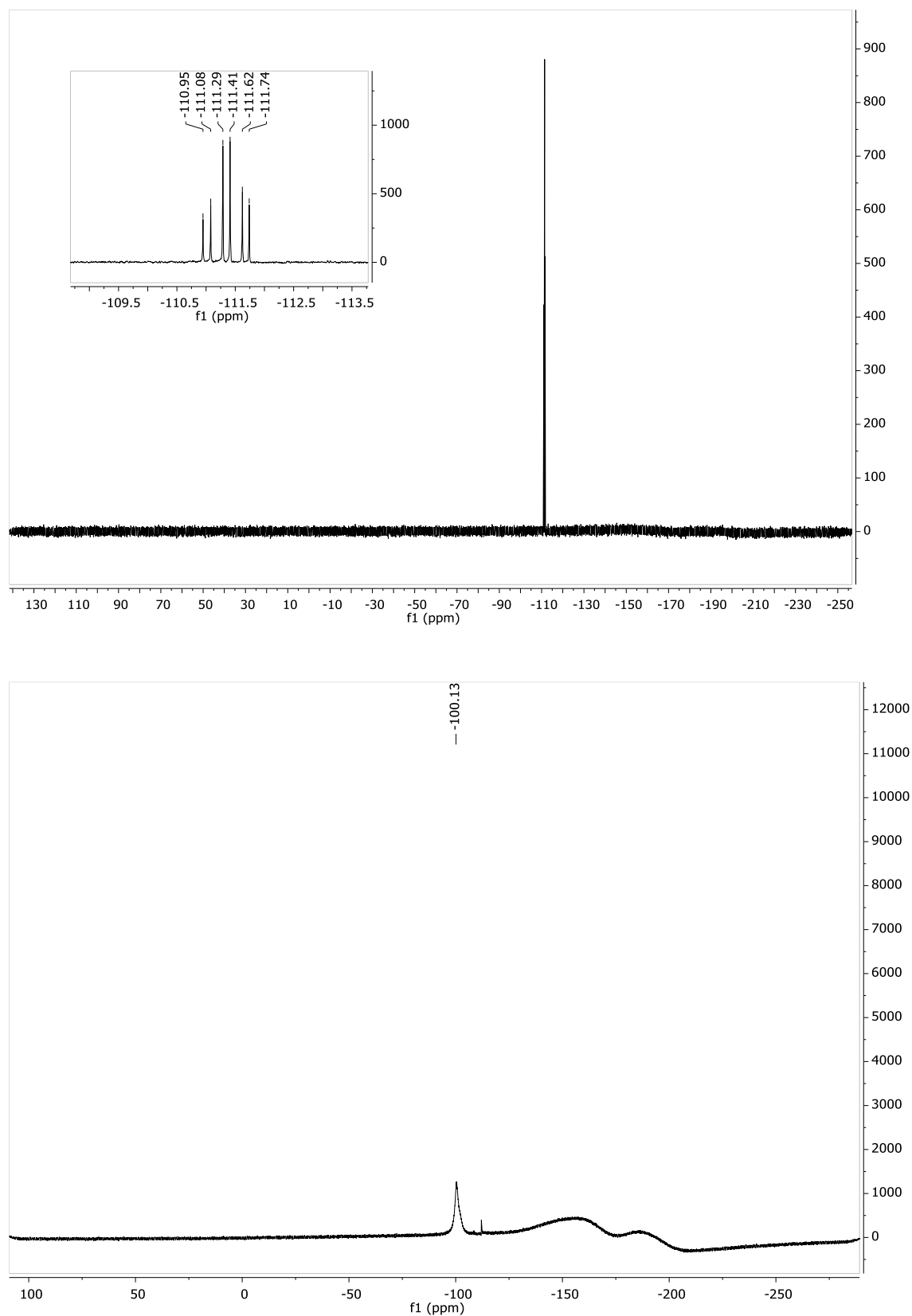


Figura 2.10: a) Espectro de ^{19}F -RMN da *meso*-arilporfirina **8**, TPP-*o*-F b) Espectro de ^{19}F -RMN da metaloporfirina **9**, Mn(III)-TPP-*o*-F, ambos em CDCl_3

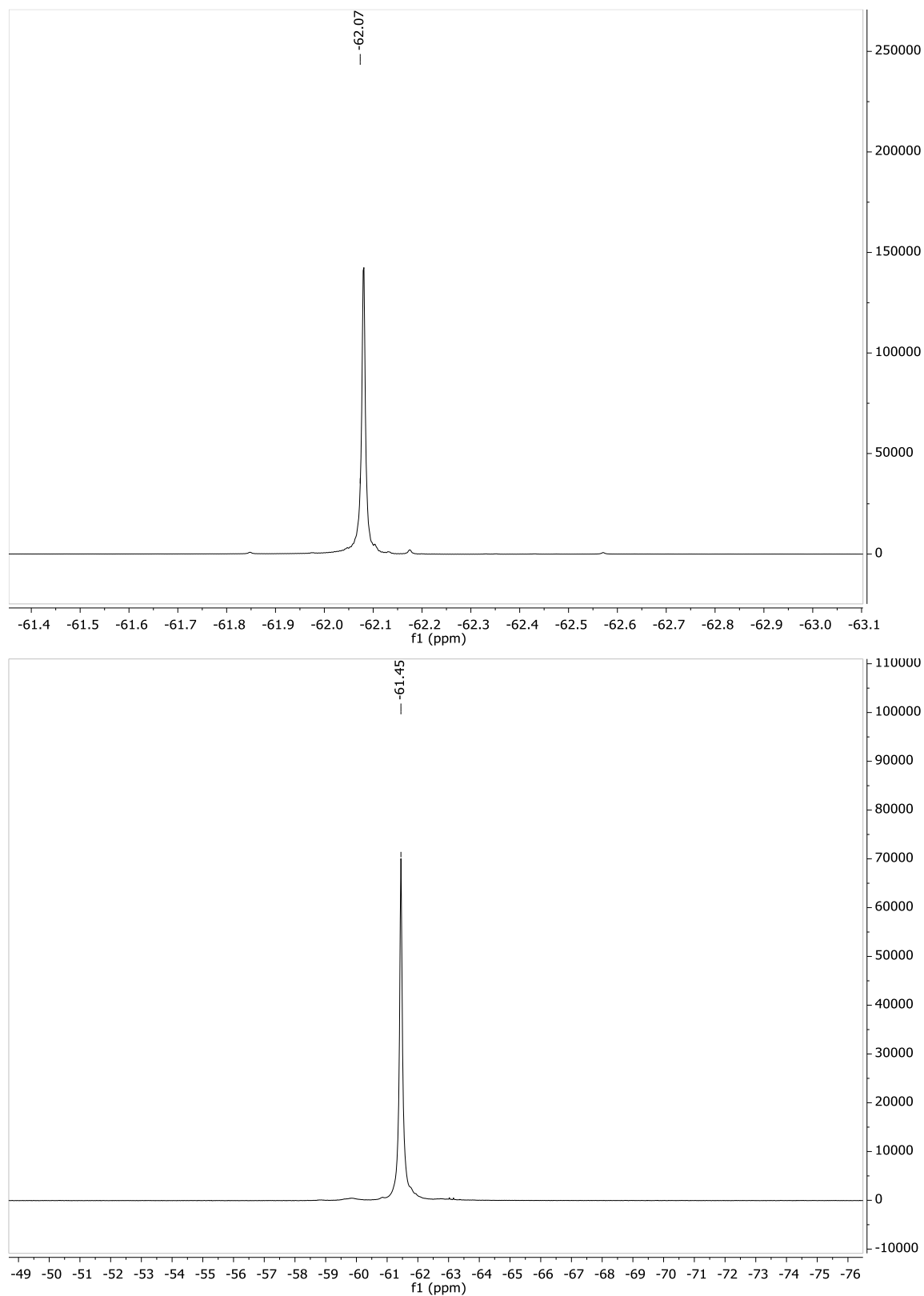


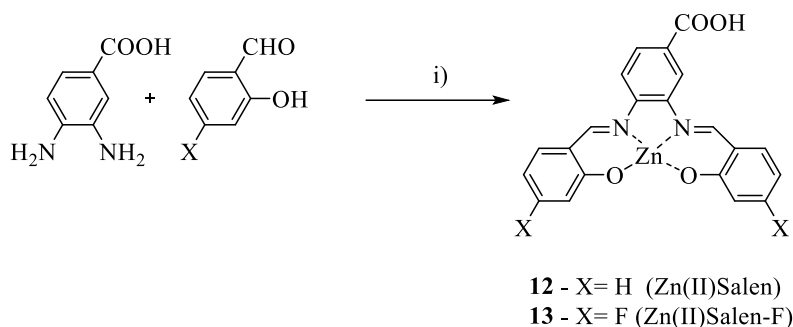
Figura 2.11: a) Espectro de ^{19}F -RMN da meso-arylporfirina **10**, TPP-*p*-CF₃ b) Espectro de ^{19}F -RMN da metalporfirinaporfirina **11**, Mn(III) TPP-*p*-CF₃, ambos em CDCl₃

Pela análise dos espectros de ^{19}F RMN observa-se que a presença do manganês afeta o espectro da TPP-*o*-F, provocando alargamento do multipeto, mas não tem qualquer interferência no caso da TPP-*p*-CF₃. Tal facto poderá estar relacionado com a distância a que o F está do átomo paramagnético. De acordo com alguns autores¹⁸, para complexos de lantanídeos de derivados fluorados do cicleno, a distância ideal é entre 4,5-7,5 Å. Pela observação dos espectros obtidos pode concluir-se, preliminarmente, que no primeiro caso o manganês está a exercer um efeito excessivo no tempo de relaxação do F, provocando o alargamento de sinal observado. Por outro lado, no caso da metaloporfirina **11**, Mn(III)-TPP-*p*-CF₃, o manganês apenas provoca um ligeiro desvio do sinal, mostrando por isso potencialidade como agente de contraste de flúor. Este tópico continua em estudo no laboratório de Catálise & Química Fina, da Universidade de Coimbra.

2.3 Síntese de Complexos de Zn(II)-Salen

No capítulo 1 referiu-se que para além dos compostos nitrogenados anteriormente abordados, ligandos que têm como estrutura base complexos de base de Schiff nomeadamente complexos de salen, são igualmente promissores no desenvolvimento de potenciais agentes de contraste²¹⁻²⁶, contudo, relativamente aos derivados do cicleno e às porfirinas, estes têm sido menos explorados para aplicação em imagiologia médica. Deste modo devido à sua fácil e simples obtenção e às suas propriedades promissoras o presente trabalho tinha também como objetivo a modelação e síntese de complexos de Zn(II)-Salen para desenvolvimento de potenciais agentes de contraste bimodais (FI-PET).

A síntese destes complexos decorreu em duas etapas. Inicialmente, efetuou-se a síntese seguindo o procedimento geral no qual se juntou um equivalente da diamina, ácido 3,4-diaminobenzoico, com dois equivalentes de aldeído, 2-hidroxibenzaldeído ou 4-fluoro-2-hidroxibenzaldeído, utilizando como solvente etanol. A reação permaneceu em refluxo durante 48 horas. Porém não se observou a formação do complexo pelo que se efetuou novamente uma reação seguindo o mesmo procedimento mas adicionando-se após 1 hora acetato de zinco para funcionar como *template* (Esquema 2.4). Deste modo, ocorreu a formação de um precipitado que ao fim das 48 horas se recolheu por filtração.^{27,28}



Esquema 2.4: Síntese dos complexos de Zn(II)-Salen. Reagentes e condições reacionais: i) Etanol, Aceto de Zinco, 48 horas, refluxo

Na tabela 2.3 apresentam-se os rendimentos obtidos para aos diferentes complexos de zinco (II).

| Complexos | Rendimento (%) |
|---------------------------|----------------|
| 12 - Zn(II)Salen | 71 |
| 13 - Zn(II)Salen-F | 97 |

Tabela 2.3: Rendimentos obtidos na síntese do complexo de Zn(II)Salen (**12**) e Zn(II)Salen-F (**13**)

Tal como os compostos sintetizados nos subcapítulos anteriores, os complexos de Zn(II)-Salen foram igualmente caracterizados por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de próton, de flúor e ainda carbono, ^1H -RMN, ^{19}F -RMN e ^{13}C -RMN, e espectrometria de massa.

Seguidamente, apresenta-se uma caracterização detalhada dos espectros de RMN obtidos. Analisando o espectro de ^1H -RMN do complexo **12**, Zn(II)Salen, presente na figura 2.12 verifica-se a presença de sete sinais característicos que foram atribuídos pela análise do espectro bidimensional de NOESY (Figura 2.13). Com um maior desvio químico apresenta-se um duplete a 9,04 ppm referente aos $\underline{\text{H}}_{\text{d}}$ do carbono da ligação imina, $\underline{\text{H}}\text{C}=\text{N}$ que se correlaciona com os prótons $\underline{\text{H}}_{\text{c}}$, $\underline{\text{H}}_{\text{a/b}}$ e $\underline{\text{H}}_{\text{e}}$. Seguidamente, temos um singuleto a 8,37 ppm correspondente ao próton $\underline{\text{H}}_{\text{c}}$, um multiplete a 7,93 ppm que engloba o $\underline{\text{H}}_{\text{a}}$ e $\underline{\text{H}}_{\text{b}}$ e um duplo duplete a 7,45 ppm alusivo aos $\underline{\text{H}}_{\text{c}}$, que por sua vez também se encontram correlacionados com os prótons $\underline{\text{H}}_{\text{d}}$. Para além disso o próton $\underline{\text{H}}_{\text{e}}$ ainda se correlaciona com o próton adjacente $\underline{\text{H}}_{\text{f}}$. Observa-se um multiplete a 7,25 ppm relativo aos $\underline{\text{H}}_{\text{g}}$ que se correlaciona com os prótons vizinhos $\underline{\text{H}}_{\text{f}}$ e $\underline{\text{H}}_{\text{h}}$ e um duplete a 6,71 ppm referente aos $\underline{\text{H}}_{\text{h}}$ que como foi referido se correlaciona com o portão vizinho $\underline{\text{H}}_{\text{g}}$. Por fim um multiplete

correspondente aos H_f a 6,50 ppm que se encontra correlacionado com os prótons adjacentes H_e e H_g . No espectro de ^{13}C -RMN do mesmo composto realça-se a presença de três picos característicos e ainda uma zona que se destaca, a zona dos aromáticos (Figura 2.14). Deste modo a 172,57 ppm encontra-se o sinal referente ao grupo carbonilo do grupo carboxilo $C=O$, seguidamente temos a 163,56 ppm o sinal correspondente à ligação $C-O$ e finalmente a 162,84 ppm o sinal da ligação imina $C=N$.

No espectro de ^{13}C -RMN do mesmo composto realça-se a presença de três picos característicos e ainda uma zona que se destaca, a zona dos aromáticos (Figura 2.14). Deste modo a 172,57 ppm encontra-se o sinal referente ao carbono do grupo carbonilo do grupo carboxilo $C=O$, seguidamente temos a 163,56 ppm o sinal correspondente ao carbono da ligação $C-O$ e finalmente a 162,84 ppm o sinal do carbono da ligação imina $C=N$.

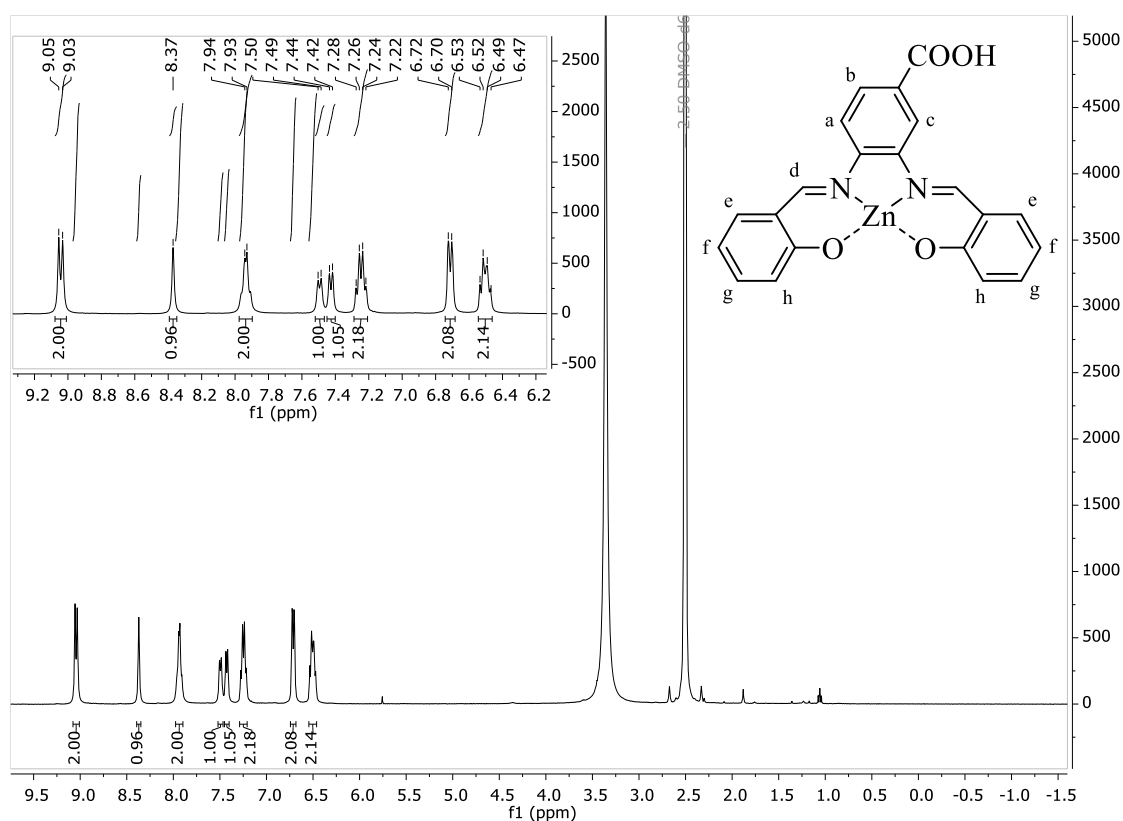


Figura 2.12: Espectro de 1H -RMN do complexo **12**, Zn(II)Salen, em DMSO deuterado

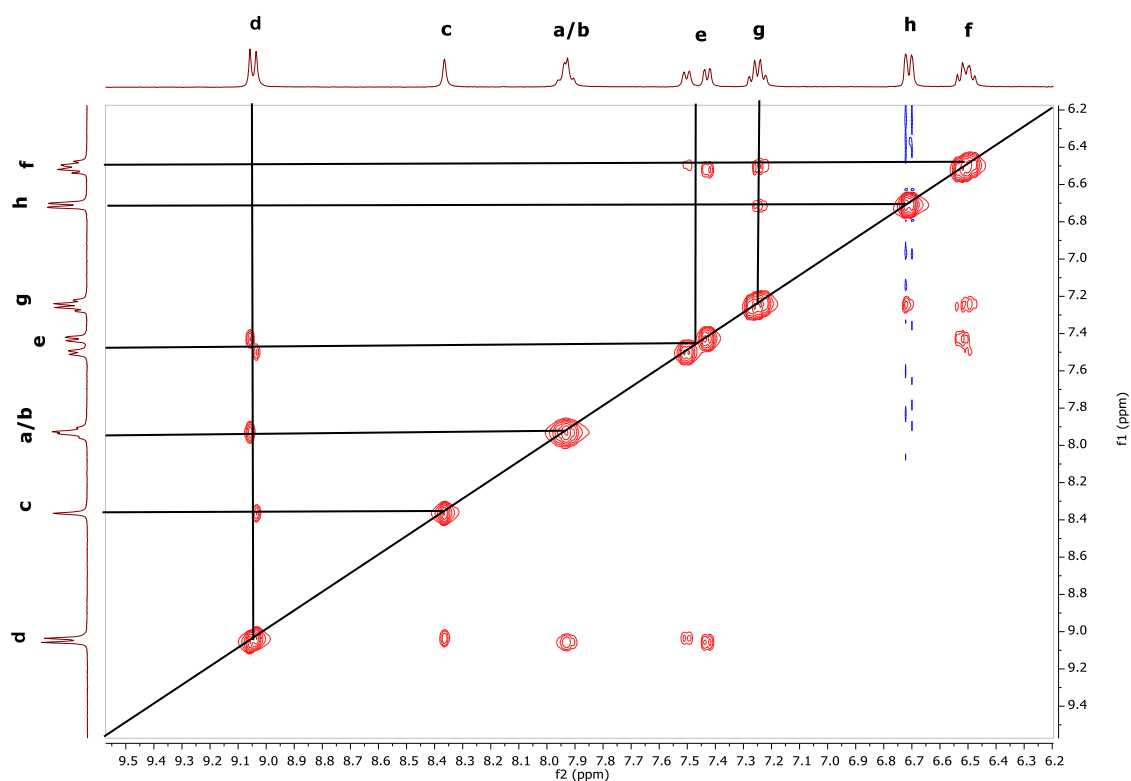


Figura 2.13: Ampliação do espectro de NOESY do complexo **12**, Zn(II)Salen, em DMSO deuterado

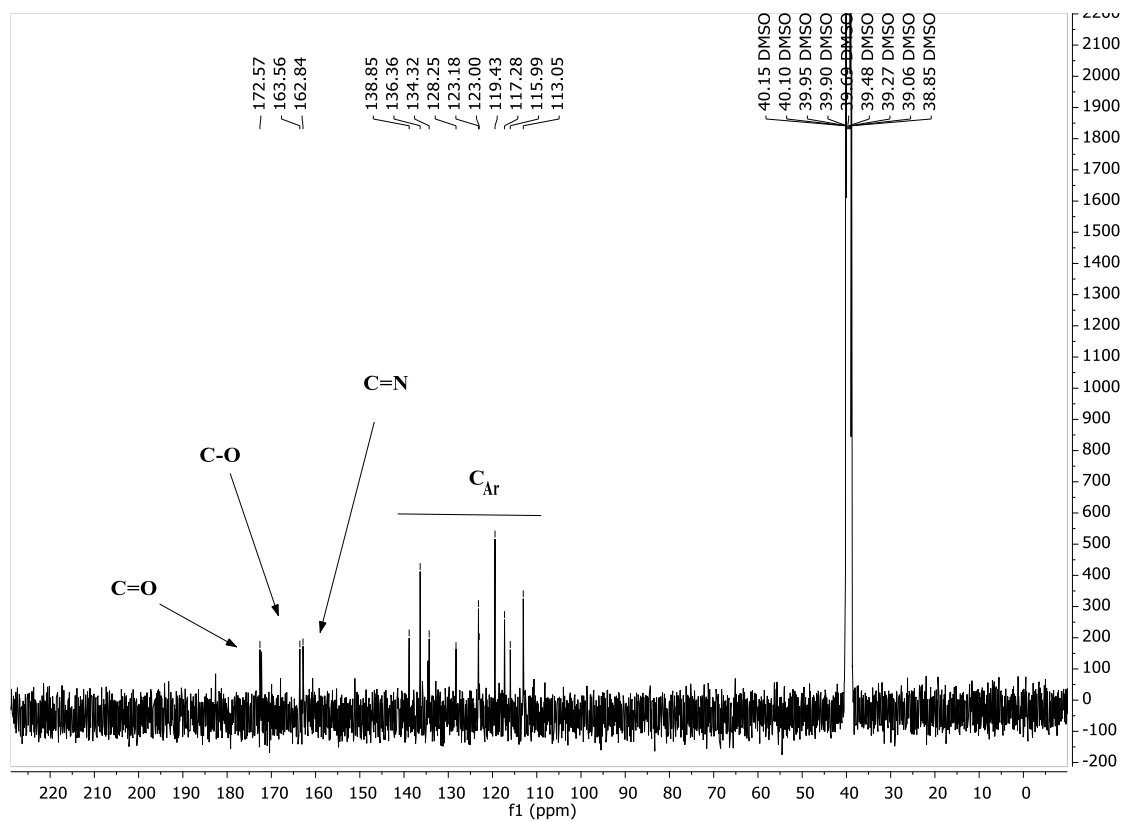


Figura 2.14: Espectro de ^{13}C -RMN do complexo **12**, Zn(II)Salen, em DMSO deuterado

Realizou-se ainda espectrometria de massa do complexo **12**, nomeadamente ESI-MS, no qual se salienta o pico referente ao ião molecular $[M]^+$ de 422.84 m/z.

Igualmente ao complexo anterior, na figura 2.15, apresenta-se o espectro de ^1H -RMN do complexo **13**, Zn(II)Salen-F. Comparando os dois espectros verifica-se que o duplete a 9,04 ppm se transforma num singuleto, o pico referente aos H_c mantém-se igual e o correspondente aos H_a e H_b passa de multiplete para singuleto. Conclui-se assim que a substituição pelo átomo de flúor não exerce um efeito notório nos protões referidos. Contudo, o átomo de flúor caracteriza-se por ser um grupo atractor de electrões que atua por efeito indutivo, deste modo provoca uma alteração nos sinais dos protões adjacentes, H_h e H_f , aparecendo juntos num único sinal e desviados para a direita, na forma de multiplete 6,39 ppm. Os átomos de hidrogénio H_e sofrem efeito de ressonância pelo grupo imina e pelo átomo de flúor o que levou à alteração do sinal na forma de o duplo duplete a 7,45 ppm para dois tripletos aparecendo ligeiramente desviados para campo baixo a 7,60 e 7,50 ppm. Salienta-se ainda a ausência do sinal de protão dos H_g devido à substituição pelo átomo de flúor.

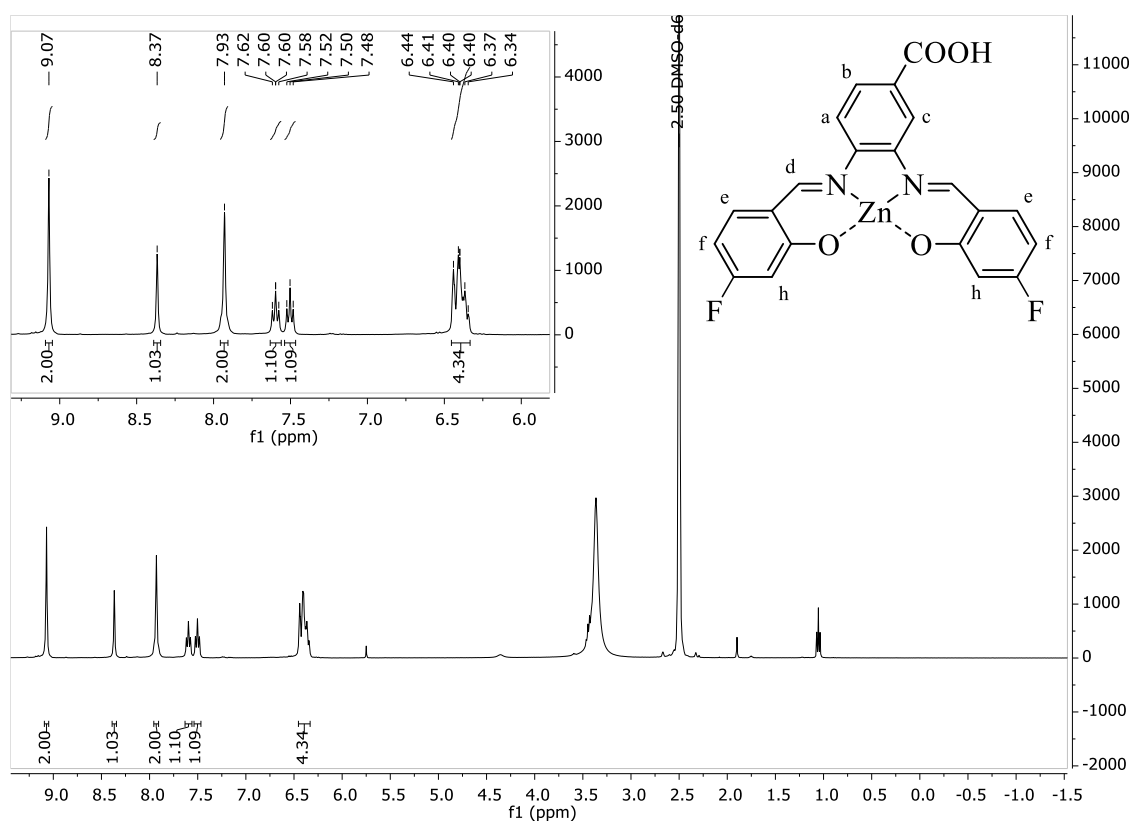


Figura 2.15: Espectro de ^1H -RMN do complexo **13**, Zn(II)Salen-F, em DMSO deuterado

Relativamente ao espectro de ^{19}F -RMN (Figura 2.16), dado à não simetria da molécula podemos verificar através da ampliação a presença de dois sinais a -105,16 e -105,66 ppm correspondentes a cada átomo de flúor.

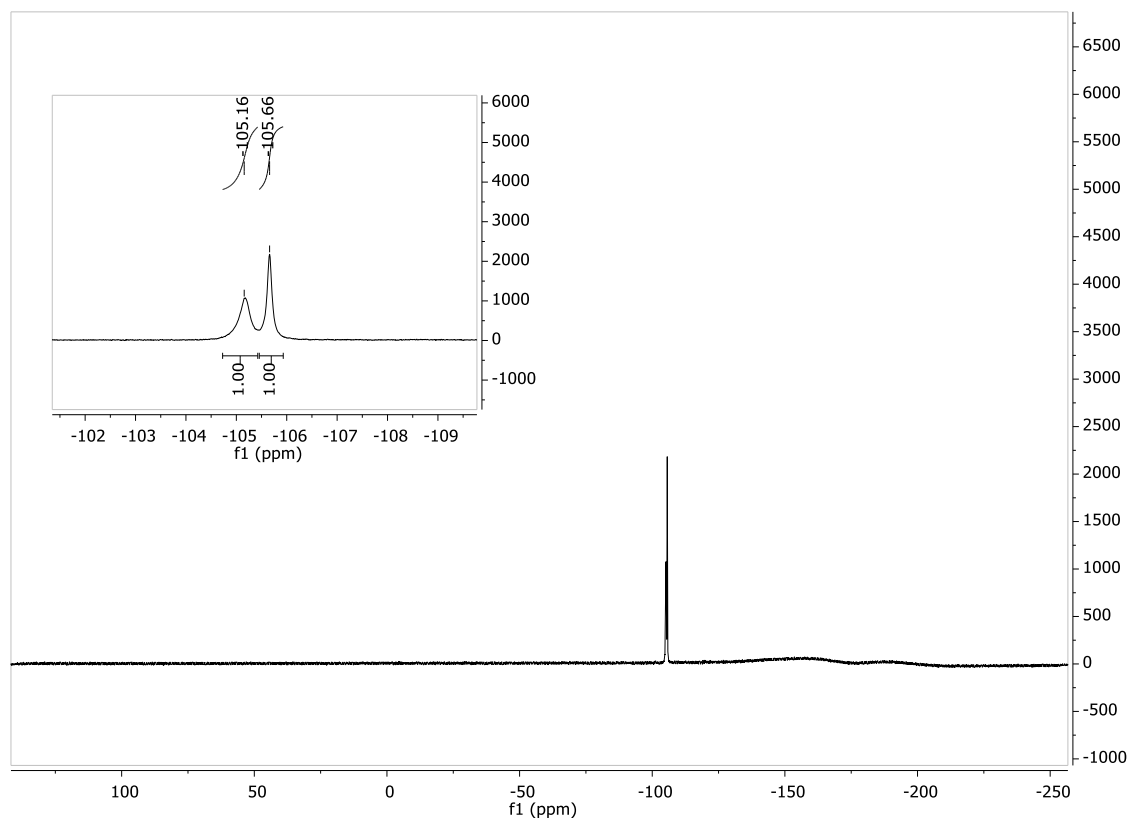


Figura 2.16: Espectro de ^{19}F -RMN do complexo **13**, Zn(II)Salen-F, em DMSO deuterado

Além da caracterização por RMN também se efetuou a caracterização dos complexos de Zn(II)-Salen por espectroscopia de UV-Visível.

Na figura 2.17 apresentam-se os espectros de absorção do complexo **12**, Zn(II)Salen, e do complexo **13**, Zn(II)Salen-F, adquiridos em DMSO. Os espectros obtidos encontram-se de acordo com os encontrados na literatura para complexos de salen similares, possuindo uma banda mais intensa a entre 370 nm e 430 nm seguida de um ombro.²⁸ Para além disso verificou-se que a presença do átomo de flúor induz um deslocamento da banda para comprimentos de onda menores.

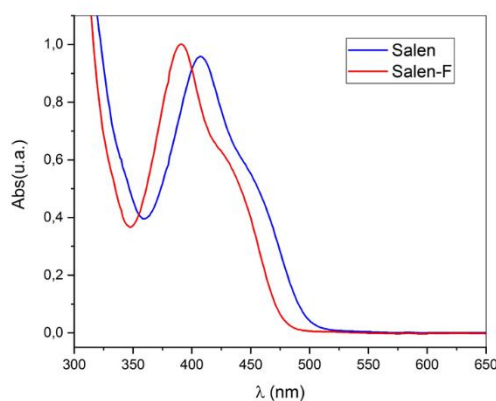


Figura 2.17: Espectros de absorção dos complexos de Zn(II)-Salen

Recorrendo à lei de *Beer-Lambert*⁸, fixando o comprimento do percurso ótico em 1 cm, determinou-se os coeficientes de absorção molar de cada complexo em DMSO através da preparação de várias soluções com concentrações de 10^{-5} M. Seguidamente, efetuou-se a representação gráfica da absorvância máxima para a banda em função da concentração das soluções previamente preparadas e, por fim procedeu-se ao ajuste linear dos pontos obtidos. Por sua vez, o declive da reta obtido no ajuste corresponde ao coeficiente de absorção molar para cada banda em análise.

Na figura 2.18 encontra-se a representação gráfica da absorvância em função da concentração para a banda a $\lambda = 405$ nm e $\lambda = 390$ nm do complexo **12**, Zn(II)Salen, e do complexo **13**, Zn(II)Salen-F, respetivamente, em DMSO.

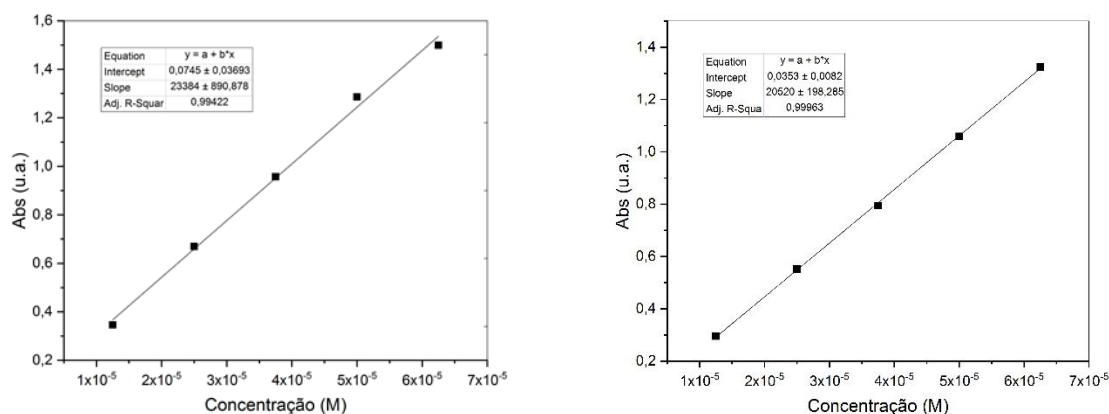


Figura 2.18: Absorvância em função da concentração para a banda $\lambda = 405$ nm e $\lambda = 390$ nm do complexo **12** e **13**, Zn(II)Salen e Zn(II)Salen-F, respetivamente, em DMSO

Pela análise da tabela 2.4 observamos que o coeficiente de absorção molar para o complexo **13**, Zn(II)Salen-F, é ligeiramente inferior.

| Absorção λ (nm) | |
|--------------------------------|-------------------|
| ϵ ($M^{-1}cm^{-1}$) | |
| Banda | |
| 12 - Zn(II)Salen | 405 |
| | $2,3 \times 10^4$ |
| 13 - Zn(II)Salen-F | 390 |
| | $2,1 \times 10^4$ |

Tabela 2.4: Dados espectroscópicos dos complexos de Zn(II)-Salen em DMSO

Tal como para as porfirinas também se realizaram espectros de emissão de fluorescência para estes complexos (Figura 2.19).

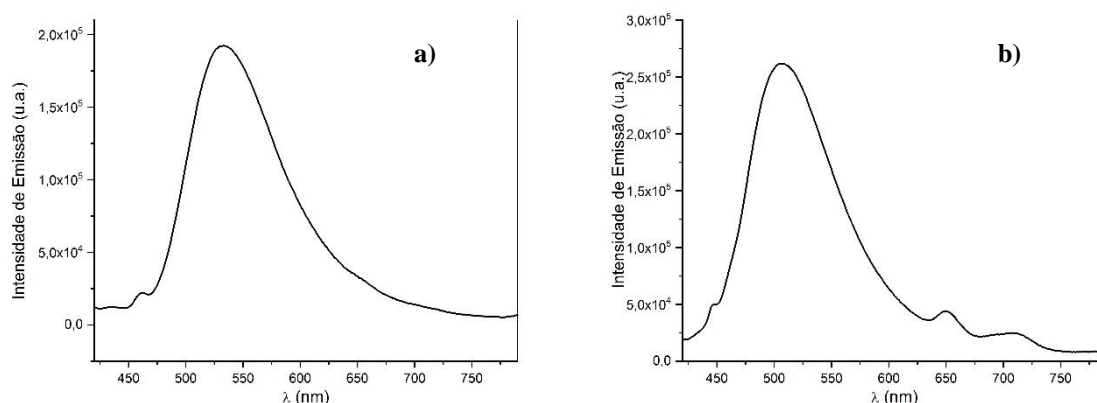


Figura 2.19: a) Espectro de emissão do complexo **12**, Zn(II)Salen, em DMSO; b) Espectro de emissão do complexo **13**, Zn(II)Salen-F, em DMSO

Calculou-se ainda o rendimento quântico de fluorescência de ambos. Para a determinação deste teve-se em conta o método proposto por *Parker*¹³ referido anteriormente. Selecionou-se como referência sulfato de quinino (SQ) em ácido sulfúrico de rendimento quântico de fluorescência igual a $\phi_F = 0.55$ ¹³. Prepararam-se soluções da referência e dos complexos em DMSO de forma a apresentarem no espectro de absorção UV-Visível uma absorvância de aproximadamente 0,2 para a banda. Procedeu-se ao

desarejamento das mesmas e de seguida, registaram-se os respetivos espectros de emissão excitando ao comprimento de onda adequado, $\lambda = 404$ nm.

| Fluorescência λ_{\max} (nm) | |
|-------------------------------------|----------|
| | Φ_F |
| SQ | 0,55 |
| 12 - Zn(II)Salen | 0,27 |
| 13 - Zn(II)Salen-F | 0,22 |

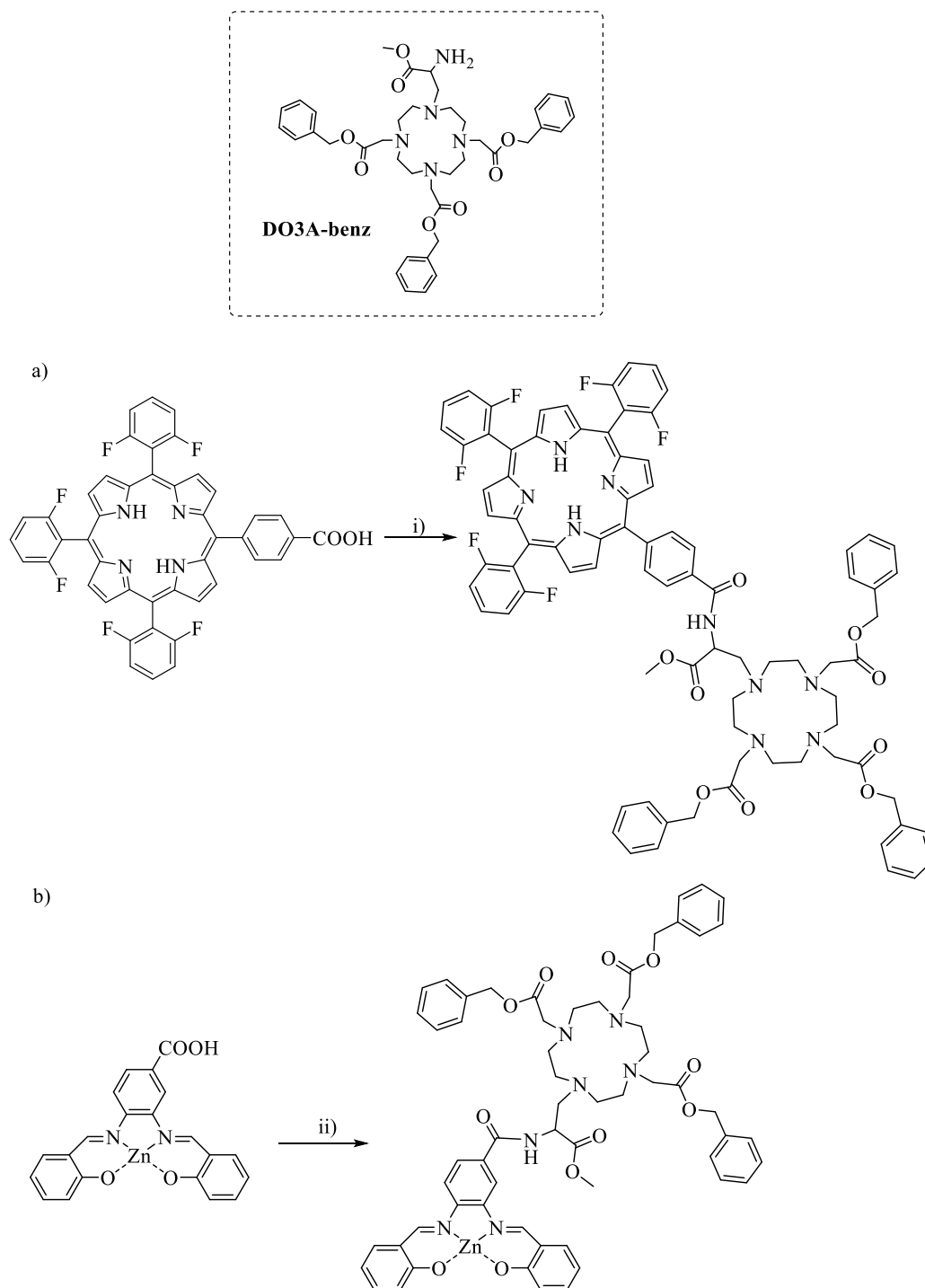
Tabela 2.5: Rendimento Quântico dos complexos de Zn(II)-Salen

Analisando os rendimentos quânticos obtidos verifica-se que são concordantes com os valores encontrados na literatura para derivados de salens²⁸⁻³¹. Além disso, observou-se que o complexo **13**, Zn(II)Salen-F, tem um rendimento quântico de fluorescência menor, devido a presença dos átomos de flúor.

2.4 Síntese de Potenciais Agentes Bimodais

Nas últimas décadas têm surgido na literatura agentes de contraste bimodais com aplicação em imagiologia médica. Estes agentes têm a capacidade de ser utilizados em mais do que uma técnica de imagiologia, como por exemplo, MRI-PET e PET-FI, permitindo assim através da junção das características de cada técnica ultrapassar suas as limitações inerentes. Assim, aumenta-se a eficiência do diagnóstico pelo fornecimento de imagens com melhor precisão e resolução, obtendo informações moleculares e fisiológicas anatómicas dos tecidos com elevada sensibilidade e resolução espacial facilitando, posteriormente, o tratamento das patologias.

Deste modo, o presente trabalho pretendeu ainda desenvolver duas novas entidades químicas bimodais com potencialidade para imagiologia médica, para ¹⁹F-MRI-⁶⁴Cu-PET e ⁶⁴Cu-PET-FI através da junção de entidades monomodais previamente sintetizadas envolvendo as classes de N-ligandos abordadas (Esquema 2.5).



Esquema 2.5: Síntese das díades TDFPP-COOH-DO3A-benz (**14**) e Zn(II)Salen-DO3A-benz (**15**).
 Reagentes e condições reacionais: i) DO3A-benz, DCM, DMF, cloreto de oxalato, 48 horas, refluxo;
 ii) DO3A-benz, DMAP, DCC, DMSO, 48 horas, temperatura ambiente

Mais concretamente, pretendeu-se ligar covalentemente um derivado do DO3A, denominado de DO3A-benz, composto **5**, que possui um grupo amina livre, com a *meso*-arilporfirina **7**, TDFPP-COOH, e com o complexo de salen **12**, Zn(II)Salen, constituídos ambos por um grupo ácido livre, através da formação de uma amida (Esquema 2.5). Nestas duas díades o composto **5**, DO3A-benz, seria radiomarcado com ^{64}Cu permitindo assim a sua aplicação em PET. Por sua vez a porfirina **7**, TDFPPCOOH, e o complexo de salen **12**, Zn(II)Salen, seriam utilizada para ^{19}F -MRI e FI, respetivamente.

Primeiramente, procedeu-se à síntese da *díade 1* -TDFPP-COOH-DO3A-benz, **14**. Para tal, colocou-se num balão a porfirina **7**, TDFPP-COOH, dissolvida em diclorometano (DCM) e dimetilformamida (DMF), ambos os solventes secos. Seguidamente, colocou-se a solução a 0°C e adicionou-se, gota a gota, cloreto de oxailo, ficando a essa temperatura durante 30 minutos. Posteriormente, colocou-se em refluxo durante 3 horas e controlou-se por TLC a formação do cloreto de ácido, o intermediário da reação. Após a formação do intermediário, evaporou-se os produtos voláteis e dissolveu-se novamente o crude obtido em diclorometano seco ao qual se juntou do nosso ligando **5**, DO3A-benz. Adicionaram-se umas gotas de trietilamina à solução e colocou-se em refluxo. A reação foi controlada por TLC e ao fim de 48 horas deu-se por terminada. Evaporou-se o solvente e purificou-se o crude da reação recorrendo a cromatografia em coluna de sílica gel. Inicialmente, utilizou-se como eluente diclorometano, e posteriormente procedeu-se a um aumento da polaridade efetuando um gradiente com acetato de etilo. Após evaporação do solvente obteve-se a *díade 1* que foi caracterizada recorrendo a espectroscopia de ressonância magnética nuclear de protão e de flúor, ^1H -RMN e ^{19}F -RMN, e espectrometria de massa.

Na figura 2.20, encontra-se o espectro de ^1H -RMN da *díade 1*, em CDCl_3 , no qual se destacam 9 sinais. Na zona dos aromáticos encontram-se um multiplete correspondente aos oito átomos hidrogénios β -pirrólicos com um desvio químico de 8,88 ppm, seguindo-se outro multiplete derivado dos 6 átomos de hidrogénio nas posições *meta* do grupo fenilo fluorado entre 8,10 e 8,53 ppm, depois temos novamente um multiplete a 7,79 ppm referente aos 4 átomos de hidrogénio do grupo fenilo substituído em *para* com o grupo carboxilo, por fim apresenta-se também um multiplete entre 7,33 e 7,41 ppm composto pelos 15 átomos de hidrogénio do grupo benzilo do derivado DO3A-benz e pelos 3 átomos de hidrogénio na posição *para* do grupo fenilo fluorado. Para menores desvios químicos (entre 5,37 e 2,84 ppm) encontram-se os restantes protões do cicleno.

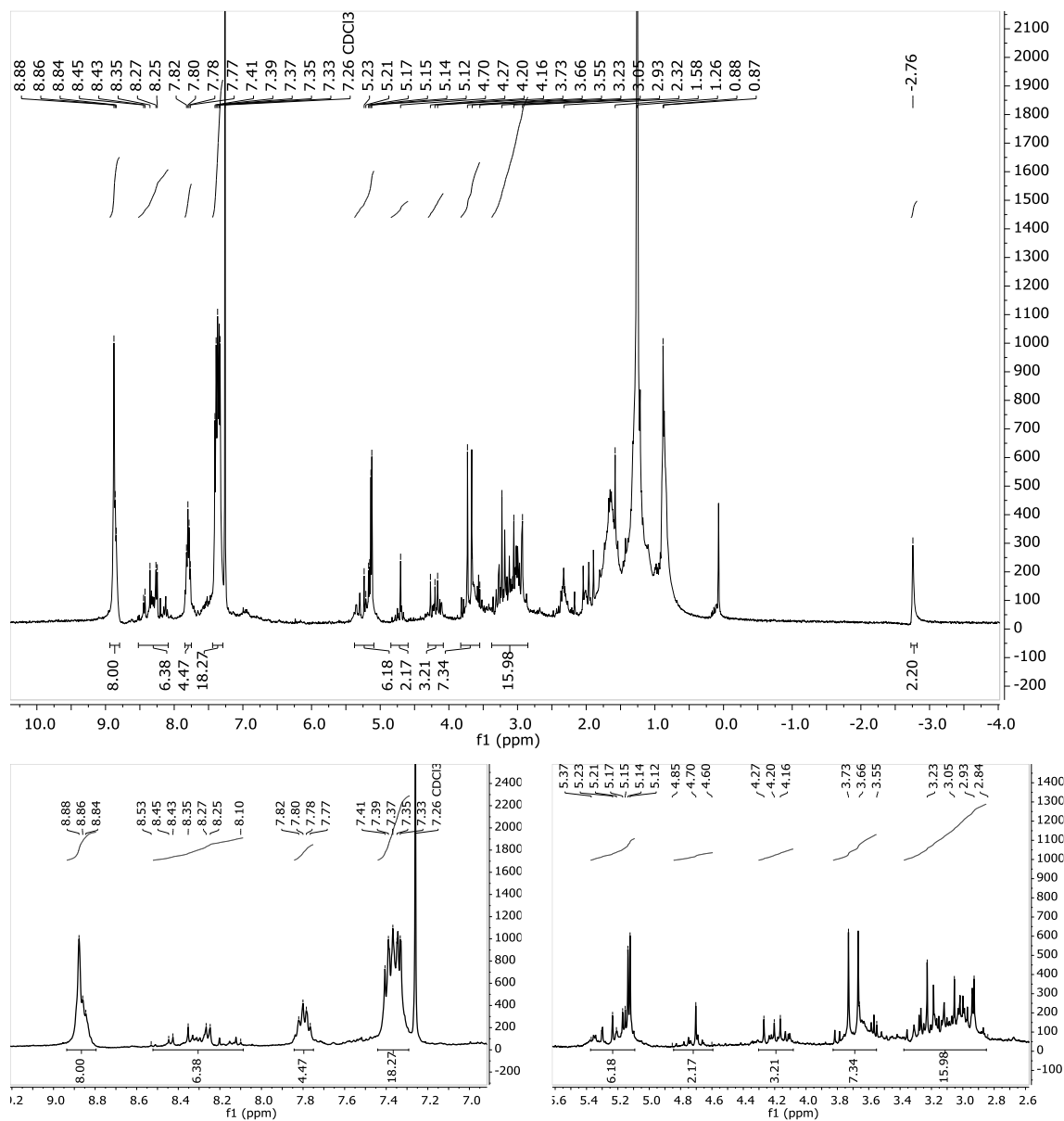


Figura 2.20: Espectro de $^1\text{H-NMR}$ da *díade 1*, TDFPP-COOH-DO3A-benz, **14**, e respectivas ampliações

Além do espectro de $^1\text{H-NMR}$, obteve-se também o espectro de $^{19}\text{F-NMR}$ que se encontra descrito no capítulo 3.

De modo a completar a caracterização acima referida realizou-se ainda espectrometria de massa do qual se salientam três picos no espectro. O pico de 1526,89 m/z correspondente a $[\text{M}+\text{Na}+\text{K}+\text{H}]^+$ e os picos 850,13 m/z e 617,29 m/z que correspondem à clivagem da *díade* pelo átomo de nitrogénio do anel do cicleno substituído com o braço aminopropionato.

Por sua vez, para a síntese da *diáde 2* - Zn(II)Salen-DO3A-benz - juntou-se o complexo **12**, Zn(II)Salen, ao qual se adicionou DMAP e DCC e por fim, adicionou-se dissolvido em DMSO seco o composto **5**, DO3A-benz. Deixou-se a reação em agitação e à temperatura ambiente controlando-se por TLC. Após 48 horas desligou-se a reação e de modo a obter o nosso composto puro realizou-se uma precipitação com éter dietílico. Identicamente à *diáde 1*, o Zn(II)Salen-DO3A-benz também foi caracterizado recorrendo a espectroscopia de ressonância magnética nuclear de protão e de flúor, $^1\text{H-RMN}$ e $^{19}\text{F-RMN}$, que se encontram descritos no capítulo 3.

Devido ao curto espaço de tempo para a realização deste projeto não foi possível obter os produtos finais radiomarcados com ^{64}Cu pelo que será realizado futuramente em colaboração com o Prof. Rafael Rosales - King's College London, Londres e o Prof. Antero Abrunhosa – ICNAS.

2.5 Conclusão

O presente trabalho teve como objetivo a síntese de ligandos nitrogenados envolvendo três diferentes classes de compostos: derivados do cicleno, *meso*-arilporfirinas e complexos de salen, para potencial aplicação em imagiologia médica.

Foi possível sintetizar por diferentes passos sintéticos o derivado do cicleno denominado DO3A-benz (**5**). Este possui na sua estrutura um grupo amina livre, que possibilita a sua ligação covalente a outros ligandos contendo o grupo terminal carboxílico. O DO3A-benz (**5**) e os respetivos intermediários foram obtidos com rendimentos superiores a 70%. Tendo como finalidade atuar como unidade em PET através da marcação com o radioisótopo ^{64}Cu , realizou-se ainda a complexação a frio do ligando desprotegido com CuCl_2 .

De seguida, procedeu-se à síntese de *meso*-arilporfirina onde tanto o método do nitrobenzeno (Método A) como o método do NaY (Método B) foram boas alternativas para sintetizar as três porfirinas fluoradas para potencial aplicação em ^{19}F -MRI. Assim, obteve-se a 5-(4-carboxifenil)-10,15,20-*tris*(2,6-difluorofenil)porfirina (TDFPP-COOH) (**7**), a 5,10,15,20-*tetraquis*(2-fluorofenil)porfirina (TPP-*o*-F) (**8**) e a 5,10,15,20-*tetraquis*(4-trifluorometilfenil)porfirina (TPP-*p*-CF₃) (**10**), com rendimentos dependendo do método de síntese selecionado. Para a porfirina TDFPP-COOH obtiveram-se rendimentos de 5% (Método A) e 7% (Método B), para a TPP-*o*-F de 18% (Método A) e 30% (Método B) e para a TPP-*p*-CF₃ de 10% (Método A) e 19% (Método B). Daqui pode concluir-se que para a carboxiporfirina obteve-se rendimentos semelhantes em ambos os métodos usados, enquanto que as porfirinas fluoradas menos polares dão resultados significativamente melhores para o método do Nitrobenzeno/NaY. Após a síntese da porfirina TPP-*o*-F e TPP-*p*-CF₃ procedeu-se à sua complexação com acetato de manganésio, um metal paramagnético, com vista a avaliar o efeito deste no espetro de flúor, tendo-se obtido rendimentos superiores a 80%. Observou-se que para a TPP-*o*-F a presença do átomo paramagnético provocou um alargamento do sinal no espetro de ^{19}F -RMN, enquanto que para a TPP-*p*-CF₃ com as átomos de flúor a uma maior distância não se observou qualquer tipo de interferência. A racionalização destes estudos continua em curso no projeto de colaboração entre o laboratório de Catálise & Química Fina e o laboratório de RMN, da Universidade de Coimbra.

Tendo em vista comparar futuramente o efeito da estrutura do ligando na seletividade das sondas para células tumorais sintetizaram-se ainda dois complexos de salen: N,N-bis((-2-hidroxibenzilideno)amino)benzoato de zinco(II) (Zn(II)Salen) (**12**) e N,N-bis((4-fluoro-2-hidroxibenzilideno)amino)benzoato de zinco(II) (Zn(II)Salen-F) (**13**), com rendimentos de 71% e 97%, respectivamente. Estes devido aos seus rendimentos quânticos de fluorescência entre 0,2 e 0,3 têm como principal objetivo a aplicação como sondas fluorescentes para FI.

Completados os objetivos iniciais os novos ligandos sintetizados permitiram sintetizar duas díades nas quais se ligou covalentemente o derivado DO3A-benz (**5**) com o seu terminal amina livre com a porfirina TDFPP-COOH (**7**) e com o complexo de salen Zn(II)-Salen (**12**), que possuem um terminal carboxílico livre, originando assim duas díades 1 e 2. Deste modo, conseguiu-se obter duas novas entidades químicas potencialmente para aplicação como sondas bimodais para imagiologia médica combinando as técnicas ¹⁹F-MRI-PET e FI-PET, respectivamente.

O objetivo central desta dissertação foi alcançado tendo-se sintetizado vários ligandos nitrogenados pertencentes a diferentes famílias de compostos e ainda alguns complexos metálicos. Este trabalho abre perspectivas futuras para se implementar a radiomarcagem das díades sintetizadas e seguidamente a sua avaliação *in vitro* e *in vivo* para imagiologia médica de tumores pequenos. Para melhorar as sondas devemos aumentar a biocompatibilidade das moléculas e introduzir-lhe vetores capazes de aumentar a sua seletividade.

2.6 Referências

- (1) Ferreira, P. M. T.; Maia, H. L. S.; Monteiro, L. S.; Sacramento, J. *J. Chem. Soc.* **1999**, *1*, 3697.
- (2) Ferreira, M. F.; Martins, A. F.; Martins, J. A.; Ferreira, P. M.; Toth, E.; Geraldès, C. F. *Chem Commun (Camb)* **2009**, *42*, 6475.
- (3) Gonçalves, A. M. d. A. R.; Varejão, J. M. T. B.; Pereira, M. M. *J. Heterocyclic Chem.* **1991**, *28*, 635.
- (4) Silva, M.; Fernandes, A.; Bebiano, S. S.; Calvete, M. J.; Ribeiro, M. F.; Burrows, H. D.; Pereira, M. M. *Chem Commun (Camb)* **2014**, *50*, 6571.
- (5) Platt, J. R. *The Journal of Chemical Physics* **1950**, *18*, 1168.
- (6) Gouterman, M. *J Mol Spectrosc* **1961**, *6*, 138.
- (7) Stern, A.; Wenderlein, H. *Phys. Chem.* **1936**, *176A*, 81.
- (8) Valeur, B. *Molecular Fluorescence Principles And Applications*; Wiley-VCH, 2001; Vol. 2.
- (9) Longuet-Higgins, H. C.; Rector, C. W.; Platt, J. R. *The Journal of Chemical Physics* **1950**, *18*, 1174.
- (10) Monteiro, C. J. P.; Pereira, M. M.; Pinto, S. M. A.; Simões, A. V. C.; Sá, G. F. F.; Arnaut, L. G.; Formosinho, S. J.; Simões, S.; Wyatt, M. F. *Tetrahedron* **2008**, *64*, 5132.
- (11) Kooriyaden, F. R.; Sujatha, S.; Arunkumar, C. *Polyhedron* **2015**, *97*, 66.
- (12) Kasha, M. *Disc. Faraday Soc.* **1950**, *9*, 14.
- (13) Parker, C. A.; Rees, W. T. *Analyst* **1960**, *85*, 587.
- (14) Pineiro, M.; Carvalho, A. L.; Pereira, M. M.; Gonsalves, A. M. d. A. R.; Arnaut, L. G.; Formosinho, S. J. *Chem. Eur. J.* **1998**, *4*, 2299.
- (15) Grancho, J. C. P.; Pereira, M. M.; Miguel, M. d. G.; Gonsalves, A. M. d. A. R.; Burrows, H. D. *Photochem Photobiol* **2002**, *75*, 249.
- (16) Pineiro, M.; Pereira, M. M.; Gonsalves, A. M. d. A. R.; Arnaut, L. G.; Formosinho, S. J. *J Photoch Photobio A* **2001**, *138*, 147.
- (17) Harvey, P.; Kuprov, I.; Parker, D. *Eur J Inorg Chem* **2012**, *2012*, 2015.
- (18) Peterson, K. L.; Srivastava, K.; Pierre, V. C. *Front Chem* **2018**, *6*, 160.
- (19) Senanayake, P. K.; Kenwright, A. M.; Parker, D.; van der Hoorn, S. K. *Chem Commun (Camb)* **2007**, *28*, 2923.
- (20) Tirota, I.; Dichiarante, V.; Pigliacelli, C.; Cavallo, G.; Terraneo, G.; Bombelli, F. B.; Metrangolo, P.; Resnati, G. *Chem Rev* **2015**, *115*, 1106.
- (21) Eguchi, H.; Umemura, M.; Kurotani, R.; Fukumura, H.; Sato, I.; Kim, J. H.; Hoshino, Y.; Lee, J.; Amemiya, N.; Sato, M.; Hirata, K.; Singh, D. J.; Masuda, T.; Yamamoto, M.; Urano, T.; Yoshida, K.; Tanigaki, K.; Yamamoto, M.; Sato, M.; Inoue, S.; Aoki, I.; Ishikawa, Y. *Sci Rep* **2015**, *5*, 9194.
- (22) Yin, H.-Y.; Tang, J.; Zhang, J.-L. *Eur J Inorg Chem* **2017**, *2017*, 5085.
- (23) Fernandez-Moreira, V.; Thorp-Greenwood, F. L.; Coogan, M. P. *Chem Commun (Camb)* **2010**, *46*, 186.
- (24) Jing, J.; Chen, J.-J.; Hai, Y.; Zhan, J.; Xu, P.; Zhang, J.-L. *Chem Sci* **2012**, *3*, 3315.
- (25) Cheng, J.; Li, Y.; Sun, R.; Liu, J.; Gou, F.; Zhou, X.; Xiang, H.; Liu, J. *J Mater Chem C* **2015**, *3*, 11099.
- (26) Jing, J.; Zhang, J.-L. *Chem Sci* **2013**, *4*, 2947.
- (27) Hai, Y.; Chen, J. J.; Zhao, P.; Lv, H.; Yu, Y.; Xu, P.; Zhang, J. L. *Chem Commun (Camb)* **2011**, *47*, 2435.
- (28) Xie, D.; Jing, J.; Cai, Y.-B.; Tang, J.; Chen, J.-J.; Zhang, J.-L. *Chem Sci* **2014**, *5*, 2318.
- (29) Zhou, L.; Cai, P.; Feng, Y.; Cheng, J.; Xiang, H.; Liu, J.; Wu, D.; Zhou, X. *Anal Chim Acta* **2012**, *735*, 96.
- (30) Tang, J.; Xie, D.; Yin, H. Y.; Jing, J.; Zhang, J. L. *Org Biomol Chem* **2016**, *14*, 3360.
- (31) Shen, G.; Gou, F.; Cheng, J.; Zhang, X.; Zhou, X.; Xiang, H. *RSC Advances* **2017**, *7*, 40640.

Capítulo 3

Experimental

Este capítulo encontra-se dividido em três partes. Na primeira parte (3.1) é apresentada toda a informação correspondente aos solventes e reagentes, segue-se a segunda parte (3.2) onde se encontra descrita a informação de todas as técnicas e instrumentação utilizada no decorrer do trabalho descrito, culminando com a última parte (3.3.) referente à descrição da síntese e caracterização dos compostos sintetizados presentes no capítulo 2.

3.1 Solventes de Reagentes

Os reagentes e solventes utilizados foram adquiridos à *Sigma-Aldrich*, *Fluorochem*, *Merck*. Os reagentes foram utilizados diretamente com a pureza descrita pelo fornecedor, no entanto, todos os solventes utilizados na síntese e cromatografia em coluna foram, sempre que necessário, purificados por destilação simples ou secos através de procedimentos *standard* descritos na literatura.¹ O clorofórmio deuterado, utilizado nos espectros de RMN foi previamente neutralizado numa coluna de alumina de grau I antes da sua utilização.

3.2 Técnicas e Instrumentação

I. Cromatografia de camada fina

A cromatografia em camada fina (TLC) é uma técnica analítica utilizada para o controlo reacional, permitindo avaliar a evolução da reação química. Foram utilizadas placas revestidas com gel de sílica 60 (*Merck*) contendo um indicador de fluorescência UV₂₅₄. O eluente usado variou consoante a reação em estudo. Sempre que necessário foi utilizada uma solução de permanganato de potássio para a deteção de grupos amina. Esta solução oxida os compostos de forma não específica e no local onde estes se encontram o permanganato reduz-se e descora, permitindo a deteção de compostos.

II. Cromatografia de adsorção em coluna

A cromatografia de adsorção em coluna é uma técnica analítica que permite a separação, isolamento e purificação de compostos químicos numa mistura. Alguns compostos sintetizados foram purificados recorrendo a esta técnica, utilizando gel de sílica 60 (Sigma-Aldrich) como fase estacionária e o eluente mais adequado indicado nas respetivas sínteses.

III. Cromatografia *flash*

A cromatografia *flash* é uma técnica analítica, utilizada para separação, isolamento e purificação de compostos químicos numa mistura em alternativa à cromatografia de adsorção em coluna. Difere da técnica anterior referida em dois grandes pontos: no tamanho das partículas de sílica (250-400 mesh) e no fluxo controlado de solvente. Deste modo, recorreu-se a esta técnica para purificação dos produtos da reação sempre que necessário. Utilizou-se como equipamento PuriFlash 420® Interchim do Departamento de Química da Universidade de Coimbra, incorporado com uma coluna de sílica HP F0025 (30 µm) usando o eluente apropriado.

IV. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)

Os espectros de ressonância magnética nuclear de próton (^1H), de carbono (^{13}C) e de flúor (^{19}F) foram obtidos num espectrómetro *BrukerAvance* 400, 101 e 376,5 MHz respetivamente, do Departamento de Química da Faculdade de Ciências da Universidade de Coimbra. Nos dois primeiros usa-se como padrão interno o tetrametilsilano ($\delta=0,00$ ppm) e no terceiro TFA ($\delta=-76,55$ ppm). O solvente deuterado utilizado depende da solubilidade dos compostos. Os desvios químicos (δ) são expressos em partes por milhão (ppm), e as constantes de acoplamento (J) expressas em Hertz (Hz). Os dados obtidos encontram-se indicados pela seguinte ordem:

-Núcleo (frequência do aparelho, solvente): desvio químico (δ , ppm), multiplicidade do sinal (s-singuleto; d- duplete; dd- duplo duplete; t- triplete; m- multiplete), constante de acoplamento (J, em Hertz), intensidade relativa (nH, número de prótons).

V. Espectroscopia de absorção Ultravioleta-Visível

Os espectros de UV-Visível foram obtidos no espectrofotómetro Hitachi U-2001, usando células de vidro de duas faces com 1 cm de percurso ótico, utilizando como referência o solvente utilizado. Os coeficientes de absorção molar foram determinados após a preparação de soluções entre 10^{-7} e 10^{-4} M nos solventes apresentados no capítulo 2, utilizando sempre estes como referência. Representou-se graficamente a absorção para o máximo da banda considerada em função da concentração das diferentes soluções, obtendo-se uma reta cujo valor do declive corresponde ao valor do coeficiente de absorvidade molar. Este cálculo é possível recorrendo à lei de *Beer-Lambert*, $A=\epsilon bc$, onde A é a absorvância, ϵ é o coeficiente de absorvidade molar, b é o caminho óptico percorrido pela luz e c é a concentração da solução.

VI. Espectroscopia de Fluorescência

Os espectros de emissão de fluorescência foram obtidos no espectrofluorímetro Horiba Fluoromax-4, utilizando células de quartzo Hellma Analytics de quatro faces com percurso ótico de 1 cm.

Rendimento quântico

Para efetuar o cálculo do rendimento quântico de fluorescência seguiu-se a metodologia publicada na literatura².

No caso das porfirinas utilizou-se como referência a 5,10,15,20-tetrafenilporfirina (TPP) dissolvida em tolueno cujo rendimento quântico de fluorescência é $\phi_F=0,11^3$ e para os complexos de salen usou-se sulfato de quinino (SQ) em ácido sulfúrico de rendimento quântico de fluorescência igual a $\phi_F=0,55^2$. Preparou-se soluções das referências e dos compostos cujo rendimento se quer determinar em tolueno ou em DMSO, consoante a solubilidade dos compostos, de forma a apresentarem no espectro de absorção UV-visível uma absorvância de aproximadamente 0,2 para a banda Soret. Procedeu-se ao desarejamento das mesmas e de seguida, registaram-se os respetivos espectros de emissão excitando ao comprimento de onda adequado a cada amostra. Por fim, os rendimentos quânticos de fluorescência foram então calculados por comparação da integração da área dos espectros de emissão de fluorescência das referências com as áreas dos espectros dos compostos sintetizados, com recurso à equação:

$$\Phi_F(\text{amostra}) = \frac{\text{Área (amostra)}}{\text{Área (ref.)}} * \frac{\text{Abs (ref.)}}{\text{Abs (amostra)}} * \frac{\eta^2(\text{amostra})}{\eta^2(\text{ref.})} * \Phi_F(\text{ref.})$$

Nesta, a área refere-se à integração do espectro de emissão, Abs à absorvância correspondente ao comprimento de onda de excitação e η ao índice de refração do solvente no qual a amostra e a referência se encontram dissolvidos, podendo este termo ser anulado quando o solvente utilizado é o mesmo.

VII. Espetrometria de massa (MS)

Os espectros de massa ESI-MS foram realizados num espectrómetro *Amazon Speed E-TD Bruker Daltonics* e os de MALDI-TOF num espectrómetro *Maldi Ultraflex extreme Bruker Daltonics*, na Universidade de São Paulo, Brasil.

VIII. Ultra-sons / Sonicação

De modo a facilitar a dissolução dos compostos utilizou-se, sempre que necessário, como sistema de ultrassons o aparelho da marca *Bandelin Sonorex TK52* do Departamento de Química da Universidade de Coimbra.

3.3 Síntese e Caracterização dos Compostos

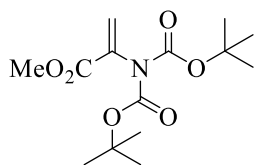
3.3.1 Síntese do DO₃A-*N*- α -aminoproprianato

(2) Boc₂- Δ -AlaOMe

Juntou-se num balão de fundo redondo Boc-Ser-OMe (**1**) (1,8412 mL; 0,0091 mol), DMAP (0,222 g; 0,00182 mol) e dicarbonato de tert-butilo (0,0276 g; 0,0273 mol) dissolvidos em acetonitrilo (10 mL). Colocou-se à temperatura ambiente e agitação vigorosa durante 24 horas e após verificação por TLC o consumo do material de partida e a formação de um novo produto terminou-se a reação. Evaporou-se o solvente e dissolveu-se novamente o produto obtido em éter etílico. De seguida, realizaram-se várias extrações com uma solução 1M de bissulfato de potássio (KHSO₄, 4x), uma solução 1M de bicarbonato de sódio (NaHCO₃, 4x), uma solução 1M de cloreto de sódio (NaCl, 2x) e, por fim, água destilada. Secou-se a fase orgânica com sulfato de sódio anidro e, após filtração deste, evaporou-se o solvente. A caracterização do composto **2** encontra-se de acordo com a literatura⁴.

Rendimento: 79% (2.16 g)

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) (δ , ppm): 6,27 (s; 1H); 5,58 (s; 1H); 3,73 (s; 3H); 1,42 (s; 18H).

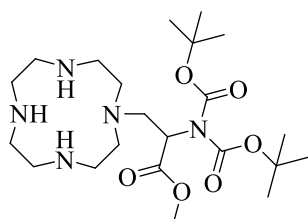


RMN ¹³C: (100.6 MHz, CDCl₃) (δ , ppm): 163,9 (CH₃O-C=O); 150,5 (N-C=O); 136,0 (N-C=CH₂); 105,0 (CH₂); 80,0 (C(CH₃)₃); 52,2 (-OCH₃); 27,2 (C(CH₃)₃).

MS (HRMS-ESI-TOF) [M+H]⁺, m/z: 302,4510; calculado para [C₁₄H₂₃NO₆]: 301,1532

(3) 2-(bis(tert-butoxicarbonil)amino)-3-(1,4,7,10-tetraaza-ciclododecano-1-il)propanoato de metilo

Num balão de fundo redondo colocou-se 1,4,7,10-tetraaza-ciclododecano (2 g; 0,01124 mol), carbonato de potássio (3 g; 0,0236 mol) e acetonitrilo (70 mL). Seguidamente, controladamente adicionou-se Boc₂-Δ-AlaOMe (2) (2 g; 7,96×10⁻³ mol) e colocou-se à temperatura ambiente, com agitação vigorosa, durante 24h. Após verificar-se por TLC que a reação tinha terminado, filtrou-se o K₂CO₃ e evaporou-se o solvente. A purificação do produto obtido foi efetuada recorrendo a cromatografia *flash* utilizando como eluente diclorometano-etanol-amónia-água 50:50:1:1. Por fim, evaporou-se o solvente e colocou-se sob vácuo. Os dados espectroscópicos do composto **3** estão de acordo com os descritos na literatura⁵.



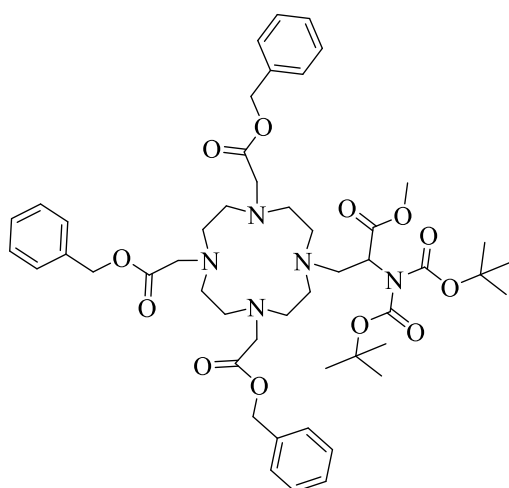
Rendimento: 77% (2.90 g)

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) (δ, ppm): 4,93 (m; 1H); 3,65 (s; 3H); 3,43 (dd; *J* = 14.3, 5.6 Hz; 2H); 2,82 (m; 16H); 1,44 (s; 18H).

MS (HRMS-ESI-TOF) [M]⁺, *m/z*: 474,3286; calculado para [C₂₂H₄₄N₅O₆]: 474,3292

(4) tribenzil-2,2',2''-(10-(2-(bis(tert-butoxicarbonil)amino)-3-metoxi-3-oxopropil)-1,4,7,10-tetraaza-ciclododecano-1,4,7-triil)triacetato

A uma solução contendo o composto **3** (2,5722 g, 5,425×10⁻³ mol), dissolvido em acetonitrilo (25 mL), juntou-se carbonato de potássio (4,50 g, 3,25×10⁻² mol). Seguidamente, adicionou-se bromoacetato de benzilo (3 mL, 1,90×10⁻² mol) e colocou-se a reação em agitação vigorosa durante 6 horas à temperatura ambiente. Controlou-se a reação por TLC e após ter verificado o consumo do reagente de partida, filtrou-se a base e evaporou-se o solvente. O crude obtido foi purificado por cromatografia em coluna de gel de sílica utilizando inicialmente como eluente diclorometano (100%), seguido de diclorometano:etanol (50:50) terminado com 100% de etanol. Evaporou-se o solvente.

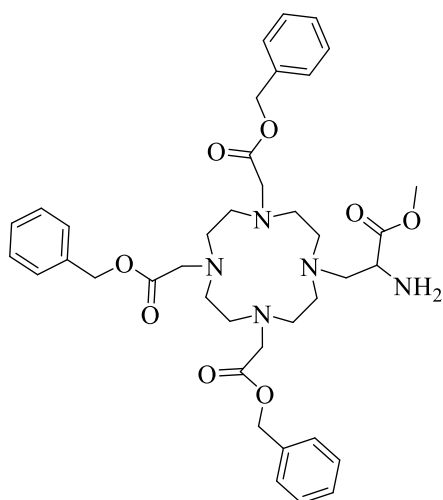


Rendimento: 71 % (3,54 g)

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) (δ, ppm): 7,33 (m; 15H); 5,18-5,04 (m; 6H); 3,80-2,33 (m; 28H); 1,47 (m; 18H).

(5) tribenzil-2,2',2''-(10-(2-amino-3-metoxi-3-oxopropil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7-triil)triacetato (DO3A-benz)

Após obtenção do produto **4** procedeu-se à desproteção seletiva do grupo protetor tert-butoxicarbonilo (Boc). Para isso, num balão de fundo redondo, dissolveu-se o composto **4** (3,5482 g, 3,865×10⁻³ mol) em diclorometano (45 mL) e 10% de TFA (4.5 mL). Colocou-se a reação em agitação vigorosa à temperatura ambiente durante 24 horas. O composto obtido foi submetido a várias lavagens (dissolução seguida de evaporação) com diclorometano de modo a retirar o ácido. Após a evaporação do solvente colocou-se o produto sob vácuo.



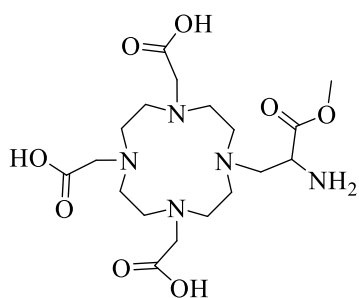
Rendimento: 83% (2,30 g)

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) (δ, ppm): 7,40-7,28 (m; 15H); 5,23-5,07 (m; 6H); 3,98-2,10 (m; 28H). A ausência do pico a 1,47 ppm indica que o grupo protetor foi eficazmente removido.

MS (MALDI-TOF) [M+H]⁺, m/z: 718,27; calculado para [C₃₉H₅₁N₅O₈]: 717,37

(6) **Ácido 2,2',2''-(10-(2-amino-3-methoxi-3-oxopropil)-1,4,7,10-tetraaza-ciclododecano-1,4,7-triil)triacético**

Com o objetivo de obter o nosso ligando todo desprotegido, colocou-se num tubo no reator uma amostra do composto **5** (50 mg, $6,97 \times 10^{-5}$) à qual se adicionou Pd/C (5%) (23 mg, $2,16 \times 10^{-4}$). Estes foram dissolvidos em Tolueno (5 mL). Realizaram-se dois ciclos de hidrogénio para colocar o reator sob vácuo e seguidamente colocou-se sob uma pressão de 10 bar a 80°C com agitação. Após 48 horas desligou-se a reação. Decantou-se o tolueno e analisando por TLC não se detetou a presença de reagentes. O sólido depositado foi dissolvido em água recorrendo a ultrassons. Filtrou-se a solução para remover o Pd/C. Realizou-se TLC da água que comprovou após revelação com uma solução de permanganato a presença de composto. Colocou-se a água no congelador e seguidamente liofilizou-se a amostra.



Rendimento: 77% (24 mg)

RMN ¹H (400 MHz, D₂O) (δ, ppm): 4,60-2,80 (m; 28H).

3.3.2 Síntese de *meso*-arilporfirinas e complexos

Método A: Procedimento geral do método do Nitrobenzeno: Num balão de 500 mL, colocou-se 210 mL de ácido acético glacial e 105 mL de nitrobenzeno. A mistura foi aquecida até a temperatura de 140°C e seguidamente adicionou-se 60 mmol de aldeído (ou mistura de aldeídos), 4.2 mL (60 mmol) de pirrole, gota a gota. Deixou-se a reação em refluxo e agitação durante 1 hora. No caso de porfirinas simétricas, após terminar a reação, adicionou-se metanol, colocou-se no frigorífico durante a noite e filtrou-se o precipitado obtido. Na obtenção de porfirinas não simétricas (com mistura de aldeídos) evaporaram-se os solventes a pressão reduzida e purificou-se o composto por coluna cromatográfica de gel de sílica.

(Método do Nitrobenzeno para a síntese de *meso*-arilporfirinas desenvolvido por *Pereira*⁶)

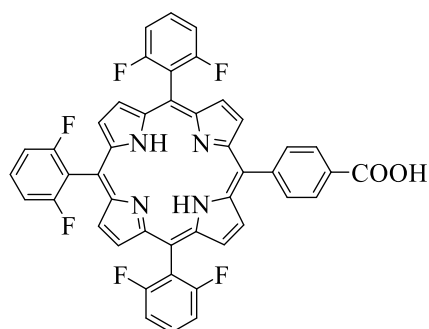
Método B: Procedimento geral do método do Nitrobenzeno/NaY: Num balão de 1L, colocou-se 210 mL de ácido acético glacial e 105 mL de nitrobenzeno. A mistura foi aquecida até a temperatura de 140°C e seguidamente adicionou-se 60 mmol de aldeído (ou mistura de aldeídos), 4.2 mL (60 mmol) de pirrole, gota a gota, e 20 g (0,179 mol) de NaY. Deixou-se a reação em refluxo durante 2 horas. Posteriormente, filtrou-se o NaY (a quente) efetuando várias lavagens com THF. No caso de porfirinas simétricas adicionou-se metanol, colocou-se no frigorífico durante a noite e filtrou-se o precipitado obtido. Na obtenção de porfirinas não simétricas (com mistura de aldeídos) evaporaram-se os solventes a pressão reduzida e purificou-se o composto por coluna cromatográfica de gel de sílica.

(Método do Nitrobenzeno/NaY para a síntese de *meso*-arilporfirinas desenvolvido por *Pereira*⁷ sob algumas modificações do método anteriormente referido)

(7) 5-(4-carboxifenil)-10,15,20-tris(2,6-difluorofenil)porfirina (TDFPP-COOH)

Utilizando o procedimento geral do método do nitrobenzeno/NaY (Método B) juntou-se 4-carboxibenzaldeído (2,25 g/ 15 mmol) e 2,6-difluorobenzaldeído (4,85 mL/ 45 mmol). A purificação do crude foi realizada por cromatografia em coluna de sílica gel com aplicação a seco. Inicialmente utilizou-se como eluente *n*-hexano com vista a retirar o nitrobenzeno ainda presente e seguidamente aumentou-se gradualmente a polaridade do eluente começado com diclorometano e terminando com etanol para retirar o nosso composto. Evaporou-se o solvente.

Rendimento: *Método A:* 5% (601 mg); *Método B:* 7% (842 mg).



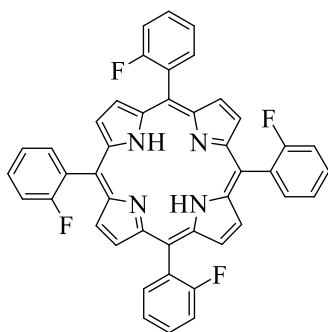
RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) (δ, ppm): 8,92-8,83 (m; *J* = 17.9, 14.7, 4.8 Hz; 8H_β); 8,47 (d; *J* = 7.8 Hz; 2H_{Ar}); 8,26 (d; *J* = 7.7 Hz; 2H_{Ar}); 7,83-7,73 (m; 3H_{Ar}); 7,40-7,35 (m; *J* = 8.4, 6.1, Hz 6H_{Ar}); -2,74 (s; 2H_{N-H}).

RMN ¹⁹F (376 MHz, CDCl₃) (δ, ppm): -108,21 (s; 2F); -108,35 (s; 4F)

UV-vis (CH₂Cl₂): λ_{max}, nm (ε, M⁻¹.cm⁻¹) 412 nm (2,9×10⁵); 507,5 nm (1,8×10⁴); 538 nm (5,4×10³); 585 nm (7,3×10³); 652 nm (3,0×10³).

(8) 5,10,15,20-Tetraquis(2-fluorofenil)porfirina (TPP-*o*-F)

Na síntese desta porfirina efetuou-se o procedimento geral do método do nitrobenzeno (Método A) e do método do nitrobenzeno/NaY (Método B) para os quais se utilizou o 2-fluorobenzaldeído (6,32 mL).



Rendimento: *Método A:* 18% (1.854 g); *Método B:* 30% (3,09 g)

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) (δ , ppm): 8,84 (s; 8H_β); 8,15-8,09 (m; 4H_{Ar}); 7,78-7,76 (m; 4H_{Ar}); 7,58-7,49 (m; 8H_{Ar}); -2,20 (s; $2\text{H}_{\text{N-H}}$).

RMN ^{19}F (376 MHz, CDCl_3) (δ , ppm): -111,74-110,95 (m; 4F , *o*-F)

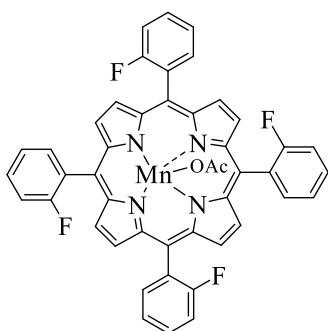
MS (HRMS-EI) $[\text{M}]^+$, m/z : 686,2086; calculado para $[\text{C}_{44}\text{H}_{26}\text{N}_5\text{F}_4]$: 686,2088

UV-vis (Tolueno): λ_{max} , nm (ϵ , $\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) 417 ($5,0 \times 10^5$) 512 ($2,4 \times 10^4$); 545 ($7,6 \times 10^3$); 588 ($6,9 \times 10^3$); 652 ($6,0 \times 10^3$).

(9) 5,10,15,20-Tetraquis(2-fluorofenil)porfirinato de mangans (II)

(Mn(II)-TPP-*o*-F)

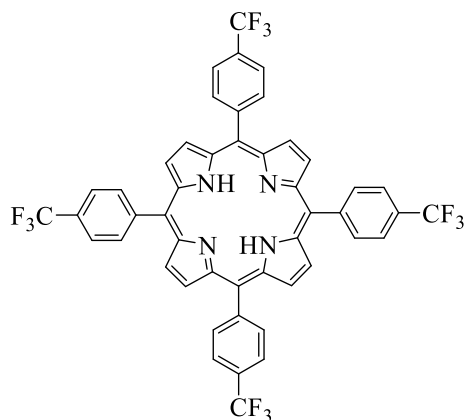
Num balão, colocou-se a TPP-*o*-F (100 mg/ $1,45 \times 10^{-4}$ mol) e acetato de Mn(II) dissolvidos (214 mg/ $8,74 \times 10^{-4}$ mol) em 2 mL de DMF. Deixou-se a reação sob agitação a 80°C . Controlou-se a formação do complexo por espectroscopia UV-Visível e após 24 horas desligou-se a reação. Realizou-se várias extrações com CH_2Cl_2 e água. Adicionou-se agente secante à fase orgânica, filtrou-se o solvente e evaporou-se.



Rendimento: 86% (92,2 mg)

(10) 5,10,15,20-tetraquis(4-trifluorometilfenil)porfirina (TPP-*p*-CF₃)

Na síntese desta porfirina seguiu-se o procedimento geral do método do nitrobenzeno (Método A) e do método do nitrobenzeno/NaY (Método B) utilizando-se em ambos o 4-trifluorometilbenzaldeído (8,19 mL). Após o *términus* da reação, adicionou-se água fria e deixou-se à temperatura ambiente durante a noite. Filtrou-se o sólido e secou-se sob vácuo.



Rendimento: Método A: 10% (1,33 g); Método B: 19% (2,53 g)

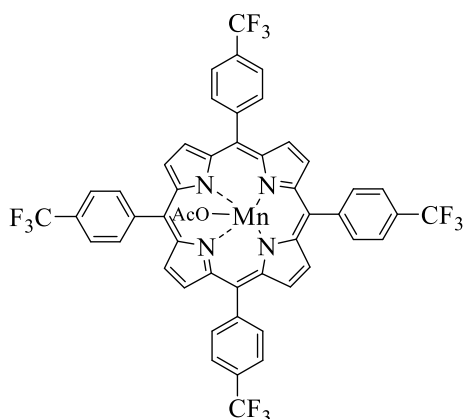
RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) (ppm): 8,79 (s, 8H_β); 8,33-8,30 (d, *J* = 8.0 Hz, 8H_{Ar}); 8,05 (d, *J* = 8.0 Hz, 8H_{Ar}); -2,81 (s, 2H_{N-H}).

RMN ¹⁹F (376 MHz, CDCl₃) (δ, ppm): -62,07 (s, 12F)

UV-vis (Tolueno): λ_{max}, nm (ε, M⁻¹.cm⁻¹) 418 (1,8×10⁵); 512,5 (9,3×10³); 546,5 (7,9×10³); 588 (7,0×10³); 646 (4,0×10³).

(11) 5,10,15,20-tetraquis(4-trifluorometilfenil)porfirinato de manganês (II) (Mn(II)-TPP-*p*-CF₃)

Num balão, colocou-se a TPP-*p*-CF₃ (300 mg/ 3,3 × 10⁻⁴ mol) e acetato de Mn(II) (0.88 g/ 3,6 × 10⁻⁴ mol) dissolvidos em 20 mL de DMF. Deixou-se a reação sob agitação a 80° C. Controlou-se a formação do complexo por espectroscopia UV-Vísível e após 24 horas desligou-se a reação. Realizou-se várias extrações com CH₂Cl₂ e água. Adicionou-se agente secante, filtrou-se o solvente e evaporou-se. O crude da reação purificou-se recorrendo a cromatografia de coluna em gel de sílica usando como eluente acetato de etilo.



Rendimento: 85% (279 mg)

MS (HRMS-ESI-FIA-TOF) $[M+Na]^+$, m/z:
1021,2432; calculado para $[C_{50}H_{27}F_{12}MnN_4O_2]$
 $[M+Na]^+$: 1021,1220

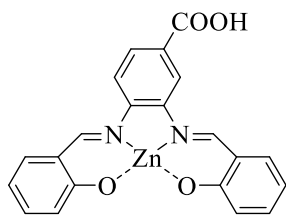
3.3.3 Síntese de Complexos de Salen

Procedimento geral: Num balão de fundo redondo coloca-se 1.5 mmol de diamina e 3.2 mmol de aldeído dissolvidos em etanol seco. Deixou-se a reação em agitação durante 1 hora com peneiros moleculares. Posteriormente adicionou-se acetato de zinco (1.5 mmol) e colocou-se a reação em refluxo durante 48 horas. O composto é obtido por filtração.

(12) N,N-bis((-2-hidroxibenzilideno)amino)benzoato de zinco(II) (Zn(II)Salen)

Pelo procedimento geral, colocou-se ácido 3,4-diaminobenzoico (230 mg) e 2-hidroxibenzaldeído (350 μ L) dissolvidos em etanol seco.

Rendimento: 71% (390 mg).



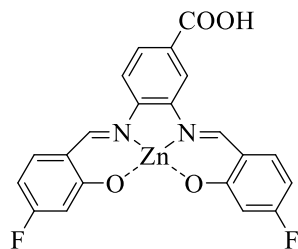
RMN 1H (400 MHz, DMSO) (δ , ppm): 9,04 (d; $J = 9.2$ Hz; 2H); 8,37 (s; 1H); 7,93 (m; $J = 8.6$ Hz; 2H); 7,45 (dd; 2H); 7,24 (m; 2H); 6,71 (d; $J = 8.7, 2.3$ Hz; 2H); 6,50 (m; $J = 10.0, 7.3$ Hz; 2H).

UV-vis (DMSO): λ_{max} , nm (ϵ , $M^{-1}.cm^{-1}$) 405 nm ($2,3 \times 10^4$)

MS (ESI) $[M]^+$, m/z: 422,84; calculado para $[C_{21}H_{14}N_2O_4Zn]$: 422,302

(13) N,N-bis((4-fluoro-2-hidroxibenzilideno)amino)benzoato de zinco(II) (Zn(II)Salen-F)

Pelo procedimento geral, colocou-se ácido 3,4-diaminobenzoico (230 mg) e 4-fluoro-2-hidroxibenzaldeído (451.4 mg) dissolvidos em etanol seco.



Rendimento: 97% (577 mg).

RMN ¹H (400 MHz, DMSO) (δ , ppm): 9,07 (s; 2H); 8,37 (s; 1H); 7,93 (s; 2H); 7,61 (t; $J = 8.4$ Hz; 1H); 7,51 (t; $J = 8.3$ Hz; 1H); 6,39 (m; $J = 19.3, 9.7, 4.4$ Hz; 4H).

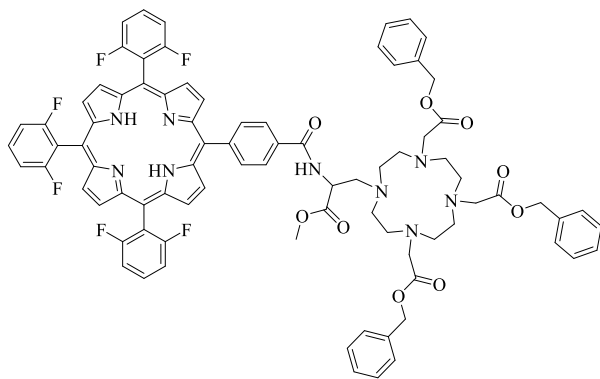
RMN ¹⁹F (376 MHz, DMSO) (δ , ppm): -105,17 (s; 1F); -105,66 (s; 1F)

UV-vis (DMSO): λ_{max} , nm (ϵ , $\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) 390 nm ($2,1 \times 10^4$)

3.3.4 Síntese de Potenciais Agentes de Contraste Bimodais (Díades)

(14) Díade 1 (TDFPP-COOH-DO3A-benz)

Colocou-se num balão a porfirina TDFPP-COOH (30,2 mg/ $3,74 \times 10^{-5}$ mol) que foi dissolvida em diclorometano (4 mL) e dimetilformamida (DMF) (1 mL), ambos os solventes secos. Seguidamente colocou-se a solução a 0°C e adicionou-se, gota a gota, cloreto de oxailo. Deixou-se a essa temperatura durante 30 minutos, e posteriormente colocou-se em refluxo durante 3 horas. Após verificar por TLC a formação do cloreto de ácido, o intermediário da reação, evaporou-se os produtos voláteis. O crude obtido foi dissolvido em diclorometano seco e juntou-se do nosso ligando DO3A-benz (27 mg/ $3,74 \times 10^{-5}$ mol). Adicionaram-se umas gotas de trietilamina à solução que ficou em refluxo. A reação foi controlada por TLC e ao fim de 48 horas deu-se por terminada. Evaporou-se o solvente. Purificou-se o crude da reação por cromatografia em coluna de sílica gel. Inicialmente, utilizou-se como eluente diclorometano, e posteriormente procedeu-se a um aumento da polaridade efetuando um gradiente com acetato de etilo. Evaporou-se o solvente.



Rendimento: 16,0% (8.8 mg)

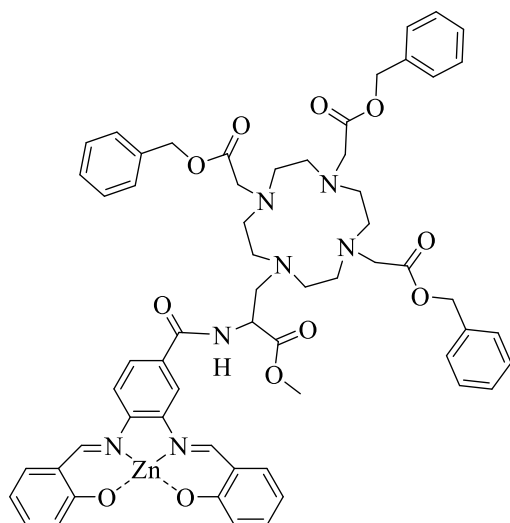
RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) (δ, ppm): 8,88 (m; 8H_β); 8,53-8,10 (m; 6H_{Ar}); 7,86-7,75 (m; 4H_{Ar}); 7,37 (m; 18H_{Ar}); 5,37-5,06 (m; 6H); 4,85-4,60 (m; 2H); 4,30-4,07 (m; 3H); 3,83-3,55 (m; 7H); 3,47-2,84 (m; 16H); -2,76 (s; 2H_{N-H}).

RMN ¹⁹F (376 MHz, CDCl₃) (δ, ppm): -108,22 (s; 2F); -108,36 (s; 4F)

MS (MALDI-TOF) [M+Na+K+H]⁺, m/z: 1528,94; calculado para [C₈₄H₇₃F₉N₉O₉NaK]: 1528,5

(15) Díade 2 (Zn(II)Salen-DO3A-benz)

Num balão colocou-se o composto Zn(II)Salen (25 mg/ 6.97×10⁻⁵ mol) ao qual se juntou DMAP (0.8 mg/ 6.97×10⁻⁶ mol) e DCC (14.38 mg/ 6.97×10⁻⁵ mol). Posteriormente adicionou-se dissolvido em DMSO seco (2 mL) o composto DO3A-benz (50 mg/ 6.97×10⁻⁵ mol). A reação ficou em agitação e à temperatura ambiente. Controlou-se a reação por TLC tendo-se dado por terminada após 48 horas. De modo a obter o nosso composto puro realizou-se uma precipitação com éter dietílico. Colocou-se o precipitado sob vácuo.



Rendimento: 15% (11,7 mg)

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) (δ, ppm): 9,08 (s; 2H); 8,38 (d; 1H); 8,24-8,08 (m; 2H); 7,96 (m; 2H); 7,38 (m; 17H); 6,72 (d; *J* = 8.6 Hz; 2H); 6,53 (t; *J* = 7.0 Hz; 2H); 5,41-4,98 (m; 6H); 4,40-2,65 (m, 28H).

3.4 Referências

- (1) Burrows, H.; Pereira, M. *Química Síntese e Estrutura Uma Abordagem Prática*; Escolar Editora, 2006; Vol. 1.
- (2) Parker, C. A.; Rees, W. T. *Analyst* **1960**, *85*, 587.
- (3) Pineiro, M.; Carvalho, A. L.; Pereira, M. M.; Gonsalves, A. M. d. A. R.; Arnaut, L. G.; Formosinho, S. J. *Chem. Eur. J.* **1998**, *4*, 2299.
- (4) Ferreira, P. M. T.; Maia, H. L. S.; Monteiro, L. S.; Sacramento, J. *J. Chem. Soc.* **1999**, *1*, 3697.
- (5) Ferreira, M. F.; Martins, A. F.; Martins, J. A.; Ferreira, P. M.; Toth, E.; Geraldès, C. F. *Chem Commun (Camb)* **2009**, *42*, 6475.
- (6) Gonçalves, A. M. d. A. R.; Varejão, J. M. T. B.; Pereira, M. M. *J. Heterocyclic Chem.* **1991**, *28*, 635.
- (7) Silva, M.; Fernandes, A.; Bebiano, S. S.; Calvete, M. J.; Ribeiro, M. F.; Burrows, H. D.; Pereira, M. M. *Chem Commun (Camb)* **2014**, *50*, 6571.

