



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Carolina dos Santos Vinagreiro

**DESENVOLVIMENTO DE ENTIDADES QUÍMICAS
INOVADORAS PARA SUPERAR O DESAFIO DA
RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA**

Tese de doutoramento em Química, ramo de especialização em Química Médica, orientada pela Professora Doutora Maria Miguéns Pereira, coorientada pelo Doutor Miguel Prudêncio e apresentada ao Departamento de Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

Janeiro de 2020

Universidade de Coimbra

Departamento de Química – Faculdade de Ciências e Tecnologia

**Desenvolvimento de entidades químicas
inovadoras para superar o desafio da
resistência antimicrobiana**

Carolina dos Santos Vinagreiro

Tese de doutoramento em Química, ramo de especialização em Química Médica,
orientada pela Professora Doutora Maria Miguéns Pereira, coorientada pelo Doutor
Miguel Prudêncio e apresentada ao Departamento de Química da Faculdade de
Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra

Janeiro de 2020

Agradecimentos

A maioria dos futebolistas que fizeram golos recebeu o passe de um colega que não foi aplaudido, mas que preparou toda a jogada. O mundo gosta de aplaudir quem fez o remate, mas esquece quem o tornou possível e os dois têm valor. Assim, eu gostava de expressar a minha gratidão a todos aqueles que me passaram a bola para que pudesse ter as minhas conquistas tanto a nível pessoal como profissional.

À Doutora Mariette Pereira, minha orientadora, por estes 7 anos de convivência, por me ter permitido conhecer outros laboratórios dentro e fora de Portugal, pela orientação e troca de ideias para superar os desafios diários, por me ter apoiado nos momentos mais difíceis a nível pessoal e pelo carinho que sempre demonstrou para comigo.

Ao meu coorientador, Miguel Prudêncio, por me ter dado a oportunidade de conhecer uma área completamente diferente (e me deixar dissecar mosquitos) e pela sua maneira de ser rigoroso, muito eficiente, mas ao mesmo tempo descontraído. A todos os colegas do Prudêncio Lab por me terem recebido, em especial à Diana e à Denise que me acompanharam.

Aos diretores do programa doutoral MedChemTrain, Doutor Luís Arnaut e Doutor Rui Moreira, pela seleção e pela bolsa atribuída para poder adquirir este grau. Agradeço o apoio financeiro da Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT) através da cedência da bolsa PD/BD/128317/2017.

Ao Doutor Luís Arnaut, a pessoa que mais me inspirou e me incentivou ao longo destes 9 anos de convivência, por acreditar em mim desde sempre, por me impulsionar e “espicaçar” a sair da minha zona de conforto e a evoluir em áreas nas quais tinha mais dificuldade. Por me transmitir formas de estar e lidar com as situações e me dar conselhos para me direcionar para o caminho correto quando necessário. Se não fosse ele certamente não tinha crescido tanto a nível pessoal!

À Doutora Gabriela Silva, a pessoa mais humana que já conheci neste meio, por me permitir implementar os estudos de aPDT no seu laboratório, tornando esta tese multidisciplinar e por ter sempre uma palavra de coragem, um sorriso, uma mensagem nos dias menos bons. Foi um enorme gosto conhece-la e trabalhar consigo. À Dra. Teresa Reis e ao Dr. Henrique Oliveira da Unidade de Patologia Clínica do CHUC pela cedência das estirpes multirresistentes. À Sandra pela sua personalidade caricata que torna o ambiente do laboratório mais acolhedor e à Cláudia e ao Tiago pelo esclarecimento de todas as dúvidas.

My greatest gratitude to Dr. Janusz M. Dabrowski for allowing me to learn the methodology of aPDT, for the discussions and exchange of ideas, for welcoming me so well in Poland and cover all my expenses. Barbara Pucelik for teaching me everything and for the effort in working a lot during the short period of time that I spent there, including weekends.

À Doutora Beatriz Royo, pela disponibilidade, partilha de conhecimentos, por me ter recebido no seu laboratório no ITQB-Lisboa e por me permitir a aprendizagem de técnicas de síntese em atmosfera inerte para a preparação de organometálicos. A todo o grupo, em especial à Rita Lopes pelo trabalho desenvolvido em conjunto e os bons momentos.

Ao Doutor Vanderlei pela oportunidade de colaboração com o seu grupo na Universidade de São Paulo, em São Carlos. Por nos ter recebido no Brasil e nos ter permitido fazer estudos adicionais que contribuíram fortemente para a melhoria desta Tese. À Natália Inada, à Kate Blanco e à Amanda Zangirolami, por todos os bons momentos, ensinamentos, pela simpatia e boa disposição. Ao Francisco Guimarães pelo apoio nos ensaios de microscopia confocal.

Ao Professor Doutor Alberto Canelas Pais e à Doutora Sandra Nunes por toda a disponibilidade e colaboração na realização dos estudos computacionais.

À Doutora Marta Piñeiro, por toda a colaboração relativamente às métricas da química verde, pela sua boa disposição e força inspiradora e pelos conselhos.

Ao Doutor Fábio Schaberle por todo o apoio nos estudos fotofísicos e fotoquímicos.

A todos os funcionários do Departamento, pelo carinho que sempre me transmitiram e por me fazerem sentir em casa. Ao Sr. Jorge por todos os bons momentos que partilhamos e brincadeiras e por me deixar conhecer o seu lado mais querido. Ao Sr. Zé, ao Sr. Carlos, às duas Olindas e à Dorinda por sempre que vinham limpar o nosso laboratório trazerem boas energias, à Dona Lurdes por ser sempre tão querida comigo e me desejar bem, à Maria João pelo momentinho que passávamos sempre que ia enviar uma carta. Ao António Manuel por estar sempre disposto a ajudar e resolver os problemas. Foi um gosto partilhar com vocês estes anos. À Sílvia pela contribuição nas análises de GC-MS.

Ao Professor Doutor Rui Brito e ao Pedro Cruz do serviço de Ressonância Magnética Nuclear do Centro de Química de Coimbra (CCC-NMR) agradeço a colaboração na obtenção dos espetros de RMN.

A todos os meus colegas e ex-colegas do laboratório de Catálise e Química Fina por todos os bons momentos que partilhamos e pelo crescimento que adquirimos juntos. Ao *“Bright Side”* pelo que foi em tempos e por todos os momentos vivenciados que guardarei no coração. Um agradecimento especial à Diana, foi um enorme gosto ver-te crescer e passar de *“minha filha”* a uma verdadeira colega e por todas as correções nesta Tese. Ao Fábio, por tudo o que partilhamos juntos.

Aos meus colegas do Programa Doutoral MedChemTrain por todos os bons momentos que vivemos. Foi um gosto partilhar esta etapa convosco.

A todos os meus amigos por fazerem parte da minha vida, por todas os bons momentos, todos os desabafos, por me darem força e energia positiva sempre que eu precisei. Sabem aqueles amigos que basta uma troca de olhares para comentar uma situação, a quem não consegues esconder estados de espírito, com quem partilhas as alegrias e as tristezas, na minha vida são a Giusi e o Rafael. A Giusi, minha irmã, por estarmos sempre lado a lado na vida, pelos abraços bons e por nos apoiarmos incondicionalmente! Ao Rafael por fazer o possível e o impossível para que eu esteja

bem, pelas apostas para me dar incentivo, pelos desafios constantes e pela revisão desta Tese.

À dança por me permitir esquecer o mundo e expressar-me livremente! Aos professores e amigos por todas as festas, ensaios e momentos únicos.

À associação Abrigo de Carinho e às minhas companheiras de luta das quais tenho o maior orgulho naquilo que conseguimos fazer com tão pouco. Somos a prova que com amor e dedicação, nada é impossível! Ao meu afilhado, o Zigue, o meu amor, estou muito grata por poder acompanhá-lo e melhorar um bocadinho a vida dele.

À minha família, mammy, pai, mano, mana, António José e avós, que me transmitiu todos os valores e me proporcionou equilíbrio. Estou eternamente grata por ter uma família como a nossa, pelo apoio constante, pela força, pela união, pela paciência para as minhas crises, pelo orgulho, pela compreensão de todas as minhas ausências e pelo amor que me dão.

Ao Filipe, por ser o meu porto de abrigo e pela paciência pelas horas e horas em falta.

Índice

Abreviaturas e símbolos	i
Resumo	vii
Abstract	xi
Nomenclatura	xv
Capítulo 1	1
1.1- Infecções microbianas: o grande desafio da Química Medicinal moderna	1
1.2- Desafios e terapias emergentes para superar a resistência antimicrobiana	3
1.2.1- Infecções bacterianas	3
1.2.1.1- Terapia fotodinâmica antimicrobiana	3
A) Fotossensibilizadores bimodais	9
B) Porfirinas catiónicas	11
C) Ftalocianinas e subftalocianinas	18
1.2.1.2- Organometálicos como antibacterianos	23
1.2.2- Infecções protozoárias - malária	32
1.2- Proposta de trabalho	34
1.3- Referências	37
Capítulo 2- Design/Síntese de fotossensibilizadores do tipo macrociclo pirrólico	49
2.1- Macrociclos tetrapirrólicos do tipo porfirina e seus derivados reduzidos	51

2.1.1- Macrociclos tetrapirrólicos neutros: sulfonamido-porfirinas e sulfonamido-bacterioclorinas (Família I)	51
2.1.2- Macrociclos tetrapirrólicos catiónicos do tipo imidazolil porfirinas (Família II)	62
2.1.2.1- Síntese de <i>meso</i> -tetra-imidazolil-porfirinas simétricas	63
2.1.2.2- Síntese de <i>trans</i> -di-imidazolil-porfirinas	69
2.2- Macrociclos pirrólicos do tipo ftalocianina e subftalocianina (Família III)	75
2.2.1- Síntese de precursores- Ftalonitrilos	76
2.2.2- Síntese de ftalocianinas	84
2.2.3- Síntese de subftalocianinas	88
2.3- Conclusão	94
2.4-Referências	97
Capítulo 3- Desenvolvimento de fotossensibilizadores “ideais” para aPDT	101
3.1- Avaliação de fotossensibilizadores bimodais em aPDT	102
3.1.1- Caracterização fotofísica e fotoquímica	103
3.1.2- Determinação de coeficientes de partição octanol-água	110
3.1.3- Avaliação da atividade antibacteriana	112
3.1.4- Estudos de cito e fototoxicidade	117
3.2- Avaliação de fotossensibilizadores catiónicos do tipo imidazolil porfirinas	119
3.2.1- Caracterização fotofísica e fotoquímica	120
3.2.2- Determinação de coeficientes de partição	123
3.2.3- Avaliação da atividade antibacteriana	123

3.2.5- Comparação com o melhor fotossensibilizador descrito na literatura	134
3.2.6- Estudos de cito e fototoxicidade	144
3.3- Conclusão e seleção do composto Líder (Lead compound)	147
3.4-Referências	152
Capítulo 4- Design/síntese e avaliação da atividade antibacteriana de complexos de Ferro (II)	157
4.1- Complexos de Ferro (II) baseados em carbenos <i>N</i> -heterocíclicos (NHCs)	158
4.1.1- Síntese de pró-ligandos NHCs	158
4.1.2- Síntese de complexos de ferro (II)- Cp*-NHC	167
4.1.3- Avaliação da atividade antibacteriana	170
4.1.4- Estudos mecanísticos preliminares	173
4.1.5- Terapia Dual	176
4.1.6 - Conclusão	178
4.1.7- Referências	180
Capítulo 5- Síntese, caracterização e avaliação da atividade antiplasmódica de chalconas	187
5.1- Desenvolvimento de um novo método de síntese de chalconas	190
5.1.1- <i>Scale-up</i> reacional	197
5.1.2- Sustentabilidade da metodologia desenvolvida	197
5.2- Avaliação da atividade antiplasmódica de chalconas	199
5.3- Conclusão	205
5.4- Referências	207

Capítulo 6-Secção Experimental	211
6.1- Métodos gerais	211
6.1.1- Solventes e Reagentes	211
6.1.2- Instrumentação	211
6.2- Experimental associada ao capítulo 2	215
6.2.1- Família I	215
6.2.2- Família II	220
6.2.3- Família III	224
6.3- Experimental associada ao capítulo 3	231
6.3.1- Caracterização fotofísica e fotoquímica	231
6.3.2- Estudos <i>in vitro</i>	232
6.4-Experimental associada ao capítulo 4	236
6.4.1- Síntese de precursores	237
6.4.2- Síntese de pró-ligandos	239
6.4.3- Síntese de complexos de ferro	242
6.4.4- Avaliação da capacidade oxidativa do ferro	245
6.5-Experimental associada ao capítulo 5	245
6.5.1- Síntese de chalconas	245
6.5.2- Cálculos de métricas relacionadas com a sustentabilidade	250
6.5.3- Atividade <i>in vitro</i> na fase hepática do <i>Plasmodium berghei</i>	251
6.6- Referências	254

Abreviaturas e Símbolos

ϵ	Coeficiente de absorvidade molar
λ	Comprimento de onda
δ	Desvio químico
η	Rendimento/Índice de refração
ϕ_F	Rendimento quântico de fluorescência
ϕ_{Δ}	Rendimento quântico de formação de oxigênio singuleto
ϕ_{Pd}	Rendimento quântico de fotodegradação
#	Número da entrada na tabela
[] /c	Concentração
1O_2	Oxigênio singuleto
$O_2^{\cdot -}$	Radical superóxido
OH^{\cdot}	Radical hidroxilo
τ_{Δ}	Tempo de vida do oxigênio singuleto
A/Abs	Absorvância
Aci	<i>Acinetobacter baumannii</i>
ADN	Ácido desoxirribonucleico
aPDT	Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (do inglês “ <i>Antimicrobial Photodynamic Therapy</i> ”)
APF	3'-(<i>p</i> -aminofenil) fluoresceína
ATCC	do inglês “ <i>American Type Culture Collection</i> ”
ATR	Reflexão Total Atenuada (do inglês “ <i>Attenuated Total Reflectance</i> ”)
BHI	Infusão de Cérebro-Coração (do inglês “ <i>Brain Heart Infusion</i> ”)
Ci	Conversão interna
CIS	Cruzamento intersistemas

CMI	Concentração mínima inibitória
Co	Concentração na fase orgânica
Cw	Concentração na fase aquosa
d	Dupleto
Da	Dalton
DCM	Diclorometano
dd	Duplo dupleto
DDQ	2,3-Dicloro-5,6-dicianobenzoquinona
DFT	Teoria da Densidade Funcional (do inglês " <i>Density Functional Theory</i> ")
DMEM	do inglês " <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> "
DMF	Dimetilformamida
DMPyP	Di-iodeto de 5,15- <i>bis</i> (<i>N</i> -metil-4-piridil)porfirina
DMAE	2-(Dimetilamino)etanol
DMimidazolil	Di-iodeto de 5,15- <i>bis</i> (1,3-dimetil-1 <i>H</i> -imidazol-3- <i>io</i> -2-il)porfirina
DMSO	Dimetilsulfóxido
Ec	<i>Escherichia coli</i>
EC	Comissão Europeia (do inglês " <i>European Commission</i> ")
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético (do inglês " <i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> ")
EPR	Espectroscopia de Ressonância Paramagnética eletrônica (do inglês " <i>Electron Paramagnetic Resonance</i> ")
ESI	Ionização por "Electrospray" (do inglês " <i>Electrospray Ionization</i> ")
Et	Grupo etilo
Fator E	Fator ambiental
FDA	do inglês " <i>Food and Drug Administration</i> "
FID	Detetor de Ionização de Chama (do inglês " <i>Flame Ionization Detector</i> ")
GC	Cromatografia Gasosa (do inglês " <i>Gas Chromatography</i> ")
GC-MS	Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massa (do inglês " <i>Gas Chromatography-Mass Spectrometry</i> ")

h	Horas
HaCaT	Linhas celulares de queratinócitos humanos imortalizados
HDFn	Fibroblastos dérmicos humanos neonatais
HEPES	Ácido <i>N</i> -(2-hidroxi-etil)piperazina- <i>N'</i> -2-etanossulfônico
HITCI	1,1',3,3,3',3'-Hexametilindotricarbocianina
HMBC	Correlação Espectroscópica Heteronuclear de Múltiplas Ligações (do inglês " <i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i> ")
HOMO	Orbital Molecular Ocupada de Maior Energia (do inglês "Highest Occupied Molecular Orbital")
HPLC	Cromatografia Líquida de Elevada Performance (do inglês "High Performance Liquid Chromatography")
HPF	3'-(<i>p</i> -hidroxifenil) fluoresceína
HSQC	Correlação de Quantum-Simples Heteronuclear (do inglês " <i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i> ")
Huh-7	Linhas celulares humanas de carcinoma hepatocelular
I	Percurso ótico
I_{λ}^0	Intensidade de luz incidente na amostra
I_{λ}	Intensidade de luz transmitida pela amostra
IC ₅₀	Concentração que inibe 50% do crescimento celular (do inglês, " <i>Half-maximal Inhibitory Concentration</i> ")
ITQB	Instituto de Tecnologia Química e Biológica
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada (do inglês " <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i> ")
IV	Espetroscopia de Infravermelho
<i>J</i>	Constante de acoplamento
K _p	Constante de partição
K _p	<i>Klebsiella pneumonia</i>
LDA	Di-isopropilamida de lítio

LED	Díodo emissor de luz (do inglês " <i>Light-Emitting Diode</i> ")
Log P	Logaritmo do coeficiente de partição
LUMO	Orbital Molecular Desocupada de Menor Energia (do inglês " <i>Lowest Unoccupied Molecular Orbital</i> ")
m	Multiplete
MALDI	Ionização/Dessorção de Matriz Assistida por Laser (do inglês " <i>Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization</i> ")
Me	Grupo metilo
MH	Muller Hinton
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina (do inglês " <i>Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus</i> ")
MTT	Brometo de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
[M] ⁺	Ião molecular
[M+H] ⁺	Ião molecular protonado
Mw	Radiação micro-ondas (do inglês " <i>Microwave</i> ")
m/z	Razão massa/carga
NaY	Zeólito de NaY
NHC	Carbenos <i>N</i> -heterocíclicos
PABA	Ácido <i>p</i> -aminobenzoico (do inglês " <i>p-aminobenzoic acid</i> ")
PBS	Tampão fosfato (pH=7.4) (do inglês " <i>phosphate buffer saline</i> ")
PbLuc	Parasitas geneticamente modificados para expressar luciferase
Pcs	Ftalocianinas
PDT	Terapia Fotodinâmica (do inglês " <i>Photodynamic Therapy</i> ")
pH	Potencial hidrogeniico
ppm	Partes por milhão
PS	Fotossensibilizador (do inglês " <i>Photosensitizer</i> ")
<i>p</i> -TSH	<i>p</i> -Toluenosulfonil-hidrazina
P&D	Pesquisa e Desenvolvimento
ref	Referências
RMN	Ressonância Magnética Nuclear

RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Protão
RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13
RMN ¹⁹ F	Ressonância Magnética Nuclear de Flúor-19
ROS	Espécies Reativas de Oxigénio (do inglês “ <i>Reactive Oxygen Species</i> ”)
rpm	Rotações por Minuto
RPMI	do inglês “ <i>Roswell Park Memorial Institute</i> ”
R _v	Relaxação vibracional
S	Estado eletrónico singuleto
s	Singuleto
S ₀	Estado singuleto fundamental
S ₁	Estado singuleto excitado de primeira ordem
S _n	Estado singuleto excitado de ordem n
Sa	<i>Staphylococcus aureus</i>
SDS	Dodecil sulfato de sódio (do inglês “ <i>sodium dodecyl sulfate</i> ”)
sl	Singuleto largo
SM ^o	Lípidos membranares da monocamada externa
SM ⁱ	Lípidos membranares da monocamada interna
SN ₂	Substituição nucleofílica bimolecular
SOSG	do inglês “ <i>Singlet Oxygen Sensor Green</i> ”
spz	Esporozoítos
SubPcs	Subftalocianinas
SW ^o	Meio aquoso extracelular
SW ⁱ	Meio aquoso intracelular
t	Tripleto
T	Estado eletrónico tripleto
T ₁	Estado tripleto excitado de primeira ordem
ta	Temperatura ambiente
td	Triplo duplete
TFA	Ácido trifluoroacético
THF	Tetrahidrofurano

TLC	Cromatografia em Camada Fina (do inglês " <i>Thin Layer Chromatography</i> ")
TMPyP	Tetra-iodeto de 5,10,15,20- <i>tetraquis</i> (<i>N</i> -metil-4-piridil)porfirina
TMS	Tetrametilsilano
TOF	Tempo de voo (do inglês " <i>Time Of Flight</i> ")
TPFPP	5,10,15,20- <i>tetraquis</i> (pentafluorofenil)porfirina
TPP	5,10,15,20- <i>tetraquis</i> (fenil)porfirina
u.a.	Unidades arbitrárias
UFC	Unidades formadoras de colônias
UniMS	Unidade de espectrometria de massa
UV-Vis	Espectroscopia Ultravioleta-visível
Zn- TMPyp	Tetra-iodeto de 5,10,15,20- <i>tetraquis</i> (<i>N</i> -metil-4-piridil)porfirinato de zinco (II)
3D	Tridimensional

Resumo

O desenvolvimento de novos tratamentos eficazes contra doenças infecciosas constitui um dos maiores desafios da Química Medicinal na atualidade e, certamente, também no futuro. Dada a relevância da problemática mencionada, o objetivo central do trabalho apresentado nesta Tese consiste no *design*, síntese e desenvolvimento de novas entidades químicas antimicrobianas com mecanismos de ação alternativos, de modo a contribuir para superar este desafio. Neste sentido, o trabalho foi dividido em duas áreas clínicas de intervenção: as infecções tópicas causadas por bactérias e as infecções causadas por protozoários.

No capítulo 1 apresenta-se uma revisão crítica e minuciosa da literatura subjacente aos diferentes tópicos e às famílias de compostos químicos com atividade antimicrobiana abordados nos capítulos seguintes. Adicionalmente, são também apresentados os objetivos do trabalho desenvolvido.

Relativamente ao tratamento de doenças infecciosas provocadas por bactérias, no capítulo 2 descreve-se a síntese de novos fotossensibilizadores que possam ser aplicados numa terapia ativada pela luz (aPDT). O trabalho desenvolvido neste capítulo foca-se em três diferentes famílias: I - macrociclos tetrapirrólicos neutros (sulfonamido-porfirinas e sulfonamido-bacterioclorinas); II - macrociclos tetrapirrólicos catiónicos do tipo imidazolil-porfirinas e III - macrociclos pirrólicos do tipo (sub)ftalocianina. A família I foi baseada em moléculas bimodais, contendo na sua estrutura porfirinas neutras e sulfonamidas, compostos com atividade antibacteriana reconhecida. Neste capítulo descreve-se a síntese seletiva de compostos mono-substituídos e tetra-substituídos derivados da TPFPP por substituição com a metanosulfonamida, em concentrações de reação controladas, assim como as respetivas bacterioclorinas com bons rendimentos (70-90%). A família II centrou-se em fotossensibilizadores porfirínicos catiónicos derivados de 1-metilimidazol. Neste, foram exploradas rotas sintéticas para obter eficientemente *meso*-tetra-imidazolil-porfirinas simétricas e *meso*-di-imidazolil-porfirinas não-simétricas, compostos com *esqueleto* semelhante, mas com diferentes propriedades lipofílicas, pesos moleculares, número e distribuição de carga, cujos

efeitos foram avaliados na atividade antibacteriana. No decurso da síntese da porfirina *meso*-tetra-imidazolil (**2.6**), foram efetuadas otimizações dos procedimentos sintéticos com recurso ao método por utilização do método de água/Mw, que permitiu diminuir o tempo de reação e aumentar a sustentabilidade do processo tendo-se obtido com bons rendimentos. Realizou-se a cationização de **2.6**, tendo obtido a porfirina **2.7** e posteriormente o complexo de zinco (II) **2.8**. A porfirina base da família das *meso*-diimidazolil-porfirinas não-simétricas **2.9** foi sintetizada mediante uma condensação [2+2], seguida de oxidação, sendo obtida com um rendimento de 19%. De seguida sintetizou-se o complexo de zinco (II) **2.10** e consequente cationização, obtendo-se a porfirina **2.11**. A família III foi baseada em ftalocianinas e subftalocianinas, pelo que se começou pela modulação dos precursores de ambos os compostos, ftalonitrilos, com grupos passíveis de serem cationizados. De seguida, procedeu-se à síntese eficiente de metaloftalocianinas de Zn (II) e posteriormente à preparação de subftalocianinas com os mesmos grupos. As subftalocianinas aminadas apresentaram baixa estabilidade química, coeficientes de absorção molar relativamente baixos, sem possibilidade de serem cationizadas. Consequentemente, não se prosseguiu com o desenvolvimento desta família.

No capítulo 3, foi feita a caracterização fotofísica e fotoquímica dos compostos sintetizados e foram realizados estudos biológicos em bactérias planctónicas e biofilmes e em células eucarióticas. Os resultados mais promissores foram observados para a família II, observando-se uma boa capacidade de absorção de luz ($\log \epsilon = 5,31-4,29$), razoável capacidade formação de ROS ($\phi_{\Delta} = 0,18-0,75$) assim como uma elevada fotoestabilidade ($\phi_{Pd} = 4 \times 10^{-5}$ e 8×10^{-6} para **2.8** e **2.11**, respetivamente). De seguida, realizaram-se estudos de fotoinativação de bactérias planctónicas, observando-se uma inativação bacteriana extremamente elevada para o fotossensibilizador **2.8**, com maior peso molecular, quatro cargas positivas e metal central zinco (II), inativando bactérias de todas as estirpes com 1000 e 100 nM (redução de 7 \log_{10} UFCs). Estes resultados promissores conduziram-nos à realização de estudos em bactérias multirresistentes coletadas de pacientes do Hospital da Universidade de Coimbra. Os graus de inativação obtidos foram elevados, sendo que o PS **2.8** demonstrou capacidade para inativar todas as estirpes usando uma concentração de apenas 1 μ M, demonstrando a premissa

original de que a aPDT tem potencial para ser aplicada com sucesso em estirpes com resistência aos antibióticos atuais. Deste modo, prosseguimos com a avaliação em biofilmes da estirpe *S. aureus* ATCC 25925 e, curiosamente, observou-se uma clara inversão dos resultados, sendo que o composto com menor peso molecular e apenas duas cargas, **2.11**, apresentou um efeito microbicida praticamente total ($6,9 \log_{10}$) com apenas 5,2 nM de composto. Estudos de microscopia confocal revelaram uma diferença na localização preferencial de cada composto, sendo que o fotossensibilizador **2.8** se localiza maioritariamente na zona planctónica, enquanto que o **2.11** tem a capacidade de difundir para o interior do biofilme, explicando assim a inversão de atividade observada. Adicionalmente, nenhum dos compostos foi tóxico no escuro ou com irradiação em linhas celulares representativas da pele (HDFn – fibroblastos; HaCaT – queratinócitos), nas concentrações utilizadas nos estudos em bactérias planctónicas e biofilmes (5,2 nM-1 μ M), tendo apenas sido observada toxicidade em concentrações várias ordens de grandeza acima destes valores.

O capítulo 4 descreve a síntese de novos complexos de ferro (II) baseados em carbenos *N*-heterocíclicos funcionalizados com diversos grupos, com o fim de obter compostos com propriedades anfífilas distintas com potencial atividade antibacteriana. Para este efeito, desenvolveram-se diversas estratégias sintéticas com vários passos, que conduziram à preparação de complexos de ferro (II) correspondentes a cada pró-ligando (**4.6a-e**), com rendimentos entre os 68-90%. A atividade antibacteriana destes compostos foi avaliada em estirpes Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*) e Gram-negativas (*Escherichia coli*), demonstrando um efeito significativo da cadeia lateral do Fe (II) -NHC. O complexo mais lipofílico (**4.6b**) foi encontrado como sendo o mais ativo contra ambas as estirpes (8 μ g/ml).

No capítulo 5 descreve-se o *design* de chalconas com grupos adequados para possuírem atividade antimalárica, de acordo com a análise de estudos estrutura-atividade previamente descritas. Além disso, desenvolveu-se um processo sintético sustentável alternativo, passível de *scale-up* (testado até 5g), para a síntese destes compostos, permitindo alcançar valores das métricas de sustentabilidade sem precedentes, obtendo-se um fator-E de apenas 4,2 e um Ecoscale de 72. De seguida, a capacidade destes compostos inibirem a infeção de linhas celulares de Huh-7

hepatócitos por *Plasmodium berghei* foi avaliada usando um protocolo baseado na medição de bioluminescência desenvolvido no Prudêncio Lab da Universidade de Lisboa. Após realização de uma avaliação preliminar, foram calculados os valores de IC₅₀ para os mais promissores, tendo-se concluído que a chalcona mais ativa na fase hepática foi a **5.12**, com um IC₅₀ = 1,45 ± 0,04 µM. Esta chalcona apresenta uma potência cerca de 7 vezes superior à da Primaquina®, um dos fármacos utilizados no tratamento da fase hepática.

No capítulo 6 apresentam-se detalhadamente os procedimentos experimentais referentes a todos os capítulos da tese bem como a caracterização química completa de todas as moléculas sintetizadas no decorrer do trabalho.

Palavras-chave: química medicinal, microorganismos multirresistentes, macrociclos tetrapirrólicos, aPDT, biofilmes

Abstract

The development of new effective treatments for infectious diseases is one of the biggest challenges of Medicinal Chemistry. Given the relevance of this problem, the main goal of the work presented in this Thesis consisted of the design, synthesis, and development of new antimicrobial chemical entities with alternative action mechanisms, in order to give a valuable contribution for the overcoming of this challenge. In this sense, the work was subdivided into two clinical areas of intervention: topical infections caused by bacteria and infections caused by protozoa.

In chapter 1, we present a critical literature revision of the different topics and families addressed in this thesis. Furthermore, the objectives of the developed work are presented.

Regarding the treatment of infectious diseases caused by bacteria, in chapter 2, we describe the synthesis of new photosensitizers that can be used in a light-activated therapy (aPDT). The work developed in this work focuses on three different families: I – neutral tetrapyrrolic macrocycles (sulfonamido-porphyrins and sulfonamido-bacteriochlorins); II – cationic tetrapyrrolic macrocycles of the imidazolylporphyrin type and III – pyrrolic macrocycles of the (sub)phthalocyanine type. Family I was based in bimodal molecules, containing neutral porphyrins and sulfonamides in their structure, which are compounds with known antibacterial activity. In this family, we selectively synthesized mono-substituted and tetra-substituted porphyrin derivatives of TPFPP by substitution with methanesulfonamide, in controlled reaction conditions, as well as the corresponding bacteriochlorins in good yields (70-90%). Family II is centred in cationic porphyrinic photosensitizers derived from 1-methylimidazole. In this family, we explored synthetic routes to attain efficiently symmetric *meso*-tetra-imidazolyl-porphyrins and non-symmetric and *meso*-di-imidazolyl-porphyrins, compounds with similar scaffolds but with different lipophilicity, molecular weights, and number and charge distribution, in order to assess their influence in their antibacterial activity. During the synthesis of the *meso*-tetra-imidazolyl porphyrin (**2.6**), some optimizations of the synthetic methodologies were made using the water/Mw method, which allowed

a significant decrease in the reaction time and a striking improvement of the process's sustainability. We performed the cationization of the aforementioned porphyrin, obtaining porphyrin **2.7** and, subsequently, the Zn (II) complex **2.8**. The base porphyrin of the group of the non-symmetric *meso*-di-imidazolyl-porphyrins **2.9** was synthesized by a [2+2] condensation, followed by oxidation, and was obtained in 19% yield. Afterward, we obtained the Zn (II) complex **2.10** and correspondent cationic porphyrin **2.11**. Family III was based on phthalocyanines and subphthalocyanines, whose synthesis was started by the modulation of the precursors for both macrocycles, phthalonitriles, with groups that could be cationized. After, we proceeded to the synthesis of Zn (II) metallophthalocyanines and, subsequently, the preparation of the subphthalocyanines with the same substituents. The aminated subphthalocyanines showed poor chemical stability, relatively low molar absorption coefficients and were unable to be cationized. Consequently, the development of this particular family was halted.

In chapter 3, the photophysical and photochemical characterization of the previously synthesized compounds was performed, as well as the biological studies in planktonic bacteria and biofilms and also eukaryotic cells. The most promising results were observed for family II, which possessed good light absorption ($\log \epsilon = 5.31-4.29$), reasonable capability of ROS production ($\phi_{\Delta} = 0.18-0.75$), as well as high photostability ($\phi_{Pd} = 4 \times 10^{-5}$ and 8×10^{-6} for **2.8** and **2.11**, respectively). Afterward, we performed the studies in planktonic bacteria, and we observed a substantial bacterial inactivation for photosensitizer **2.8**, with higher molecular weight, four positive charges and Zn (II) as central metal, allowing a 7 \log_{10} reduction of CFU's for all tested bacterial strains with 100 to 1000 nM concentrations of photosensitizer. With such promising results, we proceeded towards studies in multiresistant bacteria collected from patients of the Coimbra University Hospital. Again, the degree of inactivation was high, with photosensitizer **2.8** showing high ability to inactivate all tested strains in concentrations as low as 1 μ M, which demonstrates the original premise that aPDT has potential for being successfully used in bacterial strains with resistance towards current antibiotics. Hence, we continued our studies with their evaluation in biofilms formed by the strain *S. aureus* ATCC 25925 and, remarkably, a clear inversion of the results was observed, being the photosensitizer with lower molecular weight and just two charges, **2.11**, the

most effective with a practically total microbicide effect ($6,9 \log_{10}$) in a concentration as low as 5.2 nM. Confocal microscopy studies revealed a difference in the localization of each compound, having photosensitizer **2.8** a preferential localization in the planktonic region, while **2.11** has the capability to diffuse to the interior of biofilms, which explains the observed inversion of activity. Additionally, none of the compounds were toxic in the dark or with light irradiation in cell lines representative of human skin (HDFn – fibroblasts; HaCaT – keratinocytes), in the concentrations used in both planktonic bacteria and biofilms (5.2 nM to 1 μ M), with toxicity having only been observed in concentrations several orders of magnitude above these values.

Chapter 4 describes the synthesis of new iron (II) complexes based on *N*-heterocyclic carbenes functionalized with multiple groups in order to obtain compounds with different amphiphilicities and properties that can act as antimicrobial agents. To this effect, the corresponding iron (II) complexes for each pro-ligand (**4.6a-e**) were prepared through several sequential synthetic steps in yields between 68-90%. Their antibacterial activity was evaluated in both, Gram-positive (*Staphylococcus aureus*) and Gram-negative (*Escherichia coli*) bacteria, which demonstrated a significant influence of the side chain of the Fe (II)-NHC. The most lipophilic compound (**4.6b**) was found to be the most active towards both tested strains (8 μ g/ml).

In chapter 5, we describe the design of chalcones with appropriate groups for possessing antimalarial activity, according to the analysis of structure-activity studies previously reported. Moreover, we have developed a sustainable alternative synthetic process, amenable to scale-up (tested up to 5g), for the synthesis of these compounds, allowing the achievement of unprecedented values for green chemistry metrics, namely an E-factor of just 4.2 and an Ecoscale of 72. Afterward, the new synthesized compounds ability to inhibit the infection in Huh-7 hepatocytes' cell lines by *Plasmodium berghei* was evaluated, using a protocol based on bioluminescence measurements, developed at Prudêncio Lab, University of Lisbon. After performing a preliminary exploratory screening, the IC₅₀ values were calculated, and we concluded that the most active chalcone in the liver stage of the disease is chalcone **5.12**, with an IC₅₀ = $1.45 \pm 0,04 \mu$ M. This chalcone possesses an activity about 7 times superior to that of Primaquine®, which is one of the drugs used in the treatment of this stage.

In chapter 6, we present in detail the experimental procedures referring to all chapters of this thesis, as well as the complete chemical characterization of all molecules synthesized during this work.

Keywords: medicinal chemistry, multidrug-resistant microorganisms, tetrapyrrolic macrocycles, aPDT, biofilms

Nomenclatura

Nesta Tese, na maior parte dos casos, foram seguidas as recomendações da IUPAC para a numeração e nomeação dos compostos, salvo algumas exceções prontamente referidas nesta secção.

Porfirinas

Para a designação das porfirinas sintetizadas nesta Tese, foi utilizado o sistema de numeração da IUPAC,¹ que consiste na numeração de todos os átomos de carbono do macrociclo de 1 a 20 e os azotos internos de 21 a 24 (Figura I). Por vezes, será adotada a terminologia de Fischer,² que designa as posições 5, 10, 15 e 20 como *meso* e as posições 2, 3, 7, 8, 12, 13, 17 e 18 como posições β .

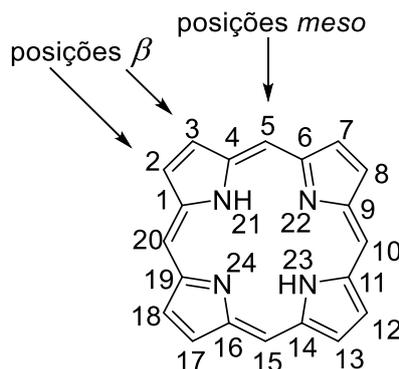


Figura I– Sistema de numeração IUPAC utilizado para porfirinas e respetivas designações segundo a terminologia de Fischer

No caso de porfirinas não-simétricas com dois substituintes diferentes nas posições *meso* do macrociclo (tipo A_2B_2), será adotada a designação de *trans* quando estes grupos se localizam nas posições 5 e 15 e *cis* quando se localizam nas posições 5 e 10 (Figura II).

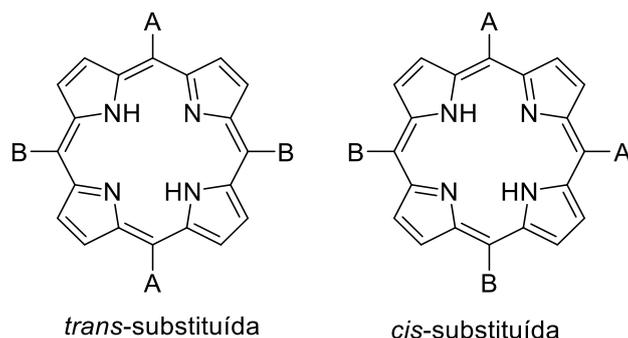


Figura II– Possíveis designações para porfirinas *meso*-substituídas não-substituídas do tipo A_2B_2

Relativamente aos derivados reduzidos das porfirinas (Figura III), são designadas por 2,3-dihidroporfirinas quando os carbonos saturados se encontram em um dos anéis pirrólicos, sendo muitas vezes utilizado o nome trivial “clorina”. Quando os carbonos saturados se encontram em dois anéis pirrólicos diametralmente opostos, são designadas por 7,8,17,18-tetrahidroporfirinas ou pelo nome trivial “bacterioclorina”. Quando os carbonos saturados se encontram em dois anéis pirrólicos consecutivos, são designadas por 2,3,7,8-tetrahidroporfirinas ou pelo nome trivial “isobacterioclorina”

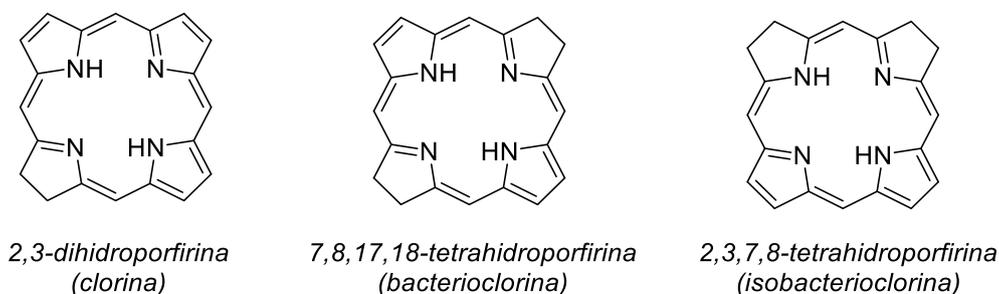


Figura III– Nomes IUPAC dos derivados reduzidos das porfirinas e respetiva designação trivial

Sub(ftalocianinas)

Para os precursores das (sub)ftalocianinas sintetizados nesta Tese, embora o nome proposto pela IUPAC seja “1,2-dicianobenzeno”, será utilizado o nome comum “ftalonitrilo”.³ O sistema de numeração utilizado nesta Tese para ftalonitrilos encontra-se de acordo com a nomenclatura IUPAC para anéis aromáticos (Figura IV).

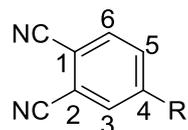


Figura IV– Sistema de numeração utilizado para ftalonitrilos monossustituídos

Para a numeração das ftalocianinas, foram utilizadas as regras da IUPAC definidas para este macrociclo (Figura V).⁴ Relativamente à numeração das subftalocianinas, foi adaptado o mesmo tipo de numeração.

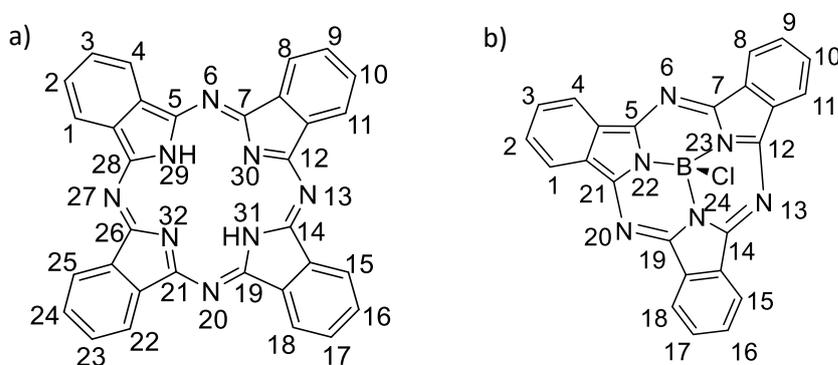


Figura V – a) Sistema de numeração IUPAC utilizado para ftalocianinas; b) Adaptação do sistema de numeração para as subftalocianinas

A numeração inicia-se num carbono do anel benzénico vicinal a um carbono de fusão entre o anel pirrólico e o anel benzénico. Depois de efetuada a numeração dos átomos que compõem o exterior do macrociclo, é feita a numeração dos azotos pirrólicos interiores. Dado que todas as ftalocianinas sintetizadas neste Tese partem de um ftalonitrilo monossustituído, ir-se-ão formar quatro isómeros posicionais, pelo que as posições alternativas dos grupos substituintes ocupadas em cada isómero são indicadas entre parêntesis. Relativamente às subftalocianinas, ir-se-ão formar dois isómeros posicionais. A título de exemplo, são apresentadas na figura VI uma ftalocianina, nomeada 2(3),9(10),16(17),23(24)-*tetraquis*(nitro)ftalocianinato de zinco (II) e uma subftalocianina, nomeada cloro[2,9,16(17)-*tris*(nitro)]subftalocianinato de boro (III).

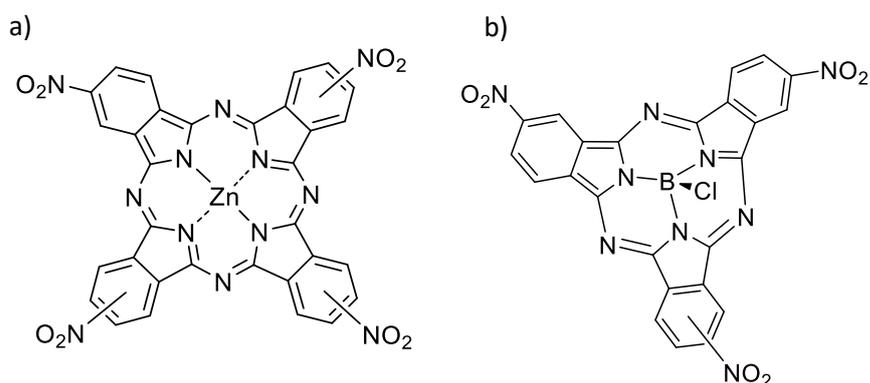


Figura VI – Estruturas exemplificativas de a) 2(3),9(10),16(17),23(24)-*tetraquis*(nitro)ftalocianinato de zinco (II); b) cloro[2,9,16(17)-*tris*(nitro)]subftalocianinato de boro (III)

Complexos de Fe (II)-NHC

Relativamente aos complexos de Fe (II) do tipo NHC sintetizados nesta Tese, por simplicidade de escrita, não foi adotada a nomenclatura IUPAC (Figura VII). Assim, à estrutura base com o nome sistemático 1-(1-fenil-2-(2,3,4,5-tetrametilciclopenta-2,4-dien-1-il)etil)-1*H*-imidazole, foi dado o nome PhCp^{*}-NHC. Aos respetivos pró-ligandos cationizados com um grupo alquílico na posição 3 do imidazole, foi atribuído o nome Cp^{*}-NHC^RI, em que “R” designa o grupo alquílico inserido e “I” o contra-íão iodeto. Relativamente aos complexos formados pelos pró-ligandos Cp^{*}-NHC^RI com Fe(II), este são designados por (Cp^{*}-NHC^RI)Fe(CO)I, em que CO e I representam os restantes ligandos do Fe(II).

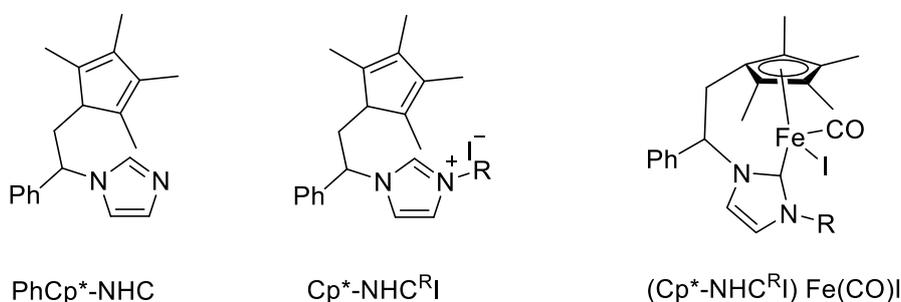


Figura VII– Estruturas base dos complexos de Fe(II)-NHC e pró-ligandos com as respetivas designações efetuadas nesta Tese

Chalconas

No capítulo 5 desta Tese, os compostos com uma estrutura base de nome sistemático IUPAC “(2E)-1,3-difenilprop-2-en-1-ona” serão designados pelo nome IUPAC “chalcona”. Estas estruturas são constituídas por dois anéis aromáticos (A e B) interligados por um carbono carbonilo α,β -insaturado (Figura VIII).⁵

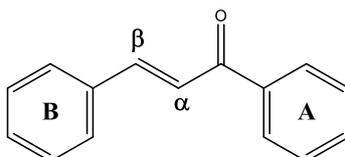


Figura VIII– Estrutura base de uma chalcona

Referências

1. Moss, G. P., Nomenclature of tetrapyrroles (Recommendations 1986). In *Pure & Appl. Chem.*, 1987; Vol. 59, pp 779-832.
2. Fischer, H.; Orth, H., *Die Chemie des Pyrrols*. Akad. Verlagsges: Leipzig, 1934.
3. Sharman, W. M.; Lier, J. E. V., *97 - Synthesis of Phthalocyanine Precursors*. Eds. Academic Press: Amsterdam, 2003.
4. Merritt, J. E.; Loening, K. L., Nomenclature of terapyrroles. *Pure & Appl. Chem.* **1979**, *51*, 2251-2304.
5. McNaught, A. D.; Wilkinson, A., *IUPAC Compendium of Chemical Terminology - Gold Book*. Blackwell Scientific Publications: Oxford, 2014.

Capítulo 1

1.1- Infecções microbianas: o grande desafio da Química Medicinal moderna

O desenvolvimento de novos tratamentos eficazes contra doenças infecciosas constitui um dos maiores desafios da Química Medicinal da atualidade e, certamente, também do futuro. Contrariamente a doenças crônicas ou tumorais, as doenças infecciosas são causadas por microrganismos que, pela sua plasticidade genética, são exímios em desenvolver mecanismos de adaptação a condições externas adversas, transmitindo essas características à sua descendência.^{1, 2} O tratamento de doenças infecciosas é, portanto, uma luta constante contra agentes que se vão aperfeiçoando à medida que são expostos a compostos terapêuticos novos, seguindo um processo de seleção natural darwiniano. Este é, portanto, um desafio contínuo, feito geração a geração, combinando um uso racional das opções terapêuticas disponíveis com o desenvolvimento de novos fármacos.

Em particular, a problemática das infecções por bactérias resistentes tem sido enfatizada por várias organizações, nomeadamente a OMS, que tem continuamente alertado para a urgência em desenvolver tratamentos novos e eficazes, tendo publicado, em 2017, uma lista global de 12 famílias de bactérias resistentes (incluindo por exemplo *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, e *Acinetobacter baumannii*) para as quais é urgente a investigação e desenvolvimento de novos antibióticos.³ O último estudo realizado em escala europeia mostrou que Portugal ocupa um dos lugares de topo em termos de resistência antimicrobiana, particularmente no que diz respeito à taxa de resistência à metilina da espécie *S. aureus* e de resistência às cefalosporinas da espécie *E. coli*, bactérias que surgem com frequência em infecções superficiais resultantes de queimaduras.^{4, 5} Segundo dados da Direção Geral de Saúde, a resistência antibacteriana da espécie *S.*

aureus tem subido gradualmente em quase todos os anos desde 2000, situando-se atualmente em valores próximos dos 50%.^{6, 7}

Por outro lado, no que diz respeito às infeções protozoárias, a malária é a doença com maior impacto no planeta. Segundo o último relatório da OMS disponibilizado sobre o tema, estima-se que existam 219 milhões de ocorrências e que esta doença seja responsável por 435.000 mortes anuais em todo o mundo.⁸ Projeções internacionais estimam que, se nenhuma medida eficiente for tomada, em 2050, cerca de 390.000 pessoas na Europa e 10 milhões em todo o mundo morrerão anualmente como consequência direta da resistência antimicrobiana, o que corresponde a uma mortalidade superior à que se verifica atualmente para doenças tumorais.⁹

Como já foi referido, tanto a nível de infeções bacterianas como protozoárias, o denominador comum é o problema do desenvolvimento de resistência aos fármacos atualmente disponibilizados pela indústria farmacêutica, o que tem dificultado o controlo das taxas de mortalidade ao longo das últimas décadas. Esta problemática, além de ser uma consequência de uma utilização abusiva e incorreta dos fármacos,^{10, 11} é agravada por uma diminuição perigosa da investigação nesta área por parte da indústria farmacêutica, quer por motivos estratégicos quer financeiros.^{12, 13} Existe, assim, a necessidade urgente de alterar o paradigma do tratamento de doenças infecciosas,^{14, 15} devendo a estratégia consistir na síntese de fármacos com novos e diversificados mecanismos de ação e, idealmente, menos passíveis de gerar resistência.

Baseado neste conhecimento e, como tentativa de dar algum contributo para a resolução desta problemática, o trabalho apresentado nesta Tese visa o *design* racional, síntese e avaliação biológica de várias famílias de compostos com propriedades estruturais modeladas estrategicamente para lhes conferir as características mais adequadas para sua potencial aplicação. Nas secções subsequentes, iremos discutir em pormenor ambas as doenças infecciosas abordadas – infeções bacterianas e malária- e cada uma das famílias selecionadas.

1.2- Desafios e terapias emergentes para superar a resistência antimicrobiana

1.2.1- Infecções bacterianas

Está bem estabelecido na literatura que as abordagens mais promissoras para o tratamento de infecções por bactérias multirresistentes e diminuição do aparecimento de novos mecanismos de resistência por parte destes microrganismos baseia-se no desenvolvimento de novos fármacos ou estratégias terapêuticas, que utilizem simultaneamente múltiplos mecanismos de ação. Esta abordagem tem como objetivo dificultar a aquisição de resistência por parte das bactérias, uma vez que a ocorrência de múltiplas mutações genéticas simultâneas na mesma célula microbiana que inviabilizem totalmente a ação destes agentes terapêuticos é um fenómeno de baixa probabilidade de ocorrência. Entre as abordagens descritas na literatura que se poderão inserir nesta modalidade, destacamos duas estratégias terapêuticas: a terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT, do inglês *antimicrobial photodynamic therapy*)^{16, 17} e o uso de organometálicos.¹⁸

1.2.1.1- Terapia fotodinâmica antimicrobiana

A terapia fotodinâmica consiste numa metodologia terapêutica que requer a combinação de três fatores: uma fonte de luz com comprimento de onda adequado, oxigénio molecular e um agente intermediário, denominado fotossensibilizador (PS, do inglês *photosensitizer*), capaz de absorver e transferir energia da fonte de luz para o oxigénio, conduzindo à formação de espécies citotóxicas que causam danos e, conseqüente, morte das células.¹⁹⁻²²

Na presença de luz, o PS transita para um estado excitado singuleto de maior energia. O retorno deste para o estado fundamental singuleto pode ocorrer de forma direta, através da emissão de luz (fluorescência) ou de calor (conversão interna), ou de forma indireta, sofrendo cruzamento intersistemas para o estado tripleto. Neste estado, o PS pode interagir com o oxigénio molecular por dois mecanismos diferentes. O mecanismo tipo I,²³ que consiste na transferência de eletrões para o oxigénio molecular, originando espécies reativas de oxigénio, tais como radicais superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radicais hidroxilo ($HO\cdot$), peróxido de hidrogénio (H_2O_2), etc. ou o mecanismo tipo II,^{24, 25} que

envolve a transferência de energia com a consequente formação de oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) (Figura 1.1). Dependendo das características dos PSs, a produção de ROS poderá prosseguir preferencialmente por um dos mecanismos acima descritos. De qualquer forma, os ROS produzidos têm a capacidade de promover reações de oxidação de vários tipos de biomoléculas, incluindo proteínas, lípidos e ácidos nucleicos. A especificidade para um determinado tipo de substrato irá depender do tipo de ROS formado, visto que estes possuem uma reatividade própria, consequência em parte de potenciais de oxidação diferentes, sendo, no entanto, o radical hidroxilo considerado o mais destrutivo. O eventual comprometimento da função de biomoléculas essenciais à sobrevivência das bactérias irá levar à sua inativação.

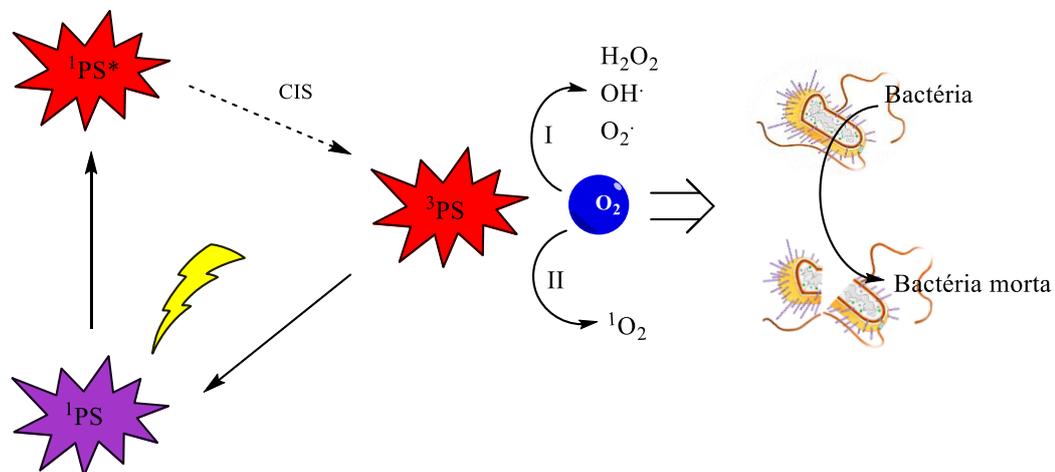


Figura 1.1- Esquema resumo do comportamento do PS em terapia fotodinâmica antimicrobiana: cis – cruzamento inter-sistemas

Maisch e os seus colaboradores²⁶ comprovaram a possibilidade das bactérias ativarem genes relacionados com a proteção contra ROS quando sujeitas a stresse, no entanto, as enzimas produzidas não são capazes de eliminar as elevadas quantidades de ROS formadas durante o tratamento e, devido à curta duração deste, não têm tempo para aumentar a produção das mesmas. Deste modo, até ao momento, ainda não foi possível induzir resistência a aPDT após tratamentos consecutivos com doses subletais, reforçando a aposta desta terapia como uma alternativa promissora para enfrentar a problemática da resistência aos antibacterianos.^{27, 28}

De modo a orientar o *design* de novos fotossensibilizadores com atividade antimicrobiana, considera-se relevante descrever a estrutura membranar dos seus alvos biológicos (bactérias, Figura 1.2). As células bacterianas exibem uma grande variedade de formas, tamanhos, arquitetura subcelular e composição bioquímica e, conseqüentemente, a suscetibilidade aos PSs pode ser substancialmente diferente. Esta família divide-se essencialmente em duas classes: as bactérias Gram-positivas e as Gram-negativas. As bactérias Gram-positivas apresentam na composição da sua parede celular os ácidos teicóico e lipoteicóico, organizados em múltiplas camadas de peptidoglicanos, conferindo um certo grau de porosidade, o que facilita a permeação de moléculas, mesmo quando estas possuem pesos moleculares mais elevados. Assim, nesta classe de bactérias, a parede celular não atua como uma barreira à permeabilidade para a maioria dos PSs comumente utilizados. Pelo contrário, as bactérias Gram-negativas, externamente à rede formada pelo peptidoglicano, possuem um elemento estrutural denso (membrana externa) com composição heterogénea, que inclui desde proteínas com função de porinas, a lipopolissacarídeos e lipoproteínas. Os lipopolissacarídeos, pela quantidade de grupos fosfato e carboxilato que possuem, conferem à superfície externa um escudo contínuo de carga negativa. Este sistema organizado forma uma barreira de permeabilidade efetiva, que se traduz num mecanismo de resistência intrínseca à ação de antibióticos, restringindo a permeação da maioria dos PSs.²⁹

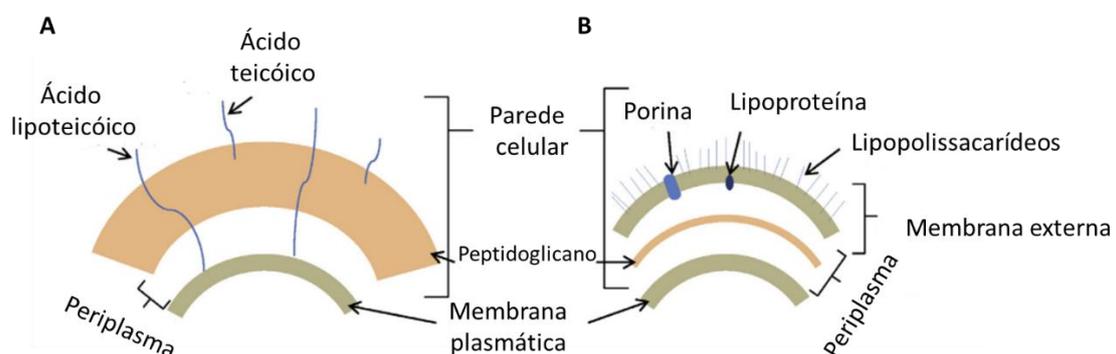


Figura 1.2 – Esquema simplificado da estrutura típica das paredes celulares de bactérias (A) Gram-positivas e (B) Gram-negativas, baseado em²⁹

Com base nestas considerações, as bactérias Gram-negativas revelam-se os alvos mais desafiantes. No âmbito da aPDT, a estratégia utilizada tem consistido essencialmente no desenvolvimento de fotossensibilizadores catiónicos, devido ao facto de estes conseguirem penetrar ou, pelo menos, estabelecer interações fortes com a membrana celular de ambas as classes de bactérias, mediante interações eletrostáticas com os resíduos carregados negativamente à sua superfície. Concomitantemente, vários estudos demonstraram que estes possuem uma maior seletividade para células bacterianas em detrimento de células humanas, o que é uma consequência do facto de as células eucarióticas possuírem uma composição lipídica diferente, contendo uma menor densidade de resíduos carregados negativamente à superfície. Apesar das restrições quanto ao tamanho molecular para uma eficaz permeação das membranas de bactérias Gram-negativas, existem reportados fotossensibilizadores de considerável tamanho com bons graus de inativação em culturas planctónicas, algo que pode ser explicado por múltiplos fenómenos: i) o mecanismo de internalização autopromovido, que envolve a criação de poros na membrana por deslocamento dos iões divalentes (Ca^{2+} e Mg^{2+}) que a estabilizam^{30, 31}; ii) comprometimento da estrutura membranar como consequência da oxidação dos seus constituintes pelos ROS gerados³². Por exemplo, os processos do tipo I são responsáveis pela inativação de *E. coli* e *S. aureus* usando *self-assembly* de uma metaloftalocianina de Zn(II) com diâmetros de 50 nm³³, provavelmente grande demais para atravessar a parede celular.; iii) o oxigénio singuleto, ao possuir tempo de vida de $\tau_{\Delta} \approx 3 \mu\text{s}$,³⁴ permite um diâmetro de difusão de 200 nm durante um período de $5 \tau_{\Delta}$ (sendo esta a espessura de uma membrana de *S. aureus*). Assim, é capaz de ser produzido por um fotossensibilizador localizado fora da bactéria e ele próprio atravessar a membrana e provocar danos em componentes intracelulares.³⁵

Na literatura descreve-se uma estratégia alternativa para o auxílio na permeação das membranas que consiste na administração simultânea de agentes desestabilizadores da membrana de bactérias Gram-negativas (Tris-EDTA e polimixina B) com os PSs.^{17, 36, 37} A adição simultânea de sais de iodo demonstrou também bons resultados.³⁸

No entanto, a maioria das bactérias não se encontra na forma planctónica, mas sim em comunidades microbianas incorporadas numa matriz e estabilizadas por superfícies biológicas ou não biológicas, denominadas biofilmes (Figura 1.3).³⁹

Basicamente, um biofilme é uma população microbiana embebida numa matriz envolvida por substâncias poliméricas extracelulares (EPS, do inglês *external polymeric substances*) auto-secretadas, compostas de polissacarídeos, proteínas, ADN extracelular, vesículas de membrana, etc.^{40, 41}

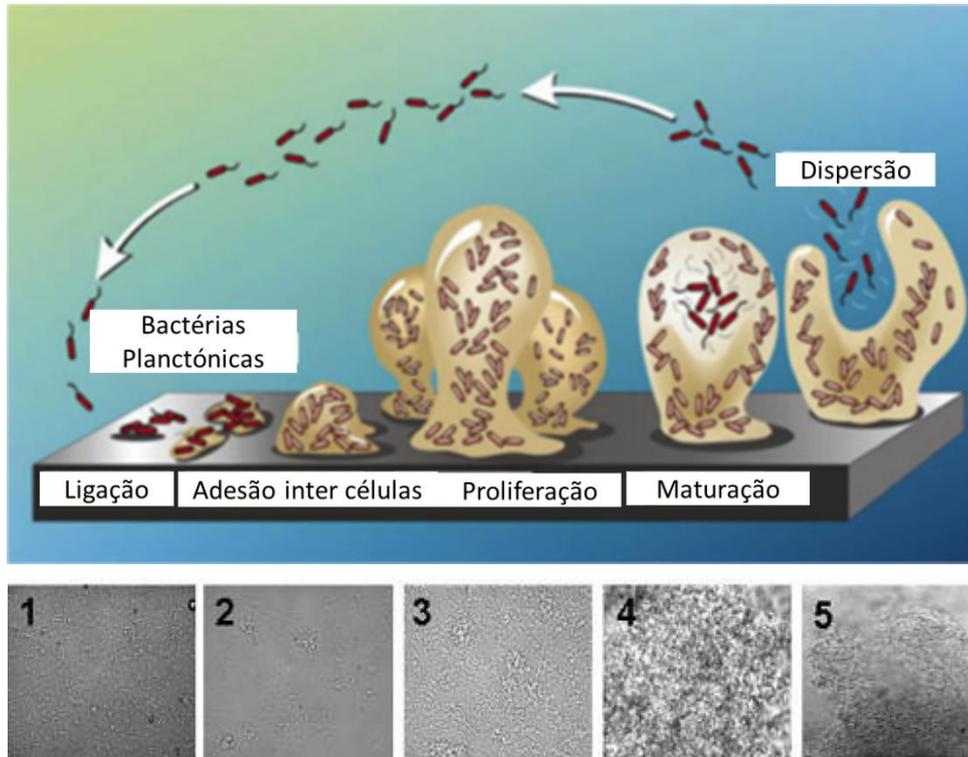


Figura 1.3 – Representação esquemática da formação de um biofilme bacteriano e imagens de microscopia, adaptado de MicrobeWiki.⁴² Imagens de microscopia: 1) Ligação, 2) Adesão inter células, 3) Proliferação, 4) Maturação, 5) Dispersão

Comparativamente às células planctônicas, as infecções bacterianas que envolvem biofilmes bacterianos são cerca de 10 a 1000 vezes mais difíceis de erradicar porque os biofilmes protegem as bactérias de ambientes hostis.⁴⁰ Estima-se que mais de 60% de todas as infecções microbianas são causadas por biofilmes. Vários mecanismos contribuem para a resistência dos biofilmes bacterianos, tais como a diminuição da difusão de biocidas, desativação do agente antimicrobiano pelas camadas externas do biofilme, dormência das bactérias em algumas regiões do biofilme e diferenciação para um estado fenotípico altamente protegido, além de mecanismos de resistência

convencionais, como por exemplo sobreexpressão de bombas de efluxo nas membranas.^{9, 43, 44}

Se relativamente às bactérias planctónicas são bastante conhecidas e discutidas as características que um fotossensibilizador deve possuir, o mesmo não acontece no caso dos biofilmes. Estes permanecem um *hot topic* na literatura atual, destacando-se o baixo peso molecular/tamanho do PS como a característica mais relevante para a difusão deste nos biofilmes.⁴⁵ Cieplik e os seus colaboradores⁴⁶ realizaram uma tentativa de provar este facto, comparando uma porfirina (tetraiodeto de 5,10,15,20-*tetraquis*(4-metilpiridínio)porfirina - TMPyP) e um pequeno novo fotossensibilizador, o SAPYR. Os resultados obtidos foram significativamente melhores com uma concentração de 100 μM do PS com menor número de cargas e tamanho (SAPYR). Apesar de os autores referirem que a fonte de luz utilizada ($\lambda_{\text{max}}=460$ nm) é mais adequada para a porfirina ($\lambda_{\text{max}}=422$ nm) do que para o SAPYR ($\lambda_{\text{max}}=360-410$ nm), através de uma análise mais detalhada das condições experimentais, pode observar-se uma baixa sobreposição dos respetivos espectros de absorção com o espectro de emissão da fonte de luz, o que revela que esta não é adequada para nenhum dos PSs. Neste sentido, com base nas diferentes propriedades fotofísicas e fotoquímicas (SAPYR $\phi_{\Delta}=0,99$ e TMPYP $\phi_{\Delta}=0,74$) e nas estruturas químicas completamente diferentes dos PSs, não é possível retirar uma conclusão assertiva da importância do tamanho.

Tendo em conta o supracitado, um fotossensibilizador ideal para aPDT e infeções localizadas⁴⁷ quer de bactérias planctónicas Gram-positivas e Gram-negativas, quer biofilmes, deve possuir as seguintes características: 1) elevada capacidade de absorção de luz (elevados valores de ϵ); 2) elevada capacidade de formação de ROS; 3) elevada fotoestabilidade durante a irradiação; 4) alguma hidrofiliabilidade e/ou cargas positivas para aumentar a afinidade e capacidade de interação com as paredes bacterianas carregadas negativamente; 5) elevado espectro de ação microbicida, permitindo o tratamento de infeções provocadas simultaneamente por múltiplas espécies bacterianas; 6) não ser citotóxico nem fototóxico em células humanas nas concentrações e doses de luz utilizadas em terapêutica e 7) capacidade de difusão em biofilmes.

Baseado neste conhecimento, decidiu-se seguir paralelamente duas estratégias: a primeira consistiu no desenvolvimento de compostos bimodais que incorporam na sua estrutura sulfonamidas, compostos com atividade bacteriana conhecida, e macrociclos tetrapirrólicos (porfirinas e bacterioclorinas) com o objetivo de obter novos compostos que possam simultaneamente atuar como antibacterianos *per si* e como fotossensibilizadores para inativação de bactérias, recorrendo à terapia fotodinâmica. Além disso, a presença de sulfonamidas pode funcionar como vetor para as células bacterianas, potenciando a seletividade do tratamento. A segunda estratégia consiste no desenvolvimento de duas diferentes famílias de fotossensibilizadores (porfirinas e (sub)ftalocianinas), mediante a síntese de novos compostos com estrutura similar mas diferente número de cargas e peso molecular, de forma a se poder fazer uma comparação fidedigna da importância destas propriedades na sua atividade antimicrobiana. Os resultados destes estudos encontram-se descritos nos capítulos 2 e 3 desta Tese.

A) Fotossensibilizadores bimodais

Ao realizar uma revisão da literatura de macrociclos tetrapirrólicos contendo grupos sulfonamidas na sua estrutura, verificou-se que, na maioria dos compostos, a ligação da sulfonamida à porfirina ocorre através do átomo de enxofre, sendo apenas exceção o composto sintetizado por Bhaumik⁴⁸, 5,10,15,20-*tetraquis*[4-*N*-(2,4-dinitrobenzeno)sulfonamidofenil]porfirina, em que a ligação ocorre pelo átomo de azoto. Por outro lado, a maioria destes encontram-se descritos como fotossensibilizadores para terapia fotodinâmica relacionada com tratamento de cancro,⁴⁹⁻⁵⁷ com exceção de duas porfirinas que foram testadas em bactérias. Roxo-rosa⁵⁸ testou o fotossensibilizador 5,10,15-*tris*(2,6-diclorofenil)-20-[4-*N*-(6-amino-hexil)sulfonamidofenil]porfirina (Figura 1.4, A), tanto em bactéria Gram-negativas como Gram-positivas. Neste trabalho, o composto, na concentração de 15 µM, foi irradiado durante 15 min com uma potência de 8,4 J/cm² em soluções com as estirpes *S. aureus* ATCC 24923 e *E. coli* ATCC 25922. A inativação bacteriana obtida foi de 3 log₁₀ para a estirpe Gram-positiva e 1,6 log₁₀ para a estirpe Gram-negativa. Mas, realmente interessantes foram os obtidos no escuro, onde o fotossensibilizador revelou ter uma atividade similar, com uma inativação de 2,3 log₁₀ em *S. aureus* e 1,4 log₁₀ em *E. coli*.

Estes resultados demonstraram que a exposição à luz apenas adiciona um pequeno efeito na inativação bacteriana e que a atividade da sulfonamida está intrinsecamente ligada a estes resultados. O facto de os resultados serem melhores para bactérias Gram-positivas era expectável devido à ausência de cargas positivas na molécula. Além disso, este composto é inócuo para o ADN celular⁵⁸. Adicionalmente, Dabrowski e os seus colaboradores⁵⁹ descreveram a síntese da 5,10,15,20-tetraquis(2,6-dicloro-3-N-etilsulfamoilfenil)porfirina (Figura 1.4, B) e avaliação da sua atividade contra bactérias Gram-negativas (*E. coli*, *P. aeruginosa*) e Gram-positivas (*S. aureus*). Este estudo demonstrou que a porfirina numa concentração de 20 µM exposta a luz visível (420±20 nm) com uma dose de luz de 10 J/cm² apresenta uma redução entre 2-3,5 log₁₀ nas três estirpes avaliadas. Outras porfirinas neutras foram utilizadas como fotossensibilizadores, mas não como agentes bimodais.⁶⁰⁻⁶⁴

Do nosso melhor conhecimento, apesar de várias bacterioclorinas terem sido descritas para aplicação em aPDT^{19, 65-69}, não se encontram bacterioclorinas funcionalizadas com sulfonamidas reportadas na literatura. No entanto, sabemos que estas fazem parte do portfólio da empresa Luzitin, S.A.⁷⁰ e são muito eficientes para terapia fotodinâmica de cancro.⁵⁰

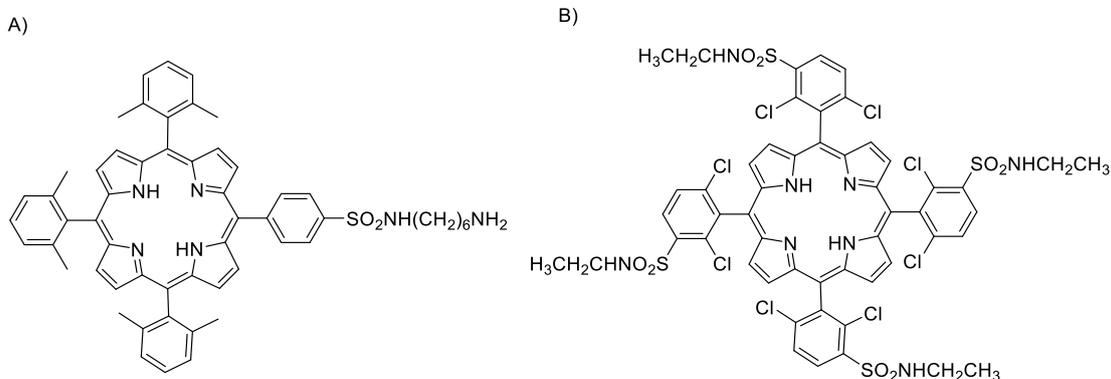


Figura 1.4 – Estrutura dos compostos bimodais com sulfonamidas testado em bactérias por (A) Rosa-Roxo⁵⁸ e (B) Dabrowski⁵⁹

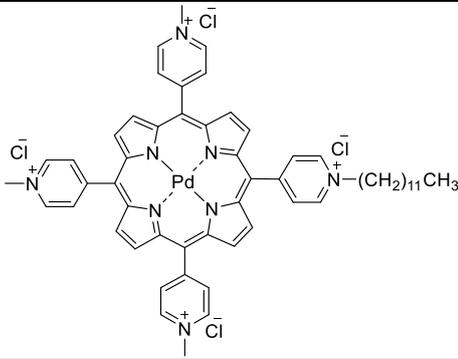
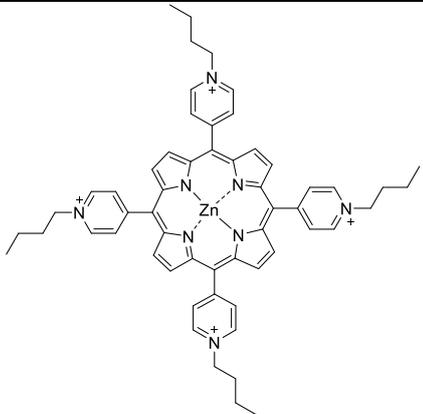
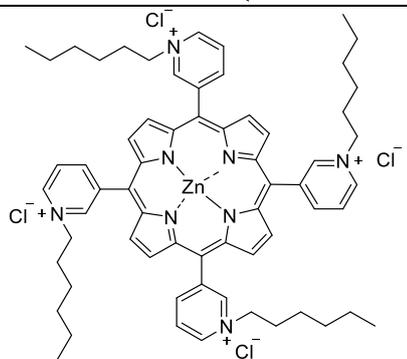
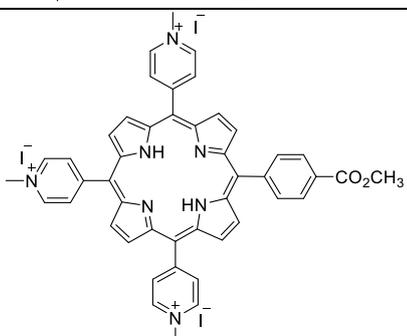
Com base nestes resultados promissores, a estratégia utilizada no *design* das entidades moleculares desenvolvidas e apresentadas nesta Tese consistiu na tentativa de encontrar sinergias entre a utilização de aPDT combinada com sulfonamidas reconhecidas como bons agentes antibacterianos.

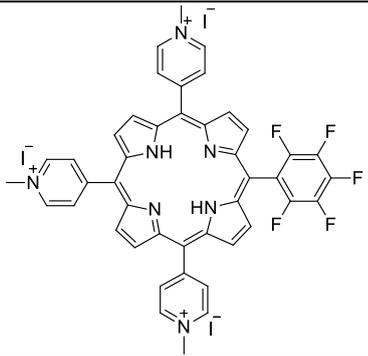
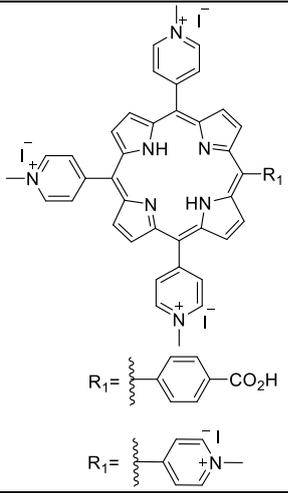
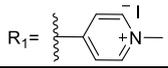
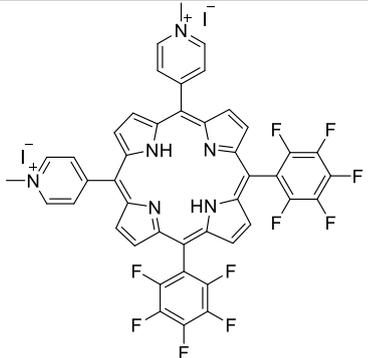
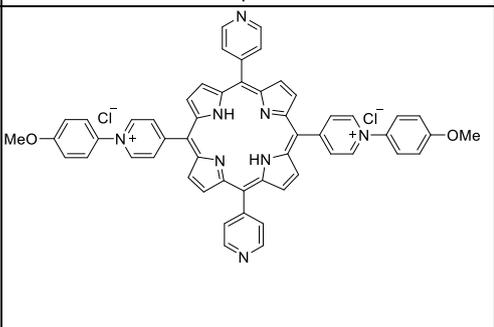
B) Porfirinas catiónicas

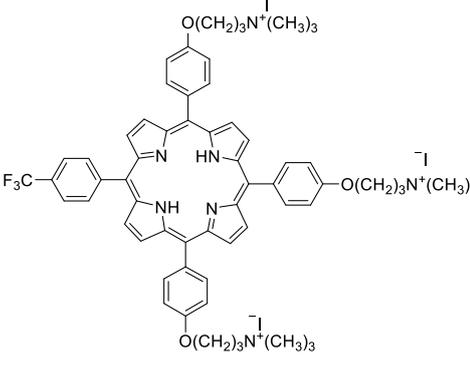
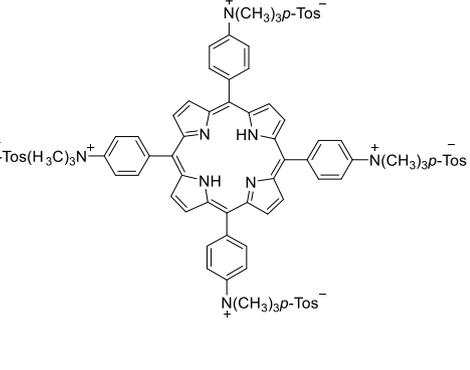
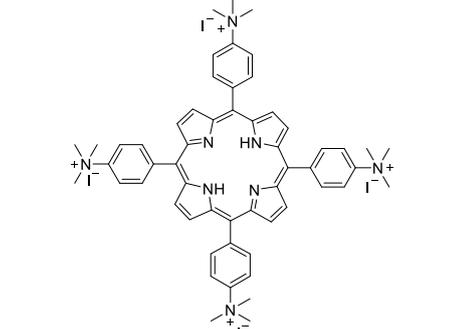
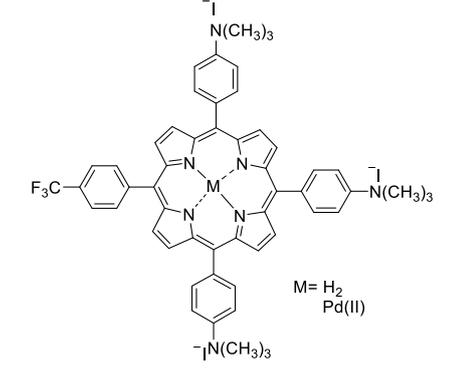
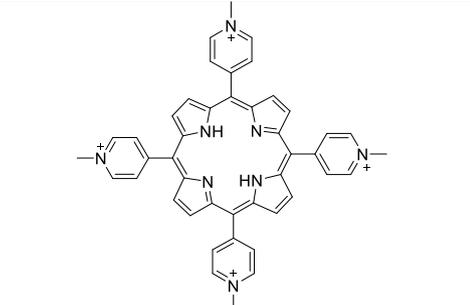
Tal como realçado acima, alguma hidrofiliçidade e/ou cargas positivas são importantes para aumentar a afinidade e capacidade de interação com as paredes das bactérias Gram-negativas carregadas negativamente. Deste modo, optou-se também nesta Tese pela síntese de novas porfirinas catiónicas. Pela revisão da literatura efetuada, pode constatar-se que este tipo de fotossensibilizadores é muito utilizado em aPDT (tabelas 1.1, 1.2 e 1.3) não tendo, no entanto, ainda sido encontrado o composto com as propriedades ideais para a inativação de espécies de bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e, especialmente, quando estas se encontram sob a forma de biofilmes.

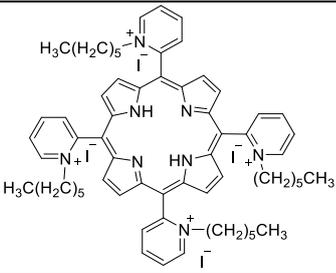
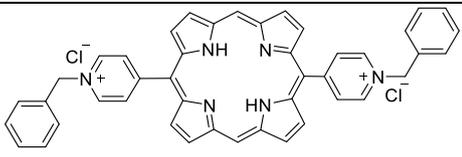
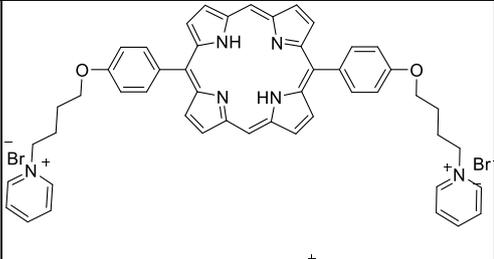
Vários autores relataram a eficiência antibacteriana em culturas planctónicas de porfirinas catiónicas^{29, 71-74} e os resultados encontram-se na tabela 1.1, todavia, os resultados descritos são difíceis de serem comparados com os obtidos neste trabalho, principalmente devido à utilização de diferentes sistemas de irradiação e cálculo da dose de luz realmente atingida através da sobreposição dos espectros de absorção dos PSs com os espectros de emissão da fonte de luz. Destacam-se os trabalhos desenvolvidos por Gyulkhandanyan e os seus colaboradores (Tabela 1.1, entrada 2)^{75, 76}, que conseguiram atingir uma inativação total (8 log₁₀) de bactérias da espécie *E. coli* com apenas 1,48 µM de concentração de tetrabrometo de 5,10,15,20-*tetraquis*[4-*N*-(2'-butil)piridil]porfirinato de zinco (II), usando baixos tempos de irradiação (30 minutos) e por Arrojado *et al*⁷⁷ (Tabela 1.1, entrada 5) que conseguiu inativação total (8log₁₀) com uma concentração de 5 µM de triiodeto de 5,10,15-*tris*(*N*-metilpiridínio-4-il)-20-pentafluorofenilporfirina em bactérias Gram-positivas (*S. aureus* e *E. faecalis*) e Gram-negativas (*P. aeruginosa* e *E. coli*), apesar de usar tempos de irradiação (60-270 minutos) e doses de luz superiores (144-648 J/cm²). Uma elevada inativação (7,5 log₁₀) foi também obtida com a TMPyP em *E. coli* com uma concentração de 5 µM e um tempo de irradiação bastante curto, 9 minutos, ideal para uma futura aplicação clínica da terapêutica.⁷⁸ (Tabela 1.1, entrada 6)

Tabela 1.1- Estrutura das porfirinas catiônicas avaliadas em bactérias planctônicas

#	Ps	Fonte de luz/ dose de luz/tempo de irradiação	Bactéria	[I] μM	Eficácia	ref
1		<p>LED ($\lambda_{max} = 415$ min)</p> <p>50 mW/cm²</p> <p>5-10 J/cm²</p> <p>2-4 min</p>	<p><i>S. aureus</i></p> <p><i>E. coli</i></p>	<p>10</p> <p>100</p>	6-7 log	⁷⁹
2		<p>Luz branca</p> <p>30 mW/cm²</p> <p>54 J/cm²</p> <p>30 min</p>	<p><i>S. aureus</i></p> <p><i>E. coli</i></p>	<p>1,4</p> <p>8</p>	8 log	^{75, 76}
3		<p>Lâmpada incandescente</p> <p>33-66 mW/cm²</p> <p>19 J/cm²</p> <p>5 min</p>	<p><i>E. coli</i></p>	1	6 log	⁸⁰
4		<p>Luz branca</p> <p>40 mW/cm²</p> <p>648 J/cm²</p> <p>270 min</p>	<p><i>E. coli</i></p>	5	>4.2log	⁸¹

5		<p>Luz branca 40 mW/cm²</p> <p>144-648 J/cm²</p> <p>60-270 min</p>	<p><i>E. faecalis</i> <i>S. aureus</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>E. coli</i></p>	5	8 log	77, 82
6	 <p>R₁ = </p> <p>R₁ = </p>	<p>Luz branca 40 mW/cm²</p> <p>15-21,6 J/cm²</p> <p>6-9 min</p>	<p><i>E. faecalis</i>; <i>E. coli</i></p>	5	~7 log ~7,5 log	78
7		<p>Luz branca 30 mW/cm²</p> <p>5 min</p>	<p><i>S. aureus</i></p>	5	7 log	83
8		<p>Lâmpada de halogéneo-tungsténio de 500W</p> <p>30 min, <i>S. aureus</i></p> <p>60 min: <i>E. coli</i> e <i>P. aeruginosa</i></p>	<p><i>S. aureus</i> <i>E. coli</i> <i>P. aeruginosa</i></p>	7,3	6-7 log	84

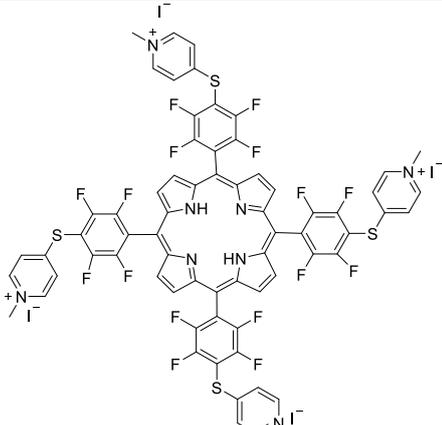
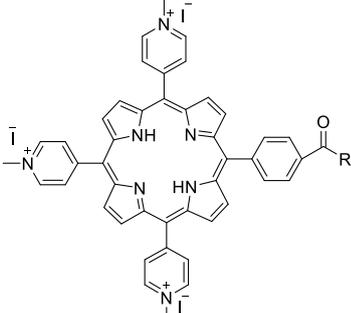
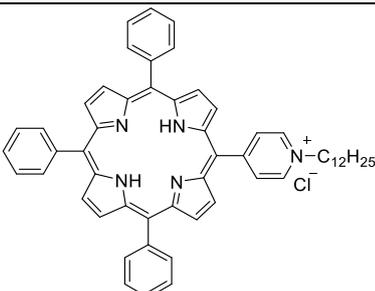
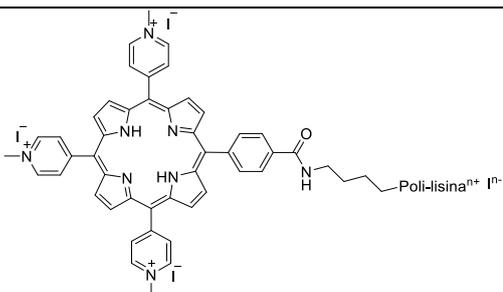
9		<p>Projektor Novamat 130 AF equipado com uma lâmpada de 150W</p> <p>90 mW/cm²</p> <p>54 J/cm²</p> <p>10 min</p>	<i>E. coli</i>	1	5,9 log	85
10		<p>Projektor Novamat 130 AF equipado com uma lâmpada de 150W</p> <p>90 mW/cm²</p> <p>1296 J cm⁻²</p> <p>240 min</p>	<i>E. coli</i>	1	3,5 log	86
11		<p>Lâmpada de tungstênio 100 W</p> <p>30 min</p>	<i>B. subtilis</i> <i>P. aeruginosa</i>	10 20	100% 38.4%	87, 88
12		<p>Projektor Novamat 130 AF equipado com uma lâmpada de 150W</p> <p>90 mW/cm²</p> <p>162 J/cm²</p> <p>30 min</p>	<i>E. coli</i>	10	5,5 log	89, 90
13		<p>Lâmpada de halogéneo 500W</p> <p>50 mW/cm²</p> <p>90 J/ cm2</p> <p>30 min</p>	<i>S. aureus</i>	20	4,5 log	91

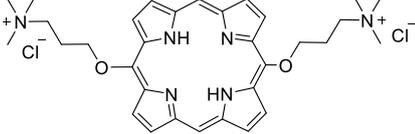
14		<p>Lâmpada incandescente</p> <p>35 mW/cm²</p> <p>42 J/cm²</p> <p>20 min</p>	<i>E. coli</i>	5,0	>6 log	92
15		<p>Lâmpada de halogéneo 500W</p> <p>48 mW/cm²</p> <p>216 J/cm²</p> <p>75 min</p>	<p><i>E. faecalis</i></p> <p><i>S. aureus</i></p> <p><i>E. coli</i></p> <p><i>P. aeruginosa</i></p>	10	6log	93
16		<p>Lâmpada de halogéneo-tungsténio de 500W</p> <p>54 J/cm²</p> <p>30 min</p>	<p><i>B. subtilis</i></p> <p><i>E. coli</i></p>	1	3 log	94

Nota: [] corresponde a concentração

Relativamente a estudos com bactérias resistentes, realça-se o trabalho reportado por Costa⁹⁵, com estirpes de *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina (MRSA) recolhidas do Centro Hospitalar da Universidade de Coimbra, provenientes de exsudatos de feridas. Neste trabalho, foi possível uma inativação total (7log₁₀) de MRSA com uma concentração de 1 μM de tetraiodeto de 5,10,15,20-tetraquis[2,3,5,6-tetrafluoro-4-(*N*-metilpiridínio-4-ilsulfanil)fenil]porfirina. Salienta-se, no entanto, a elevada dose de luz necessária (540 J/cm²) e tempo de irradiação (60 minutos). (Tabela 1.2, entrada 1).

Tabela 1.2- Estrutura das porfirinas catiónicas avaliadas em bactérias planctónicas resistentes

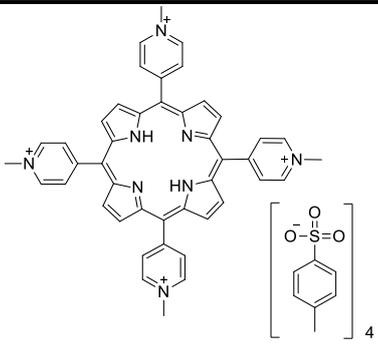
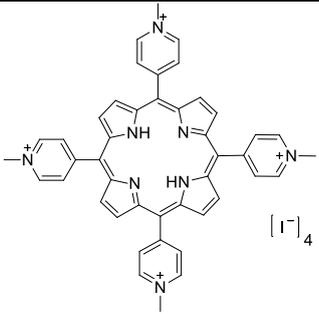
#	Ps	Fonte de luz/ dose de luz/tempo de irradiação	Bactéria	[μM	Eficácia	ref
1		Lâmpada de quartzo/halo géneo de 250W de luz branca (400- 800 nm) 150 mW/cm ² 540 J/ cm ² 60 min	<i>S. aureus</i> (<i>MRSA</i>)	1	~8 log	⁹⁵
2	 R=Gly-Asn-Asn-Arg-Pro-Val-Tyr-Ile-Pro-Gln-Pro-Arg-Pro-Pro-His(N-CH ₃)-Pro-Arg-Leu-OH	Luz azul (390-460 nm) 15,2 mW/cm ² 13,5 J/ cm ² 15 min	<i>S. aureus</i> (<i>MRSA</i>) <i>E. coli</i>	1 5	7. log	⁹⁶
3		Lâmpada de quartzo- halogéneo 100 mW/cm ² 180 J/cm ² 30 min	<i>S. aureus</i> (<i>MRSA</i>)	10	3 log	⁹⁷
4		Luz branca 50 mW/cm ² 90 J/cm ² 30 min	<i>S. aureus</i> (<i>MRSA</i>) <i>E. coli</i>	2,5	4 log	⁹⁸

5		<p>Lâmpada UV 236; Emissão a 380-480 nm</p> <p>15,2 mW/cm²</p> <p>13,7 J/cm²</p> <p>15 min</p>	<p><i>S. aureus</i> (MRSA) <i>E. coli</i></p>	10	<p>>5.8 log</p> <p>4.5 log</p>	99
---	---	--	--	----	-----------------------------------	----

Nota: [] corresponde a concentração

Relativamente aos estudos de porfirinas catiónicas em biofilmes (Tabela 1.3), a TMPyP foi a porfirina que demonstrou melhores resultados, com uma inativação de 6,3 log₁₀ em biofilmes de *S. aureus*, utilizando uma concentração de 20 μM de composto e uma dose de luz de 64,8 J/cm² (tabela 1.3, entrada 5).¹⁰⁰ Os restantes compostos não conseguiram inativações acima de 4 log₁₀, quer recorrendo a altas doses de luz^{60, 101-103} ou altas concentrações de composto^{46, 103} (Tabela 1.3, entradas 1-4, 6). Deste modo, com os resultados planctónicos e em biofilmes, a TMPyP revela-se como um dos melhores fotossensibilizadores catiónicos até ao momento.

Tabela 1.3- Estrutura das porfirinas catiônicas avaliadas em biofilmes bacterianos

#	PS	Fonte de luz/ dose de luz/tempo de irradiação	Bactéria	[] μM	Eficácia	ref
1		Lâmpada de tungstênio 66 mW/cm ² 150-200 J/cm ² 38-50 min	<i>S. aureus</i>	10	1-2 log	¹⁰¹
2		Lâmpada de tungstênio 166 mW/cm ² 150-300 J/cm ² 15-30 min	<i>S. epidermis</i>	10	3-4 log	¹⁰²
3		Lâmpada de mercúrio (100W) 220-240 J/cm ² 10 min	<i>P. aeruginosa</i>	225	4 log	¹⁰³
4		LED 1360 mW/cm ² 163 J/cm ² 2 min	<i>E. faecalis</i>	100	0 log	⁴⁶
5		Luz branca 4 mW/cm ² 64,8 J/cm ² 270 min	<i>S. aureus</i>	20	6,3 log	¹⁰⁰

Nota: [] corresponde a concentração

C) Ftalocianinas e subftalocianinas

A motivação do interesse na família das (sub)ftalocianinas é bastante semelhante à das porfirinas catiônicas. Mais uma vez, focamos a nossa atenção em compostos catiônicos, de modo a obter uma inativação mais eficiente de bactérias de ambas as classes, Gram-negativas e Gram-positivas. Concomitantemente, conseguimos

obter duas estruturas congêneres, nas quais varia o peso molecular, não alterando significativamente a estrutura base das moléculas.

Ftalocianinas catiónicas contendo diferentes motivos estruturais foram relatadas para aplicação em aPDT tanto em bactérias Gram-positivas como Gram-negativas.¹⁰⁴⁻¹⁰⁹ Entre estas, destacam-se as metaloftalocianinas contendo grupos *N*-metilpiridínio, com vários metais centrais e padrões de substituição,¹¹⁰⁻¹¹⁶ que se têm demonstrado eficazes contra uma ampla variedade de bactérias, atingindo uma redução de 5 log₁₀ com baixas concentrações. Por outro lado, a ftalocianina octa catiónica de Zn (II) com grupos 1,2-etanodiamina¹¹⁷ conseguiu uma redução de 5 log₁₀ de *E. coli* com concentrações de 5 µM e uma redução de 4 log₁₀ de *S. aureus* com apenas 0,5 µM.¹¹⁸ Soncin *et al.*¹¹⁹ sintetizaram um conjunto de ftalocianinas que diferem no número (um, quatro ou oito) de substituintes anilínio catiónicos nas posições periféricas (β) e não-periféricas (α) do macrociclo, com uma redução de até 5 log₁₀ com a concentração de 100 nM em bactérias da espécie *S. aureus*. Outros derivados de metaloftalocianinas tetra e octa catiónicas de Zn (II) substituídas com os grupos trialquilanilínio provocaram uma redução de 6 log₁₀ nas culturas de *S. aureus* e *E. coli* em concentrações de 1 µM.¹⁰⁴

No Grupo de Catálise e Química Fina em colaboração com Dabrowski e a sua equipa¹²⁰, foi desenvolvida uma nova família de tetra-imidazolil ftalocianinas catiónicas com uma diversidade de tamanho da cadeia alquílica, grau de cationização e metal coordenado. Os resultados obtidos demonstraram que concentrações de 0,1 µM de tetraiodeto de 2(3),9(10),16(17),23(24)-*tetraquis*(3'-etil-1'*H*-imidazol-1'-il)ftalocianinato de zinco (II) reduzem as colónias de bactérias Gram-negativas (*E. coli*, *P. aeruginosa*) em 7 log₁₀.

As subftalocianinas (SubPcs) são compostos homólogos da família das ftalocianinas (Pcs), apresentando menor peso molecular e propriedades fotofísicas particulares. São caracterizadas por um conjunto de três anéis de isoindol ligados por pontes azo em torno de um átomo de boro central, possuindo um conjunto de ligações duplas conjugadas que formam um anel aromático com apenas catorze eletrões π.¹²¹

Tal como várias grandes invenções na História, as subftalocianinas foram fortuitamente descobertas, em 1972, por Meller e Ossko¹²², quando estes tentavam

obter a ftalocianina de boro. Com efeito, a reação de condensação do ftalonitrilo, na presença de tricloreto de boro (BCl_3) em 1-cloronaftaleno a $200\text{ }^\circ\text{C}$, não conduziu ao produto esperado da reação de ciclotramerização. Em vez disso, observaram a formação de um composto violeta, cuja análise foi consistente com a formação da cloro subftalocianina de boro (Figura 1.5).

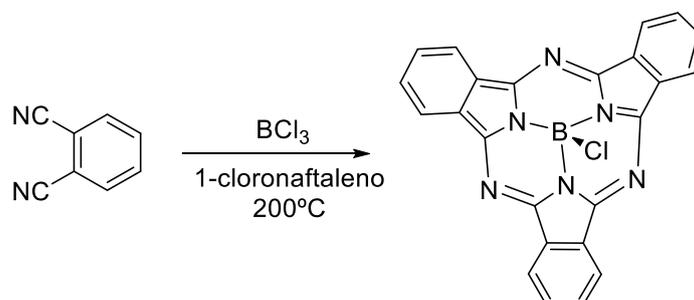


Figura 1.5 - Síntese da primeira subftalocianina por Meller e Ossko

Devido às características exibidas, estas podem ser aplicadas no foro das ciências dos materiais, incluindo fotoconversão de energia solar em energia química¹²³ e em ótica não-linear¹²⁴, e no foro da medicina, com particular atenção para a sua potencial utilização como fotossensibilizadores em Terapia Fotodinâmica (PDT). Atualmente, as subftalocianinas são sintetizadas em múltiplos casos com rendimentos por vezes superiores a 90%, através da reação de ciclotrimerização dos seus precursores de síntese (os ftalonitrilos), na presença de um derivado de boro (geralmente um trihalogeneto de boro do tipo BX_3 , como por exemplo, o BCl_3 e o BBr_3 , Figura 1.5). Contudo, é de salientar que o ácido de Lewis BCl_3 é mais comumente utilizado na síntese destes compostos, uma vez que, sendo menos reativo que o BBr_3 , dará origem à correspondente subftalocianina de boro contendo um átomo de cloro axialmente ligado, que é mais estável devido à maior força da ligação B-Cl comparativamente à da ligação B-Br.¹²¹ Em contraste com os seus congêneres - as ftalocianinas - as subftalocianinas possuem uma estrutura cônica, imposta por fatores estéreos e estabilizada pela natureza tetraédrica do átomo central de boro que, até à data, é o único elemento químico que foi possível introduzir no interior da cavidade central do macrociclo.¹²¹ Esta peculiar estrutura proporciona às subftalocianinas uma solubilidade relativamente elevada e baixa tendência para agregarem, em virtude da menor planaridade dos anéis aromáticos destes macrociclos.¹²⁵ Adicionalmente, a grande

vantagem fotofísica desta classe de compostos é baseada nas suas fortes propriedades de absorção de luz na região visível (entre 500 a 650 nm). É de realçar ainda que o baixo peso molecular destes compostos poderá potenciar a sua permeação nas membranas celulares, maximizando o *uptake* do potencial fotossensibilizador pelas células-alvo e tornando este PS extremamente promissor para aplicações dérmicas. Além das propriedades físico-químicas destes compostos serem muito atraentes para diversas áreas, estas podem ser eficientemente moduladas. Primeiramente, através de estratégias de modelação do seu precursor – o ftalonitrilo ou, após sintetizadas, através de dois tipos de funcionalização do macrociclo: a) a reatividade axial¹²⁶ e b) a reatividade periférica¹²⁷ (Figura 1.6).

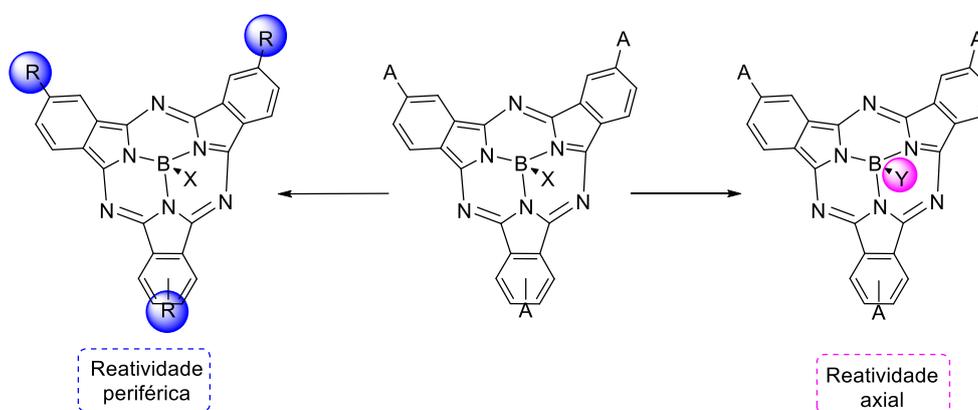


Figura 1.6 - Diferentes modos de reatividade das subftalocianinas

Nos estudos executados do decorrer desta Tese, dedicamo-nos à modulação dos ftalonitrilos, uma vez que pretendíamos sintetizar ftalocianinas e subftalocianinas com os mesmos substituintes.

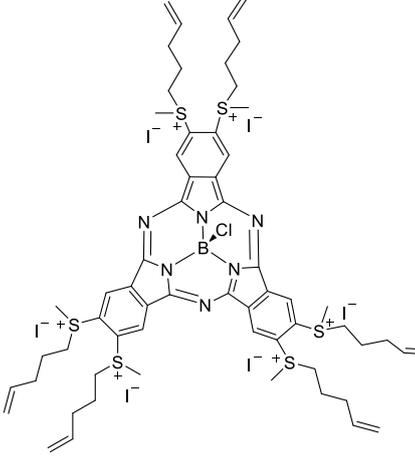
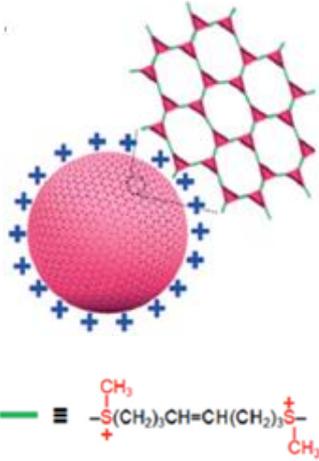
Estudos pioneiros em aPDT foram reportados em 2007, com um trabalho de Durantini¹²⁸, que consistiu na síntese da triiodeto de cloro[2,9,16(17)-*triquis*(4-(*N*-metilpiridiloxi))]subftalocianinato de boro (III) e na avaliação da sua capacidade microbicida de bactérias do tipo *E. coli*. Verificou-se que com uma concentração de 4 μM de PS e um tempo de irradiação de apenas 30 minutos se conseguia uma redução de 2,5 \log_{10} (Tabela 1.3, entrada 1). Em 2012, Díndar e os seus colaboradores¹²⁹ reportaram a síntese de uma subftalocianina neutra hidroxil[2,9,16(17)-*triquis*(3,5-di-*tert*-butil-4-hidroxifenil)]subftalocianinato de boro (III) e avaliaram a sua atividade antibacteriana na presença de luz, quer em bactérias Gram-positivas, quer Gram-

negativas. Observou-se que, em bactérias Gram-negativas, esta não possuía atividade mas, com uma irradiação de 180 minutos, conduzia a uma inativação total ($6\log_{10}$) de *S. aureus* e *E. faecalis* com uma concentração de PS de $0,9 \mu\text{M}$ (Tabela 1.3, entrada 2).

Mais recentemente, *Kim et al*¹³⁰ descreveu a síntese da triiodeto de cloro[2,3,9,10,16,17-hexaquis(penten-4-ilmetilulfanil)]subftalocianinato de boro (III) e de uma nanoesfera composta por várias unidades desta subftalocianina ligadas covalentemente. Tanto a subftalocianina catiónica, como a nanoesfera foram irradiadas com um laser ($\lambda_{\text{ex}}=600 \text{ nm}$), tendo a nanoesfera se revelado cerca de 200 vezes mais ativa que a subftalocianina catiónica (Tabela 1.3, entradas 3 e 4). Os resultados obtidos foram notáveis, conseguindo uma inativação total ($8 \log_{10}$) de bactérias da espécie *E. coli* com uma irradiação de apenas 60 segundos, correspondente a uma dose de luz de $4,2 \text{ J/cm}^2$ (Tabela 1.3, entrada 4).

Tabela 1.3- Estrutura das subftalocianinas avaliadas em aPDT

#	PS	Fonte de luz/ dose de luz/tempo de irradiação	Bactéria	[] μM	Eficácia	ref
1		Projetor Novamat 130 AF equipado com uma lâmpada de 150W 135 J/cm^2 30 min	<i>E. coli</i>	4	2,5 log	¹²⁸
2		$103,3 \text{ mW/cm}^2$ 1100 J/cm^2 180 min	<i>S. aureus</i> <i>E. faecalis</i>	0,9	6 log	¹²⁹

3		<p>Laser (600 nm)</p> <p>70 mW/cm²</p> <p>4,2 J/cm²</p> <p>1 min</p>	<p><i>E. coli</i></p> <p><i>S. aureus</i> (MRSA)</p>	<p>2</p> <p>4</p>	<p>8 log</p>	<p>¹³⁰</p>
4		<p>Laser (600 nm)</p> <p>70 mW/cm²</p> <p>4,2 J/cm²</p> <p>1 min</p>	<p><i>E. coli</i></p> <p><i>S. aureus</i> (MRSA)</p>	<p>0,010</p> <p>0,020</p>	<p>8 log</p>	<p>¹³⁰</p>

De acordo com a pesquisa supracitada, podemos observar que as três famílias de compostos abordadas são promissoras para a sua aplicação em aPDT.

1.2.1.2- Organometálicos como antibacterianos

O conhecimento empírico das propriedades antissépticas dos metais, mais concretamente da prata, remonta à Grécia antiga, onde já eram utilizados utensílios de prata para a conservação de alimentos e água.¹³¹ O contínuo estudo das propriedades deste metal levou ao desenvolvimento de sais orgânicos de prata como antibióticos, como é o caso da sulfadiazina de prata (Figura 1.7), um antibiótico utilizado em queimados para a prevenção de infeções. Apesar de o mecanismo de ação da prata não

ser totalmente compreendido, sabe-se que atua por interação com múltiplos alvos, nomeadamente com proteínas específicas e ácidos nucleicos.¹³²

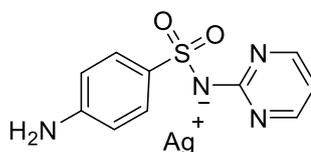
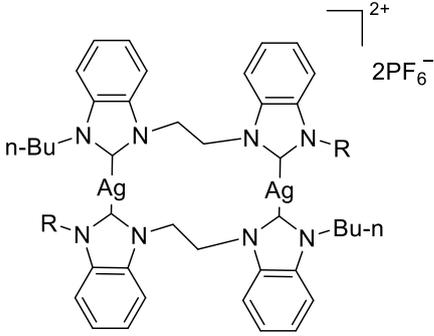
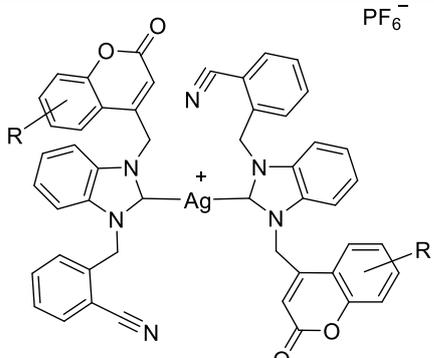
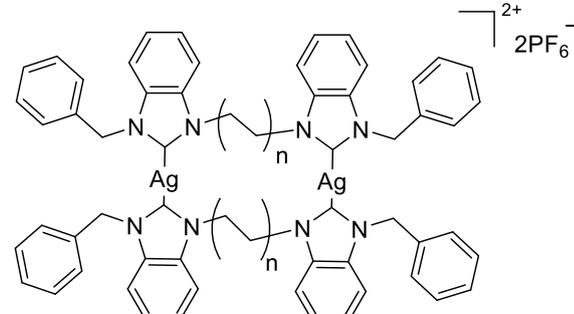
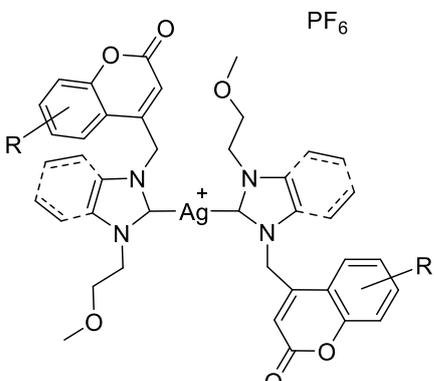


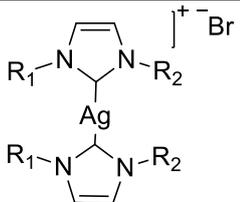
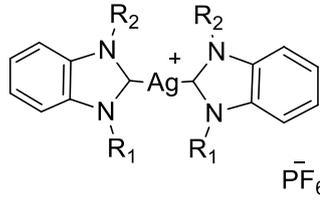
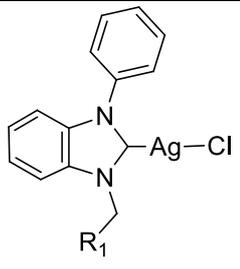
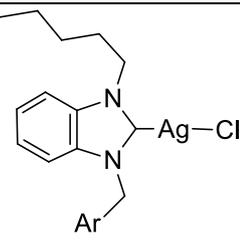
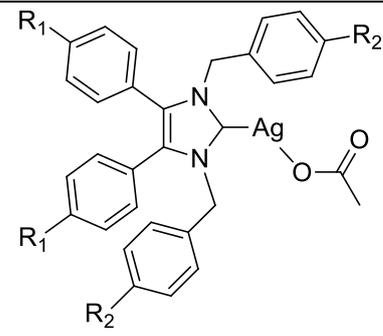
Figura 1.7 – Estrutura química da sulfadiazina de prata

Deste modo, a utilização de organometálicos como agentes antimicrobianos é considerada uma estratégia bastante atrativa, uma vez que os metais podem: i) conferir novos mecanismos de ação multi-alvo, como é o caso da sulfadiazina de prata; ii) modularem a anfifilicidade das moléculas e, conseqüentemente, a interação com as membranas (*uptake*); iii) gerar espécies reativas de oxigênio, que podem matar bactérias por mecanismos descritos previamente. Deste modo, a síntese de novos compostos organometálicos é uma abordagem promissora para superar o problema da resistência antimicrobiana, uma vez que eles podem oferecer um modo de ação específico do metal que não está disponível para a molécula puramente orgânica.¹³³

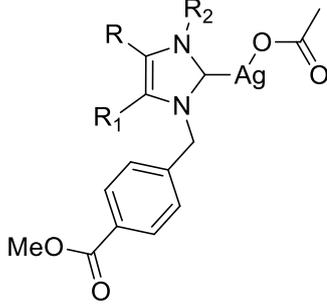
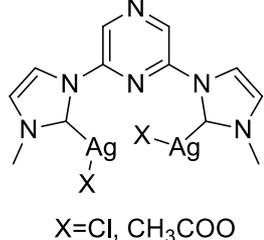
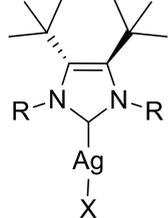
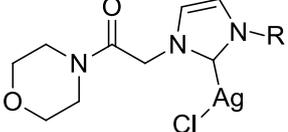
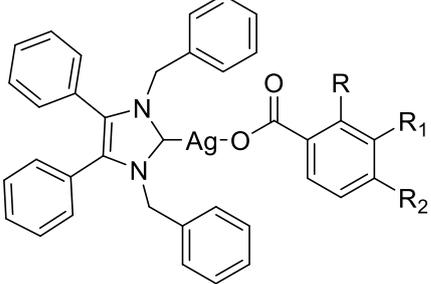
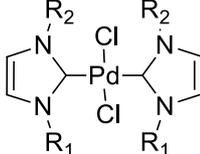
Complexos metálicos de carbenos N-heterocíclicos (NHC) têm sido amplamente explorados na química organometálica e na catálise homogênea¹³⁴⁻¹³⁶ e recentemente reportados na literatura como moléculas promissoras para diversas aplicações em química medicinal.^{137, 138} Em 2004, Young e os seus colaboradores¹³⁹ relataram originalmente o uso de um complexo de Ag (I) NHC para fins de aplicação antibacteriana (9 a 12 mm de diâmetro da zona de inibição de crescimento em meio sólido). Depois disso, outros complexos de prata (Tabela 1.4, entradas 1-18)¹⁴⁰⁻¹⁵⁸, paládio (Tabela 1.4, entradas 19 e 20)¹⁵⁹, ouro (Tabela 1.4, entradas 21-27)^{156, 160,161,162,163,164,165}, rutênio (Tabela 1.4, entradas 28-29) e ródio (Tabela 1.4, entradas 30-31)¹⁶⁶, demonstraram possuir atividade antibacteriana. NHCs de mercúrio¹⁶⁷ foram também reportados como antibacterianos atingindo MICs de 22 µg/ml quer em *S. aureus*, quer em *E. coli*, no entanto devido à sua impossibilidade óbvia de aplicação *in vivo* (toxicidade elevada), decidiu-se não os inserir na tabela.

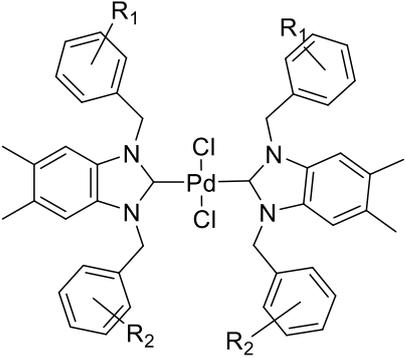
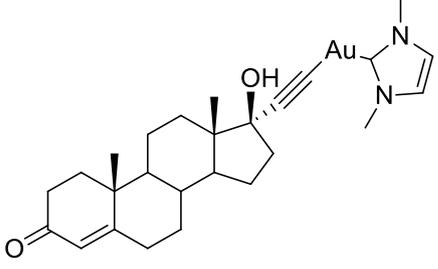
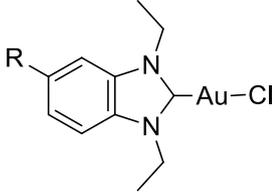
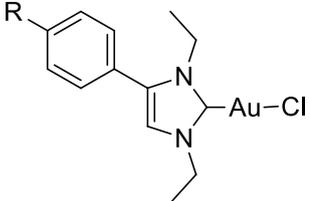
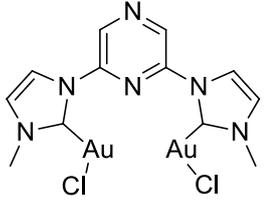
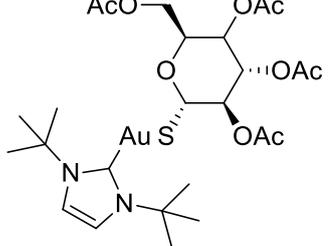
Tabela 1.4- Complexos metálicos de NHCs. A atividade antibacteriana é indicada através da constante mínima inibitória (MIC) ou da zona de inibição (mm)

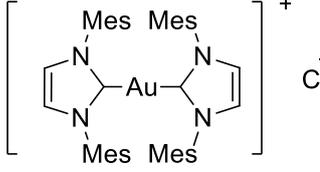
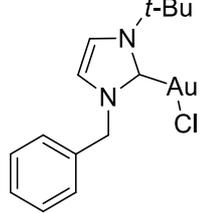
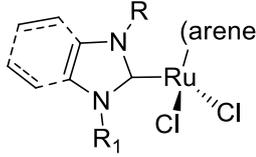
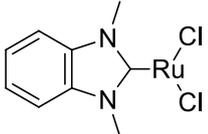
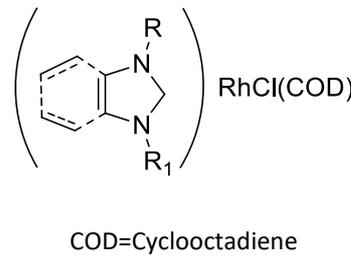
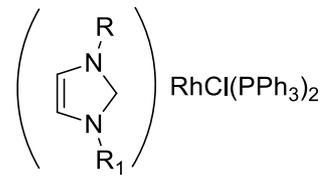
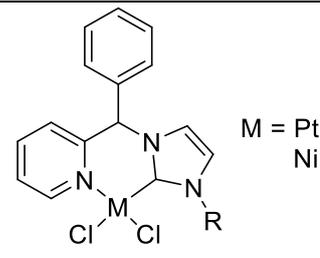
#	Estrutura geral	Atividade antibacteriana	Ref
1	 <p style="text-align: right;">$2+$ $2PF_6^-$</p>	<p><i>S. aureus</i> 6,25-50 $\mu\text{g/mL}$</p> <p><i>E. coli</i> 6,25-12,5 $\mu\text{g/mL}$</p>	168
2	 <p style="text-align: right;">PF_6^-</p>	<p><i>S. aureus</i> 32-128 $\mu\text{g/mL}$</p> <p><i>E. coli</i> 16 $\mu\text{g/mL}$</p>	169
3	 <p style="text-align: right;">$2+$ $2PF_6^-$</p>	<p><i>S. aureus</i> 12,5-25 $\mu\text{g/mL}$</p> <p><i>E. coli</i> 12,5-25 $\mu\text{g/mL}$</p>	170
4	 <p style="text-align: right;">PF_6^-</p>	<p><i>S. aureus</i> 16 $\mu\text{g/mL}$</p> <p><i>E. coli</i> 8-16 $\mu\text{g/mL}$</p>	140

5		<p><i>S. aureus</i> 6,25-100 μM</p>	<p>141, 142</p>
6		<p><i>S. aureus</i> 12,5- 50 μg/mL <i>E. coli</i> 12,5- 50 μg/mL</p>	<p>145, 144</p>
7		<p><i>S. aureus</i> 50-100 μg/mL <i>E. coli</i> 50-100 μg/mL</p>	<p>146</p>
8		<p><i>S. aureus</i> 50-100 μg/mL <i>E. coli</i> 50-100 μg/mL</p>	<p>147</p>
9		<p><i>S. aureus</i> 4-7 mm <i>E. coli</i> 6-7 mm</p>	<p>148</p>

<p>10</p>		<p><i>S. aureus</i> 16-19 mm <i>E. coli</i> 14-18 mm</p>	<p>149</p>
<p>11</p>		<p><i>S. aureus</i> 11-16 mm <i>E. coli</i> 7-8 mm</p>	<p>150</p>
<p>12</p>		<p><i>S. aureus</i> 6,25-50 µg/mL <i>E. coli</i> 6,25-50 µg/mL</p>	<p>152</p>
<p>13</p>		<p><i>S. aureus</i> 1-7 mm <i>E. coli</i> 1-7 mm</p>	<p>153, 171</p>

14		<p><i>S. aureus</i> 3-7 mm</p> <p><i>E. coli</i> 3-6 mm</p>	154
15	 <p>X=Cl, CH₃COO</p>	<p><i>E. coli</i> 8 µg/mL</p>	162
16		<p><i>S. aureus</i> 1-32 µg/mL</p> <p><i>E. coli</i> 4-64 µg/mL</p>	157
17		<p><i>S. aureus</i> 6,25-25 µM</p>	143
18		<p><i>S. aureus</i> 2-4,5 mm</p> <p><i>E. coli</i> 0-6 mm</p>	172
19		<p><i>S. aureus</i> 5-11 mm</p> <p><i>E. coli</i> 6-7 mm</p>	159

20		<i>S. aureus</i> 12-14 mm	173
21		<i>S. aureus</i> 14 µg/mL <i>E. coli</i> 2,34 µg/mL	160
22		<i>E. coli</i> 37- >100 µg/mL	161
23		<i>E. coli</i> 100 - >100 µg/mL	161
24		<i>E. coli</i> 4 µg/mL	162
25		<i>H. pylori</i> 2 µg/mL	163

26		<p><i>S. aureus</i> 3,12 µg/mL</p> <p><i>E. coli</i> 800 µg/mL</p>	164
27		<p>Bac. Subtilis 15 µM</p>	156
28		<p><i>S. aureus</i> 25-1000 µg/mL</p> <p><i>E. coli</i> 800-1000 µg/mL</p>	166
29		<p><i>S. aureus</i> 6,25 µg/mL</p> <p><i>E. coli</i> 1000 µg/mL</p>	166
30	 <p>COD=Cyclooctadiene</p>	<p><i>S. aureus</i> 5-200 µg/mL</p> <p><i>E. coli</i> 200-1000 µg/mL</p>	166
31		<p><i>S. aureus</i> 25 µg/mL</p> <p><i>E. coli</i> >1000 µg/mL</p>	166
32	 <p>M = Pt Ni</p>	<p><i>S. aureus</i> 1,65-825 µg/ml</p> <p><i>E. coli</i> 35-825 µg/ml</p>	174

No entanto, muitos destes complexos NHC contêm metais de transição bastante caros, com uma citotoxicidade notável e, portanto, o desenvolvimento de complexos metálicos NHC antibacterianos não-tóxicos permanece ainda um grande desafio. O ferro surge como um candidato promissor devido à sua reduzida toxicidade e ao seu comportamento redox [(II)-(III)], oferecendo uma reatividade química diferente e, conseqüentemente, com potenciais novos mecanismos de ação. Os complexos metálicos de ferro são amplamente reconhecidos como agentes antimicrobianos eficazes e o seu desenvolvimento tem seguido essencialmente duas estratégias: i) preparação de complexos metálicos de antibióticos atualmente comercializados; ii) desenvolvimento de novos complexos metálicos, baseados em famílias de compostos com atividade antibacteriana previamente descrita. Em relação à primeira estratégia, a melhor concentração inibitória mínima (CMI) (0,42 $\mu\text{g/mL}$) foi obtida por Xiang¹⁷⁵ contra *Escherichia coli* usando derivados de ferrocenil-penem. Relativamente ao desenvolvimento de novos complexos metálicos de Fe (II), observou-se uma influência notável da estrutura do ligando (0,27 a 512 $\mu\text{g/mL}$), sendo um complexo de ferro (II) baseado em corantes formazan o melhor para inibir o crescimento de *S. aureus* e *E. coli* (0,27 $\mu\text{g/mL}$) (Figura 1.8).¹⁷⁶

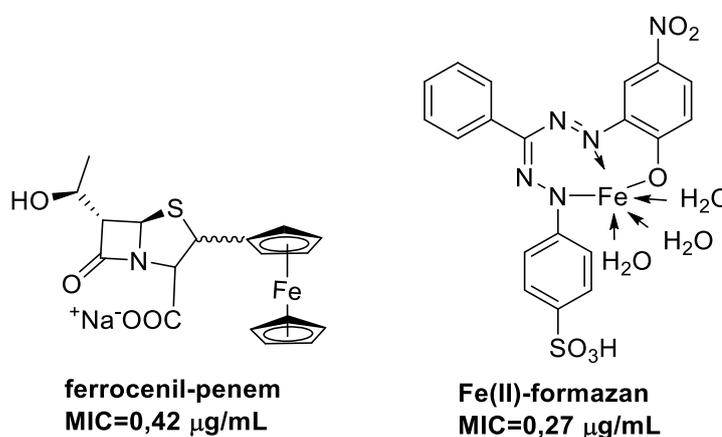


Figura 1.8- Estrutura dos compostos de Fe (II) mais ativos

De acordo com o nosso conhecimento, não foi realizada a avaliação da atividade antibacteriana de qualquer complexo de ferro NHC. Neste sentido, o nosso trabalho centrou-se na preparação de complexos de Fe (II)-NHC, novos ou previamente descritos unicamente para uso catalítico, e na avaliação da sua atividade antibacteriana. Os resultados destes estudos encontram-se descritos no capítulo 4 desta Tese.

1.2.2- Infecções protozoárias - malária

A malária é atualmente a doença infecciosa do foro parasitário com maior impacto no planeta.⁸ Como foi referido previamente, estima-se que existam 219 milhões de ocorrências e que esta doença seja responsável por 435.000 mortes em todo o mundo. Assim, tal como no caso das bactérias, referido nas secções anteriores, um dos problemas associados ao combate desta doença resulta do facto de estirpes do parasita desenvolverem mecanismos de resistência aos medicamentos existentes.^{177, 178}

A malária é causada por parasitas complexos do género *Plasmodium*, dos quais cinco espécies são capazes de infetar o ser humano: *Plasmodium falciparum*, *P. ovale*, *P. vivax*, *P. malariae* e *P. knowlesi*. O complexo ciclo de vida do parasita *Plasmodium* inclui um vetor invertebrado obrigatório, mosquitos fêmea do género *Anopheles*, onde ocorre a fase sexuada do ciclo, e um hospedeiro vertebrado, que pode incluir seres humanos ou outros mamíferos, onde decorre a fase assexuada do desenvolvimento do parasita¹⁷⁹ (Figura 1.9). O ciclo de vida dos parasitas *Plasmodium* no hospedeiro humano inclui duas fases distintas: uma fase assintomática, mas obrigatória, que ocorre no fígado (fase hepática), e outra fase, responsável pelos sintomas da doença, que decorre nos glóbulos vermelhos (fase eritrocitária). Quando um mosquito fêmea do género *Anopheles* infetado se alimenta do sangue de um hospedeiro mamífero, injeta formas infecciosas móveis dos parasitas *Plasmodium*, denominadas esporozoítos (spz), na corrente sanguínea. Os esporozoítos atingem o fígado e invadem os hepatócitos, onde tem lugar um processo de replicação que resulta na formação de milhares de merozoítos. No final deste processo replicativo, os merozoítos são libertados na corrente sanguínea infetando ciclicamente os eritrócitos em circulação. Algumas formas sanguíneas do parasita diferenciam-se em gametócitos imaturos, os quais podem ser ingeridos por um mosquito, dando origem a gâmetas masculinos e femininos. Os gâmetas macho e fêmea fundem-se e formam um zigoto fertilizado móvel denominado oocineto. Os oocinetos dão origem a oocistos, dentro dos quais se formam novos esporozoítos, que migram para as glândulas salivares do inseto, prontos a infetar um novo hospedeiro mamífero, reiniciando o ciclo.

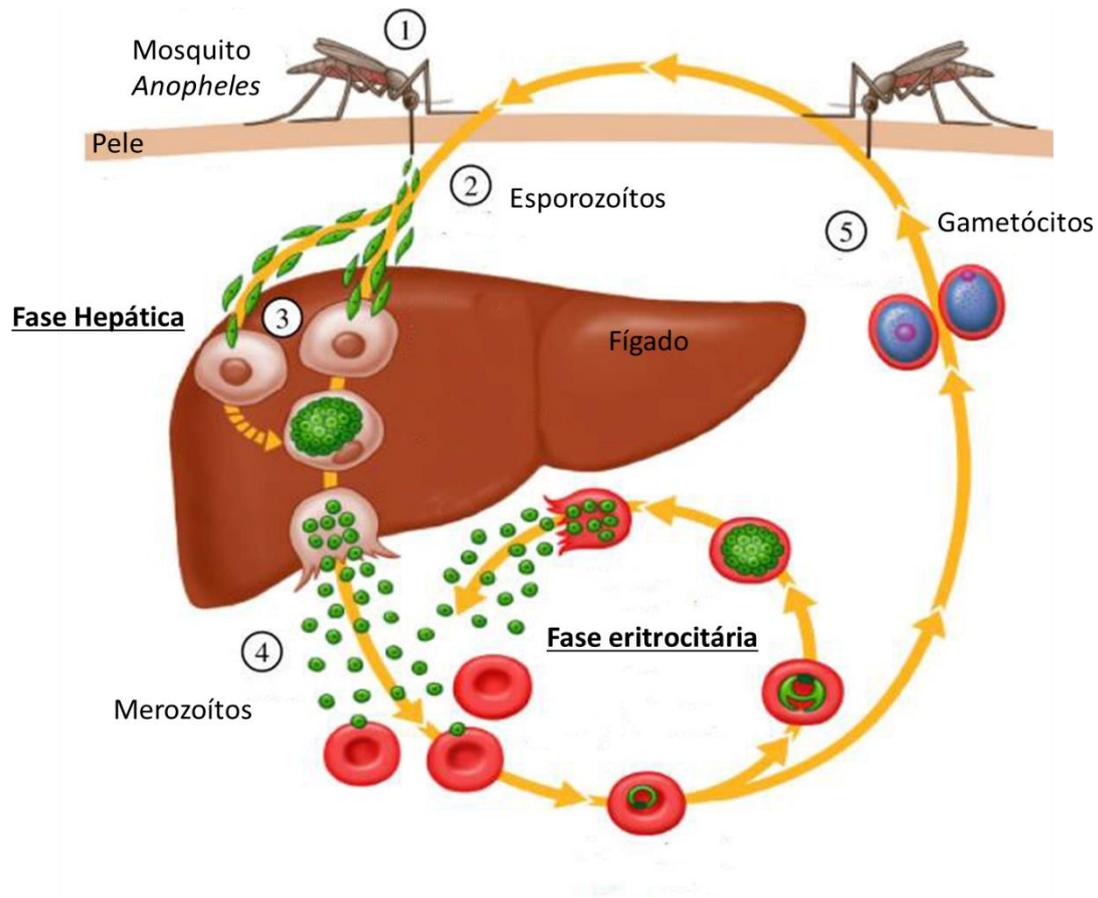


Figura 1.9- Ciclo de vida do parasita causador da malária. Adaptado da publicação “*Vaccines against malaria*” de Adrian V. S. Hill¹⁸⁰, publicado sob os termos do “*Creative Commons attribution license*”

A maioria dos medicamentos utilizados atualmente no tratamento da malária atua sobretudo na fase eritrocitária do ciclo de vida do *Plasmodium*.¹⁸¹ No entanto, para a erradicação da malária, é necessário o desenvolvimento de medicamentos que atuem na fase hepática do desenvolvimento do parasita. Tais fármacos poderão constituir profiláticos eficazes, capazes de prevenir a infecção antes de esta atingir a fase sintomática. Além disso, permitirão a eliminação de hipnozoítos de *P. vivax* e *P. ovale*, formas latentes destes parasitas que podem persistir no fígado, resultando em recidivas.¹⁸² Até ao momento, apenas existem dois fármacos licenciados capazes de atuar na fase hepática do desenvolvimento do parasita: a atovaquona e a primaquina (Figura 1.10), sendo que o último atua também na fase eritrocitária da infecção.

Deste modo, a fase hepática do desenvolvimento do parasita tem um enorme potencial para o desenvolvimento de novas terapêuticas antimaláricas.¹⁸²⁻¹⁸⁸

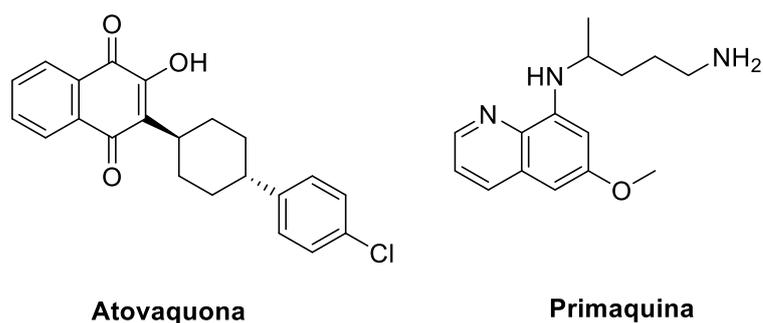


Figura 1.10- Estruturas de fármacos ativos na fase hepática do desenvolvimento do parasita

A atividade antimalárica das chalconas foi pela primeira vez observada num produto natural denominado Licochalcona A.¹⁸⁹ Depois desse marco, inúmeras chalconas com diferentes funcionalizações foram sintetizadas. No entanto, a sua atividade na fase eritrocitária encontra-se muito mais explorada do que na fase hepática da infecção por *Plasmodium*.¹⁹⁰ Desta forma, é do nosso particular interesse estudar a aplicabilidade desta família de compostos na inibição da infecção hepática por parasitas *Plasmodium*. Para tal, procedeu-se à síntese e ao estudo da capacidade de compostos derivados de chalcona inibirem a infecção de linhas celulares de hepatoma humano, Huh-7, por *P. berghei*, um parasita de malária de roedores comumente usado como modelo para estudo da fase hepática da infecção pelos parasitas humanos.¹⁸³ Os resultados destes estudos encontram-se descritos no capítulo 5 desta Tese.

1.2- Proposta de trabalho

Compilando todos os conhecimentos supracitados, definimos como proposta de trabalho (Figura 1.11) desenvolvido e apresentado por escrito nesta Tese, o *design*, síntese e desenvolvimento de novas entidades químicas antimicrobianas com mecanismos de ação alternativos, de modo a contribuir para superar o desafio da resistência antimicrobiana. Neste sentido, subdividimos o trabalho em duas áreas clínicas de intervenção, as infecções tópicas causadas por bactérias e as infecções causadas por protozoários.

Relativamente à primeira, a nossa estratégia consiste na síntese de novas entidades químicas que possam ser aplicadas numa terapia ativada pela luz (aPDT) e/ou possuam atividade antibacteriana *per si* no escuro. Deste modo, no que a fotossensibilizadores diz respeito, este trabalho foca-se em três diferentes famílias: macrociclos tetrapirrólicos neutros: sulfonamido-porfirinas e bacterioclorinas, macrociclos tetrapirrólicos catiónicos do tipo imidazolil porfirinas e macrociclos pirrólicos do tipo (sub)ftalocianina. Adicionalmente, inspirados no reconhecido sucesso dos organometálicos como antibacterianos *per si*, foram desenvolvidos complexos de ferro (II) contendo ligandos do tipo carbenos *N*-heterocíclicos funcionalizados com diferentes grupos.

Por outro lado, tendo conhecimento da importância da fase hepática no desenvolvimento do parasita *Plasmodium* e que esta tem um enorme potencial para o desenvolvimento de novas terapêuticas antimaláricas, o nosso particular interesse consiste no desenvolvimento da família das chalconas e no estudo da sua aplicabilidade na inibição da fase hepática da infeção.

Com esta proposta de trabalho, pretendemos contribuir para a descoberta de novas soluções terapêuticas com vista a uma aplicação clínica enquanto alternativa aos tratamentos convencionais atualmente disponibilizados, dado que estes já exibem elevados níveis de resistência. Consequentemente, com os resultados obtidos esperamos conseguir diminuir a enorme taxa de mortalidade associada a esta problemática.

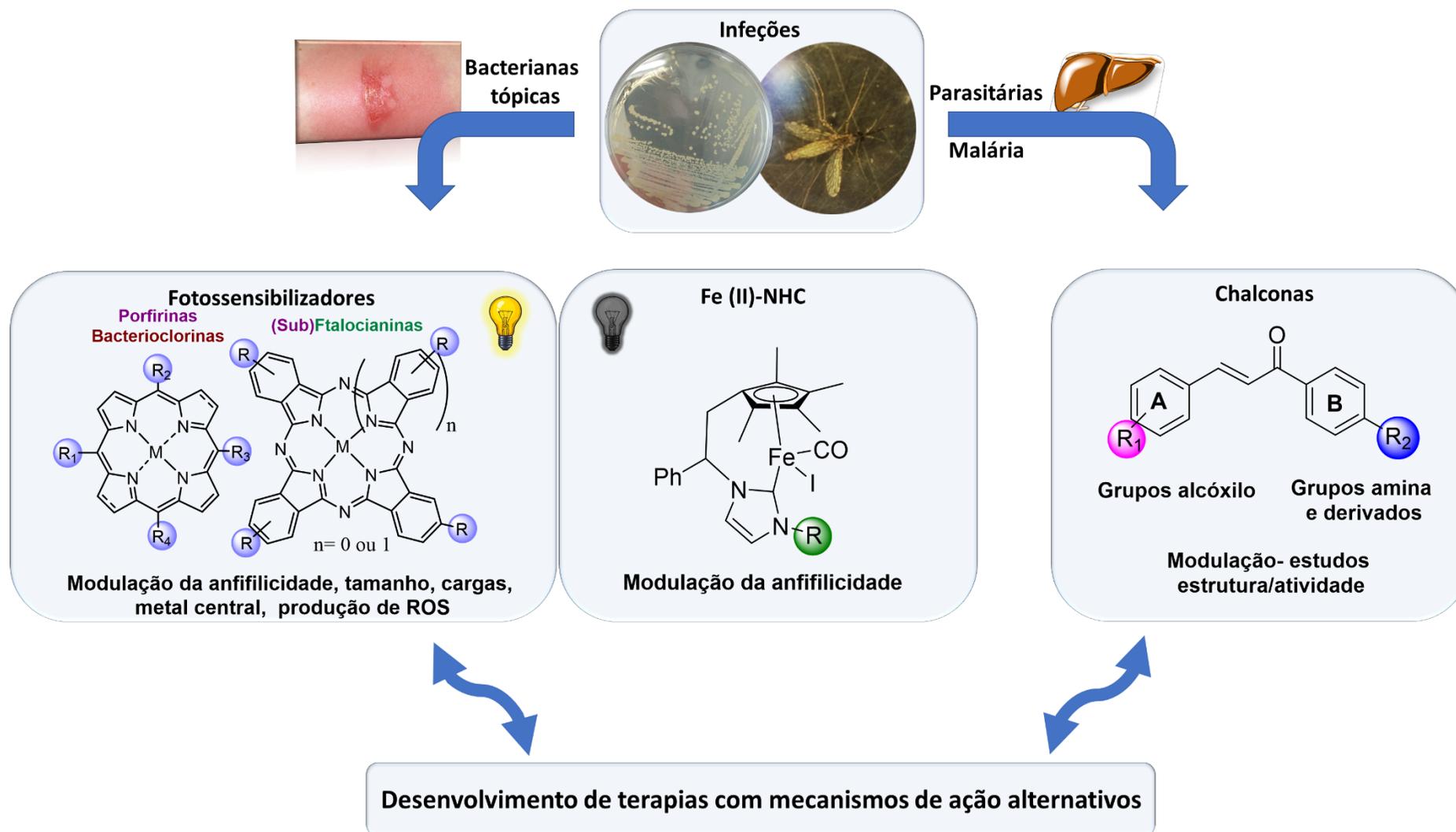


Figura 1.11- Esquema resumo da proposta de trabalho descrita nesta Tese

1.3- Referências

1. Li, X.-Z.; Plésiat, P.; Nikaido, H., The Challenge of Efflux-Mediated Antibiotic Resistance in Gram-Negative Bacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* **2015**, *28* (2), 337-418.
2. Blair, J. M. A.; Webber, M. A.; Baylay, A. J.; Ogbolu, D. O.; Piddock, L. J. V., Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* **2014**, *13*, 42-51.
3. World Health Organization, *Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics*; Geneva, 2017.
4. World Health Organization, *Antimicrobial resistance: global report on surveillance*; 2014.
5. European Antimicrobial Resistance Surveillance Network, *Antimicrobial resistance surveillance in Europe*; 2018.
6. Direção Geral de Saúde, *Prevenção e Controlo de Infeções e de Resistência aos Antimicrobianos em Números*; 2015.
7. Direção Geral de Saúde, *Infeções e Resistências aos Antimicrobianos: Relatório Anual do Programa Prioritário*; 2018.
8. World Health Organization, *World malaria report 2018*.
9. The Review on Antimicrobial Resistance, *Antimicrobial Resistance : Tackling a crisis for the health and wealth of nations*; 2014.
10. Woolhouse, M.; Ward, M.; van Bunnik, B.; Farrar, J., Antimicrobial resistance in humans, livestock and the wider environment. *Phil. Trans. R. Soc. B* **2015**, *370* (1670), 20140083.
11. Van Boeckel, T. P.; Pires, J.; Silvester, R.; Zhao, C.; Song, J.; Criscuolo, N. G.; Gilbert, M.; Bonhoeffer, S.; Laxminarayan, R., Global trends in antimicrobial resistance in animals in low- and middle-income countries. *Science* **2019**, *365* (6459), eaaw1944.
12. <https://www.pewtrusts.org/en/research-and-analysis/issue-briefs/2019/09/tracking-the-global-pipeline-of-antibiotics-in-development> (acedido a 30/10/2019).
13. Lepore, C.; Silver, L.; Theuretzbacher, U.; Thomas, J.; Visi, D., The small-molecule antibiotics pipeline: 2014–2018. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2019**, *18* (10), 739.
14. Simpkin, V. L.; Renwick, M. J.; Kelly, R.; Mossialos, E., Incentivising innovation in antibiotic drug discovery and development: progress, challenges and next steps. *J. Antibiot.* **2017**, *70* (12), 1087-1096.
15. Tegos, G. P.; Hamblin, M. R., Disruptive innovations: new anti-infectives in the age of resistance. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2013**, *13* (5), 673-677.
16. Hamblin, M. R.; Hasan, T., Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? *Photochem. Photobiol. Sci.* **2004**, *3*, 436-450.
17. Hamblin, M. R.; Jori, G., *Photodynamic Inactivation of Microbial Pathogens*. The Royal Society of Chemistry: Cambridge, 2011.
18. Gasser, G.; Metzler-Nolte, N., The potential of organometallic complexes in medicinal chemistry. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2012**, *16* (1), 84-91.
19. Hamblin, M. R., Antimicrobial photodynamic inactivation: a bright new technique to kill resistant microbes. *Curr. Opin. Microbiol.* **2016**, *33*, 67-73.
20. Wainwright, M.; Maisch, T.; Nonell, S.; Plaetzer, K.; Almeida, A.; Tegos, G. P.; Hamblin, M. R., Photoantimicrobials—are we afraid of the light? *Lancet Infect. Dis.* **2017**, *17* (2), e49-e55.
21. Wang, Y.; Wang, Y.; Wang, Y.; Murray, C. K.; Hamblin, M. R.; Hooper, D. C.; Dai, T., Antimicrobial blue light inactivation of pathogenic microbes: State of the art. *Drug Resist. Updat.* **2017**, *33-35*, 1-22.
22. Jori, G.; Camerin, M.; Soncin, M.; Guidolin, L.; Coppelotti, O., Chapter 1 Antimicrobial Photodynamic Therapy: Basic Principles. In *Photodynamic Inactivation of Microbial Pathogens*:

- Medical and Environmental Applications*, The Royal Society of Chemistry: 2011; Vol. 11, pp 1-18.
23. Dabrowski, J. M.; Arnaut, L. G., Photodynamic Therapy (PDT) of Cancer: From a Local to a Systemic Treatment. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2015**, *14*, 1765-1780.
24. Silva, E. F. F.; Serpa, C.; Dabrowski, J. M.; Monteiro, C. J. P.; Arnaut, L. G.; Formosinho, S. J.; Stochel, G.; Urbanska, K.; Simoes, S.; Pereira, M. M., Mechanisms of singlet oxygen and superoxide ion generation by porphyrins and bacteriochlorins. *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 9273-9286.
25. Arnaut, L. G.; Pereira, M. M.; Dabrowski, J. M.; Silva, E. F.; Schaberle, F. A.; Abreu, A. R.; Rocha, L. B.; Barsan, M. M.; Urbanska, K.; Stochel, G.; Brett, C. M., Photodynamic therapy efficacy enhanced by dynamics: the role of charge transfer and photostability in the selection of photosensitizers. *Chem. Eur. J.* **2014**, *20* (18), 5346-5357.
26. Maisch, T., Resistance in antimicrobial photodynamic inactivation of bacteria. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2015**, *14* (8), 1518-1526.
27. Kashef, N.; Hamblin, M. R., Can microbial cells develop resistance to oxidative stress in antimicrobial photodynamic inactivation? *Drug Resist. Updat.* **2017**, *31*, 31-42.
28. Tavares, A.; Carvalho, C. M. B.; Faustino, M. A.; Neves, M.; Tome, J. P. C.; Tome, A. C.; Cavaleiro, J. A. S.; Cunha, A.; Gomes, N. C. M.; Alves, E.; Almeida, A., Antimicrobial Photodynamic Therapy: Study of Bacterial Recovery Viability and Potential Development of Resistance after Treatment. *Mar. Drugs* **2010**, *8* (1), 91-105.
29. Alves, E.; Faustino, M. A. F.; Neves, M.; Cunha, A.; Nadais, H.; Almeida, A., Potential applications of porphyrins in photodynamic inactivation beyond the medical scope. *J. Photochem. Photobiol. C* **2015**, *22*, 34-57.
30. George, S.; Hamblin, M. R.; Kishen, A., Uptake pathways of anionic and cationic photosensitizers into bacteria. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2009**, *8* (6), 788-795.
31. Hancock, R. E. W.; Farmer, S. W.; Li, Z.; Poole, K., Interaction of aminoglycosides with the outer membranes and purified lipopolysaccharide and OmpF porin of Escherichia coli. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1991**, *35*, 1309-1314.
32. Valduga, G.; Breda, B.; Giacometti, G. M.; Jori, G.; Reddi, E., Photosensitization of wild and mutant strains of Escherichia coli by meso-tetra(N-methyl-4-pyridyl)porphine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1999**, *256*, 84-88.
33. Li, X.; Lee, D.; Huang, J.-D.; Yoon, J., Phthalocyanine-assembled nanodots as photosensitizers for highly efficient Type I photoreactions in photodynamic therapy. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 9885-9890.
34. Silva, E. F. F.; Pedersen, B. W.; Breitenbach, T.; Toftegaard, R.; Kuimova, M. K.; Arnaut, L. G.; Ogilby, P. R., Irradiation- and Sensitizer-Dependent Changes in the Lifetime of Intracellular Singlet Oxygen Produced in a Photosensitized Process. *J. Phys. Chem. B* **2012**, *116*, 445-461.
35. Maisch, T.; Baier, J.; Franz, B.; Maier, M.; Landthaler, M.; Szeimies, R.-M.; Bäumler, W., The role of singlet oxygen and oxygen concentration in photodynamic inactivation of bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 7223-7228.
36. Valduga, G.; Bertoloni, G.; Reddi, E.; Jori, G., Effect of extracellularly generated singlet oxygen on Gram-positive and Gram-negative bacteria. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **1993**, *21* (1), 81-86.
37. Rovner, J., US bill aids HIV-1-infected haemophiliacs. *Lancet* **1998**, *352* (9140), 1610.
38. Huang, L.; Szewczyk, G.; Sarna, T.; Hamblin, M. R., Potassium Iodide Potentiates Broad-Spectrum Antimicrobial Photodynamic Inactivation Using Photofrin. *ACS Infectious Diseases* **2017**, *3* (4), 320-328.
39. de Melo, W. C. M. A.; Avci, P.; de Oliveira, M. N.; Gupta, A.; Vecchio, D.; Sadasivam, M.; Chandran, R.; Huang, Y.-Y.; Yin, R.; Perussi, L. R.; Tegos, G. P.; Perussi, J. R.; Dai, T.; Hamblin, M. R., Photodynamic inactivation of biofilm: taking a lightly colored approach to stubborn infection. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* **2013**, *11* (7), 669-693.

40. Hu, X. Q.; Huang, Y. Y.; Wang, Y. G.; Wang, X. Y.; Hamblin, M. R., Antimicrobial Photodynamic Therapy to Control Clinically Relevant Biofilm Infections. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 1299.
41. Stewart, P. S.; William Costerton, J., Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* **2001**, *358* (9276), 135-138.
42. <https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/MicrobeWiki> (acedido em 17/11/19).
43. Costerton, J. W.; Stewart, F. A.; Greenberg, E. P., Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. *Science* **1999**, *284*, 1318-1322.
44. Stewart, P. S.; Costerton, J. W., Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* **2001**, *358*, 135-138.
45. Cieplik, F.; Deng, D. M.; Crielaard, W.; Buchalla, W.; Hellwig, E.; Al-Ahmad, A.; Maisch, T., Antimicrobial photodynamic therapy - what we know and what we don't. *Crit. Rev. Microbiol.* **2018**, *44* (5), 571-589.
46. Cieplik, F.; Späth, A.; Regensburger, J.; Gollmer, A.; Tabenski, L.; Hiller, K.-A.; Bäuml, W.; Maisch, T.; Schmalz, G., Photodynamic biofilm inactivation by SAPYR—An exclusive singlet oxygen photosensitizer. *Free Radical Biol. Med.* **2013**, *65*, 477-487.
47. Dai, T.; Huang, Y.-Y.; Hamblin, M. R., Photodynamic therapy for localized infections--state of the art. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **2009**, *6* (3-4), 170-188.
48. Bhaumik, J.; Weissleder, R.; McCarthy, J. R., Synthesis and Photophysical Properties of Sulfonamidophenyl Porphyrins as Models for Activatable Photosensitizers. *J. Org. Chem.* **2009**, *74* (16), 5894-5901.
49. Monteiro, C. J. P.; Pereira, M. M.; Pinto, S. M. A.; Simoes, A. V. C.; Sa, G. F. F.; Arnaut, L. G.; Formosinho, S. J.; Simoes, S.; Wyatt, M. F., Synthesis of amphiphilic sulfonamide halogenated porphyrins: MALDI-TOFMS characterization and evaluation of 1-octanol/water partition coefficients. *Tetrahedron* **2008**, *64* (22), 5132-5138.
50. Arnaut, L. G.; Pereira, M. M.; Dąbrowski, J. M.; Silva, E. F. F.; Schaberle, F. A.; Abreu, A. R.; Rocha, L. B.; Barsan, M. M.; Urbańska, K.; Stochel, G.; Brett, C. M. A., Photodynamic Therapy Efficacy Enhanced by Dynamics: The Role of Charge Transfer and Photostability in the Selection of Photosensitizers. *Chem. Eur. J.* **2014**, *20* (18), 5346-5357.
51. Pereira, M. M.; Monteiro, C. J. P.; Simões, A. V. C.; Pinto, S. M. A.; Arnaut, L. G.; Sá, G. F. F.; Silva, E. F. F.; Rocha, L. B.; Simões, S.; Formosinho, S. J., Synthesis and photophysical properties of amphiphilic halogenated bacteriochlorins: New opportunities for photodynamic therapy of cancer. *J. Porphyr. Phthalocya.* **2009**, *13*, 567-573.
52. Simoes, A. V. C.; Adamowicz, A.; Dabrowski, J. M.; Calvete, M. J. F.; Abreu, A. R.; Stochel, G.; Arnaut, L. G.; Pereira, M. M., Amphiphilic meso(sulfonate ester fluoroaryl)porphyrins: refining the substituents of porphyrin derivatives for phototherapy and diagnostics. *Tetrahedron* **2012**, *68* (42), 8767-8772.
53. Ressurreicao, A. S. M.; Pineiro, M.; Arnaut, L. G.; Gonsalves, A., Atropisomers of 5,10,15,20-tetrakis(2,6-dichloro-3-sulfamoyl-phenyl)porphyrins. *J. Porphyrins Phthalocyanines* **2007**, *11* (1), 50-57.
54. Seixas de Melo, J.; Sobral, A. J. F. N.; Gonsalves, A. M. d. A. R.; Burrows, H. D., Singlet and triplet energy transfer in a bichromophoric system with anthracene covalently linked through sulfonamide to a meso-tetraphenylporphyrin. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **2005**, *172* (2), 151-160.
55. Banfi, S.; Cassani, E.; Caruso, E.; Cazzaro, M., Oxidative cleavage of plasmid bluescript by water-Soluble Mn-Porphyrins and artificial oxidants or molecular oxygen. *Biorg. Med. Chem.* **2003**, *11* (17), 3595-3605.
56. Sobral, A. J. F. N.; Eléouet, S.; Rousset, N.; Gonsalves, A. M. d. A. R.; Le Meur, O.; Bourré, L.; Patrice, T., New sulfonamide and sulfonic ester porphyrins as sensitizers for photodynamic therapy. *J. Porphyr. Phthalocya.* **2002**, *06* (07), 456-462.

57. Manono, J.; Marzilli, P. A.; Fronczek, F. R.; Marzilli, L. G., New porphyrins bearing pyridyl peripheral groups linked by secondary or tertiary sulfonamide groups: synthesis and structural characterization. *Inorg. Chem.* **2009**, *48* (13), 5626-5635.
58. Mendes, S.; Camacho, F.; Silva, T.; Calado, C. R. C.; Serra, A. C.; Rocha Gonsalves, A. M. d. A.; Roxo-Rosa, M., A Nonionic Porphyrin as a Noninterfering DNA Antibacterial Agent. *Photochem. Photobiol.* **2011**, *87* (6), 1395-1404.
59. Pucelik, B.; Paczynski, R.; Dubin, G.; Pereira, M. M.; Arnaut, L. G.; Dabrowski, J. M., Properties of halogenated and sulfonated porphyrins relevant for the selection of photosensitizers in anticancer and antimicrobial therapies. *PLoS ONE* **2017**, *12* (10), e0185984.
60. Mamone, L.; Ferreyra, D. D.; Gandara, L.; Di Venosa, G.; Vallecorsa, P.; Saenz, D.; Calvo, G.; Batlle, A.; Buzzola, F.; Durantini, E. N.; Casas, A., Photodynamic inactivation of planktonic and biofilm growing bacteria mediated by a meso-substituted porphyrin bearing four basic amino groups. *J. Photoch. Photobio. B* **2016**, *161*, 222-229.
61. Meng, S.; Xu, Z. P.; Hong, G.; Zhao, L. H.; Zhao, Z. J.; Guo, J. H.; Ji, H. Y.; Liu, T. J., Synthesis, characterization and in vitro photodynamic antimicrobial activity of basic amino acid-porphyrin conjugates. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *92*, 35-48.
62. Yuan, Y.; Liu, Z. Q.; Jin, H.; Sun, S.; Liu, T. J.; Wang, X.; Fan, H. J.; Hou, S. K.; Ding, H., Photodynamic antimicrobial chemotherapy with the novel amino acid-porphyrin conjugate 4I: In vitro and in vivo studies. *PLoS ONE* **2017**, *12* (5), e0176529.
63. Nitzan, Y.; Dror, R.; Ladan, H.; Malik, Z.; Kimel, S.; Gottfried, V., Structure-activity relationship of porphines for photoinactivation of bacteria. *Photochem. Photobiol.* **1995**, *62* (2), 342-347.
64. Scanone, A. C.; Gsponer, N. S.; Alvarez, M. G.; Durantini, E. N., Porphyrins containing basic aliphatic amino groups as potential broad-spectrum antimicrobial agents. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **2018**, *24*, 220-227.
65. Meerovich, G. A.; Akhlyustina, E. V.; Tiganova, I. G.; Makarova, E. A.; Alekseeva, N. V.; Romanishkin, I. D.; Philipova, N. I.; Lukyanets, E. A.; Gonchukov, S. A.; Romanova, Y. M.; Loschenov, V. B., Photosensitizers for antibacterial photodynamic therapy based on tetracationic derivatives of synthetic bacteriochlorins. *Laser Physics Letters* **2018**, *15* (11), 115602-115610.
66. Meerovich, G. A.; Tiganova, I. G.; Makarova, E. A.; Meerovich, I. G.; Ju, M. R.; Tolordova, E. R.; Alekseeva, N. V.; Stepanova, T. V.; Yu, K.; Luk'anets, E. A.; Krivospitskaya, N. V.; Sipailo, I. P.; Baikova, T. V.; Loschenov, V. B.; Gonchukov, S. A., Photodynamic inactivation of bacteria and biofilms using cationic bacteriochlorins. *J. Phys. Conf. Ser.* **2016**, *691* (1), 012011.
67. Tiganova I.G.; Makarova E.A.; Meerovich G.A.; Alekseeva N.V.; Tolordava E.R.; Zhizhimova Yu.S.; Lukyanets E.A.; Yu.M., R., Photodynamic inactivation of pathogenic bacteria in biofilms using novel synthetic bacteriochlorin derivatives. *Biomedical Photonics* **2017**, *6* (4), 27-36.
68. Akhlyustina, E. V.; Meerovich, G. A.; Tiganova, I. G.; Makarova, E. A.; Philipova, N. I.; Romanishkin, I. D.; Alekseeva, N. V.; Lukyanets, E. A.; Romanova, Y. M.; Loschenov, V. B., New cationic photosensitizers: photophysical properties and results of preliminary studies of antibacterial efficacy. *J. Phys. Conf. Ser.* **2019**, *1189* (1), 012033.
69. Meerovich, G. A.; Akhlyustina, E. V.; Tiganova, I. G.; Makarova, E. A.; Philipova, N. I.; Romanishkin, I. D.; Alekseeva, N. V.; Lukianets, E. A.; Romanova, Y. M.; Loschenov, V. B., Nanostructured photosensitizer based on a tetracationic derivative of bacteriochlorin for antibacterial photodynamic therapy. *Bull. Russ. State Med. Univ.* **2019**, (6), 74-78.
70. <https://www.luzitin.pt/> (acedido a 27/10/2019).
71. Amos-Tautua, B. M.; Songca, S. P.; Oluwafemi, O. S., Application of Porphyrins in Antibacterial Photodynamic Therapy. *Molecules* **2019**, *24* (13), 2456-2484.
72. Yu, K. G.; Li, D. H.; Zhou, C. H.; Diao, J. L., Study on the synthesis and antimicrobial activity of novel cationic porphyrins. *Chin. Chem. Lett.* **2009**, *20* (4), 411-414.

73. Oliveira, A.; Almeida, A.; Carvalho, C. M. B.; Tomé, J. P. C.; Faustino, M. A. F.; Neves, M. G. P. M. S.; Tomé, A. C.; Cavaleiro, J. A. S.; Cunha, Â., Porphyrin derivatives as photosensitizers for the inactivation of *Bacillus cereus* endospores. *J. Appl. Microbiol.* **2009**, *106* (6), 1986-1995.
74. Gomes, M. C.; Woranovicz-Barreira, S. M.; Faustino, M. A. F.; Fernandes, R.; Neves, M. G. P. M. S.; Tomé, A. C.; Gomes, N. C. M.; Almeida, A.; Cavaleiro, J. A. S.; Cunha, Â.; Tomé, J. P. C., Photodynamic inactivation of *Penicillium chrysogenum* conidia by cationic porphyrins. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2011**, *10* (11), 1735-1743.
75. Gyulkhandanyan, G. V.; Ghazaryan, R. K.; Paronyan, M. H.; Ulikhanyan, G. I.; Gyulkhandanyan, A. G.; Sahakyan, L. A., Antimicrobial activity of new porphyrins of synthetic and natural origin. In *Mechanisms for Low-Light Therapy VII*, Hamblin, M. R.; Anders, J.; Carroll, J. D., Eds. 2012; Vol. 8211.
76. Gyulkhandanyan, G. V.; Paronyan, M. H.; Hovsepyan, A. S.; Ghazaryan, R. K.; Tovmasyan, A. G.; Gyulkhandanyan, A. G.; Gyulkhandanyan, A. G.; Amelyan, G. V., Photodynamic inactivation of Gram (-) and Gram (+) microorganisms by cationic porphyrins and metalloporphyrins. In *12th World Congress of the International Photodynamic Association: Photodynamic Therapy: Back to the Future*, Kessel, D. H., Ed. 2009; Vol. 7380.
77. Arrojado, C.; Pereira, C.; Tome, J. P. C.; Faustino, M. A. F.; Neves, M.; Tome, A. C.; Cavaleiro, J. A. S.; Cunha, A.; Calado, R.; Gomes, N. C. M.; Almeida, A., Applicability of photodynamic antimicrobial chemotherapy as an alternative to inactivate fish pathogenic bacteria in aquaculture systems. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2011**, *10* (10), 1691-1700.
78. Alves, E.; Costa, L.; Carvalho, C. M. B.; Tome, J. P. C.; Faustino, M. A.; Neves, M.; Tome, A. C.; Cavaleiro, J. A. S.; Cunha, A.; Almeida, A., Charge effect on the photoinactivation of Gram-negative and Gram-positive bacteria by cationic meso-substituted porphyrins. *BMC Microbiol.* **2009**, *9*, 1-13.
79. Xuan, W.; Huang, L.; Wang, Y.; Hu, X.; Szewczyk, G.; Huang, Y.-Y.; El-Hussein, A.; Bommer, J. C.; Nelson, M. L.; Sarna, T.; Hamblin, M. R., Amphiphilic tetracationic porphyrins are exceptionally active antimicrobial photosensitizers: In vitro and in vivo studies with the free-base and Pd-chelate. *J. Biophotonics* **2019**, *12* (8), e201800318.
80. Alenezi, K.; Tovmasyan, A.; Batinic-Haberle, I.; Benov, L. T., Optimizing Zn porphyrin-based photosensitizers for efficient antibacterial photodynamic therapy. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **2017**, *17*, 154-159.
81. Alves, E.; Carvalho, C. M. B.; Tome, J. P. C.; Faustino, M. A. F.; Neves, M.; Tome, A. C.; Cavaleiro, J. A. S.; Cunha, A.; Mendo, S.; Almeida, A., Photodynamic inactivation of recombinant bioluminescent *Escherichia coli* by cationic porphyrins under artificial and solar irradiation. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, *35* (11), 1447-1454.
82. Alves, E.; Costa, L.; Carvalho, C. M. B.; Tomé, J. P. C.; Faustino, M. A.; Neves, M. G.; Tomé, A. C.; Cavaleiro, J. A. S.; Cunha, Â.; Almeida, A., Charge effect on the photoinactivation of Gram-negative and Gram-positive bacteria by cationic meso-substituted porphyrins. *BMC Microbiol.* **2009**, *9* (1), 1-13.
83. Marciel, L.; Mesquita, M. Q.; Ferreira, R.; Moreira, B.; Pms Neves, M. G.; F Faustino, M. A.; Almeida, A., An efficient formulation based on cationic porphyrins to photoinactivate *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Future Med. Chem.* **2018**, *10* (15), 1821-1833.
84. Banfi, S.; Caruso, E.; Buccafurni, L.; Battini, V.; Zazzaron, S.; Barbieri, P.; Orlandi, V., Antibacterial activity of tetraaryl-porphyrin photosensitizers: An in vitro study on Gram negative and Gram positive bacteria. *J. Photoch. Photobio. B* **2006**, *85* (1), 28-38.
85. Caminos, D. A.; Spesia, M. B.; Durantini, E. N., Photodynamic inactivation of *Escherichia coli* by novel meso-substituted porphyrins by 4-(3-N,N,N-trimethylammoniumpropoxy)phenyl and 4-(trifluoromethyl)phenyl groups. *Photoch. Photobio. Sci.* **2006**, *5* (1), 56-65.

86. Caminos, D. A.; Spesia, M. B.; Pons, P.; Durantini, E. N., Mechanisms of Escherichia coli photodynamic inactivation by an amphiphilic tricationic porphyrin and 5,10,15,20-tetra(4-N,N,N-trimethylammoniumphenyl) porphyrin. *Photoch. Photobio. Sci.* **2008**, *7* (9), 1071-1078.
87. Fayyaz, F.; Rahimi, R.; Rassa, M.; Maleki, A., Efficient photo-oxidation of phenol and photo-inactivation of bacteria by cationic tetrakis(trimethylanilinium)porphyrins. *Water Sci. Tech-W Sup.* **2015**, *15* (5), 1099-1105.
88. Hurst, A. N.; Scarbrough, B.; Saleh, R.; Hovey, J.; Ari, F.; Goyal, S.; Chi, R. J.; Troutman, J. M.; Vivero-Escoto, J. L., Influence of Cationic meso-Substituted Porphyrins on the Antimicrobial Photodynamic Efficacy and Cell Membrane Interaction in Escherichia coli. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20* (1), 134-152.
89. Lazzeri, D.; Rovera, M.; Pascual, L.; Durantini, E. N., Photodynamic studies and photoinactivation of Escherichia coli using meso-substituted cationic porphyrin derivatives with asymmetric charge distribution. *Photochem. Photobiol.* **2004**, *80* (2), 286-293.
90. Spesia, M. B.; Lazzeri, D.; Pascual, L.; Rovera, M.; Durantini, E. N., Photoinactivation of Escherichia coli using porphyrin derivatives with different number of cationic charges. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **2005**, *44* (3), 289-295.
91. Sabbahi, S.; Ben Ayed, L.; Boudabbous, A., Cationic, anionic and neutral dyes: effects of photosensitizing properties and experimental conditions on the photodynamic inactivation of pathogenic bacteria. *J. Water Health* **2013**, *11* (4), 590-599.
92. Thomas, M.; Craik, J. D.; Tovmasyan, A.; Batinic-Haberle, I.; Benov, L. T., Amphiphilic cationic Zn-porphyrins with high photodynamic antimicrobial activity. *Future Microbiol.* **2015**, *10* (5), 709-724.
93. Orlandi, V. T.; Caruso, E.; Tettamanti, G.; Banfi, S.; Barbieri, P., Photoinduced antibacterial activity of two dicationic 5,15-diarylporphyrins. *J. Photoch. Photobio. B* **2013**, *127*, 123-132.
94. Caruso, E.; Malacarne, M. C.; Banfi, S.; Gariboldi, M. B.; Orlandi, V. T., Cationic diarylporphyrins: In vitro versatile anticancer and antibacterial photosensitizers. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **2019**, *197*, 111548-111559.
95. Costa, D. C. S.; Gomes, M. C.; Faustino, M. A. F.; Neves, M.; Cunha, A.; Cavaleiro, J. A. S.; Almeida, A.; Tome, J. P. C., Comparative photodynamic inactivation of antibiotic resistant bacteria by first and second generation cationic photosensitizers. *Photoch. Photobio. Sci.* **2012**, *11* (12), 1905-1913.
96. Dosselli, R.; Ruiz-Gonzalez, R.; Moret, F.; Agnolon, V.; Compagnin, C.; Mognato, M.; Sella, V.; Agut, M.; Nonell, S.; Gobbo, M.; Reddi, E., Synthesis, Spectroscopic, and Photophysical Characterization and Photosensitizing Activity toward Prokaryotic and Eukaryotic Cells of Porphyrin-Magainin and -Boforin Conjugates. *J. Med. Chem.* **2014**, *57* (4), 1403-1415.
97. Ferro, S.; Ricchelli, F.; Monti, D.; Mancini, G.; Jori, G., Efficient photoinactivation of methicillin-resistant Staphylococcus aureus by a novel porphyrin incorporated into a poly-cationic liposome. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2007**, *39* (5), 1026-1034.
98. Tome, J. P. C.; Neves, M.; Tome, A. C.; Cavaleiro, J. A. S.; Soncin, M.; Magaraggia, M.; Ferro, S.; Jori, G., Synthesis and antibacterial activity of new poly-S-lysine-porphyrin conjugates. *J. Med. Chem.* **2004**, *47* (26), 6649-6652.
99. Maisch, T.; Bosl, C.; Szeimies, R. M.; Lehn, N.; Abels, C., Photodynamic effects of novel XF porphyrin derivatives on prokaryotic and eukaryotic cells. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2005**, *49* (4), 1542-1552.
100. Beirão, S.; Fernandes, S.; Coelho, J.; Faustino, M. A. F.; Tomé, J. P. C.; Neves, M. G. P. M. S.; Tomé, A. C.; Almeida, A.; Cunha, A., Photodynamic Inactivation of Bacterial and Yeast Biofilms With a Cationic Porphyrin. *Photochem. Photobiol.* **2014**, *90* (6), 1387-1396.
101. Di Poto, A.; Sbarra, M. S.; Provenza, G.; Visai, L.; Speziale, P., The effect of photodynamic treatment combined with antibiotic action or host defence mechanisms on Staphylococcus aureus biofilms. *Biomaterials* **2009**, *30* (18), 3158-3166.

102. Sbarra, M.; Arciola, C.; Dipoto, A.; Saino, E.; Rohde, H.; Speziale, P.; Visai, L., *The Photodynamic Effect of Tetra-Substituted N-Methyl-Pyridyl-Porphine Combined with the Action of Vancomycin or Host Defense Mechanisms Disrupts Staphylococcus Epidermidis Biofilms*. 2009; Vol. 32, p 574-83.
103. Collins, T. L.; Markus, E. A.; Hassett, D. J.; Robinson, J. B., The Effect of a Cationic Porphyrin on *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Curr. Microbiol.* **2010**, *61* (5), 411-416.
104. Dei, D.; Chiti, G.; De Filippis, M. P.; Fantetti, L.; Giuliani, F.; Giuntini, F.; Soncin, M.; Jori, G.; Roncucci, G., Phthalocyanines as photodynamic agents for the inactivation of microbial pathogens. *J. Porphyr. Phthalocya.* **2006**, *10* (03), 147-159.
105. Kussovski, V.; Mantareva, V.; Angelov, I.; Avramov, L.; Popova, E.; Dimitrov, S. In *Al(III), Pd(II), and Zn(II) phthalocyanines for inactivation of dental pathogen Aggregatibacter actinomycetemcomitans as planktonic and biofilm-cultures*, 2012; pp 84273X-84273X-10.
106. Kussovski, V.; Mantareva, V.; Angelov, I.; Orozova, P.; Wöhrle, D.; Schnurpfeil, G.; Borisova, E.; Avramov, L., Photodynamic inactivation of *Aeromonas hydrophila* by cationic phthalocyanines with different hydrophobicity. *FEMS Microbiol. Lett.* **2009**, *294* (2), 133-140.
107. Rocha, D. M. G. C.; Venkatramaiyah, N.; Gomes, M. C.; Almeida, A.; Faustino, M. A. F.; Almeida Paz, F. A.; Cunha, A.; Tome, J. P. C., Photodynamic inactivation of *Escherichia coli* with cationic ammonium Zn(II) phthalocyanines. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2015**, *14* (10), 1872-1879.
108. Długaszewska, J.; Szczolko, W.; Koczorowski, T.; Skupin-Mrugalska, P.; Teubert, A.; Konopka, K.; Kucinska, M.; Murias, M.; Düzgüneş, N.; Mielcarek, J.; Goslinski, T., Antimicrobial and anticancer photodynamic activity of a phthalocyanine photosensitizer with N-methyl morpholiniummethoxy substituents in non-peripheral positions. *J. Inorg. Biochem.* **2017**, *172*, 67-79.
109. Pereira, J. B.; Carvalho, E. F.; Faustino, M. A.; Fernandes, R.; Neves, M. G.; Cavaleiro, J. A.; Gomes, N. C.; Cunha, A.; Almeida, A.; Tome, J. P., Phthalocyanine thio-pyridinium derivatives as antibacterial photosensitizers. *Photochem. Photobiol.* **2012**, *88* (3), 537-47.
110. Di Palma, M. A.; Alvarez, M. G.; Durantini, E. N., Photodynamic Action Mechanism Mediated by Zinc(II) 2,9,16,23-Tetrakis[4-(N-methylpyridyloxy)]phthalocyanine in *Candida albicans* Cells. *Photochem. Photobiol.* **2015**, *91* (5), 1203-1209.
111. Lourenço, L. M. O.; Sousa, A.; Gomes, M. C.; Faustino, M. A. F.; Almeida, A.; Silva, A. M. S.; Neves, M. G. P. M. S.; Cavaleiro, J. A. S.; Cunha, Â.; Tomé, J. P. C., Inverted methoxypyridinium phthalocyanines for PDI of pathogenic bacteria. *Photochemical & Photobiological Sciences* **2015**, *14* (10), 1853-1863.
112. Mantareva, V.; Kussovski, V.; Angelov, I.; Wöhrle, D.; Dimitrov, R.; Popova, E.; Dimitrov, S., Non-aggregated Ga(III)-phthalocyanines in the photodynamic inactivation of planktonic and biofilm cultures of pathogenic microorganisms. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2011**, *10* (1), 91-102.
113. Scalise, I.; Durantini, E. N., Synthesis, properties, and photodynamic inactivation of *Escherichia coli* using a cationic and a noncharged Zn(II) pyridyloxyphthalocyanine derivatives. *Biorg. Med. Chem.* **2005**, *13* (8), 3037-3045.
114. Osifeko, O. L.; Durmuş, M.; Nyokong, T., Physicochemical and photodynamic antimicrobial chemotherapy studies of mono- and tetra-pyridyloxy substituted indium(III) phthalocyanines. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **2015**, *301*, 47-54.
115. Mantareva, V.; Kussovski, V.; Angelov, I.; Borisova, E.; Avramov, L.; Schnurpfeil, G.; Wöhrle, D., Photodynamic activity of water-soluble phthalocyanine zinc(II) complexes against pathogenic microorganisms. *Biorg. Med. Chem.* **2007**, *15* (14), 4829-4835.
116. Pereira, J. B.; Carvalho, E. F. A.; Faustino, M. A. F.; Fernandes, R.; Neves, M. G. P. M. S.; Cavaleiro, J. A. S.; Gomes, N. C. M.; Cunha, Â.; Almeida, A.; Tomé, J. P. C., Phthalocyanine Thio-Pyridinium Derivatives as Antibacterial Photosensitizers†. *Photochem. Photobiol.* **2012**, *88* (3), 537-547.

117. Li, M.; Mai, B.; Wang, A.; Gao, Y.; Wang, X.; Liu, X.; Song, S.; Liu, Q.; Wei, S.; Wang, P., Photodynamic antimicrobial chemotherapy with cationic phthalocyanines against *Escherichia coli* planktonic and biofilm cultures. *RSC Advances* **2017**, *7* (65), 40734-40744.
118. Gao, Y.; Mai, B.; Wang, A.; Li, M.; Wang, X.; Zhang, K.; Liu, Q.; Wei, S.; Wang, P., Antimicrobial properties of a new type of photosensitizer derived from phthalocyanine against planktonic and biofilm forms of *Staphylococcus aureus*. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **2018**, *21*, 316-326.
119. Soncin, M.; Fabris, C.; Buseti, A.; Dei, D.; Nistri, D.; Roncucci, G.; Jori, G., Approaches to selectivity in the Zn(II)-phthalocyanine-photosensitized inactivation of wild-type and antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus*. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2002**, *1* (10), 815-819.
120. Aroso, R. T.; Calvete, M. J. F.; Pucelik, B.; Dubin, G.; Arnaut, L. G.; Pereira, M. M.; Dąbrowski, J. M., Photoinactivation of microorganisms with sub-micromolar concentrations of imidazolium metallophthalocyanine salts. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, *184*, 111740.
121. Claessens, C. G.; González-Rodríguez, D.; Torres, T., Subphthalocyanines: Singular Nonplanar Aromatic Compounds Synthesis, Reactivity, and Physical Properties. *Chem. Rev.* **2002**, *102* (3), 835-854.
122. Meller, A.; Ossko, A., Phthalocyaninartige Bor-Komplexe. *Monatshefte für Chemie / Chemical Monthly* **1972**, *103* (1), 150-155.
123. González-Rodríguez, D.; Torres, T.; Guldi, D. M.; Rivera, J.; Herranz, M. Á.; Echegoyen, L., Subphthalocyanines: Tuneable Molecular Scaffolds for Intramolecular Electron and Energy Transfer Processes. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (20), 6301-6313.
124. del Rey, B.; Keller, U.; Torres, T.; Rojo, G.; Agulló-López, F.; Nonell, S.; Martí, C.; Brasselet, S.; Ledoux, I.; Zyss, J., Synthesis and Nonlinear Optical, Photophysical, and Electrochemical Properties of Subphthalocyanines. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120* (49), 12808-12817.
125. Claessens, C. G.; González-Rodríguez, D.; Rodríguez-Morgade, M. S.; Medina, A.; Torres, T., Subphthalocyanines, Subporphyrines, and Subporphyrins: Singular Nonplanar Aromatic Systems. *Chem. Rev.* **2014**, *114* (4), 2192-2277.
126. Guilleme, J.; González-Rodríguez, D.; Torres, T., Triflate-Subphthalocyanines: Versatile, Reactive Intermediates for Axial Functionalization at the Boron Atom. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50* (15), 3506-3509.
127. González-Rodríguez, D.; Torres, T., Peripheral Functionalization of Subphthalocyanines. *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, *2009* (12), 1871-1879.
128. Spesia, M.; Durantini, E., Synthesis and antibacterial photosensitizing properties of a novel tricationic subphthalocyanine derivative. *Dyes Pigments* **2008**, *77*, 229-237.
129. Ince, M.; Seven, Ö.; Dindar, B., Synthesis, characterization and the photodynamic activity against some gram negative and positive bacteria of novel subphthalocyanine derivative. *Gazi University Journal of Science* **2013**, *26*, 1-10.
130. Roy, I.; Shetty, D.; Hota, R.; Baek, K.; Kim, J.; Kim, C.; Kappert, S.; Kim, K., A Multifunctional Subphthalocyanine Nanosphere for Targeting, Labeling, and Killing of Antibiotic-Resistant Bacteria. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54* (50), 15152-15155.
131. Alexander, J. W., History of the Medical Use of Silver. *Surg. Infect. (Larchmt.)* **2009**, *10* (3), 289-292.
132. Jung, W. K.; Koo, H. C.; Kim, K. W.; Shin, S.; Kim, S. H.; Park, Y. H., Antibacterial Activity and Mechanism of Action of the Silver Ion in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2008**, *74* (7), 2171-2178.
133. Patra, M.; Gasser, G.; Metzler-Nolte, N., Small organometallic compounds as antibacterial agents. *Dalton Trans.* **2012**, *41* (21), 6350-6358.
134. Wang, F.; Liu, L.-j.; Wang, W.; Li, S.; Shi, M., Chiral NHC-metal-based asymmetric catalysis. *Coord. Chem. Rev.* **2012**, *256* (9), 804-853.

135. Herrmann, W. A., N-Heterocyclic Carbenes: A New Concept in Organometallic Catalysis. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41* (8), 1290-1309.
136. Flanigan, D. M.; Romanov-Michailidis, F.; White, N. A.; Rovis, T., Organocatalytic Reactions Enabled by N-Heterocyclic Carbenes. *Chem. Rev.* **2015**, *115* (17), 9307-9387.
137. Hindi, K. M.; Panzner, M. J.; Tessier, C. A.; Cannon, C. L.; Youngs, W. J., The Medicinal Applications of Imidazolium Carbene–Metal Complexes. *Chem. Rev.* **2009**, *109* (8), 3859-3884.
138. Oehninger, L.; Rubbiani, R.; Ott, I., N-Heterocyclic carbene metal complexes in medicinal chemistry. *Dalton Trans.* **2013**, *42* (10), 3269-3284.
139. Melaiye, A.; Simons, R. S.; Milsted, A.; Pingitore, F.; Wesdemiotis, C.; Tessier, C. A.; Youngs, W. J., Formation of Water-Soluble Pincer Silver(I)–Carbene Complexes: A Novel Antimicrobial Agent. *J. Med. Chem.* **2004**, *47* (4), 973-977.
140. Achar, G.; Agarwal, P.; Brinda, K. N.; Małeck, J. G.; Keri, R. S.; Budagumpi, S., Ether and coumarin–functionalized (benz)imidazolium salts and their silver(I)–N–heterocyclic carbene complexes: Synthesis, characterization, crystal structures and antimicrobial studies. *J. Organomet. Chem.* **2018**, *854*, 64-75.
141. Aher, S.; Das, A.; Muskawar, P.; Osborne, J.; Bhagat, P., Synthesis, Characterization and Antimicrobial properties of Methylbenzyl and Nitrobenzyl containing Imidazolium-based Silver N-Heterocyclic Carbenes. *J. Mol. Liq.* **2017**, *233*, 270-277.
142. Aher, S.; Das, A.; Muskawar, P.; Osborne, J.; Bhagat, P., Silver (I) complexes of imidazolium based N-heterocyclic carbenes for antibacterial applications. *J. Mol. Liq.* **2017**, *231*, 396-403.
143. Aher, S.; Das, A.; Muskawar, P.; Osborne, J.; Bhagat, P., In vitro antimicrobial evaluation, effects of halide concentration and hemolysis study of silver-N-heterocyclic carbene complexes. *Res. Chem. Intermed.* **2018**, *44* (3), 2099-2110.
144. Asekunowo, P. O.; Haque, R. A., Counterion-induced modulation in biochemical properties of nitrile functionalized silver(I)-N-heterocyclic carbene complexes. *J. Coord. Chem.* **2014**, *67* (22), 3649-3663.
145. Asekunowo, P. O.; Haque, R. A.; Razali, M. R., Sterically modulated silver(I) complexes of N-benzyl-substituted N-heterocyclic carbenes: synthesis, crystal structures and bioactivity. *Transition Met. Chem.* **2015**, *40* (1), 79-88.
146. Gök, Y.; Akkoç, S.; Albayrak, S.; Akkurt, M.; Tahir, M. N., N-Phenyl-substituted carbene precursors and their silver complexes: synthesis, characterization and antimicrobial activities. *Appl. Organomet. Chem.* **2014**, *28* (4), 244-251.
147. Günal, S.; Kaloğlu, N.; Özdemir, İ.; Demir, S.; Özdemir, İ., Novel benzimidazolium salts and their silver complexes: Synthesis and antibacterial properties. *Inorg. Chem. Commun.* **2012**, *21*, 142-146.
148. Hackenberg, F.; Lally, G.; Müller-Bunz, H.; Paradisi, F.; Quaglia, D.; Streciwilk, W.; Tacke, M., Novel symmetrically p-benzyl-substituted 4,5-diaryl-imidazole N-heterocyclic carbene-silver(I) acetate complexes – Synthesis and biological evaluation. *J. Organomet. Chem.* **2012**, *717*, 123-134.
149. Haque, R. A.; Asekunowo, P. O.; Razali, M. R., Dinuclear silver(I)-N-heterocyclic carbene complexes of N-allyl substituted (benz)imidazol-2-ylidenes with pyridine spacers: synthesis, crystal structures, nuclease and antibacterial studies. *Transition Met. Chem.* **2014**, *39* (3), 281-290.
150. Haque, R. A.; Choo, S. Y.; Budagumpi, S.; Abdullah, A. A.-A.; Khadeer Ahamed, M. B.; Abdul Majid, A. M. S., Synthesis, crystal structures, characterization and biological studies of nitrile-functionalized silver(I) N-heterocyclic carbene complexes. *Inorg. Chim. Acta* **2015**, *433*, 35-44.
151. Johnson, N. A.; Southerland, M. R.; Youngs, W. J., Recent Developments in the Medicinal Applications of Silver-NHC Complexes and Imidazolium Salts. *Molecules* **2017**, *22* (8), 1263-1283.

152. Kaloğlu, M.; Kaloğlu, N.; Özdemir, İ.; Günal, S.; Özdemir, İ., Novel benzimidazol-2-ylidene carbene precursors and their silver(I) complexes: Potential antimicrobial agents. *Biorg. Med. Chem.* **2016**, *24* (16), 3649-3656.
153. Patil, S.; Claffey, J.; Deally, A.; Hogan, M.; Gleeson, B.; Méndez, L. M. M.; Müller-Bunz, H.; Paradisi, F.; Tacke, M., Synthesis, Cytotoxicity and Antibacterial Studies of p-Methoxybenzyl-Substituted and Benzyl-Substituted N-Heterocyclic Carbene–Silver Complexes. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2010**, *2010* (7), 1020-1031.
154. Patil, S.; Dietrich, K.; Deally, A.; Gleeson, B.; Müller-Bunz, H.; Paradisi, F.; Tacke, M., Synthesis, Cytotoxicity and Antibacterial Studies of Novel Symmetrically and Nonsymmetrically 4-(Methoxycarbonyl)benzyl-Substituted N-Heterocyclic Carbene–Silver Acetate Complexes. *Helv. Chim. Acta* **2010**, *93* (12), 2347-2364.
155. Peana, M.; Medici, S.; Crisponi, G.; Nurchi, V.; Lachowicz, J.; Remelli, M.; Zoroddu, M., *Silver coordination compounds: A new horizon in medicine*. 2016.
156. Ray, S.; Mohan, R.; Singh, J. K.; Samantaray, M. K.; Shaikh, M. M.; Panda, D.; Ghosh, P., Anticancer and Antimicrobial Metallopharmaceutical Agents Based on Palladium, Gold, and Silver N-Heterocyclic Carbene Complexes. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (48), 15042-15053.
157. Sylvain, R.; Claude, J.; Thierry, C.; Laure, E.; Pascale, B.; Arnaud, H.; Virginie, M.; Corinne, V.; Jean-Marc, P., Investigation of a Series of Silver–N-Heterocyclic Carbenes as Antibacterial Agents: Activity, Synergistic Effects, and Cytotoxicity. *Chem. Eur. J.* **2011**, *17* (5), 1442-1446.
158. Mottais, A.; Berchel, M.; Le Gall, T.; Sibiril, Y.; d'Arbonneau, F.; Laurent, V.; Jaffrès, P.-A.; Montier, T., Antibacterial and transfection activities of nebulized formulations incorporating long n-alkyl chain silver N-heterocyclic carbene complexes. *Int. J. Pharm.* **2019**, *567*, 118500-118510.
159. Haque, R. A.; Salman, A. W.; Budagumpi, S.; Abdullah, A. A.-A.; Majid, A. M. S. A., Sterically tuned Ag(i)- and Pd(ii)-N-heterocyclic carbene complexes of imidazol-2-ylidenes: synthesis, crystal structures, and in vitro antibacterial and anticancer studies. *Metallomics* **2013**, *5* (6), 760-769.
160. Vellé, A.; Maguire, R.; Kavanagh, K.; Sanz Miguel, P. J.; Montagner, D., Steroid–Au–NHC Complexes: Synthesis and Antibacterial Activity. *Chemmedchem* **2017**, *12* (11), 841-844.
161. Claudia, S.; Bianka, K.; Rainer, M.; Aram, P.; Raimo, F.; Mark, B.; Ingo, O., Gold(I) NHC Complexes: Antiproliferative Activity, Cellular Uptake, Inhibition of Mammalian and Bacterial Thioredoxin Reductases, and Gram-Positive Directed Antibacterial Effects. *Chem. Eur. J.* **2017**, *23* (8), 1869-1880.
162. Roymahapatra, G.; Mandal, S. M.; Porto, W. F.; Samanta, T.; Giri, S.; Dinda, J.; Franco, O. L.; Chattaraj, P. K., Pyrazine Functionalized Ag(I) and Au(I)-NHC Complexes are Potential Antibacterial Agents. *Curr. Med. Chem.* **2012**, *19* (24), 4184-4193.
163. Owings, J. P.; McNair, N. N.; Mui, Y. F.; Gustafsson, T. N.; Holmgren, A.; Contel, M.; Goldberg, J. B.; Mead, J. R., *Auranofin and N-heterocyclic carbene gold-analogs are potent inhibitors of the bacteria Helicobacter pylori*. 2016; Vol. 363.
164. İsmail, Ö.; Akın, D.; Tansel, Ö. H.; Bekir, Ç., Synthetic and antimicrobial studies on new gold(I) complexes of imidazolidin-2-ylidenes. *Appl. Organomet. Chem.* **2004**, *18* (7), 318-322.
165. Mora, M.; Gimeno, M. C.; Visbal, R., Recent advances in gold–NHC complexes with biological properties. *Chem. Soc. Rev.* **2019**, *48* (2), 447-462.
166. Cetinkaya, B.; Cetinkaya, E.; Kucukbay, H.; Durmaz, R., *Antimicrobial activity of carbene complexes of Rhodium(I) and Ruthenium(II)*. 1996; Vol. 46, p 821-3.
167. Dorosti, N.; Afshar, F.; Ghaziani, F.; Gholivand, K.; Zarabi, S., Two Hg(II) complexes of 4-pyridinecarbacylamidophosphates: Synthesis, crystal structures, theoretical studies and in vitro antibacterial evaluation. *Inorg. Chim. Acta* **2019**, *489*, 140-149.
168. Haziz, U. F. M.; Haque, R. A.; Amirul, A. A.; Aidda, O. N.; Razali, M. R., New class of non-symmetrical homo-dibenzimidazolium salts and their dinuclear Silver(I) di-NHC complexes. *J. Organomet. Chem.* **2019**, *899*, 120914-120921.

169. Achar, G.; Hokrani, P. P.; Brinda, K. N.; Małeckı, J. G.; Budagumpı, S., Synthesis, characterization, crystal structure and antibacterial properties of N- and O-functionalized (benz)imidazolium salts and their N-heterocyclic carbene silver(I) complexes. *J. Mol. Struct.* **2019**, *1196*, 627-636.
170. Loh, Y. L.; Haziz, U. F. M.; Haque, R. A.; Amirul, A. A.; Aııda, O. N.; Razali, M. R., The effect of short alkane bridges in stability of bisbenzimidazole-2-ylidene silver(I) complexes: synthesis, crystal structure and antibacterial activity. *J. Coord. Chem.* **2019**, *72* (5-7), 894-907.
171. Patil, S.; Deally, A.; Gleeson, B.; Hackenberg, F.; Müller-Bunz, H.; Paradisi, F.; Tacke, M., Synthesis, Cytotoxicity and Antibacterial Studies of Novel Symmetrically and Non-Symmetrically p-Nitrobenzyl-Substituted N-Heterocyclic Carbene-Silver(I) Acetate Complexes. *Z. Anorg. Allg. Chem.* **2011**, *637* (3-4), 386-396.
172. O'Beirne, C.; Alhamad, N. F.; Ma, Q.; Müller-Bunz, H.; Kavanagh, K.; Butler, G.; Zhu, X.; Tacke, M., Synthesis, structures and antimicrobial activity of novel NHC*- and Ph₃P-Ag(I)-Benzoate derivatives. *Inorg. Chim. Acta* **2019**, *486*, 294-303.
173. Boubakri, L.; Al-Ayed, A. S.; Mansour, L.; Abutaha, N.; Harrath, A. H.; Özdemir, I.; Yasar, S.; Hamdi, N., Bioactive NHC-derived palladium complexes: synthesis, catalytic activity for the Suzuki-Miyaura coupling of aryl chlorides and bromides and their antibacterial activities. *J. Coord. Chem.* **2019**, 1-17.
174. Choo, K. B.; Lee, S. M.; Lee, W. L.; Cheow, Y. L., Synthesis, characterization, in vitro antimicrobial and anticancer studies of new platinum N-heterocyclic carbene (NHC) complexes and unexpected nickel complexes. *J. Organomet. Chem.* **2019**, *898*, 120868-120882.
175. Long, B.; He, C.; Yang, Y.; Xiang, J., Synthesis, characterization and antibacterial activities of some new ferrocene-containing penems. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45* (3), 1181-1188.
176. Khan, S. A.; Shahid, S.; Kanwal, S.; Hussain, G., Synthesis characterization and antibacterial activity of Cr (III), Co (III), Fe (II), Cu (II), Ni (III) complexes of 4-(2-(((2-hydroxy-5-nitrophenyl) diazenyl) (phenyl) methylene) hydrazinyl) benzene sulfonic acid based formazan dyes and their applications on leather. *Dyes Pigm.* **2018**, *148*, 31-43.
177. Ecker, A.; Lehane, A. M.; Clain, J.; Fidock, D. A., PfCRT and its role in antimalarial drug resistance. *Trends Parasitol.* **2012**, *28* (11), 504-514.
178. Fidock, D. A.; Nomura, T.; Talley, A. K.; Cooper, R. A.; Dzekunov, S. M.; Ferdig, M. T.; Ursos, L. M. B.; bir Singh Sidhu, A.; Naudé, B.; Deitsch, K. W.; Su, X.-z.; Wootton, J. C.; Roepe, P. D.; Wellems, T. E., Mutations in the P. falciparum Digestive Vacuole Transmembrane Protein PfCRT and Evidence for Their Role in Chloroquine Resistance. *Mol. Cell* **2000**, *6* (4), 861-871.
179. Fujioka, H.; Aikawa, M., Structure and Life Cycle. In *Malaria Immunology. Chem Immunol.*, Perlmann P.; Troye-Blomberg M. ed.; Basel, Karger, 2002; Vol. 80, pp 1-26.
180. Hill, A. V. S., Vaccines against malaria. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **2011**, *366* (1579), 2806-2814.
181. Marella, A.; Verma, G.; Shaquiquzzaman, M.; Akhter, M.; Alam, M., Malaria: Hitches and Hopes. *Mini Rev. Med. Chem.* **2014**, *14* (5), 453-470.
182. Rodrigues, T.; Prudêncio, M.; Moreira, R.; Mota, M. M.; Lopes, F., Targeting the Liver Stage of Malaria Parasites: A Yet Unmet Goal. *J. Med. Chem.* **2012**, *55* (3), 995-1012.
183. Prudêncio, M.; Mota, M. M.; Mendes, A. M., A toolbox to study liver stage malaria. *Trends Parasitol.* **2011**, *27* (12), 565-574.
184. Derbyshire, E. R.; Mota, M. M.; Clardy, J., The Next Opportunity in Anti-Malaria Drug Discovery: The Liver Stage. *PLoS Pathog.* **2011**, *7* (9), e1002178.
185. Derbyshire, E. R.; Prudêncio, M.; Mota, M. M.; Clardy, J., Liver-stage malaria parasites vulnerable to diverse chemical scaffolds. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2012**, *109* (22), 8511-8516.
186. Mazier, D.; Goma, J.; Pied, S.; Renia, L.; Nussler, A.; Miltgen, F.; Mattei, D.; Grau, G., Hepatic phase of malaria: a crucial role as "go-between" with other stages. *Bull. World Health Organ.* **1990**, *68 Suppl*, 126-31.

187. Derbyshire, E. R.; Mota, M. M.; Clardy, J., The next opportunity in anti-malaria drug discovery: the liver stage. *PLoS Pathog.* **2011**, *7* (9), e1002178-e1002178.
188. Frevert, U.; Krzych, U.; Richie, T., Editorial: Breaking the cycle: attacking the malaria parasite in the liver. *Front. Microbiol.* **2015**, *6* (810), 1-24.
189. Chen, M.; Theander, T. G.; Christensen, S. B.; Hviid, L.; Zhai, L.; Kharazmi, A., Licochalcone A, a new antimalarial agent, inhibits in vitro growth of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* and protects mice from *P. yoelii* infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1994**, *38* (7), 1470-1475.
190. Rani, A.; Anand, A.; Kumar, K.; Kumar, V., Recent developments in biological aspects of chalcones: the odyssey continues. *Expert Opin. Drug Disc.* **2019**, *14* (3), 249-288.

Capítulo 2

Design/Síntese de fotossensibilizadores do tipo macrociclo pirrólico

Considerando o número crescente de patógenos resistentes aos antibióticos comumente usados, existe uma necessidade premente de abordagens antimicrobianas que sejam capazes de inativar estes microorganismos eficientemente, sem o risco de induzir resistências. Nesse sentido, uma abordagem alternativa é a terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT). O efeito antimicrobiano da aPDT baseia-se no princípio de que uma luz de comprimento de onda adequado ativa uma molécula não tóxica *per si*, denominada fotossensibilizador (PS), resultando na geração de espécies reativas de oxigênio que matam as bactérias. Durante os últimos anos, houve uma extensa pesquisa de novos fotossensibilizadores, dos quais se destaca a família dos macrociclos pirrólicos, tal como descrito na revisão da literatura apresentada no capítulo 1 desta Tese. No entanto, a busca pelo fotossensibilizador com as propriedades ideais permanece ainda um grande desafio. Com base neste conhecimento, um dos objetivos fulcrais deste trabalho centra-se no desenvolvimento de novas moléculas da família dos macrociclos pirrólicos possuindo características moduladas, de acordo com o descrito em cada subcapítulo subsequente, de modo a serem aplicadas como fotossensibilizadores em aPDT. Neste sentido, foram desenvolvidas três famílias de compostos: i) uma baseada em moléculas bimodais contendo na sua estrutura sulfonamidas, compostos com atividade antibacteriana reconhecida, ligadas a porfirinas neutras, nas quais pretendemos modular o número de substituições e estado de oxidação do anel macrocíclico, de modo a avaliar a sua influência na anfifilicidade e atividade antibacteriana; ii) a segunda centrada em fotossensibilizadores porfirínicos catiónicos derivados do 1-metilimidazole, de modo a estudar a influência do número de cargas e do peso molecular na atividade antibacteriana quer em solução, quer em biofilmes; iii) a terceira baseada em ftalocianinas e subftalocianinas catiónicas, com o mesmo objetivo de estudo da classe anterior, tal como explicitado na figura 2.1.

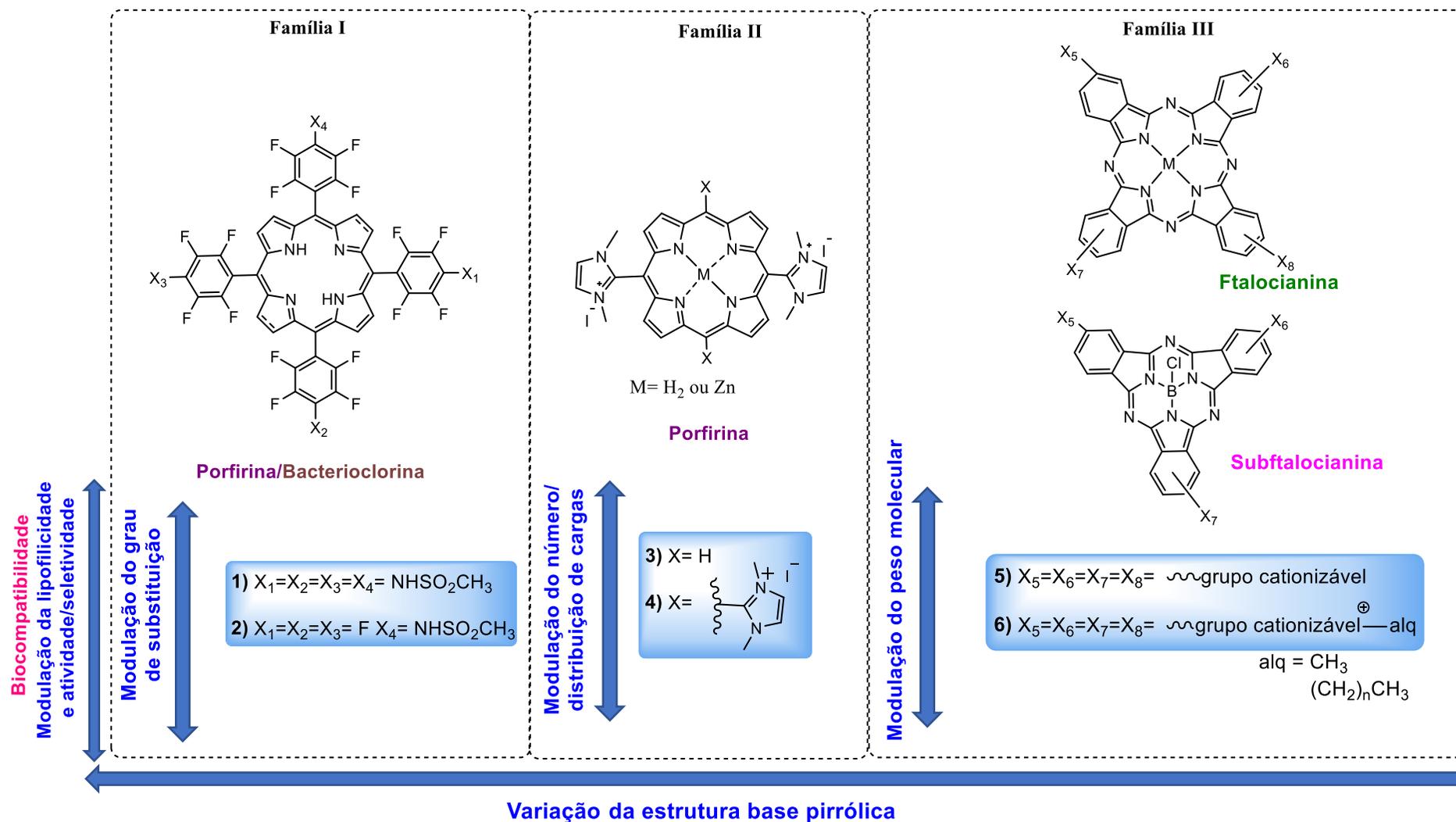


Figura 2.1- Esquema geral do trabalho desenvolvido no decorrer deste capítulo

2.1- Macroscios tetrapirrólicos do tipo porfirina e seus derivados reduzidos

2.1.1- Macroscios tetrapirrólicos neutros: sulfonamido-porfirinas e sulfonamido-bacterioclorinas (Família I)

A história das sulfonamidas iniciou-se com a descoberta do Prontosil, o primeiro fármaco pertencente a esta classe. Este foi desenvolvido na década de 1930 por uma equipa de investigadores dos laboratórios Bayer na Alemanha, detendo atividade antibacteriana. Curiosamente, este apresentava atividade *in vivo* mas não *in vitro*, mistério desvendado ao se descobrir que o Prontosil tinha de ser metabolizado por uma enzima intestinal para se tornar ativo, tratando-se assim de um pró-fármaco onde o metabolito (Sulfanilamida) é que apresenta atividade (Figura 2.2). Em 1939, Gerhard Johannes Paul Domagk, diretor do Instituto de Patologia e Bacteriologia da Bayer, foi premiado com o Nobel da Fisiologia/Medicina pelo trabalho desenvolvido na descoberta deste fármaco.¹

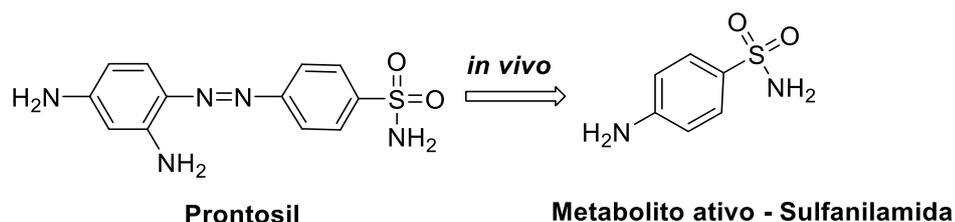


Figura 2.2- Metabolismo de ativação do Prontosil *in vivo*

Desencadeou-se uma nova Era, onde inúmeras sulfonamidas foram sintetizadas e novas atividades terapêuticas destas foram descobertas.²⁻⁴ A nível da sua atividade antibacteriana, sabe-se que estas atuam como inibidores competitivos da enzima sintetase de dihidroperoxato, mimetizando o seu substrato natural, o ácido *p*-aminobenzóico (PABA). Deste modo, impossibilitam a síntese de ácido tetrahidrofólico, imprescindível para a formação de precursores dos ácidos nucleicos, com consequente inibição do crescimento e divisão celular.⁵ No entanto, a ligação das sulfonamidas à enzima referida é reversível, sendo possível que as células bacterianas adquiram resistência ao fármaco, quer pelo aumento da quantidade de PABA produzido, quer pela ocorrência de mutações que podem alterar a permeabilidade da membrana celular ao fármaco ou diminuir a afinidade da enzima para este. Os fármacos não são tóxicos para o organismo humano, uma vez que as nossas células não produzem ácido

tetrahidrofílico e consequentemente não contém a enzima alvo.¹ Com base neste conhecimento, este subcapítulo tem como objetivo o desenvolvimento de moléculas que incorporam na sua estrutura sulfonamidas e macrociclos tetrapirrólicos com o objetivo de obter novos compostos que possam simultaneamente atuar como antibacterianos *per se* e como fotossensibilizadores para inativação de bactérias, recorrendo à terapia fotodinâmica. A presença de sulfonamidas pode funcionar como vetor para células bacterianas, potenciando a atividade e seletividade do tratamento. O número de sulfonamidas pretende modular a anfifilicidade/biocompatibilidade. Adicionalmente, com a redução às correspondentes bacterioclorinas, pretendemos estudar a formação de tipos de ROS alternativos (uma vez que estes compostos são conhecidos por adicionalmente produzir radicais hidroxilo)⁶ e, consequentemente, as alterações na sua atividade (Figura 2.3). Este trabalho teve o seu início na dissertação de mestrado com a síntese das porfirinas e início do estudo das suas propriedades fotofísicas e fotoquímicas. Os estudos das suas propriedades e atividade antibacteriana apresentam-se no capítulo 3.

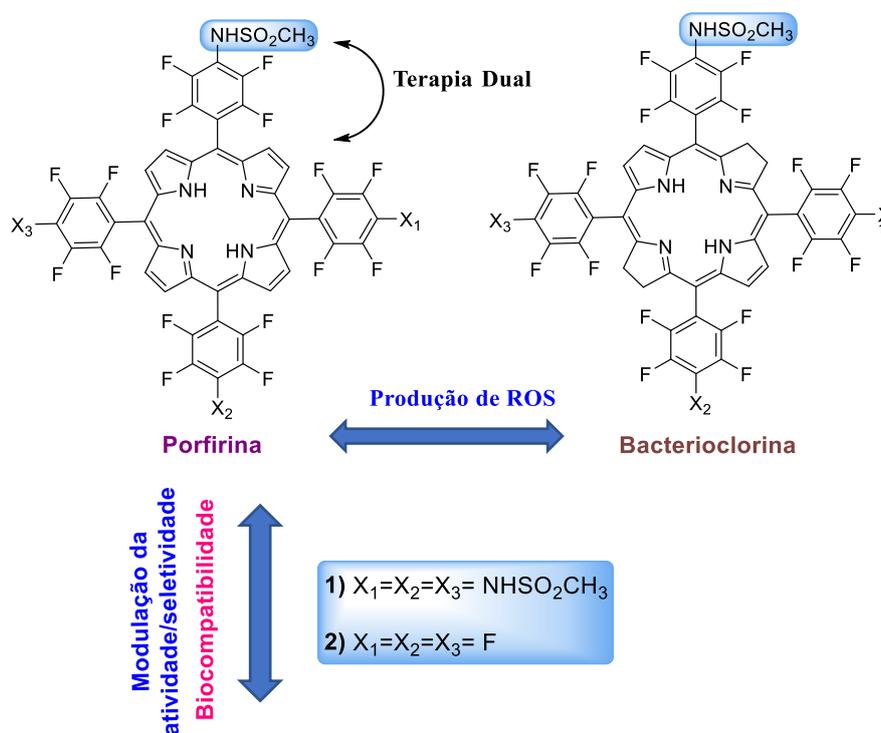


Figura 2.3- Modulação estrutural dos macrociclos tetrapirrólicos neutros do tipo sulfonamido-porfirinas e bacterioclorinas

Na sequência do trabalho anteriormente desenvolvido conducente à dissertação de mestrado, onde foram otimizadas condições experimentais para a obtenção preferencial de porfirinas mono, di, tri e tetra substituídas com diferentes sulfonamidas, foram preparadas *meso*-tetra-pentafluorofenilporfirinas mono e tetra substituídas com a metanosulfonamida. A porfirina base, 5,10,15,20-*tetraquis*(pentafluorofenil)porfirina (TPFPP) **2.1**, foi preparada de acordo com uma metodologia descrita anteriormente.^{7, 8} Nesta fase continuamos os estudos otimizando a síntese e prosseguindo com a sua avaliação *in vitro*.

Assim, numa experiência tipo, a 5,10,15,20-*tetraquis*(pentafluorofenil)porfirina (concentração de $5,1 \times 10^{-3}$ M) e 6 equivalentes de metanosulfonamida foram dissolvidos em 1,4-dioxano, sendo posteriormente adicionado carbonato de céσιο como base. De seguida, a mistura foi aquecida até 100 °C. Após 72 horas, desligou-se a reação e deixou-se arrefecer a mistura reacional até à temperatura ambiente.

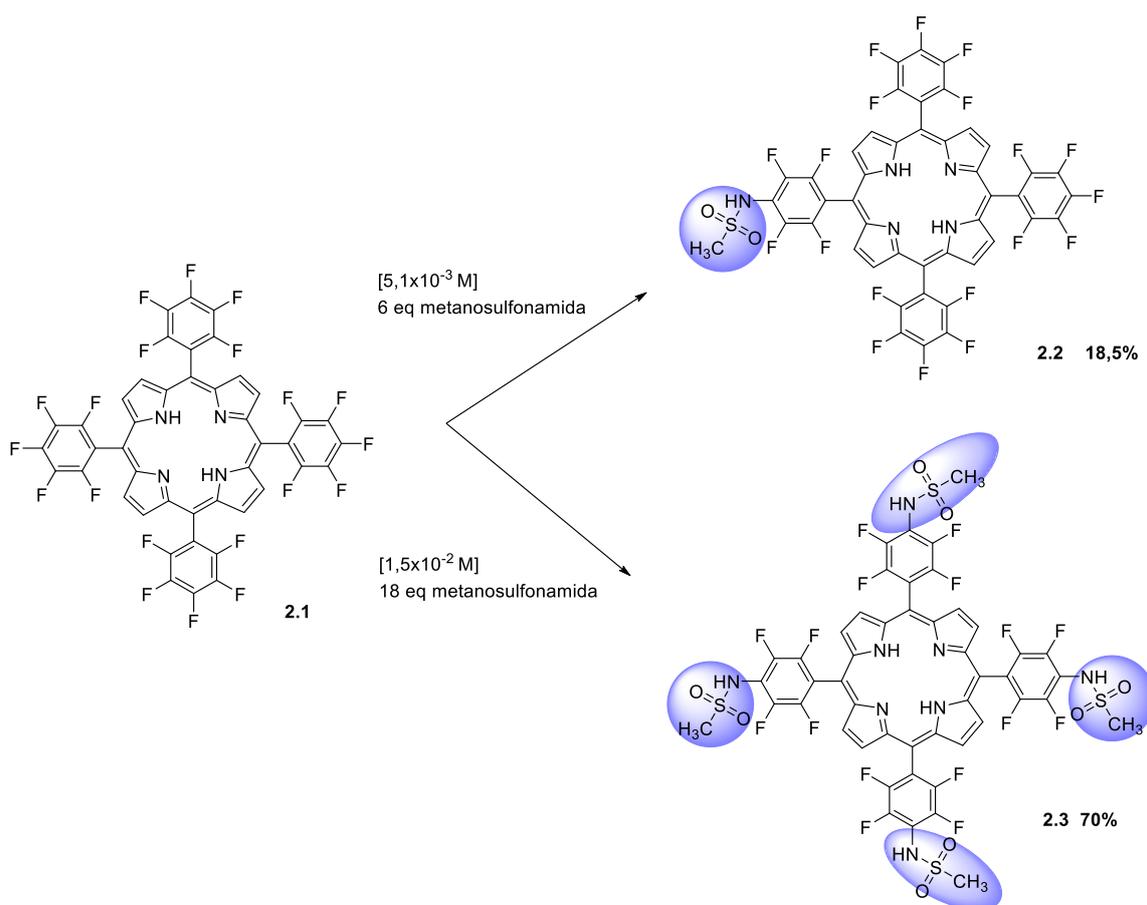


Figura 2.4- Esquema geral da síntese de sulfonamido-porfirinas

Usando como fase orgânica diclorometano, a mistura foi lavada primeiramente com uma solução saturada de bicarbonato de sódio e de seguida água. Posteriormente, realizou-se cromatografia utilizando como eluente *n*-hexano/acetato de etilo (2:1) e gel de sílica como fase estacionária, tendo-se obtido a 5-[2',3',5',6'-tetrafluoro-4'-metanosulfamoil)fenil]-10,15,20-*tris*(pentafluorofenil)porfirina **2.2** com um rendimento de 18,5% (Figura 2.4).

Com o intuito de obter o composto tetra substituído, foi realizada uma outra reação mais concentrada ($1,5 \times 10^{-2}$ M) e com um excesso de 12 e 18 equivalentes de carbonato de cézio e metanosulfonamida, respetivamente. O composto obtido foi purificado por filtração por tamanho utilizando um dispositivo Amicon® equipado com uma membrana de 1 KDa (retém compostos com peso molecular superior a 1000 Dalton). Obteve-se a 5,10,15,20-*tetraquis*-[2',3',5',6'-tetrafluoro-4'-metanosulfamoil)fenil]porfirina **2.3** com um rendimento de 70% (Figura 2.4).

Para além de um fotossensibilizador ideal possuir todos os requisitos fotofísicos e fotoquímicos avaliados e apresentados adiante nesta Tese, é favorável que este absorva na gama de comprimentos de onda compreendidos na janela terapêutica (600-850 nm). Todas as porfirinas apresentadas possuem uma banda de absorção nesta gama de valores, no entanto, esta apresenta uma baixa absorvidade molar ($\epsilon \leq 1,3 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Deste modo, dependendo do objetivo, pode ser de interesse evoluir, a partir destes, para compostos que absorvam com maior intensidade e preferencialmente que apresentem um maior desvio para o infravermelho.

As porfirinas possuem na sua estrutura duas ligações duplas que não pertencem ao sistema de conjugação do macrociclo, tornando-as suscetíveis à ocorrência de redução. Desta forma, obtêm-se clorinas quando apenas uma das posições é reduzida e bacterioclorinas quando são ambas.

A síntese de bacterioclorinas baseia-se tipicamente em três estratégias sintéticas: a síntese total⁹, a modificação de produtos naturais e ainda a derivatização de porfirinas ou clorinas¹⁰⁻¹². Têm sido preparadas bacterioclorinas por derivatização de porfirinas recorrendo a tetróxido de ósmio¹³ bem como através de reações de cicloadição, tais como Diels-Alder¹¹, 1,3-dipolar¹⁴, entre outras¹⁵. A síntese destes derivados reduzidos começou por enfrentar algumas dificuldades devido à instabilidade

demonstrada pela gama de compostos testados¹⁶⁻¹⁸, contudo, recorrendo à introdução de grupos substituintes eletroatratores, que contribuem para a estabilização eletrónica do macrociclo, estas foram superadas.¹⁹⁻²¹ Na síntese de bacterioclorinas por redução com hidrazinas salienta-se o trabalho pioneiro de Whitlock²², recentemente otimizado por Pereira e os seus colaboradores, para a transformação de *meso*-arilporfirinas contendo grupos sulfonamida nas bacterioclorinas correspondentes, sem adição de solvente e/ou base.^{23, 24} Este método foi utilizado na síntese da 5,10,15,20-*tetraquis*(2,6-difluoro-3-*N*-metilsulfamoilfenil)bacterioclorina, o primeiro fármaco para terapia fotodinâmica do cancro desenvolvido numa universidade portuguesa em colaboração com a indústria, que já se encontra em ensaios clínicos.^{25, 26}

Neste sentido, foram preparadas as bacterioclorinas correspondentes às porfirinas acima descritas, através da redução com *p*-toluenosulfonilhidrazina, usando a metodologia sem solvente desenvolvida no grupo, decorrente da otimização do método da redução da diimida de Whitlock. Assim, numa experiência tipo (Figura 2.5), os dois sólidos, porfirina e um excesso de *p*-toluenosulfonilhidrazina (1:40), foram misturados e aquecidos até 140 °C por 20 e 60 min na ausência de oxigénio, e a uma pressão de 0,1 Torr.

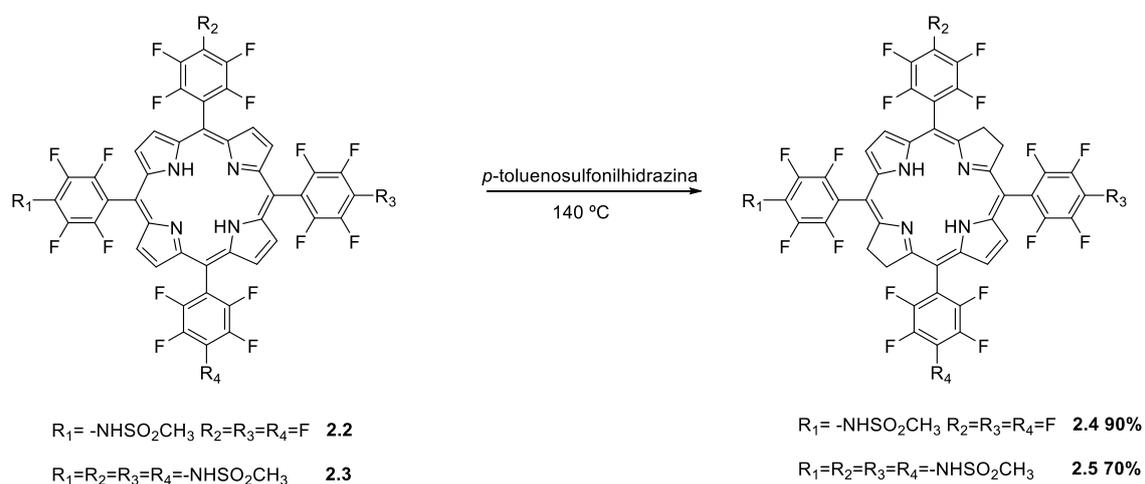


Figura 2.5- Síntese de metanosulfonamida bacterioclorinas

Após arrefecimento da reação, o crude foi purificado por cromatografia em coluna com sílica gel, usando como eluente diclorometano/acetato de etilo (3:1). A 5-[2',3',5',6'-tetrafluoro-4'-metanosulfamoil]fenil]-10,15,20-*tris*(pentafluorofenil)bacte-

rioclorina **2.4** e a 5,10,15,20-*tetraquis*-[2',3',5',6'-tetrafluoro-4'-metanosulfamóil)fenil]bacterioclorina **2.5** foram obtidas com rendimentos de 90 e 70%, respectivamente (Figura 2.5).

Os compostos foram caracterizados por RMN de ^1H , ^{19}F e espectrometria de massa. Uma vez que a maior diferença entre os compostos mono e tetra substituídos é observada no espectro de ^{19}F , apenas este será analisado em detalhe. Os restantes dados encontram-se descritos no capítulo experimental (Capítulo 6).

A título de exemplo, encontra-se discutido de seguida a espectroscopia de RMN de ^{19}F das bacterioclorinas sintetizadas. Para uma melhor compreensão da atribuição dos picos aos respetivos núcleos de ^{19}F , encontra-se na figura 2.6 a numeração atribuída aos átomos de flúor da 5,10,15,20-*tetraquis*(pentafluorofenil)porfirina.

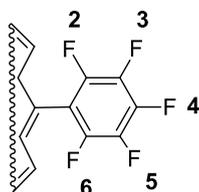


Figura 2.6- Numeração dos átomos de flúor da 5,10,15,20-*tetraquis*(pentafluorofenil)porfirina

Na figura 2.7, encontra-se, a título de exemplo, o espectro de RMN de ^{19}F da bacterioclorina **2.4**. Neste, a bacterioclorina apresenta cinco sinais distintos: dois em forma de duplo duplete a -138,13 ppm e -147,32 ppm, e três sinais em forma de multiplete a -138,28, -152,77 e -161,06 ppm. Três dos sinais são comuns ao espectro da porfirina sem substituição **2.1**, uma vez que apenas ocorre substituição em um dos quatro grupos pentafluorofenil, ficando os restantes inalterados. Começando por estes e, de acordo com o esquema acima, o multiplete a -138,28 ppm deve-se à ressonância dos seis átomos de flúor das posições 2 e 6 do anel benzénico, o multiplete de -152,77 ppm à ressonância de três átomos de flúor da posição 4 do anel benzénico e, por fim, o multiplete de -161,06 ppm corresponde aos seis átomos de flúor das posições 3 e 5. Existe um acoplamento a curta distância (três ligações) com os átomos vizinhos, denominado acoplamento J^3 , que apresenta valores elevados; a longa distância (quatro ou cinco ligações) com o átomo que se encontra em posição *meta* ou *para* relativamente a si, acoplamento J^4 ou J^5 , respetivamente, apresentando valores mais baixos. Cada átomo na posição 2 e 6 acopla com o seu átomo adjacente, e com os átomos em

posições *meta* e *para*, originando um multipletto; o mesmo acontece com cada átomo na posição 3 e 5, no entanto, adicionalmente estes acoplam com dois átomos de flúor diferentes em posições *orto*, originando deste modo um multipletto mais complexo. Os dois duplos dupletos, de -138,13 ppm e de -147,32 ppm, são referentes à posição monosubstituída, onde cada flúor acopla com o átomo adjacente e com o oposto, tal como explicitado anteriormente.

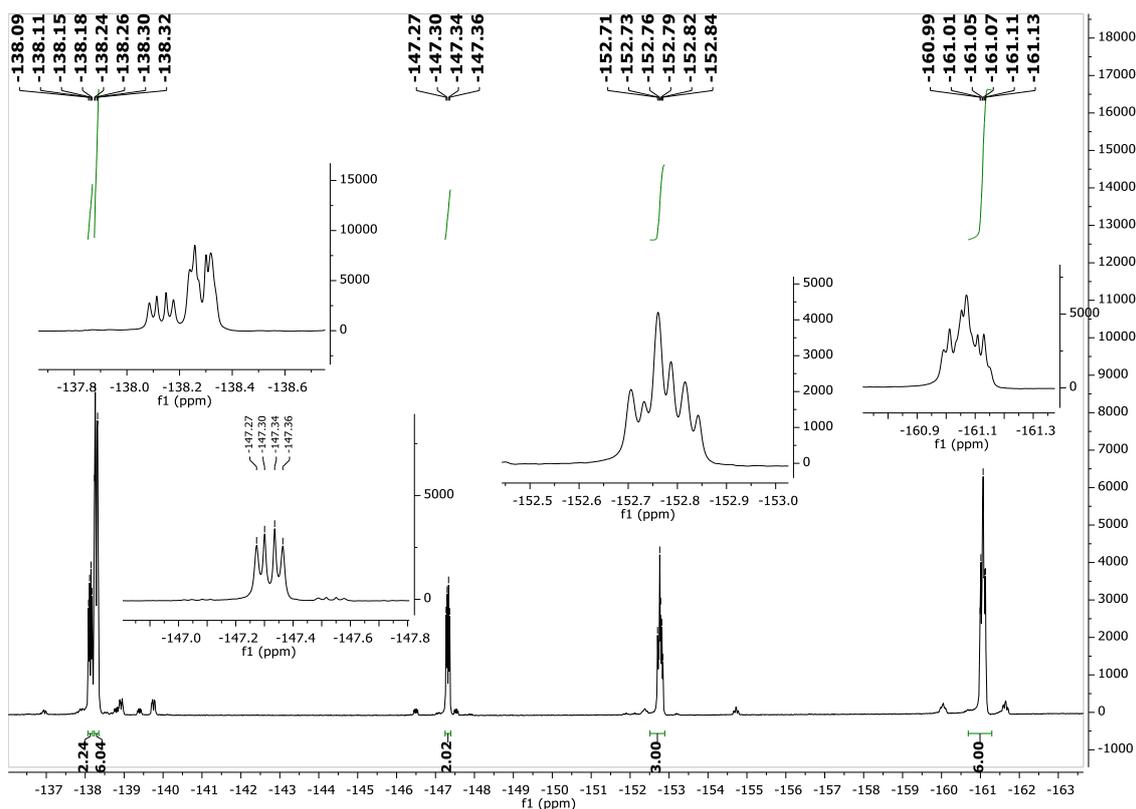


Figura 2.7- Espectro de RMN ^{19}F da bacterioclorina **2.4** em CDCl_3

No caso da bacterioclorina tetrassubstituída **2.5**, todas as posições *meso* possuem o mesmo substituinte, deste modo, o espectro apenas apresenta dois sinais, tal como demonstrado na figura 2.8. Estes são dois duplos dupletos, referentes aos pares de átomos 3/5 e 2/6.

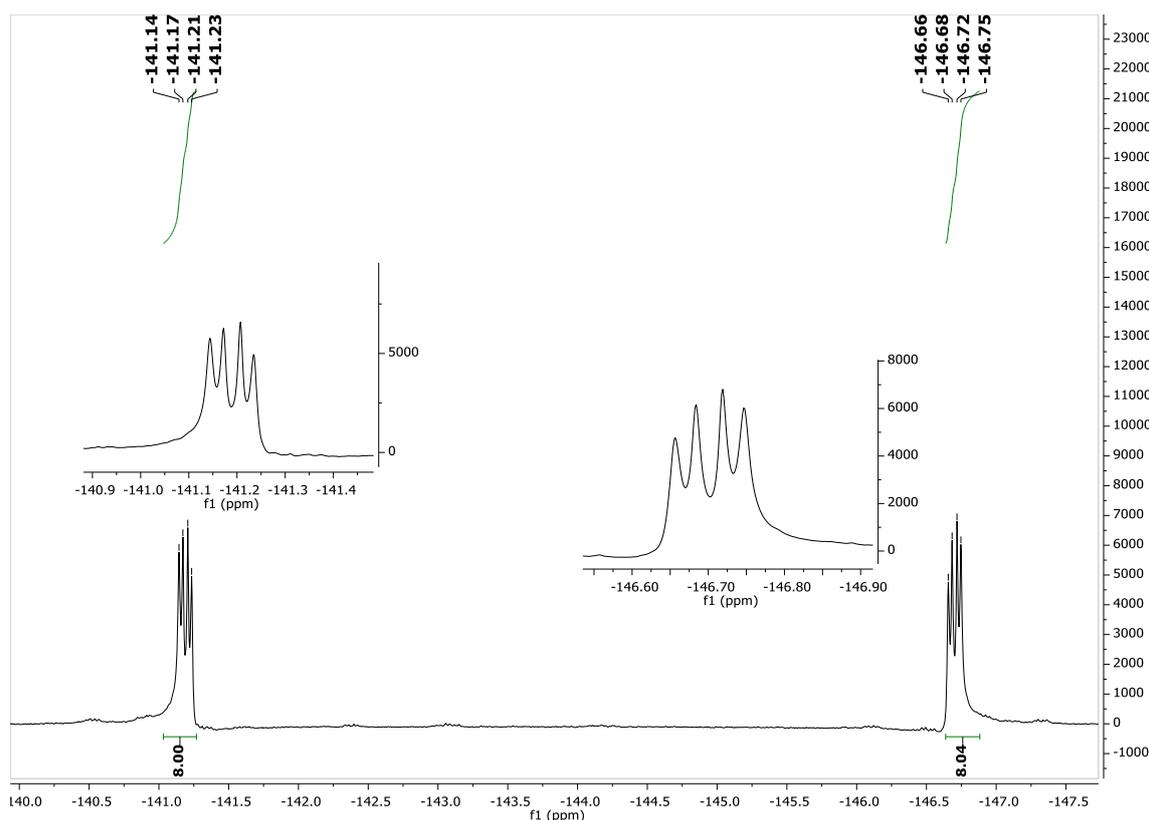


Figura 2.8- Espectro de ^{19}F da bacterioclorina **2.5** em DMSO-d_6

Espectroscopia de absorção UV-Vis

O espectro de absorção UV-Vis característico de uma porfirina de base livre distingue-se pela existência de uma banda com elevado coeficiente de absorvidade molar (ϵ) próxima dos 400 nm, geralmente entre 400 a 450 nm, seguida de quatro bandas de baixa intensidade compreendidas entre os 500 e os 660 nm. A primeira é denominada de banda B ou Soret e as quatro bandas de menor intensidade de bandas Q, segundo a terminologia descrita por Platt.²⁷ Ao longo de várias décadas, foram publicados trabalhos com interpretações dos espectros deste tipo de compostos, no entanto, o modelo teórico das quatro orbitais proposto por Gouterman^{28, 29}, no início da década de 60, continua a ser o mais consensual devido à sua natureza simplificada. De acordo com esta análise, o espectro deveria apresentar duas bandas B, no entanto, este facto não se verifica uma vez que a baixa diferença de energia entre as transições B_x e B_y conduz ao aparecimento de uma única banda, ligeiramente alargada.³⁰ A intensidade das quatro bandas Q varia de acordo com os grupos substituintes presentes no macrociclo, o que levou Stern *et al.* a propor uma classificação dos espectros de

absorção de acordo com esta intensidade relativa. Esta compreende quatro tipos: *etio*, *rhodo*, *oxorhodo* e *filo*.

Na figura 2.9, encontram-se os espectros da porfirina base **2.1**, e das porfirinas mono **2.2** e tetrassubstituídas **2.3** com a metanosulfonamida e respetivas ampliações. Todos os espectros foram adquiridos utilizando diclorometano como solvente, exceto o da porfirina **2.3** que foi realizado em DMSO devido à sua insolubilidade em diclorometano. Analisando os espectros apresentados, verifica-se que a intensidade relativa das bandas Q não é alterada pelo número de substituições, classificando-se todos os espectros como sendo do tipo *filo*. Este facto era previsível, uma vez que a substituição ocorre no anel fenílico e não no macrociclo tetrapirrólico.

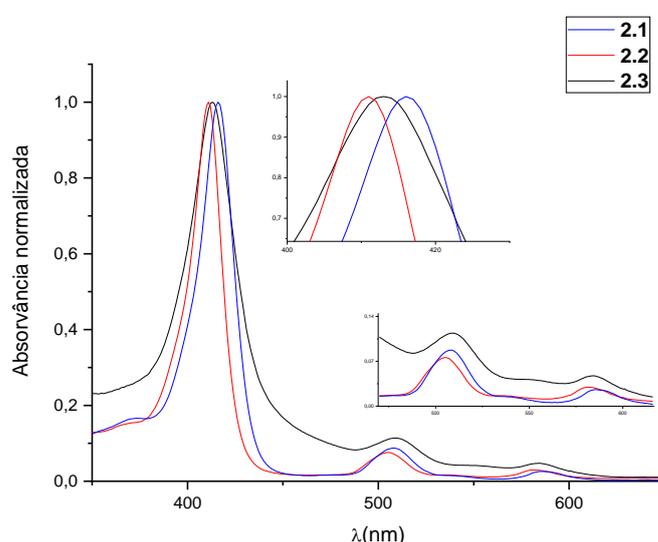


Figura 2.9- Espectros de absorção das porfirinas **2.1-2.3** e respetivas ampliações

Relativamente aos seus derivados reduzidos, a redução do macrociclo tetrapirrólico provoca uma diminuição da diferença de energia entre as orbitais HOMO (do inglês, *Highest Occupied Molecular Orbital*) e LUMO (do inglês, *Lowest Unoccupied Molecular Orbital*) que se torna mais evidente com o aumento do número de posições reduzidas, bem como uma destabilização da orbital HOMO devida essencialmente à distorção do macrociclo. Consequentemente, observa-se um desvio batocrómico do espectro UV-Vis, essencialmente das bandas Q, associado a um aumento da absorvidade molar das mesmas.³¹ Na figura 2.10 encontra-se, a título de exemplo, o

espectro da bacterioclorina **2.4**. Como se observa, ocorre um deslocamento da banda de absorção de menor energia de $\lambda_{\text{max}} = 636 \text{ nm}$ na porfirina (**2.2**) para $\lambda_{\text{max}} = 751 \text{ nm}$ na bacterioclorina.

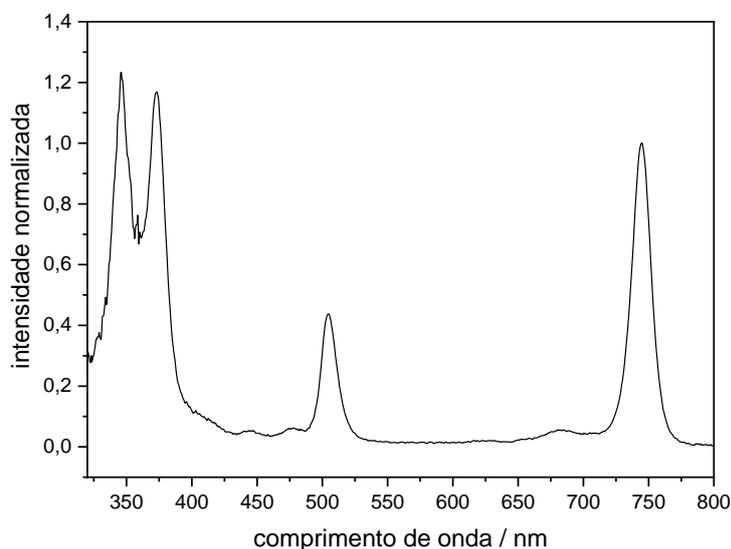


Figure 2.10- Espectro de absorção normalizado na banda $Q_x(0,0)$ da bacterioclorina **2.4** em etanol

A lei de Beer-Lambert indica que existe uma dependência logarítmica entre a intensidade de luz incidente numa amostra (I_{λ}^0) e a intensidade de luz transmitida por esta (I_{λ}). Adicionalmente, relaciona esta fração de luz incidente absorvida, num determinado comprimento de onda, com o coeficiente de absorção molar (ϵ , em $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), com a concentração da amostra (c , em M) e com o comprimento do percurso ótico (l , em cm).

$$A(\lambda) = \log \frac{I_{\lambda}^0}{I_{\lambda}} = \epsilon(\lambda)lc \Leftrightarrow \epsilon(\lambda) = \frac{A(\lambda)}{lc} \quad (I)$$

Com recurso a esta lei, e fixando o comprimento do percurso ótico em 1 cm, determinaram-se os coeficientes de absorção molar de cada composto. Para isso, foram preparadas soluções em diversos solventes, de acordo com a solubilidade dos compostos, com concentrações entre 10^{-5} e 10^{-7} M, das quais se efetuaram os respetivos espectros de absorção. De seguida, representaram-se graficamente os máximos de absorção para cada banda em função das concentrações das soluções previamente

preparadas e procedeu-se ao ajuste linear destes pontos. O declive do ajuste corresponde ao coeficiente de absorção molar da banda em análise. Na figura 2.11, apresenta-se, a título de exemplo, a representação gráfica da absorvância em função da concentração para a banda $Q_x(0,0)$ da bacterioclorina **2.4**.

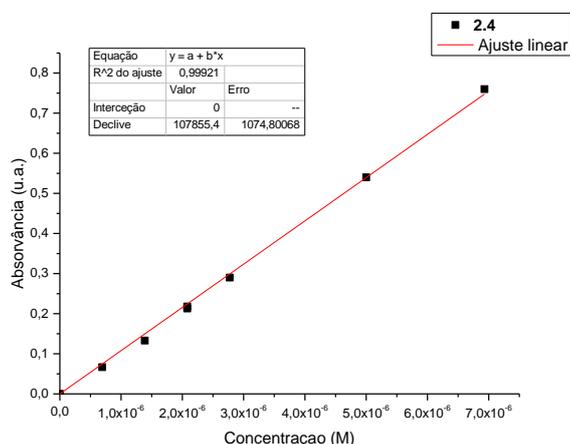


Figura 2.11- Absorvância em função da concentração para a banda $Q_x(0,0)$ ($\lambda = 751$ nm) da bacterioclorina **2.4** em etanol

Os coeficientes dos restantes compostos foram calculados do mesmo modo, obtendo-se em todos eles uma boa correlação, indicando que, na gama de concentrações utilizadas, não se observaram desvios à lei de Beer-Lambert e que consequentemente não ocorreu agregação.³² Observou-se um aumento do coeficiente de absorvidade molar de $\epsilon = 6,6 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e $\epsilon = 6,3 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ nas porfirinas **2.2** e **2.3** para $\epsilon = 1,08 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e $\epsilon = 1,31 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ na bacterioclorina **2.4** e **2.5**, respetivamente, consistente com os valores usualmente reportados para bacterioclorinas.³³

A restante caracterização fotofísica e fotoquímica encontra-se descrita no capítulo 3 e mais pormenorizadamente no capítulo 6.

2.1.2- Macrosciclos tetrapirrólicos catiónicos do tipo imidazolil porfirinas (Família II)

Tal como referido no capítulo 1 desta Tese, segundo a literatura, fotossensibilizadores com uma ou mais cargas positivas intrínsecas, habitualmente geradas por átomos de azoto quaternários, possibilitam uma inativação mais eficiente de bactérias de ambas as classes, Gram-negativas e Gram-positivas.^{34, 35} Neste sentido, o objetivo fulcral do trabalho descrito neste subcapítulo centra-se na preparação de uma família de fotossensibilizadores catiónicos derivados do 1-metilimidazole. Adicionalmente, continua a ser um *hot topic* na comunidade científica a influência do peso molecular de um composto na sua atividade antibacteriana, em particular na inativação de biofilmes.³⁶ Alguns autores realizaram estudos comparativos, contudo, utilizaram moléculas com características diferentes, não permitindo retirar conclusões assertivas.³⁷

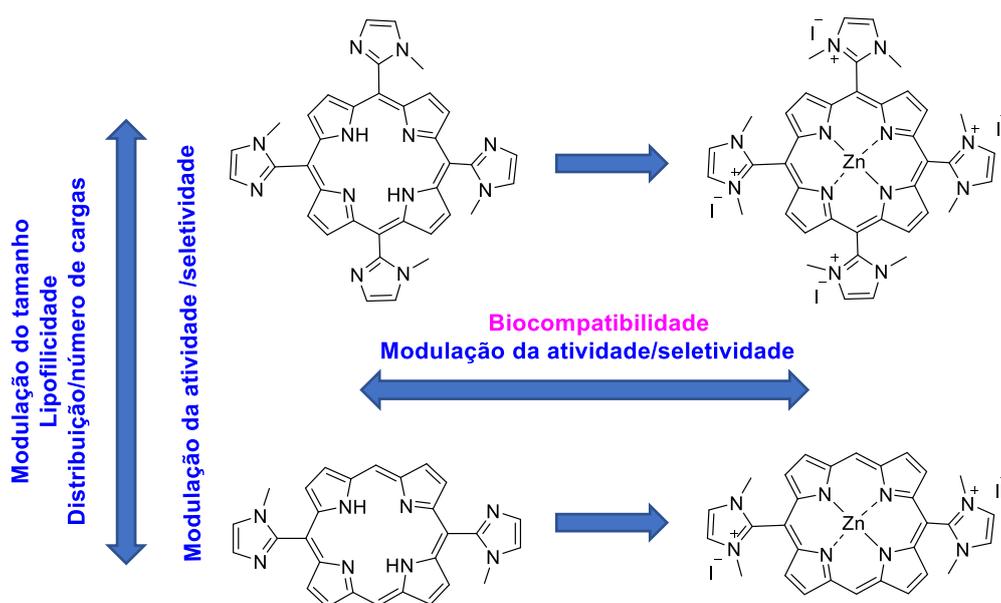


Figura 2.12- Modulação estrutural pretendida de macrosciclos tetrapirrólicos catiónicos do tipo imidazolil porfirinas

Numa tentativa de contribuir para a clarificação destes tópicos, compostos de estrutura semelhante com diferentes lipoflicidades/anfilicidades (porfirinas simétricas e não-simétricas), pesos moleculares, número e distribuição de cargas (4 ou 2 cargas positivas) foram também preparados, numa tentativa de desenvolver compostos com propriedades otimizadas para aumentar quer a permeação em membranas, quer a

difusão em biofilmes e, conseqüentemente, aumentar a sua atividade antimicrobiana (Figura 2.12).

2.1.2.1- Síntese de *meso*-tetra-imidazolil-porfirinas simétricas

Em 1935, Rothmund³⁸ descreveu pela primeira vez a síntese de porfirinas simétricas, através da reação de condensação de pirrole com o aldeído apropriado, realizada em atmosfera inerte, à temperatura de 100 °C durante 48 h e usando como solvente piridina. Mais tarde, em 1967, Adler e Longo³⁹ modificaram esta reação usando ácido propiônico como solvente e meio aeróbio, obtendo melhores rendimentos. No entanto, esta estratégia apresentava problemas no que diz respeito à contaminação com as clorinas correspondentes e baixos rendimentos e reprodutibilidade com a maioria dos aldeídos testados. Posteriormente, Lindsey e os seus colaboradores⁴⁰ desenvolveram um método empregando condições mais suaves, no qual a tetraciclização e a oxidação do porfirinogénio ocorrem em 2 passos distintos. Esta estratégia não necessita de altas temperaturas, o intermediário é sintetizado por condensação do pirrole com aldeídos aromáticos numa solução diluída de um solvente clorado (CHCl_3 ou CH_2Cl_2) à temperatura ambiente e em atmosfera inerte, na presença de TFA ou $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$, usados como catalisadores ácidos. A oxidação do porfirinogénio à correspondente porfirina efetua-se usando quinonas (ex: 2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona, DDQ). Como desvantagens, este método apresenta a necessidade de grandes diluições no primeiro passo, a utilização de um oxidante caro e de processos de purificação difíceis e dispendiosos, produzindo quantidades consideráveis de resíduos, alguns deles com toxicidade elevada, como é o caso do DDQ (Figura 2.13).

Já em 1991, foi desenvolvido por Pereira e Gonçalves uma metodologia de síntese de porfirinas, num único passo reacional, com objetivo de colmatar as limitações que os métodos anteriores apresentavam. Este novo método de síntese, conhecido na literatura como método do nitrobenzeno⁴¹, consiste na reação aeróbia de pirrole com os diferentes aldeídos, a uma temperatura de 120 °C durante aproximadamente 1 hora, utilizando como solvente uma mistura de ácido acético/nitrobenzeno (2:1). Em muitos dos casos em que este método é utilizado, a porfirina cristaliza diretamente no meio reacional, após adição de metanol, com um elevado grau de pureza e com pequenas ou nenhuma contaminação com a clorina correspondente.

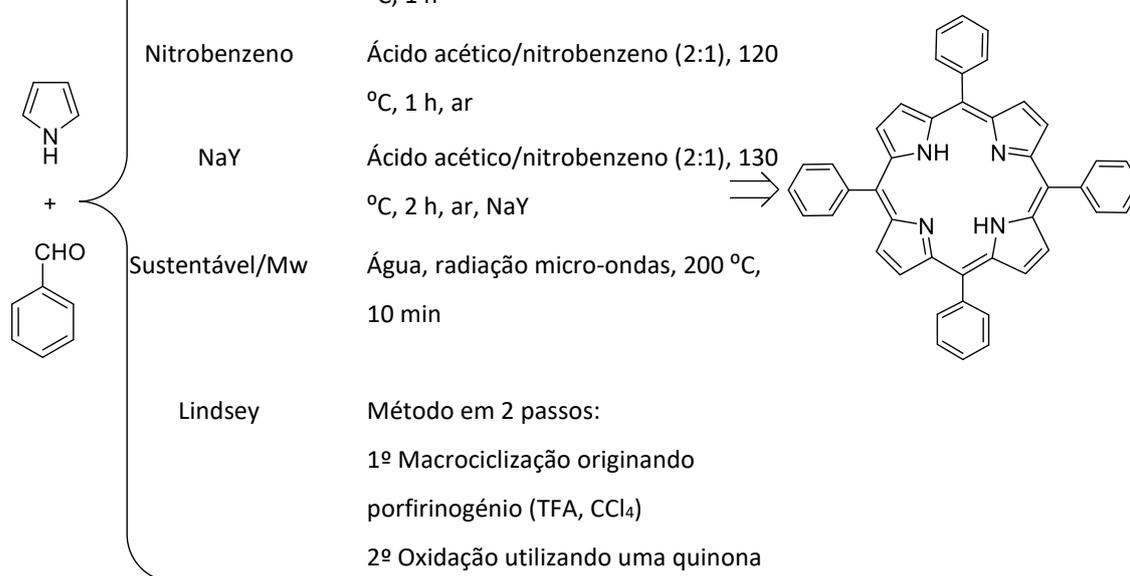
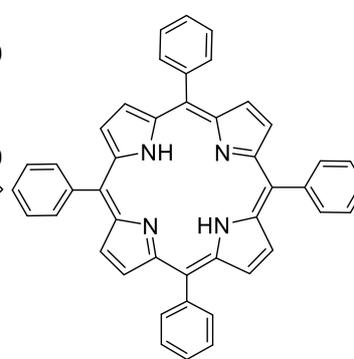
	Método	Condições	
	Rothemund	Piridina, tubo selado, 100 °C, 48 h	
	Adler e Longo	Ácido propiónico, tubo selado, 130 °C, 1 h	
	Nitrobenzeno	Ácido acético/nitrobenzeno (2:1), 120 °C, 1 h, ar	
	NaY	Ácido acético/nitrobenzeno (2:1), 130 °C, 2 h, ar, NaY	
	Sustentável/Mw	Água, radiação micro-ondas, 200 °C, 10 min	
Lindsey	Método em 2 passos: 1º Macrociclicização originando porfirinogénio (TFA, CCl ₄) 2º Oxidação utilizando uma quinona		

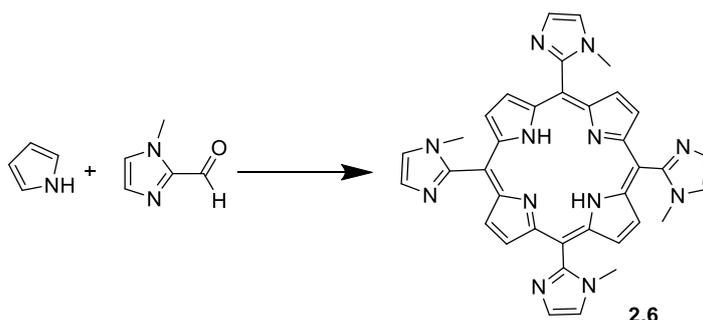
Figura 2.13- Esquema resumo dos métodos de síntese de *meso*-arilporfirinas

Numa tentativa de otimizar os rendimentos e sustentabilidade dos processos, em 2014, foi desenvolvido por Pereira e colaboradores⁴² o método do NaY que tem por base o método citado anteriormente mas difere na adição de NaY, um alumino-silicato que funciona como ácido de Lewis e que pode ser recuperado por filtração e reutilizado, necessitando apenas de lavagem e reativação a 300 °C. Na maioria das porfirinas descritas na literatura, este método permite uma duplicação de rendimento. No mesmo ano, procurando métodos menos poluentes, desenvolveu-se mais uma vez no laboratório de Catálise & Química Fina de Coimbra por Pereira e Calvete, um método pioneiro para a síntese sustentável de porfirinas, através da exploração de características únicas da água superaquecida sob irradiação micro-ondas⁴³. A água, sob estas condições (potência máxima de 300 W), e a uma temperatura de 473 K, atinge pressões acima de 16 bar, sendo capaz de agir como catalisador, sem o uso de solventes orgânicos e oxidantes. Nestas condições, as ligações de hidrogénio quebram-se, tornando a molécula menos polar e conseqüentemente as suas propriedades dielétricas ficam próximas dos solventes orgânicos, podendo substituí-los, permitindo a formação de porfirinas com elevados rendimentos. Deste modo, esta metodologia é detentora de um fator-E de apenas 35, superando de longe as restantes metodologias descritas em

termos de sustentabilidade (Adler e Longo- 158; Pereira-Nitrobenzeno- 300; Lindsey- 2252). Além dos benefícios ambientais referidos, esta apresenta também uma diminuição considerável do impacto económico, uma vez que dispensa a utilização de solventes e oxidantes, geralmente de elevado custo.

Com base neste conhecimento, o trabalho descrito nesta secção iniciou-se com a síntese da 5,10,15,20-*tetraquis*(1-metilimidazol-2-il)porfirina **2.6**. Esta foi sintetizada com recurso a quatro métodos distintos: o método do nitrobenzeno, a sua otimização recente com adição de NaY, o método recorrendo à síntese por micro-ondas utilizando como solvente água e, por fim, por um método desenvolvido no decurso desta dissertação, que consiste numa conjugação entre o método de Lindsey e o método do micro-ondas utilizando água como solvente (Tabela 2.1).

Tabela 2.1- Métodos de síntese da 5,10,15,20-*tetraquis*(1-metilimidazol-2-il)porfirina **2.6**



Entrada	Método	Tempo	Rendimento isolado	Fator E
1	Nitrobenzeno	1 h	15%	228,5
2	NaY	2 h	8%	461,0
3	Água e micro-ondas	10 min	12%	9,5
4	Conjugação entre Lindsey e água em micro-ondas	1h + 10 min	13%	1993,9

No que diz respeito ao método clássico do nitrobenzeno, colocou-se uma solução de 1-metilimidazol-2-carboxaldeído em ácido acético/nitrobenzeno (2:1) a 150 °C. Posteriormente foi adicionada, gota a gota, uma quantidade equimolar de pirrole e a mistura permaneceu em refluxo durante uma hora. Após arrefecimento, procedeu-se a

uma destilação a pressão reduzida. O crude foi purificado por duas colunas cromatográficas, usando como eluente clorofórmio/metanol (19:1) seguidas de uma precipitação usando clorofórmio e hexano. O composto **2.6** foi obtido com elevado grau de pureza e um rendimento de 14% (Tabela 2.1, entrada 1).

A otimização recente desenvolvida no grupo usando o zeólito NaY como ácido de Lewis para ativar o grupo carbonilo do aldeído difere do protocolo anterior apenas na adição inicial de um zeólito alumino-silicato denominado NaY e no tempo de reação, que é prolongado para duas horas. As etapas de purificação necessárias foram semelhantes, o que nos permite obter uma comparação mais fiável. O rendimento obtido foi de 8% (Tabela 2.1, entrada 2). Contrariamente ao descrito até ao momento utilizando aldeídos com grupos amina, o rendimento não foi superior por este método. Pensa-se que este efeito poderá ser atribuído devido à coordenação entre os núcleos ácidos do NaY e o reagente de partida que contem azotos conjugados no anel, uma vez que, por exemplo, é sabido que o NaY é um ácido de Lewis cuja acidez é calculada pela relação de adsorção de piridina aos seus centros.^{44,45} Desta forma, pode-se propor que a coordenação/adsorção dos aldeídos contendo azotos aromáticos com o NaY reduz a sua atividade como catalisador e diminuiu a quantidade de reagente disponível na fase homogénea.

Em terceiro lugar, foi empregue o método recorrendo à síntese por micro-ondas utilizando água como solvente. Assim, numa experiência tipo, a um copo reacional de 10 mL foi adicionado o 1-metilimidazol-2-carboxaldeído, o pirrole e a água. Este foi submetido a ultrassons, de forma a garantir a completa dissolução do aldeído. De seguida, a mistura foi sujeita a radiação micro-ondas por 10 minutos, usando um programa dinâmico com temperatura de 200 °C e potência máxima de 300 W. Após o arrefecimento da mistura reacional até à temperatura ambiente, o crude foi purificado por coluna cromatografia em sílica gel utilizando o eluente supramencionado. A porfirina **2.6** foi obtida com um rendimento de 12% (Tabela 2.1, entrada 3).

O método de Lindsey continua a ser uma dos métodos mais citados e utilizados para a síntese de porfirinas, no entanto, tal como supramencionado, este utiliza, no segundo passo, DDQ como agente oxidante, um composto caro e com alguma toxicidade (LD₅₀ de 82 mg/kg)⁴⁶ e leva à libertação de HCN após contacto com a água.

Neste sentido, seria importante encontrar uma alternativa mais barata, segura e sustentável para a realização deste segundo passo da metodologia. Deste modo, idealizámos uma metodologia em que o primeiro passo segue as condições de Lindsey e o segundo passo é realizado em micro-ondas utilizando a água como agente oxidante.

Num tubo de *Schlenk* em atmosfera inerte, adicionou-se o 1-metilimidazol-2-carboxaldeído, pirrole e diclorometano. A mistura foi borbulhada com árgon durante 20 minutos e, de seguida, adicionou-se ácido trifluoroacético (TFA) e colocou-se em agitação, à temperatura ambiente, durante uma hora. Após este tempo, adicionou-se uma quantidade equimolar de trietilamina e evaporou-se o solvente sob vácuo. O sólido foi transferido para um tubo de micro-ondas, ao qual se adicionou água. A mistura foi sujeita a radiação micro-ondas por 10 minutos, usando um programa dinâmico com temperatura de 200 °C e potência máxima de 300 W. Observou-se a formação de um sólido escuro, que foi redissolvido em diclorometano, confirmando-se por TLC e por UV-Vis a formação de porfirina. As etapas de purificação foram semelhantes ao supracitado, tendo-se obtido a porfirina **2.6** com um rendimento de 13% (Tabela 2.1, entrada 4).

Em suma, usando métodos mais sustentáveis (Tabela 2.1, entrada 3, 12%, Fator E =9,5) conseguimos diminuir o tempo reacional (1 h para 10 minutos), mantendo os rendimentos na mesma ordem de grandeza do método tradicional (Tabela 2.1, entrada 1, 14 %). Além disso, as etapas de purificação diminuem, uma vez que a porfirina precipita no meio reacional, não sendo necessário realizar destilação a pressão reduzida para remover os solventes. Adicionalmente, conseguiu-se uma significativa melhoria ao método de Lindsey,⁴⁰ evitando o uso de oxidantes caros e tóxicos e facilitando significativamente a purificação.

Após a síntese da porfirina base, com o propósito de modular as suas propriedades, procedeu-se à síntese do complexo de zinco (II), uma vez que estudos reportam que a presença de zinco em porfirinas pode aumentar as interações com a membrana, bem como promover um cruzamento intersistemas mais eficiente, conduzindo a um aumento da sua eficiência como fotossensibilizador.⁴⁷ Assim, numa experiência tipo, dissolveu-se a porfirina em clorofórmio e aqueceu-se a mistura até 50 °C. O acetato de zinco previamente dissolvido em metanol (solução saturada) foi adicionado, permanecendo a mistura sob aquecimento e agitação magnética. No

entanto, observou-se a formação de uma banda atípica para este tipo de complexos a 480 nm. Após pesquisa na literatura, verificámos que esta banda se encontrava em desvios correspondentes a estruturas poliméricas resultantes da coordenação entre os azotos do grupo imidazole e o zinco.⁴⁸ Foram realizadas tentativas para evitar a formação destes agregados, fazendo a complexação em diversos solventes (metanol, DMF, dioxano, piridina) e/ou utilizando meios básicos (adição de NaOH), mas em todos os casos se observou a formação dos agregados. Deste modo, decidiu-se realizar primeiro a cationização da base livre, de modo a alterar a sua estrutura e diminuir a formação de agregados em solução, aliando ao objetivo de obter um fotossensibilizador com eficiência em ambos os tipos de bactérias e biocompatível (Figura 2.14). Deste modo, dissolveu-se a porfirina em DMF e adicionou-se 0,1 mL de iodometano. A mistura foi aquecida e deixada em agitação a 25 °C. Procedeu-se ao longo do dia à adição de pequenas porções de iodometano até atingir um máximo de 300 equivalentes. Após 12 horas, terminou-se a reação e adicionou-se éter dietílico para precipitar o composto, tendo este sido filtrado. Obteve-se o tetra-iodeto de 5,10,15,20-tetraquis(1,3-dimetilimidazol-2-il)porfirina **2.7** com rendimento quantitativo. A tetracationização foi confirmada por RMN de próton, encontrando-se estes dados descritos na secção experimental (Capítulo 6).

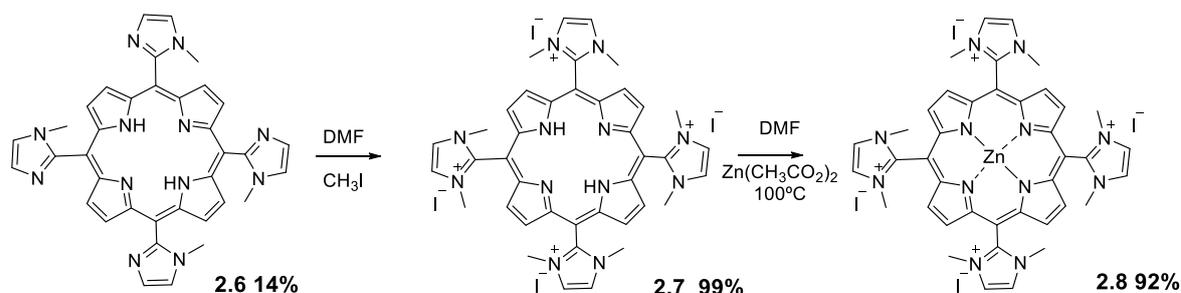


Figura 2.14- Metodologia sintética seguida na preparação das porfirinas catiónicas simétricas

De seguida, realizou-se a síntese do complexo de Zn (II) do composto **2.7**. Neste sentido, a uma solução da porfirina tetracatiónica **2.7** em DMF, previamente aquecida a 100°C , adicionou-se acetato de zinco. A reação foi monitorizada por UV-Vis até que a banda Soret se alterasse de 407 para 417 nm, e as 4 bandas Q características desaparecessem e se formassem 2 bandas Q, típicas do complexo metálico. Terminada a reação, deixou-se arrefecer até à temperatura ambiente e a porfirina foi precipitada

com uma mistura de diclorometano e éter dietílico, redissolvida em água e o excesso de acetato de zinco foi removido numa coluna cromatográfica de Sephadex G10. Obteve-se a porfirina **2.8** com um rendimento de 92% (Figura 2.14).

Destes resultados, salienta-se que o melhor método para a síntese da porfirina base é o método usando radiação micro-ondas e água e que a reação de complexação deve ser realizada após a cationização para evitar a formação de polímeros.

2.1.2.2- Síntese de *trans*-di-imidazolil-porfirinas

No subcapítulo anterior, foi explorada a síntese de porfirinas simétricas incorporando quatro grupos imidazolil catiónicos na sua estrutura. No entanto, para facilitar a penetração de membranas e difusão em biofilmes bacterianos, temos interesse em desenvolver compostos com menor peso molecular e número de cargas, pelas razões explicitadas no capítulo introdutório desta Tese. Neste sentido, decidiu-se preparar *trans*-di-imidazolilporfirinas numa tentativa de preparar compostos com estrutura otimizada para aPDT, para inativação de bactérias quer Gram-positivas, quer Gram-negativas.

Em geral, a preparação de porfirinas não-simétricas pode efetuar-se seguindo três metodologias principais:

a) método de um só passo onde ocorrem a condensação/ciclização mista de aldeídos e pirrole. Little e os seus colaboradores,⁴⁹ adaptaram o método anteriormente descrito por Adler e Longo utilizando as mesmas condições mas com uma mistura de aldeídos. Calvete e Pereira⁵⁰ descreveram a adaptação do método anteriormente descrito pelos mesmos, usando o zeólito NaY. Por esta estratégia obtém-se uma mistura de 6 porfirinas, tal como representado na figura 2.15, o que torna laborioso o processo de purificação.

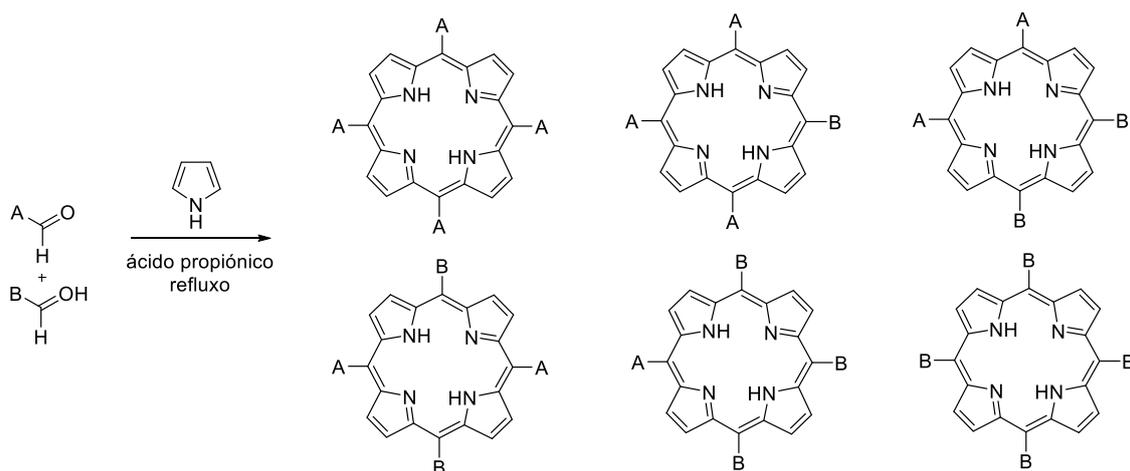


Figura 2.15- Mistura de porfirinas geradas pelo método da “mistura de aldeídos”

b) síntese total em vários passos através de condensação/ciclização 2+2.⁵¹ Um método mais seletivo que o referido no ponto a) foi descrito por MacDonald, usando um procedimento em três passos, em que o primeiro consiste na preparação do dipirrometano através de um aldeído e um excesso de pirrole, no segundo ocorre a tetramerização por uma condensação [2+2], onde o dipirrometano reage com um segundo aldeído em condições ácidas e, por último, ocorre a oxidação do porfirinogénio, usando quinonas (DDQ) (Figura 2.16). Este método está limitado a porfirinas 5,15-*trans*-disubstituídas.

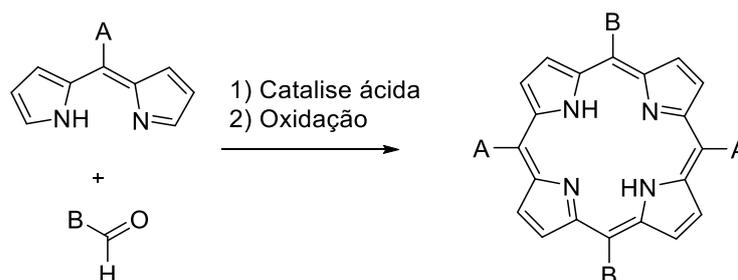


Figura 2.16- Adaptação esquemática do método de síntese descrito por MacDonald⁵¹

c) introdução de grupos funcionais em porfirinas simétricas previamente sintetizadas.^{52, 53}

Baseado nos conhecimentos supracitados, o trabalho descrito nesta secção iniciou-se com a síntese da 5,15-*bis*(1-metilimidazol-2-il)porfirina **2.9** (Figura 2.17). Assim,

seguido uma adaptação da metodologia de MacDonald, o dipirrometano não substituído, comercial, e 1-metilimidazol-2-carboxaldeído foram dissolvidos em diclorometano e a mistura foi borbulhada com árgon durante 15 minutos. De seguida, adicionou-se ácido trifluoroacético e deixou-se em agitação em atmosfera inerte à temperatura de 30 °C. Ao fim de 8 horas, adicionou-se DDQ e aumentou-se a temperatura para 50 °C durante 1 hora. De seguida, o solvente foi evaporado e a mistura lavada por diversas vezes com água. Após este processo, realizou-se coluna cromatográfica de sílica gel usando como eluente DCM/metanol, obtendo-se a 5,15-*bis*(1-metilimidazol-2-il)porfirina **2.9** com um rendimento de 19%.

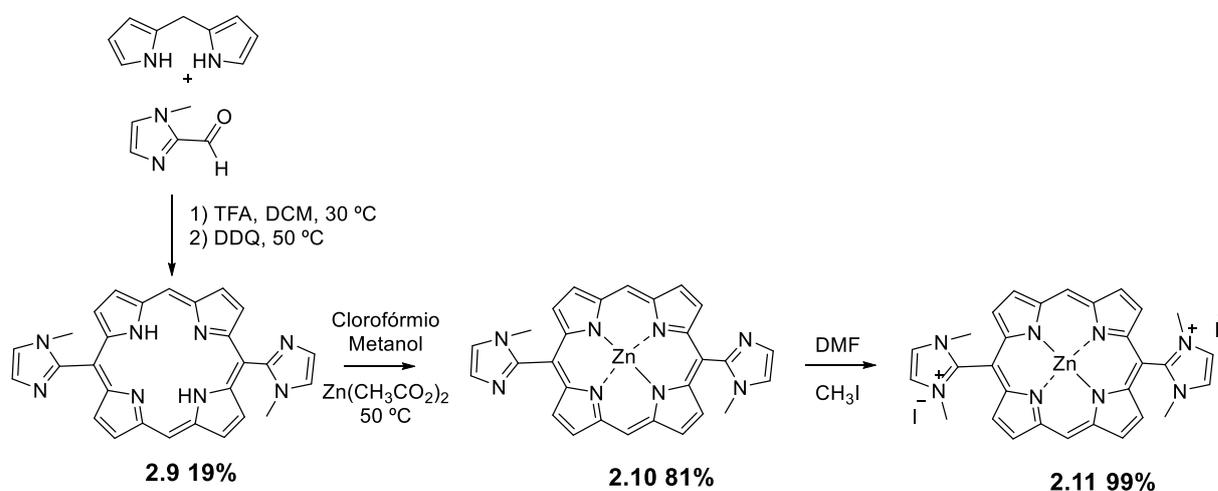


Figura 2.17– Metodologia sintética seguida na preparação da porfirina catiónica não-simétrica.

Após a síntese da porfirina base, procedeu-se também à sua complexação com zinco, utilizando o mesmo protocolo experimental descrito acima para a porfirina simétrica. Neste caso, nunca se observou a formação dos polímeros mencionados no caso da porfirina simétrica. Terminada a reação, deixou-se arrefecer até à temperatura ambiente. De seguida, o solvente foi removido sob vácuo e o sólido obtido redissolvido em diclorometano. A fase orgânica foi lavada com uma solução saturada de bicarbonato de sódio e água destilada, sucessivamente. Por fim, foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e o solvente posteriormente removido no evaporador rotativo. A porfirina 5,15-*bis*(1-metilimidazol-2-il)porfirinato de zinco (II) **2.10** foi obtida com um rendimento de 81% (Figura 2.17). De seguida, procedeu-se à cationização com iodometano, obtendo-se a porfirina di-iodeto de 5,15-*bis*(1,3-dimetilimidazol-2-il)porfirinato de zinco(II) **2.11**. A dicationização foi confirmada por RMN de protão e por massa (ESI-MS positivo).

Todos os compostos foram caracterizados por espectroscopia de RMN de próton e massa e a sua descrição encontra-se no capítulo 6 desta Tese. A título de exemplo, encontra-se na figura 2.18, o RMN de ^1H da porfirina **2.9**, resultante de uma mistura de dois atropoisómeros. Neste espectro, para cada atropoisómero, observam-se 7 sinais característicos: um sinal em forma de singuleto a 10,35 ppm atribuído aos prótons das posições *meso*; dois sinais em forma de duplete a 9,43 e 9,03 ppm atribuídos aos prótons das posições β ; dois sinais a 7,73 e 7,54 ppm atribuídos aos prótons do grupo imidazole; um sinal em forma de singuleto a 3,52 ppm atribuído aos grupos metílicos diretamente ligados ao azoto do grupo imidazole e, por fim, um sinal em forma de singuleto a -3,31 ppm, correspondente aos N-H internos da porfirina. Os desvios indicados são para um dos atropoisómeros, observando-se sinais similares com pequenos desvios para o outro, tal como facilmente se observa na figura 2.18.

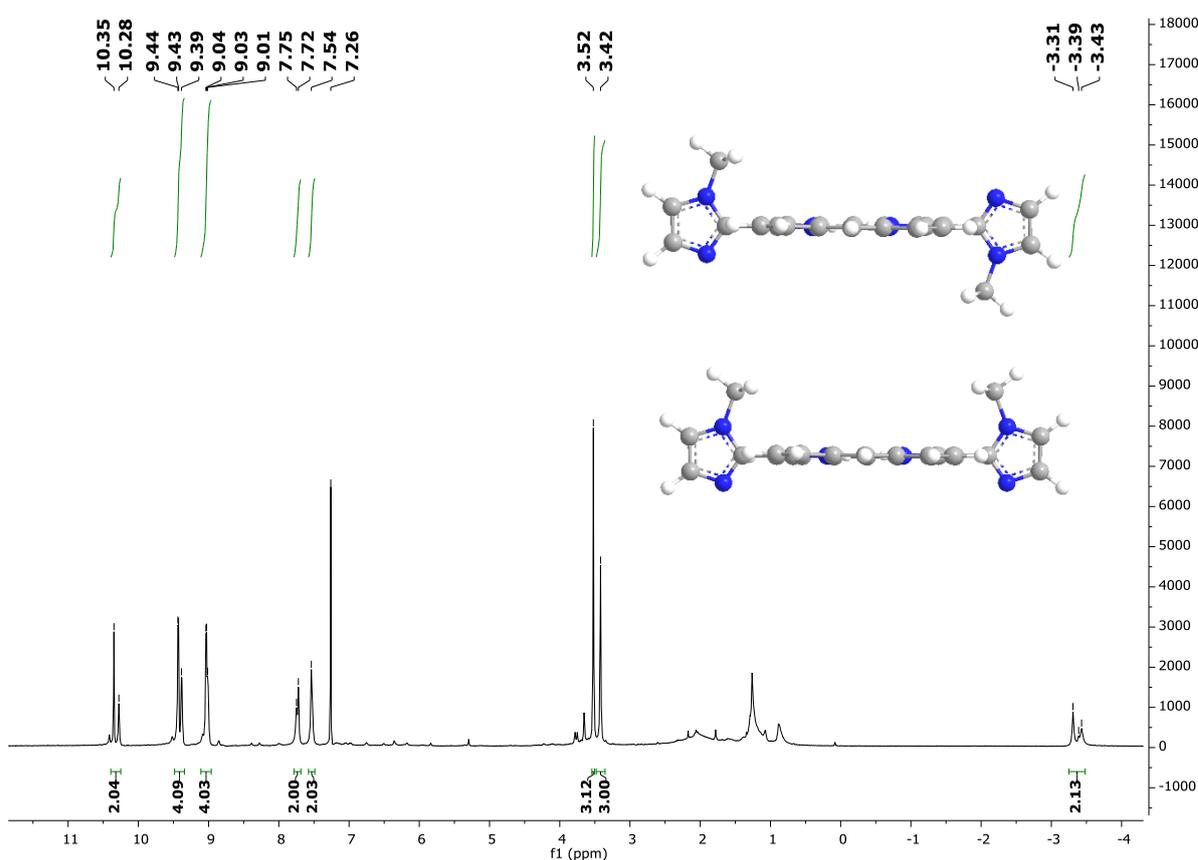


Figura 2.18- Espectro de RMN ^1H para a porfirina **2.9** em CDCl_3

Observa-se por espectroscopia de RMN que a metilação torna o composto totalmente simétrico, deixando de se observar a presença de atropoisómeros. Este

comportamento deve-se às estruturas de ressonância possíveis no imidazole, que tornam os dois azotos idênticos, como se pode observar na figura abaixo (Figura 2.19).

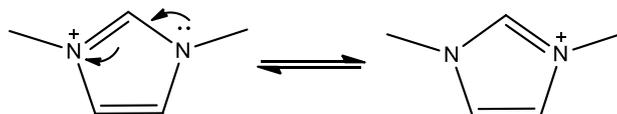


Figura 2.19- Estruturas de ressonância do grupo imidazole

De forma a complementar a caracterização apresentada, realizaram-se espectros de massa com a técnica de ionização ESI-TOF de todas as porfirinas novas descritas. A título de exemplo, apresenta-se na figura 2.20 os resultados obtidos para a porfirina **2.9**, onde se pode observar a presença da molécula protonada $[M+H]^+$ a 471,20405. Os restantes resultados encontram-se descritos na secção experimental (Capítulo 6).

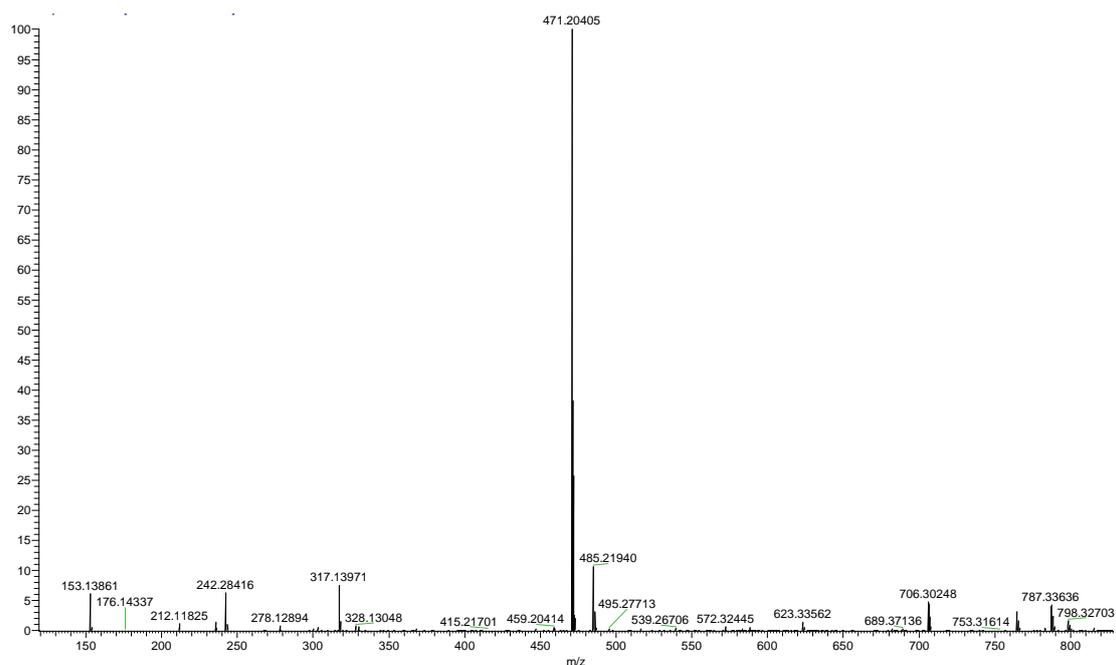


Figura 2.20- Espectro de massa ESI para a porfirina **2.9** adquirido no modo positivo

De seguida, prosseguiu-se com a tentativa de preparação da correspondente bacterioclorina. Assim, numa experiência tipo, os dois sólidos, a porfirina **2.8** e um excesso de *p*-toluenossulfonilhidrazina (1:40) foram misturados e aquecidos até 140 °C por 1 hora na ausência de oxigénio e a uma pressão de 0,1 Torr. No entanto, verificou-se que não foi possível obter exclusivamente a bacterioclorina mas sim uma mistura de derivados reduzidos, tal como se observa na figura 2.21. Dado que o composto é

carregado positivamente, não é fácil proceder à sua purificação por coluna cromatográfica em sílica gel de fase normal ou alumina. Diversos eluentes foram testados em TLCs de sílica de fase reversa, não sendo possível obter uma boa separação entre os compostos. Deste modo, devido a limites temporais não se prosseguiu com a otimização da reação de síntese da bacterioclorina.

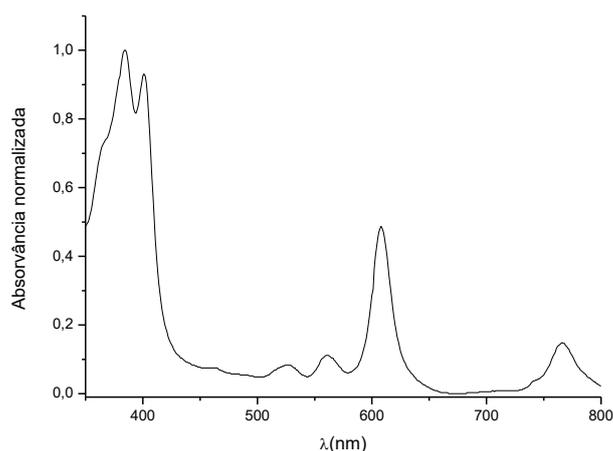


Figura 2.21- Espectro UV-Vis normalizado da mistura reacional obtida na preparação da bacterioclorina

Espectroscopia de absorção UV-Vis

Na figura 2.22, encontram-se os espectros das duas porfirinas bases, **2.6** e **2.9** e respectivas ampliações. Ambos os espectros foram adquiridos usando diclorometano como solvente.

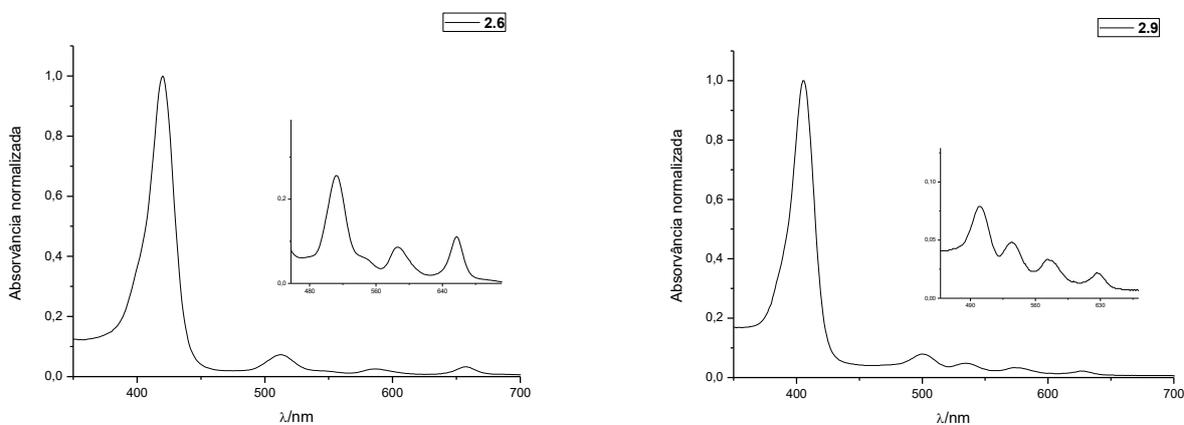


Figura 2.22- Espectros de absorção normalizados das porfirinas **2.6** e **2.9** e respectivas ampliações, usando como solvente diclorometano

Analisando os espectros apresentados, observa-se que a intensidade relativa das bandas Q é diferente, sendo o espectro da porfirina **2.6** do tipo *filo* e o da **2.9** do tipo *etio*.

Contrariamente, os complexos metálicos de porfirinas apresentam apenas uma banda B e duas Q, uma vez que a complexação da porfirina com zinco altera a simetria do anel, passando de D_{2h} para D_{4h} . Esta mudança de simetria tem implicações diretas na degeneração das orbitais HOMO e LUMO envolvidas nas transições eletrônicas que originam as bandas do espectro de absorção destes compostos.³¹ Na figura 2.23, encontram-se os espectros dos respectivos complexos metálicos catiónicos, **2.8** e **2.11**, em água.

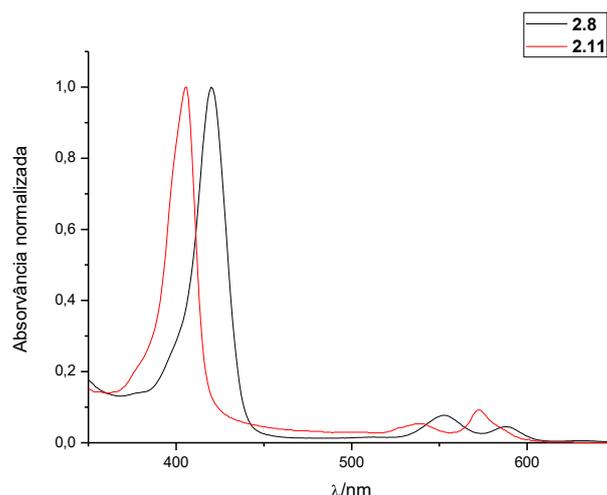


Figura 2.23- Espectros de absorção normalizado das porfirinas **2.8** e **2.11** em água

A restante caracterização fotofísica e fotoquímica encontra-se descrita no capítulo 3 e mais pormenorizadamente no capítulo 6.

2.2- Macro ciclos pirrólicos do tipo ftalocianina e subftalocianina (Família III)

A motivação do desenvolvimento de fotossensibilizadores da família das ftalocianinas e subftalocianinas é bastante semelhante à explicitada anteriormente para as porfirinas catiónicas derivadas do imidazole. Mais uma vez, pretendíamos desenvolver uma nova família de compostos em que pudéssemos incluir uma ou mais

cargas positivas intrínsecas, de modo a obter uma inativação mais eficiente de bactérias de ambas as classes, Gram-negativas e Gram-positivas, e por outro lado pudéssemos variar o peso molecular, não alterando significativamente a estrutura base das moléculas. Neste sentido, o objetivo fulcral do trabalho descrito neste subcapítulo centra-se na preparação de uma família de fotossensibilizadores do tipo ftalocianina contendo grupo passíveis de serem cationizados, assim como dos seus análogos de menor peso molecular, as subftalocianinas, de modo a obter compostos com o mesmo *scaffold* mas diferentes lipofilicidades, pesos moleculares, número e distribuição de cargas (Figura 2.24).

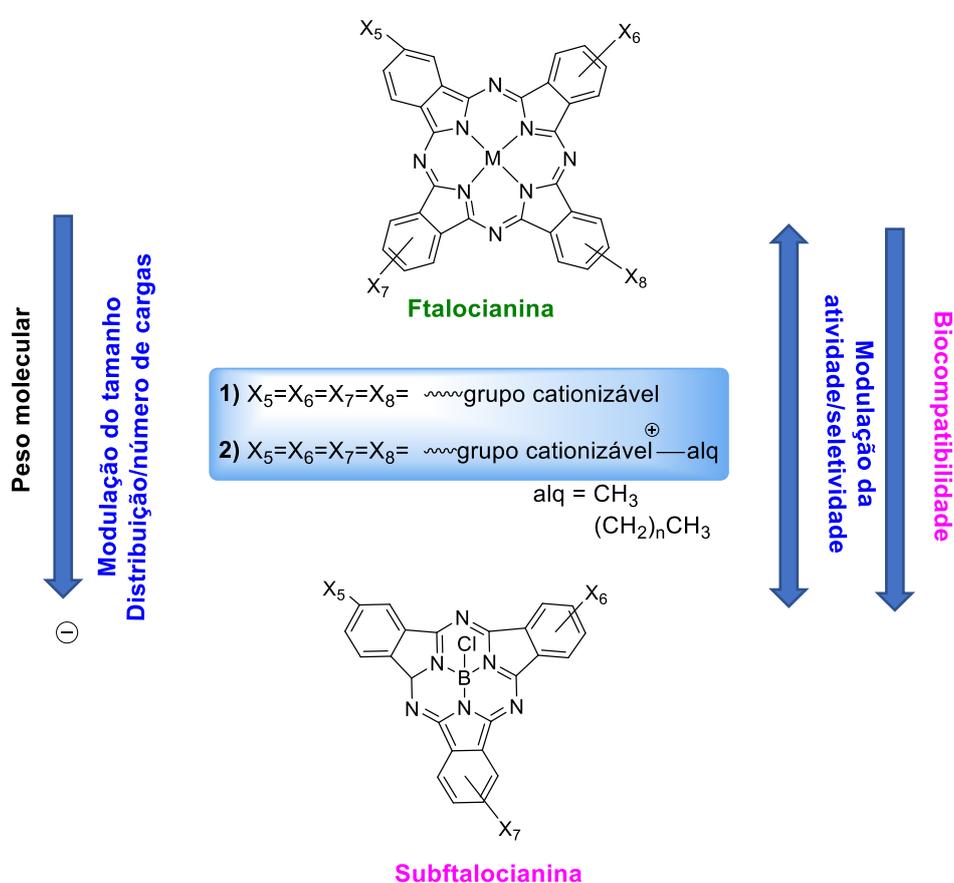


Figura 2.24- Modulação estrutural pretendida de macrociclos pirrólicos do tipo ftalocianina e subftalocianina

2.2.1- Síntese de precursores- Ftalonitrilos

Tendo em vista a preparação de ftalocianinas e suftalocianinas com grupos passíveis de serem cationizados, iniciou-se este trabalho com a síntese dos precursores do tipo ftalonitrilos monossustituídos.

Neste sentido, os ftalonitrilos pretendidos foram preparados a partir do 4-nitroftalonitrilo por substituição *ipso* nitro, que envolve o ataque direto da espécie nucleofílica ao carbono onde está localizado o grupo nitro, originando ftalonitrilos substituídos na posição 4. Com base no supracitado, os nucleófilos escolhidos deveriam possuir na sua constituição dois grupos chave: um grupo nucleofílico para que ocorra a funcionalização do ftalonitrilo e um grupo passível de ser cationizado. Resultados bastante promissores em bactérias Gram-negativas foram obtidos no trabalho conducente à dissertação de mestrado do Rafael T. Aroso utilizando ftalocianinas funcionalizadas com o grupo imidazole,⁵⁴ incentivando à continuação do trabalho com este substituinte. Deste modo, selecionou-se o imidazole, o 2-((dimetilamino)metil)fenol, o *N*-(2-hidroxietil)imidazole e o etanotiol. No caso, do 2-((dimetilamino)metil)fenol) deparamo-nos com um desafio, dado que o reagente comercial não era puro mas sim uma mistura dos constituintes representados na figura 2.25, pelo que foi necessário realizar primeiramente uma coluna cromatográfica de sílica gel usando como eluente primeiramente éter dietílico/diclorometano (1:1) e de seguida, acetonitrilo/acetona/metanol/trietilamina (14:7:1,5:1), obtendo-se o 2-((dimetilamino)metil)fenol isolado.

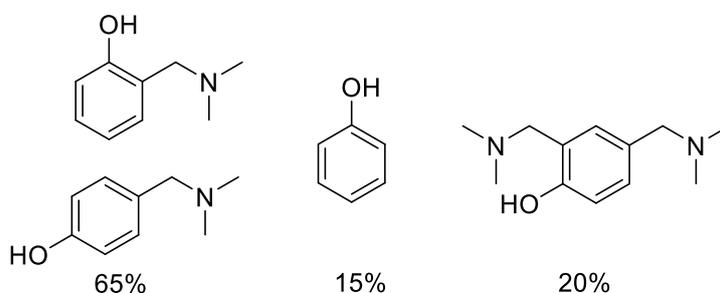


Figura 2.25- Mistura de compostos encontrados no reagente comercial 2-((dimetilamino)metil)fenol

A seleção do isómero pretendido (*orto* substituído) foi confirmada por RMN, do qual se evidencia a região aromática na figura 2.26, que apresenta um aspeto típico de um anel 1,2-dissubstituído. Como se pode observar, o espectro é constituído por dois duplos dupletos, ou seja, dois H's que têm um acoplamento com um H do tipo J^3 (vicinais, maior constante de acoplamento) e com um H do tipo J^4 (H em *meta*, menor constante de acoplamento) (H3 e H6) e dois triplos dupletos, o que indica que temos

dois H's que acoplam com dois H's geminais (J^3) - tripeto e com um em *meta* (J^4) - duplete (H4 e H5). Caso tivéssemos o isômero *para* substituído observaríamos apenas dois conjuntos de sinais, com integração 2.

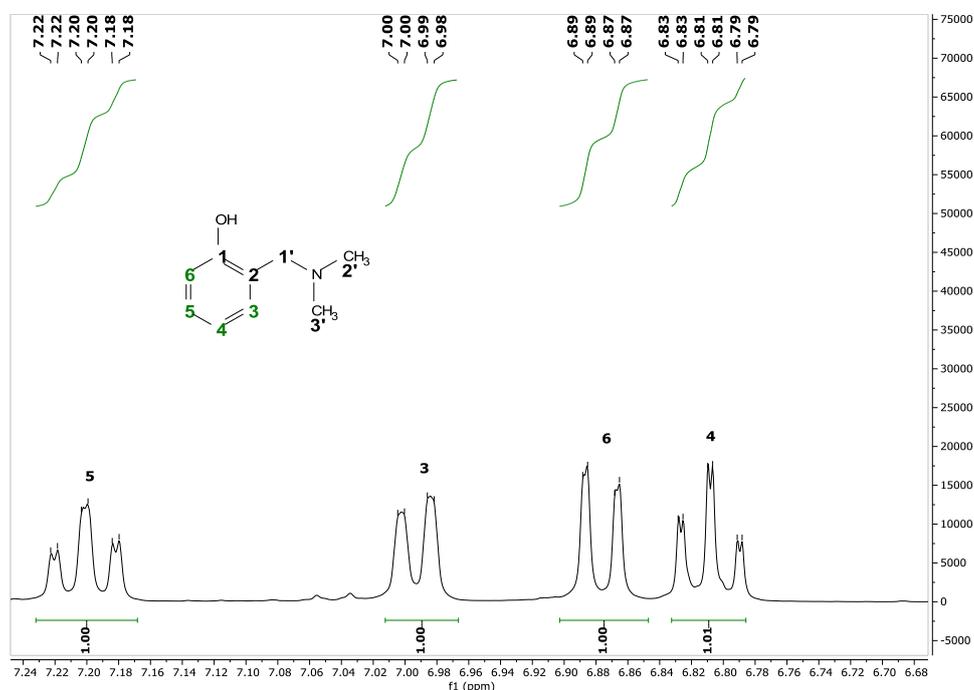


Figura 2.26- Espectro de RMN ^1H da fração do 2-((dimetilamino)metil)fenol em CDCl_3

O 4-nitroftalonitrilo foi convertido nos ftalonitrilos pretendidos, por reação com o nucleófilo desejado, usando um excesso de carbonato de potássio como base, em DMF como solvente, à temperatura de 35 °C (Figura 2.27). A reação foi realizada a temperatura baixas para evitar formação de ftalocianina ou de produtos secundários resultantes, nomeadamente, da presença de quantidades residuais de água no meio ou da degradação do solvente.

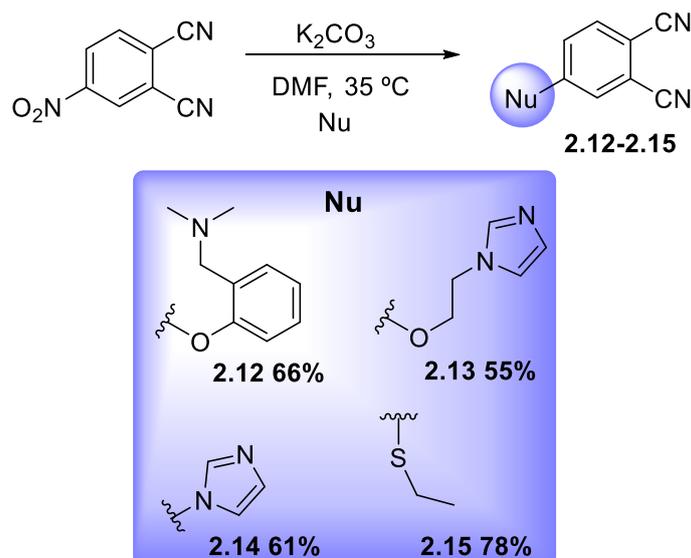


Figura 2.27- Esquema da síntese de ftalonitrilos e respectivos rendimentos isolados obtidos

A evolução da reação foi acompanhada por TLC e cada reação terminada quando se observou consumo total do 4-nitroftalonitrilo. A base foi filtrada e, dado que o DMF é miscível com água, a purificação do composto passou por uma precipitação por adição de uma mistura de água e gelo à reação, de modo a induzir a precipitação do ftalonitrilo. O composto pretendido foi filtrado e seco sob vácuo, sendo necessário uma lavagem adicional com metanol para o ftalonitrilo **2.14**. Estes foram obtidos com rendimentos compreendidos entre 55-78%. A caracterização espectroscópica completa encontra-se descrita na secção experimental desta Tese (Capítulo 6).

A título de exemplo, encontra-se na figura 2.28A o espectro de RMN de ^1H do ftalonitrilo **2.12** em DMSO- d_6 . Neste, observam-se nove sinais: um sinal em forma de singuleto a 2,06 ppm atribuído aos protões do grupo metilo ($\text{H}8'$, $\text{H}9'$); um singuleto a 3,30 ppm atribuído aos protões do grupo CH_2 e sete sinais entre 7,1-8,6 ppm atribuídos aos protões aromáticos dos dois anéis benzénicos da molécula. Destes sete sinais destaca-se: 1) o padrão típico dos protões de um ftalonitrilo substituído na posição 4, correspondente a 3 sinais protónicos: 1 duplete (J^3) de maior constante de acoplamento (8,05 ppm; $J = 8,8$ Hz; $\text{H}6$) um duplete (J^4) de menor constante de acoplamento (7,66 ppm; $J = 2,6$ Hz; $\text{H}3$) e um duplo duplete (7,25 ppm; $J = 2,6$ Hz; 8,8 Hz; $\text{H}5$); 2) o padrão inicialmente observado para o reagente 2-((dimetilamino)metil)fenol: dois duplos dupletos, ou seja, dois $\text{H}'\text{s}$ que têm um acoplamento com um H do tipo J^3 e com um H

do tipo J^4 ($H6'$ e $H3'$) e dois triplos dupletos, o que indica que temos dois H's que acoplam com dois H's geminais (J^3) - triplo e com um em *meta* (J^4) - duplo ($H4'$ e $H5'$).

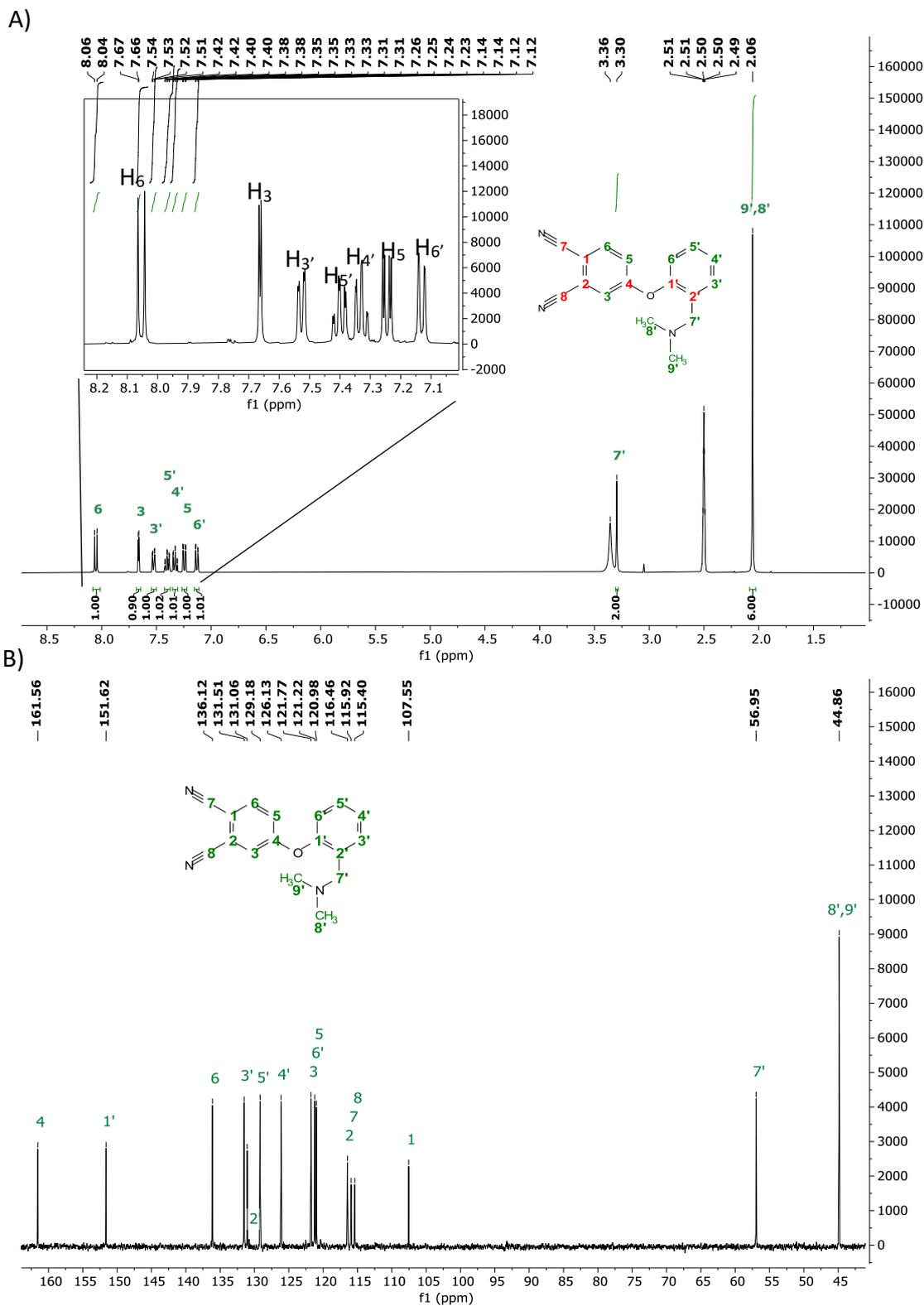
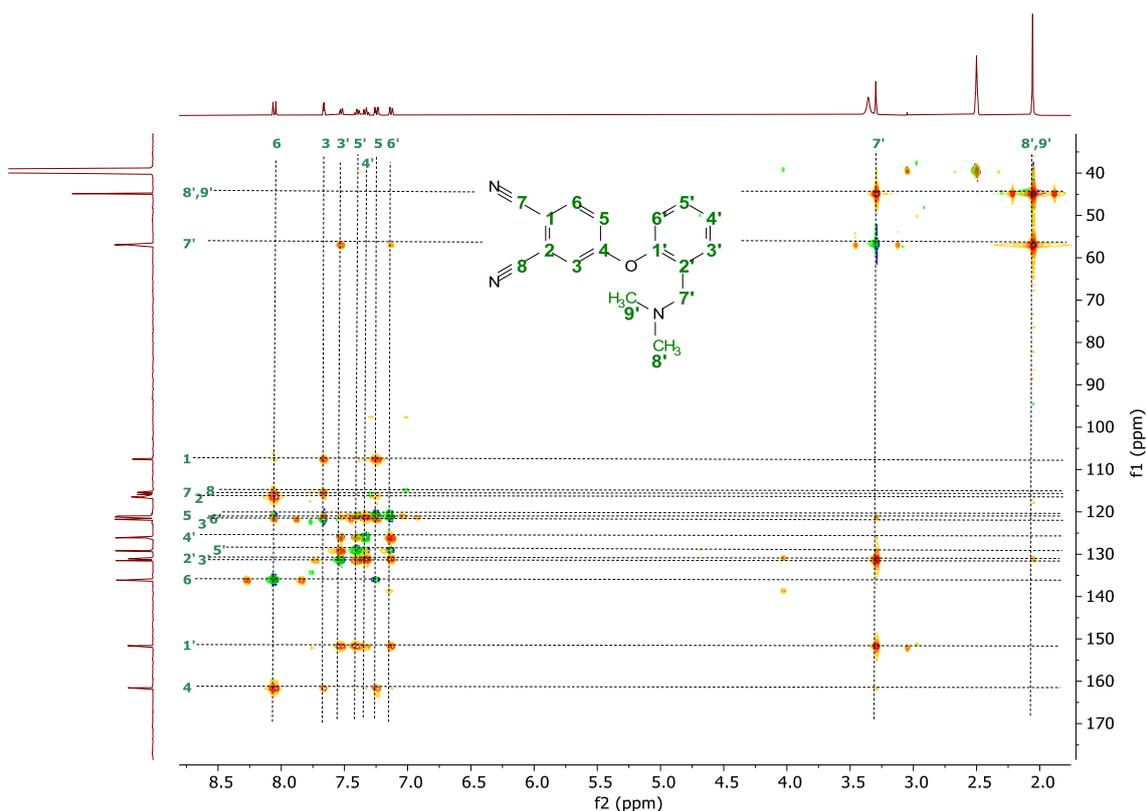


Figura 2.28- Espectros de RMN do ftalonitrilo **2.12** em DMSO- d_6 A) 1H B) ^{13}C

Tendo em conta o efeito doador dos substituintes neste anel, é de esperar que o duplo duplete em posição *orto* em relação ao oxigénio (7,13 ppm; H6') possua um menor desvio químico que H3' (7,53 ppm), que se encontra em posição *meta*. Pela mesma razão, o triplo duplete em posição *para* (7,33 ppm; H4') possui um desvio químico inferior ao triplo duplete em posição *meta* (7,40 ppm; H5').

O espectro de ^{13}C do mesmo ftalonitrilo (**2.12**) encontra-se representado na figura 2.28B. A completa atribuição dos sinais foi efetuada com auxílio de técnicas de RMN 2D, nomeadamente HSQC e HMBC (Figura 2.29). O HSQC (*Heteronuclear single quantum coherence*) permite analisar correlações entre núcleos ^{13}C e ^1H diretamente ligados. Por outro lado, o HMBC identifica correlações entre núcleos ^{13}C e ^1H separados por várias ligações (maioritariamente do tipo J^2 e J^3 e, em alguns casos, também do tipo J^4), permitindo identificar C-H's próximos entre si e/ou próximos de carbonos sem hidrogénios diretamente ligados.



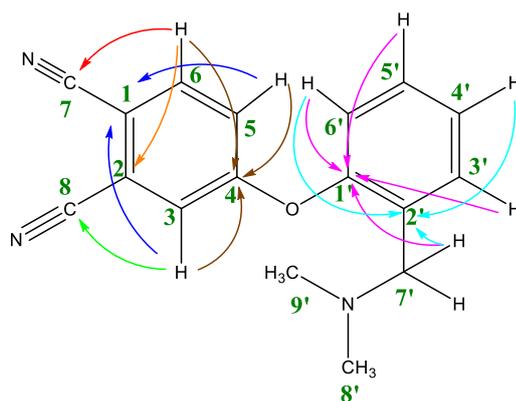


Figura 2.29- Sobreposição do espectro HSQC (verde) com o espectro HMBC (laranja) para o ftalonitrilo **2.12** em DMSO- d_6 e esquema das correlações ^1H - ^{13}C do tipo J^2 e J^3 observadas em HMBC mais relevantes para a identificação dos sinais de RMN dos carbonos quaternários do ftalonitrilo **2.12**

Começando pelos sinais localizados em campo baixo, é possível identificar dois carbonos localizados numa zona típica de carbonos aromáticos quaternários ligados diretamente a um átomo eletronegativo, C4 e C1' (161,56 e 151,62 ppm). Dado que o C4 se encontra localizado num anel aromático com menor densidade eletrónica, fruto da presença de grupos atratores de eletrões (grupos ciano), é de esperar que se encontre a um desvio químico superior. Esta atribuição é confirmada por HMBC pela correlação dos protões do anel aromático do ftalonitrilo com o sinal a 161,56 ppm (C4) e dos protões aromáticos do seu substituinte fenóxi com o sinal a 151,62 (C1'), tal como esquematizado na figura 2.29. Relativamente aos carbonos aromáticos ligados diretamente a um hidrogénio, é possível observar que as suas frequências de ressonância são fortemente afetadas pela sua posição relativamente ao oxigénio, sendo que os três carbonos que se encontram em posição *meta* (C6, C3' e C5') apresentam desvios químicos superiores. O carbono C6, pelas considerações de densidade eletrónica efetuadas previamente, encontra-se mais desviado para campo baixo (136,12 ppm). Os carbonos C3, C4', C5 e C6', por se encontrarem em posição *orto* ou *para* relativamente ao oxigénio, encontram-se desviados para campo alto devido ao seu efeito doador de eletrões por ressonância. O carbono C2', pelas correlações com os protões do anel fenóxi, corresponde à ressonância observada a 131,06 ppm. Seguem-se quatro sinais correspondentes a carbonos quaternários. Os carbonos correspondentes ao grupo ciano podem ser identificados a 115,92 e 115,40 ppm, que são valores muito típicos para

ftalonitrilos substituídos na posição 4. Próximos destes, encontram-se dois carbonos quaternários que correspondem aos carbonos benzênicos ligados aos grupos ciano. Devido ao efeito anisotrópico de blindagem provocado pela ligação tripla dos grupos ciano, estes carbonos apresentam desvios para campos maiores relativamente aos restantes carbonos aromáticos. O carbono C1, pela sua posição *para* relativamente ao grupo fenóxi apresenta uma densidade eletrónica superior e, por isso, localiza-se a 107,55 ppm e C2 a 116,46 ppm. Por fim, é possível identificar os sinais alquílicos a 56,95 e 44,86 como correspondentes aos carbonos do tipo CH₂ e CH₃, respetivamente. O grupo CH₂, pelo efeito simultâneo de estar diretamente ligado a um anel aromático e a um átomo eletronegativo sofrerá um desvio superior.

Para complementar a caracterização dos ftalonitrilos acima apresentados, recorreu-se à espectrometria de massa. Nos espectros de ESI-TOF obtidos para os ftalonitrilos **2.12-2.15**, observou-se sempre a presença da molécula protonada [M+H]⁺, bem como uma boa concordância entre o padrão isotópico calculado e o observado, como se pode verificar na secção experimental (Capítulo 6). Na figura 2.30 apresenta-se, como exemplo, a distribuição isotópica calculada e observada para o ftalonitrilo **2.12**. Como se pode observar, existe uma excelente concordância entre o espectro de massa calculado e observado experimentalmente, sendo o erro de apenas 0,0001 ppm. A distribuição isotópica apresenta um pico de maior intensidade de 278,1289 m/z correspondente à massa da molécula protonada [M+H]⁺.

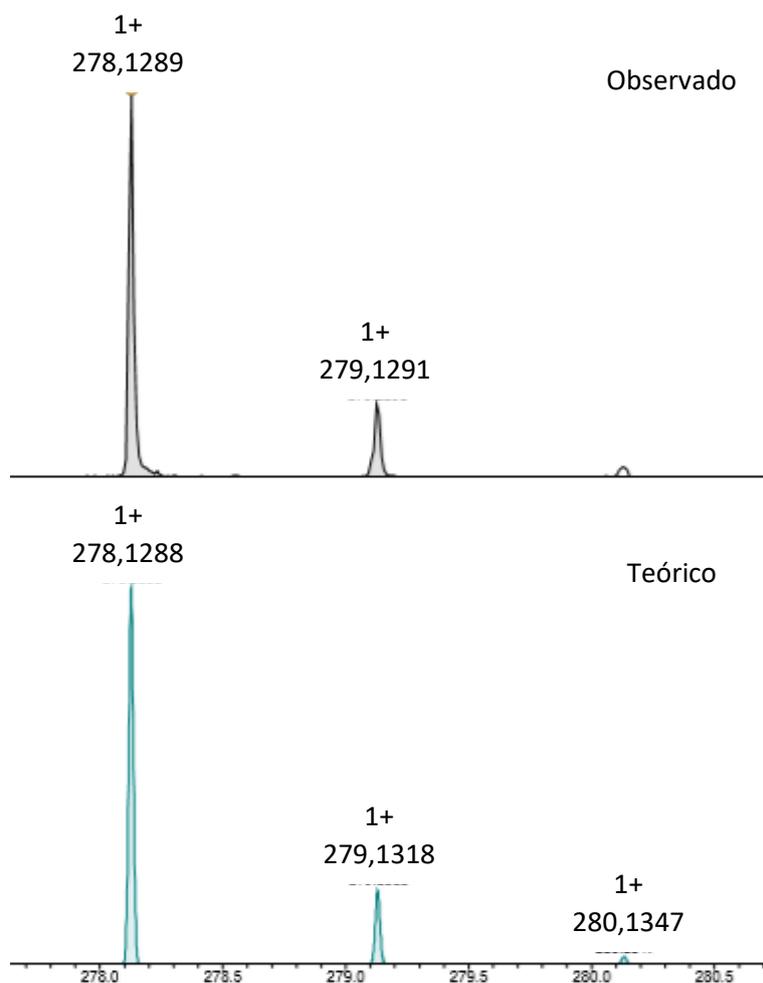


Figura 2.30- Padrão isotópico observado e teórico, obtido por ESI-TOF de alta resolução do ftalonitrilo **2.12**

2.2.2- Síntese de ftalocianinas

As ftalocianinas podem ser obtidas quer na forma de base livre, quer de complexo metálico.⁵⁵ No entanto, tendo em conta o nosso objetivo de aplicar estes compostos em aPDT, é fundamental a capacidade de formação de espécies reativas de oxigénio, pelo que se optou exclusivamente pela síntese de ftalocianinas na forma de complexos metálicos. Além disso, os complexos metálicos são usualmente obtidos com rendimentos mais elevados.

Para a síntese destes complexos metálicos, existem dois métodos possíveis. O primeiro método consiste na complexação da ftalocianina de base livre utilizando um sal metálico apropriado.⁵⁶ Contudo, dado que tipicamente é mais difícil a obtenção da

ftalocianina na forma de base livre, este método apenas é útil para a inserção de alguns metais ou semi-metais.⁵⁷ O segundo método é o mais comumente utilizado e aquele que foi seguido neste trabalho, consistindo na condensação de ftalonitrilos ou outros precursores na presença de um sal metálico.⁵⁸

Assim, numa reação tipo, a condensação do ftalonitrilo desejado foi efetuada na presença de acetato de zinco em dimetilaminoetanol (DMAE). A mistura foi aquecida a 140 °C e agitada durante 24 horas em atmosfera inerte. Depois de arrefecer até à temperatura ambiente, precipitou-se a ftalocianina por adição de *n*-hexano. Após filtração e secagem, obtiveram-se as respetivas ftalocianinas com rendimentos compreendidos entre 60-76% (Figura 2.31). A caracterização estrutural dos compostos obtidos foi efetuada recorrendo a técnicas de RMN de ¹H, à espectrometria de massa e UV-Vis, sendo que os dados espectroscópicos se encontram na secção experimental, capítulo 6.

Numa primeira abordagem, foi tentada uma caracterização das ftalocianinas na sua forma neutra por RMN de ¹H em DMSO ou clorofórmio deuterados, consoante a solubilidade das mesmas, no entanto não foi possível obter sinais definidos devido ao grau de agregação demonstrado. Deste modo, a caracterização por espectroscopia de RMN de ¹H teve que ser otimizada para cada um dos compostos obtidos. Foi possível obter os espectros pretendidos recorrendo ao solvente piridina-d₅ e aquecimento a 80 °C para a ftalocianina **2.18**, a uma mistura de DMSO-d₆ + 5% TFA-d para a ftalocianina **2.17** e a uma mistura clorofórmio-d + 5% piridina-d₅ para a ftalocianina **2.16**.

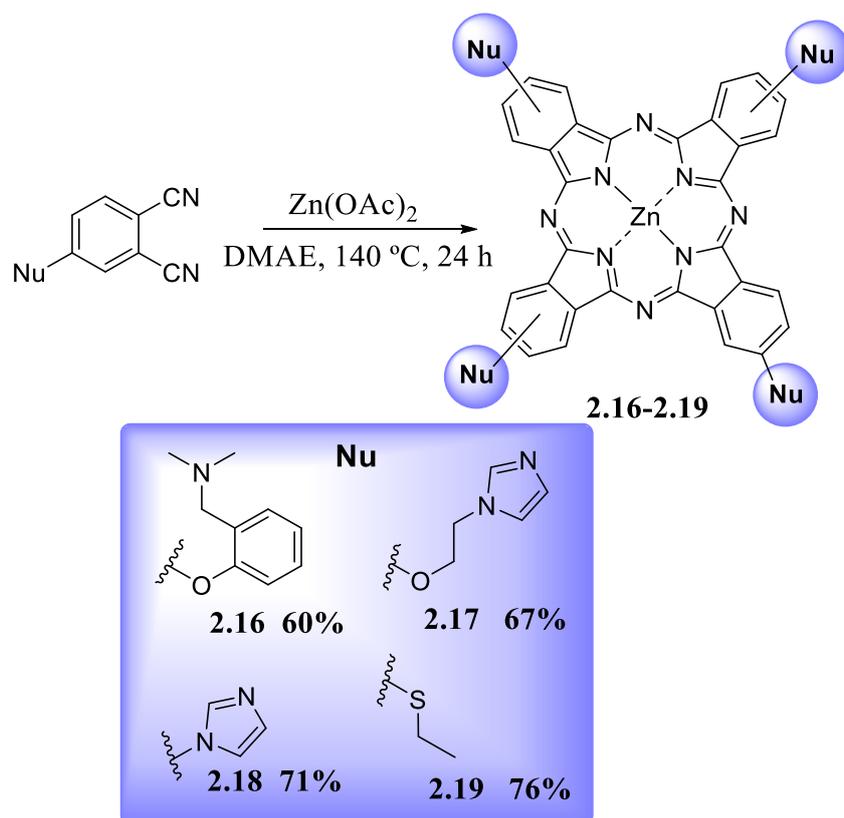


Figura 2.31- Esquema de síntese de metaloftalocianinas de Zn(II) com os respectivos rendimentos isolados

A título de exemplo, encontra-se na figura 2.32 o espectro de RMN de ^1H para ftalocianina **2.16** em clorofórmio- d + 5% piridina- d_5 . Pela análise do espectro, distingue-se, na zona alifática, um multiplete atribuído à ressonância dos protões $-(\text{CH}_3)_2$ a 2,30-2,28 ppm e outro multiplete a 3,66-3,62 ppm devido à ressonância do grupo $-\text{CH}_2-$. Quanto à zona aromática do espectro, observam-se quatro sinais complexos, entre 9,17-7,21 ppm atribuídos à ressonância dos protões do anel benzénico e dos protões aromáticos externos da ftalocianina (macrociclo central). Os três singletos a 7,14; 7,26 e 8,47 ppm foram atribuídos aos protões aromáticos da piridina, utilizada como co-solvente. Tal como referido na nomenclatura apresentada no início desta Tese, todas as ftalocianinas tetra-substituídas sintetizadas constituem uma mistura de isómeros constitucionais, justificando a maior complexidade do RMN observado.

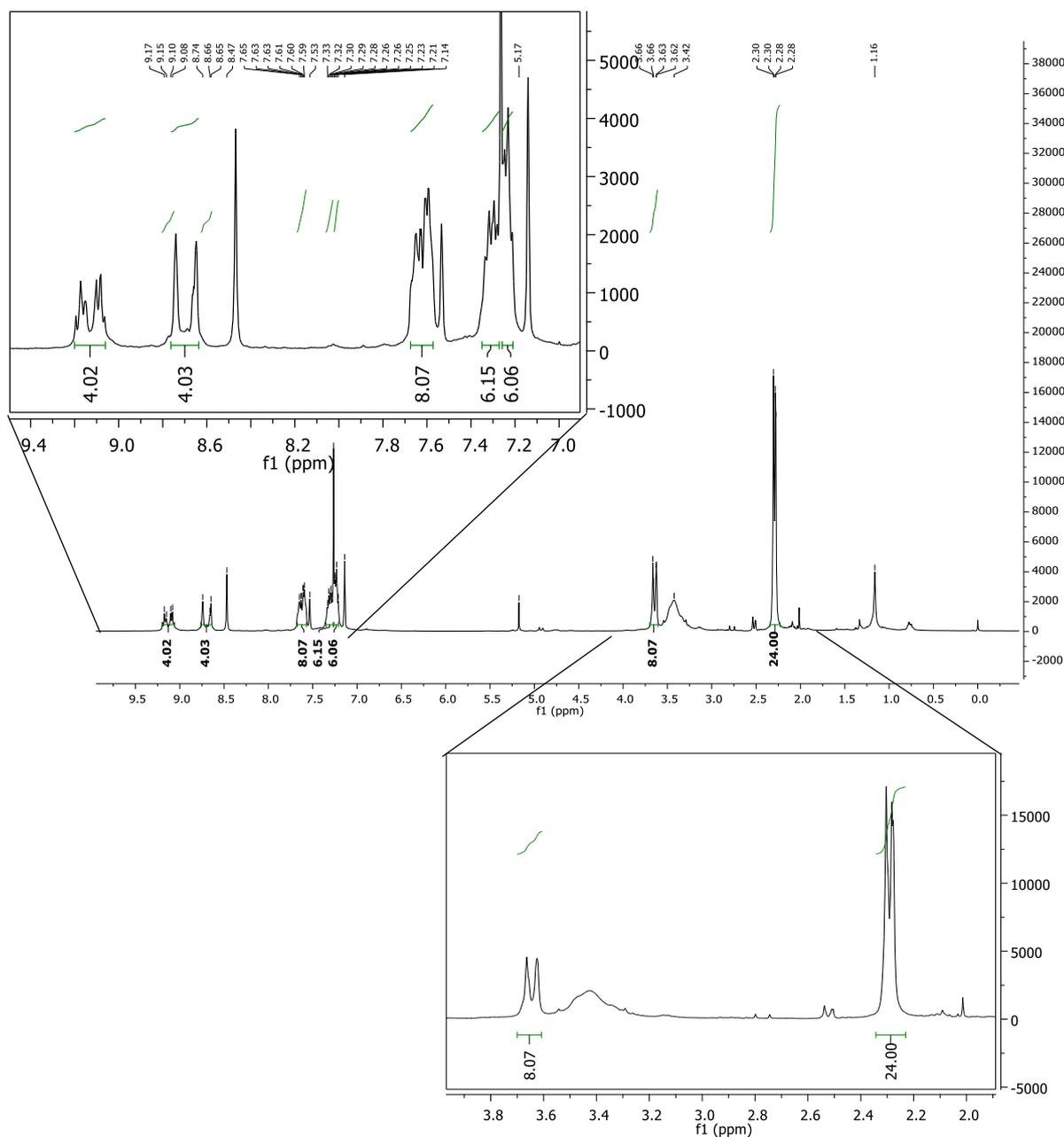


Figura 2.32- Espectro de RMN ^1H para ftalocianina **2.16** em clorofórmio-d + 5% piridina-d₅

Espectroscopia de absorção UV-Vis

O espectro de absorção UV-Vis característico de uma metaloftalocianina caracteriza-se por duas bandas de absorção na região dos 300-400 nm e 650-750 nm. A primeira destas bandas, com um máximo de absorção localizado próximo dos 350 nm, é chamada de banda B ou Soret, surgindo frequentemente como uma banda alargada. A segunda banda é mais intensa e estreita, sendo conhecida como banda Q. Esta banda, de menor energia, é atribuída à transição da orbital π HOMO para a orbital π^* LUMO do anel conjugado do macrociclo. A banda Q encontra-se tipicamente acompanhada por

bandas satélite de maior energia, resultantes de transições para níveis vibracionais superiores da LUMO.^{59,60} Os espectros de absorção das ftalocianinas **2.16-2.19** em DMSO estão representados na figura 2.33.

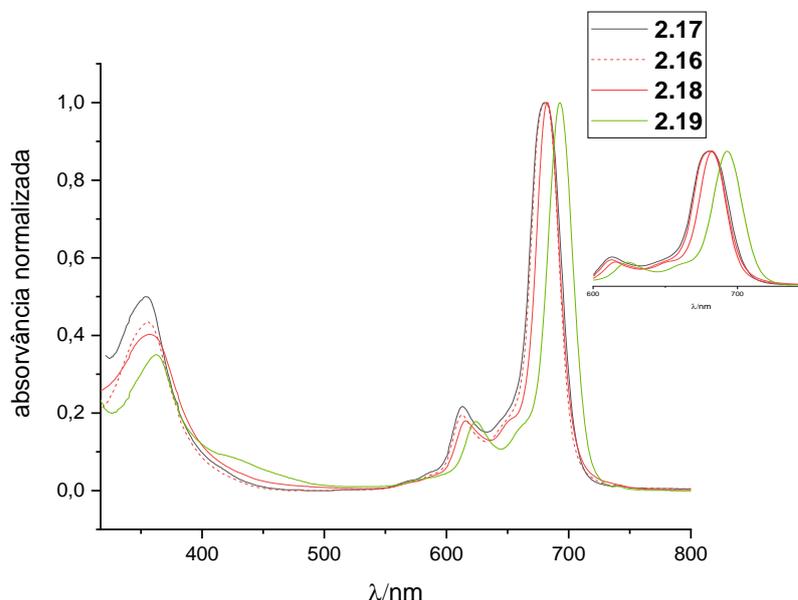


Figura 2.33- Espectros de absorção de UV-Vis normalizados das quatro metaloftalocianinas neutras em DMSO

2.2.3- Síntese de subftalocianinas

Contrariamente, à suas homólogas ftalocianinas, as subftalocianinas apenas podem existir na forma de complexo de boro. As subftalocianinas são sintetizadas com bons rendimentos através da reação de ciclotrimerização dos seus precursores de síntese (os ftalonitrilos), na presença de um derivado de boro (geralmente um trihalogeneto de boro do tipo BX_3 , como por exemplo, o BCl_3 e o BBr_3). Contudo, é de salientar que o ácido de Lewis BCl_3 é mais comumente utilizado na síntese destes compostos, uma vez que, sendo menos reativo que o BBr_3 , dará origem à correspondente subftalocianina de boro contendo um átomo de cloro axialmente ligado. Esta coordenação axial é mais estável devido à maior força da ligação B-Cl comparativamente à ligação B-Br.⁶¹⁻⁶³

Assim, numa experiência tipo, a um tubo de *Schlenk* em atmosfera inerte contendo o ftalonitrilo pretendido foi adicionada uma solução de BCl_3 em *p*-xileno de concentração 1 M. A mistura foi aquecida à temperatura de refluxo e agitada até se verificar o consumo total do ftalonitrilo de partida. Após o arrefecimento, a mistura reacional foi submetida a uma corrente de argon e, de seguida, o solvente evaporado a pressão reduzida (Figura 2.34).

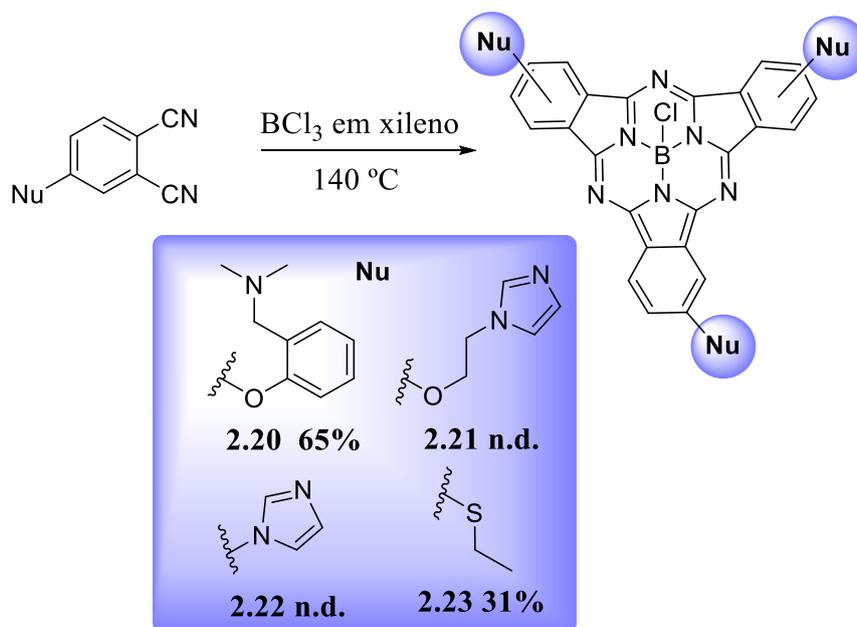


Figura 2.34- Esquema de síntese de subftalocianinas com os respetivos rendimentos isolados obtidos

A formação das subftalocianinas pretendidas foi confirmada por TLC e espectroscopia UV-Vis. Para a purificação das subftalocianina **2.20** e **2.23**, realizou-se coluna cromatográfica de sílica gel usando como eluente diclorometano, de modo a remover os sais formados no decorrer da reação, obtendo-se um rendimento de 65% e 31%, respetivamente. Em relação à subftalocianina **2.22**, verificou-se por TLC que não era possível a realização de coluna cromatográfica quer em sílica gel, quer em alumina. Purificação por exclusão de tamanho não foi possível recorrendo ao material existente no nosso laboratório, devido ao reduzido peso molecular do composto. Deste modo, foram testadas lavagens com água, no entanto, o composto não se revelou estável. Comportamento similar foi observado para a subftalocianina **2.21**, que rapidamente se degradou nas tentativas de purificação. Dificuldades de purificação e instabilidade similares já foram observadas por outros autores.⁶⁴

Atendendo a que a otimização de parâmetros reacionais é um objetivo importante no desenvolvimento de uma estratégia de síntese orgânica, foram efetuados estudos de otimização da reação de síntese de subftalocianinas, usando como modelo a subftalocianina **2.20**.

Neste sentido, a um copo reacional de 10 mL foi adicionado o ftalonitrilo e realizado um fluxo de argon durante 5 minutos. De seguida, adicionou-se uma solução de BCl₃ em *p*-xileno de concentração 1 M. A mistura foi sujeita a irradiação micro-ondas por diferentes intervalos de tempo, usando um programa dinâmico com temperatura de 200 °C e potência máxima de 300 W. Observou-se que apenas eram necessários 6 minutos para o consumo total do ftalonitrilo de partida. O processo de purificação foi similar ao anteriormente descrito, tendo-se obtido a suftalocianina **2.20** com um rendimento de 69% (Tabela 2.2).

Tabela 2.2- Métodos de síntese da cloro[2,9,16(17)-*triquis*(2-((dimetilamino)metil)fenoxi)]subftalocianinato de boro (III) **2.20**.

Entrada	Método	Tempo	Rendimento
1	Convencional	2 horas	65%
2	Micro-ondas	6 minutos	69%

Da análise destes resultados, podemos concluir que a síntese assistida por micro-ondas é um método bastante mais sustentável e rápido, apesar dos rendimentos serem sido bastante similares.

A caracterização estrutural dos compostos obtidos foi efetuada recorrendo a técnicas de RMN de ¹H e UV-Vis, e os dados espectroscópicos encontram-se descritos na secção experimental, capítulo 6. A título de exemplo, encontra-se na figura 2.35 o espectro de RMN de ¹H para a subftalocianina **2.20**, utilizando metanol-d como solvente. Pela análise do espectro distingue-se, na zona alifática, um singuleto atribuído à ressonância dos protões -(CH₃)₂ a 2,91 ppm e um singuleto a 4,38 ppm devido à ressonância do grupo -CH₂-. Quanto à zona aromática do espectro, observam-se cinco sinais complexos, entre 8,01-7,19 ppm atribuídos às ressonâncias dos protões do anel benzénico e dos protões aromáticos externos da subftalocianina (macrociclo central).

Similarmente ao que acontece para as ftalocianinas, também as subftalocianinas sintetizadas constituem uma mistura de isómeros constitucionais, dois neste caso, justificando a maior complexidade do espectro de RMN e o aparecimento de picos em duplicado, tal como se observa facilmente para o singuleto atribuído à ressonância dos prótons $-(CH_3)_2$ a 2,91 ppm, com um similar de menor intensidade a 2,94 ppm. Neste caso, observa-se a formação preferencial de um dos isómeros em detrimento do outro.

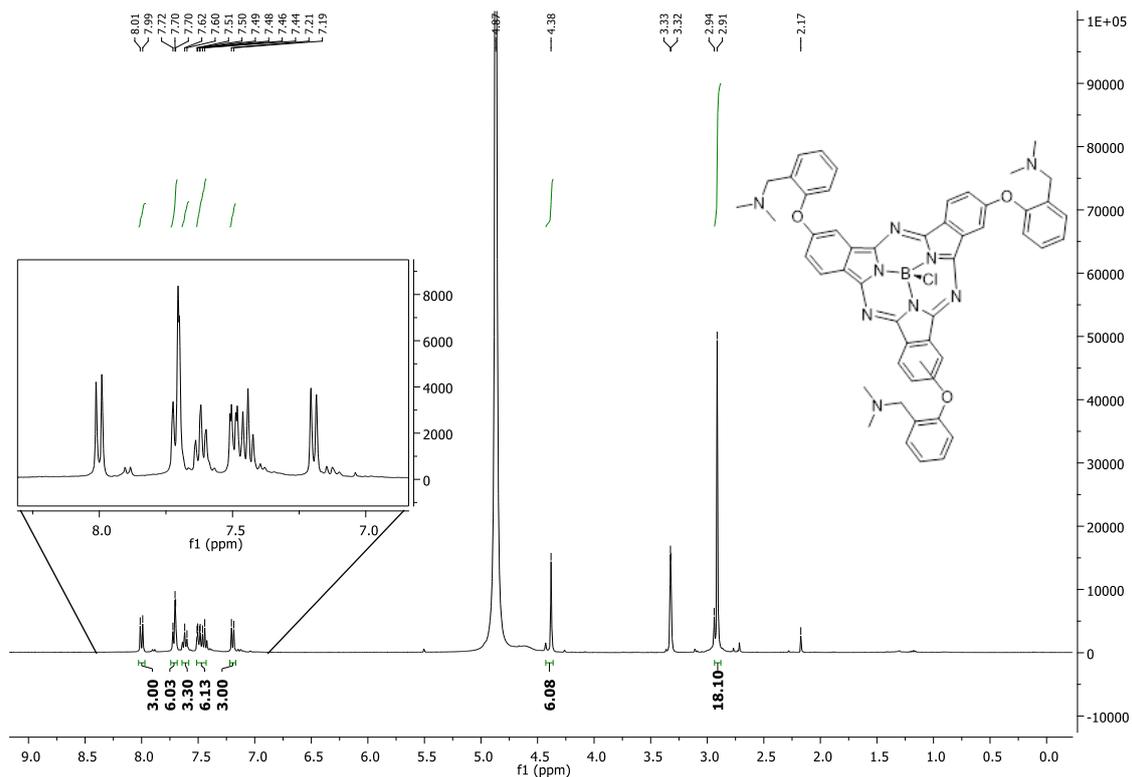


Figura 2.35- Espectro de RMN de 1H da subftalocianina **2.20** utilizando como solvente CD_3OD

Foram realizadas várias tentativas de análise de massa destes compostos, quer por técnicas ESI, quer MALDI, no entanto, os compostos aminados demonstraram muita fragmentação, não sendo possível atribuir de forma inequívoca os padrões de fragmentação, nem tão pouco se observar o íão molecular. No entanto, conseguimos uma caracterização completa da subftalocianina **2.23** (Capítulo 6).

De seguida, procedeu-se à cationização das subftalocianinas **2.20** e **2.23**. Assim, numa experiência tipo, a um tubo de *Schlenk* em atmosfera inerte contendo a subftalocianina adicionou-se DMF seco e fizeram-se três ciclos de vácuo/azoto. De seguida, a mistura foi colocada em agitação a 30 °C. Pequenas frações de iodometano foram adicionadas ao longo do decorrer da reação e a sua evolução acompanhada por

TLC. No caso da subftalocianina **2.20**, não se observou qualquer evolução da reação pelo que se aumentou a temperatura para 50 °C, adicionando-se mais porções de iodometano. Ao longo de uma semana, nenhuma indicação de cationização foi observada, apenas degradação do composto. Deste modo, pensou-se que o composto poderia não cationizar devido a estar protonado com o ácido iodídrico resultante da degradação do iodometano, ou com HCl da sua reação de formação, e colocou-se uma nova reação, mas com a presença de base (NaOH). No entanto, o mesmo problema foi observado.

Relativamente à suftalocianina **2.23**, a cationização completa foi observada por TLC após 3 dias, ficando o composto retido no ponto de aplicação. Evaporou-se o solvente sob vácuo e lavou-se o sólido resultante com pentano seco. De seguida, realizou-se RMN em clorofórmio deuterado, tendo-se observado a presença de uma minoria de composto catiónico e outro resultante da hidrólise após cationização. Realizou-se TLC da amostra de RMN, que confirmou o fenómeno observado. Com o objetivo de diminuir a hidrólise do composto catiónico, decidiu-se colocar o solvente deuterado em agitação durante umas horas com peneiros moleculares 4Å ativados. A preparação de uma amostra utilizando solvente deuterado seco desta forma reduziu a percentagem de hidrólise observada, no entanto, não se conseguiu obter RMN do composto catiónico puro. Adicionalmente, ao se dissolver a amostra em DMSO e diluir com água para as percentagens permitidas nos estudos em bactérias, observou-se hidrólise do composto. Conclui-se, por isso, que não seria possível realizar testes biológicos com o composto na sua forma catiónica.

Espectroscopia de absorção UV-Vis

No caso das subftalocianinas, o sistema intramolecular conjugado é constituído por 14 electrões π e caracteriza-se pelo aparecimento de uma banda intensa na região do visível, entre os 500 e os 600 nm. O espectro eletrónico de absorção das subftalocianinas apenas difere ligeiramente do espectro dos seus análogos ftalocianinas, sendo a maior diferença um desvio hipsocrómico da banda Q de aproximadamente 100 nm.⁶³ Na figura 2.36 encontra-se a título de exemplo o espectro da subftalocianina **2.20** em metanol.

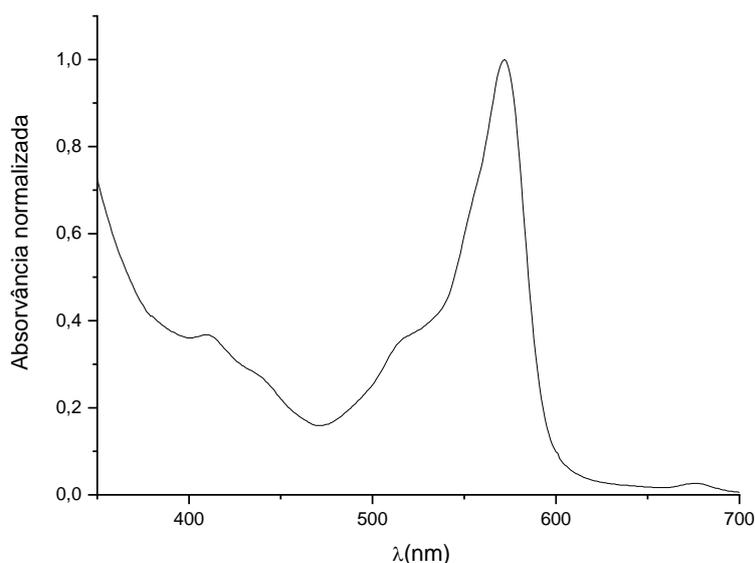


Figura 2.36- Espectro de absorção normalizado da subftalocianina **2.20** em metanol ($\lambda_{\max}=572$ nm)

Após a purificação da cloro[2,9,16(17)-triquis(2-(dimetilamino)metil)fenoxi]subftalocianinato de boro (III) **2.20**, realizou-se o cálculo da sua absorvância molar, tendo esta se revelado abaixo do normal para esta classe de compostos ($\epsilon=2,7 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Colocou-se a hipótese da purificação não ter sido bem-sucedida, pelo que se realizaram duas colunas cromatográficas adicionais. No entanto, o valor do ϵ não sofreu alterações, revelando que este composto não possui as características adequadas para ser utilizado como um bom fotossensibilizador. Por outro lado, a absorvância molar da subftalocianina **2.23** revelou valores típicos para esta classe de compostos ($\epsilon=6,9 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).⁶¹

Em suma, devido à baixa estabilidade química demonstrada pelas subftalocianinas **2.21** e **2.22**, aos coeficientes de absorção relativamente baixos, impossibilidade de cationização da subftalocianina **2.20**, e à incompatibilidade da subftalocianina **2.23** catiónica com meios biológicos, decidiu-se não prosseguir com esta família de compostos (Família III) para os consequentes estudos e avaliação da atividade antibacteriana.

2.3- Conclusão

O objetivo central deste capítulo consistiu no desenvolvimento de novas moléculas da família dos macrociclos pirrólicos possuindo características moduladas de modo a serem aplicadas como fotossensibilizadores em aPDT. Neste sentido, foram desenvolvidas três famílias de compostos:

i) A primeira família foi baseada em moléculas bimodais, contendo na sua estrutura porfirinas neutras e sulfonamidas, compostos com atividade antibacteriana reconhecida. Neste foram sintetizados seletivamente compostos mono-substituídos e tetra-substituídos derivados da TPFPP por substituição com a metanosulfonamida, em concentrações de reação controladas. De seguida, no sentido de desviar os valores de absorção para a designada “janela terapêutica”, prepararam-se as respectivas bacterioclorinas com bons rendimentos (70-90%). O cálculo dos coeficientes de absorvidade molar revelou valores usualmente reportados para a classe de compostos e promissores para a requerida aplicação.

ii) A segunda família centrou-se em fotossensibilizadores porfirínicos catiónicos derivados do 1-metilimidazole. Neste, foram exploradas rotas sintéticas para obter eficientemente *meso*-tetra-imidazolil-porfirinas simétricas e *meso*-di-imidazolil-porfirinas não-simétricas, compostos com *scaffold* semelhante, mas com diferentes lipofilicidades, pesos moleculares, número e distribuição de cargas, de modo a avaliar a sua influência na atividade antibacteriana.

Relativamente às *meso*-tetra-imidazolil-porfirinas simétricas, começou-se pela otimização do método de síntese da porfirina base **2.6**, fazendo uma comparação entre os métodos do nitrobenzeno, nitrobenzeno/NaY, água e radiação micro-ondas e uma conjugação entre o método de Lindsey e o método de água/Mw. Em suma, usando métodos mais sustentáveis (água/Mw, $\eta = 12\%$, Fator E= 9,5) conseguimos diminuir o tempo reacional (1 h para 10 minutos), mantendo os rendimentos na mesma ordem de grandeza do método tradicional ($\eta = 14\%$). Além disso, as etapas de purificação diminuem, uma vez que a porfirina precipita no meio reacional, não sendo necessário realizar destilação a pressão reduzida para remover os solventes. Adicionalmente, conseguiu-se uma significativa melhoria do método de Lindsey, evitando o uso de oxidantes caros e tóxicos e facilitando significativamente a purificação. Por outro lado,

observamos que, ao complexar a porfirina antes da sua cationização, ocorria a formação de estruturas poliméricas resultantes de interações entre os azotos do grupo imidazole e o zinco, pelo que foi necessário inverter a estratégia e realizar primeiramente a cationização **2.7** e posteriormente formar o complexo de zinco (II) **2.8**, que foi obtido com um rendimento de 92%.

Por outro lado, a porfirina base da família das *meso*-di-imidazolil-porfirinas não-simétricas **2.9** é sintetizada por um método de síntese total em dois passos através de uma condensação [2+2], seguida de oxidação, sendo obtida com um rendimento de 19%. Neste caso, conseguimos proceder ao método típico, realizando primeiramente o complexo de zinco (II) **2.10** e de seguida a cationização, obtendo-se a porfirina **2.11**.

iii) A terceira família foi baseada em ftalocianinas e subftalocianinas, tendo basicamente a mesma motivação que a família II, ou seja, desenvolver compostos onde pudéssemos incluir uma ou mais cargas positivas intrínsecas, de modo a obter uma inativação mais eficiente de bactérias de ambas as classes e, por outro lado, poder variar o peso molecular não alterando significativamente a estrutura das moléculas. Com este objetivo, começou-se pela modulação dos precursores de ambos os compostos, ftalonitrilos, com grupos passíveis de serem cationizados (*N*-heterociclos, aminas e tióis, **2.12-2.15**). De seguida, procedeu-se à síntese eficiente de complexos metálicos de ftalocianinas (**2.16-2.19**) e posteriormente à preparação de subftalocianinas com os mesmos grupos. Verificou-se que duas das subftalocianinas sintetizadas possuíam baixa estabilidade química (**2.20** e **2.21**) e a cloro[2,9,16(17)-*triquis*(2-((dimetilamino)metil)fenoxi)]subftalocianinato de boro (III) **2.20** um coeficiente de absorção molar relativamente baixo. Adicionalmente, não foi possível obter a subftalocianina **2.20** catiónica e a subftalocianina **2.23** catiónica apresentou muito baixa estabilidade em meios biológicos. Deste modo, decidiu-se não prosseguir com esta família para consequentes estudos de avaliação da atividade antimicrobiana.

Em suma, os estudos efetuados no decorrer do trabalho que conduziu à escrita deste capítulo permitiram o desenvolvimento de três famílias de compostos e à seleção de duas famílias de compostos baseadas em porfirinas e bacterioclorinas com rendimentos de síntese razoáveis, estabilidade química e coeficientes de absorção molar apropriados, que são bons indicadores da sua potencial aplicação como

fotosensibilizadores em terapia fotodinâmica. A completa caracterização fotofísica e fotoquímica, assim como a respetiva avaliação biológica encontram-se descritos no capítulo 3.

2.4-Referências

1. Patrick, G. L., *An Introduction to Medicinal Chemistry*. 5 ed.; Oxford: 2012; p 413-419.
2. Kołaczek, A.; Fusiarz, I.; Lawecka, J.; Branowska, D., Biological activity and synthesis of sulfonamide derivatives: A brief review. *Chemik* **2014**, *68*, 620-628.
3. Khan, F.; Mushtaq, S.; Naz, S.; Farooq, U.; Zaidi, A.; Bukhari, S.; Rauf, A.; Mubarak, M., Sulfonamides as potential bioactive scaffolds. *Curr. Org. Chem.* **2018**, *22* (8), 818-830.
4. Apaydin, S.; Török, M., Sulfonamide derivatives as multi-target agents for complex diseases. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2019**, *29* (16), 2042-2050.
5. Brunton, L. L.; Lazo, J. S.; Parker, K. L., *Goodman&Guilman's: As bases farmacológicas da terapêutica*. 10 ed.; Mc Graw-Hill: Rio de Janeiro, 2005; p 877-881.
6. Silva, E. F. F.; Serpa, C.; Dąbrowski, J. M.; Monteiro, C. J. P.; Formosinho, S. J.; Stochel, G.; Urbanska, K.; Simões, S.; Pereira, M. M.; Arnaut, L. G., Mechanisms of Singlet-Oxygen and Superoxide-Ion Generation by Porphyrins and Bacteriochlorins and their Implications in Photodynamic Therapy. *Chem. Eur. J.* **2010**, *16* (30), 9273-9286.
7. Vinagreiro, C. S. Síntese de conjugados de porfirinas e macrociclos tetrapirrólicos com potencial aplicação dual em químio- e fototerapia. Universidade de Coimbra, 2015.
8. Vinagreiro, C. S.; Gonçalves, N. P. F.; Calvete, M. J. F.; Schaberle, F. A.; Arnaut, L. G.; Pereira, M. M., Synthesis and characterization of biocompatible bimodal meso-sulfonamide-perfluorophenylporphyrins. *J. Fluorine Chem.* **2015**, *180*, 161-167.
9. Kim, H.-J.; Lindsey, J. S. De novo synthesis of bacteriochlorins. 2012.
10. Callot, H. J., Stereochimie de l'addition de carbenes sur la meso-tetraphenylporphine. *Tetrahedron Lett.* **1972**, *13* (11), 1011-1014.
11. Ostrowski, S.; Wyrębek, P., The first example of Diels–Alder cycloaddition of ortho-hylylenes to meso-tetraarylporphyrins containing electron-deficient β,β -double bonds. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47* (47), 8437-8440.
12. Silva, A. M. G.; Tomé, A. C.; Neves, M. G. P. M. S.; Cavaleiro, J. A. S.; Kappe, C. O., Porphyrins in Diels–Alder reactions. Improvements on the synthesis of barrelene-fused chlorins using microwave irradiation. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46* (28), 4723-4726.
13. Chang, C. K.; Sotitiou, C.; Wu, W., Differentiation of bacteriochlorin and isobacteriochlorin formation by metallation. High yield synthesis of porphyrindiones via OsO₄ oxidation. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1986**, (15), 1213-1215.
14. Tomé, A. C.; Lacerda, P. S. S.; Neves, M. G. P. M. S.; Cavaleiro, J. A. S., meso-Arylporphyrins as dienophiles in Diels–Alder reactions: a novel approach to the synthesis of chlorins, bacteriochlorins and naphthoporphyrins. *Chem. Commun.* **1997**, *1997* (13), 1199-1200.
15. Morgan, A. R.; Garbo, G. M.; Keck, R. W.; Selman, S. H.; Skalkos, D., Synthesis and in vivo photodynamic activity of some bacteriochlorin derivatives against bladder tumors in rodents. *J. Med. Chem.* **1991**, *34* (7), 2126-2133.
16. Sternberg, E. D.; Dolphin, D.; Brückner, C., Porphyrin-based photosensitizers for use in photodynamic therapy. *Tetrahedron* **1998**, *54* (17), 4151-4202.
17. Senge, M. O.; Kalisch, W. W.; Runge, S., Conformationally distorted chlorins via diimide reduction of nonplanar porphyrins. *Tetrahedron* **1998**, *54* (15), 3781-3798.
18. Grahn, M. F.; McGuinness, A.; Benzie, R.; Boyle, R.; de Jode, M. L.; Dilkes, M. G.; Abbas, B.; Williams, N. S., Intracellular uptake, absorption spectrum and stability of the bacteriochlorin photosensitizer 5,10,15, 20-tetrakis (m-hydroxyphenyl) bacteriochlorin (mTHPBC). Comparison with 5,10,15,20-tetrakis (m-hydroxyphenyl) chlorin (mTHPC). *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **1997**, *37* (3), 261-266.
19. Monteiro, C. J. P.; Pereira, M. M.; Pinto, S. M. A.; Simoes, A. V. C.; Sa, G. F. F.; Arnaut, L. G.; Formosinho, S. J.; Simoes, S.; Wyatt, M. F., Synthesis of amphiphilic sulfonamide halogenated porphyrins: MALDI-TOFMS characterization and evaluation of 1-octanol/water partition coefficients. *Tetrahedron* **2008**, *64* (22), 5132-5138.

20. Pereira, M. M.; Monteiro, C. J. P.; Simoes, A. V. C.; Pinto, S. M. A.; Abreu, A. R.; Sa, G. F. F.; Silva, E. F. F.; Rocha, L. B.; Dabrowski, J. M.; Formosinho, S. J.; Simoes, S.; Arnaut, L. G., Synthesis and photophysical characterization of a library of photostable halogenated bacteriochlorins: an access to near infrared chemistry. *Tetrahedron* **2010**, *66*, 9545-9551.
21. Pereira, M. M.; Monteiro, C. J. P.; Simões, A. V. C.; Pinto, S. M. A.; Arnaut, L. G.; Sá, G. F. F.; Silva, E. F. F.; Rocha, L. B.; Simões, S.; Formosinho, S. J., Synthesis and photophysical properties of amphiphilic halogenated bacteriochlorins: New opportunities for photodynamic therapy of cancer. *J. Porphyr. Phthalocya.* **2009**, *13*, 567-573.
22. Whitlock, H. W.; Hanauer, R.; Oester, M. Y.; Bower, B. K., Diimide reduction of porphyrins. *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, *91* (26), 7485-7489.
23. Pereira, M. M.; Abreu, A. R.; Goncalves, N. P. F.; Calvete, M. J. F.; Simões, A. V. C.; Monteiro, C. J. P.; Arnaut, L. G.; Eusébio, M. E.; Canotilho, J., An insight into solvent-free diimide porphyrin reduction: a versatile approach for meso-aryl hydroporphyrin synthesis. *Green Chem.* **2012**, *14* (6), 1666-1672.
24. Pereira, M. M.; Arnaut, L. G.; Formosinho, S. J.; Monteiro, C. J. P. Novel derivatives of porphyrin, particularly chlorins and/or bacteriochlorins, and uses thereof in photodynamic therapy WO/2006/053707, 2006.
25. Arnaut, L.; Pereira, M.; Formosinho, S.; Simões, S.; Stochel, G.; Urbańska, K. Process for Preparing Chlorins and their Pharmaceutical Uses. 2009.
26. Arnaut, L. G.; Pereira, M. M.; Dąbrowski, J. M.; Silva, E. F. F.; Schaberle, F. A.; Abreu, A. R.; Rocha, L. B.; Barsan, M. M.; Urbańska, K.; Stochel, G.; Brett, C. M. A., Photodynamic Therapy Efficacy Enhanced by Dynamics: The Role of Charge Transfer and Photostability in the Selection of Photosensitizers. *Chem. Eur. J.* **2014**, *20* (18), 5346-5357.
27. Platt, J. R., Molecular Orbital Predictions of Organic Spectra. *J. Chem. Phys.* **1950**, *18* (9), 1168-1173.
28. Gouterman, M., Study of the Effects of Substitution on the Absorption Spectra of Porphin. *J. Chem. Phys.* **1959**, *30* (5), 1139-1161.
29. Gouterman, M., Spectra of porphyrins. *J. Mol. Spectrosc.* **1961**, *6*, 138-163.
30. Minaev, B.; Wang, Y.-H.; Wang, C.-K.; Luo, Y.; Ågren, H., Density functional theory study of vibronic structure of the first absorption Qx band in free-base porphin. *Spectrochim. Acta A.* **2006**, *65* (2), 308-323.
31. Arnaut, L. G., Chapter 5 - Design of porphyrin-based photosensitizers for photodynamic therapy. In *Adv. Inorg. Chem.*, Eldik, R. v.; Stochel, G., Eds. Academic Press: 2011; Vol. 63, pp 187-233.
32. Longuet-Higgins, H. C.; Rector, C. W.; Platt, J. R., Molecular Orbital Calculations on Porphine and Tetrahydroporphine. *J. Chem. Phys.* **1950**, *18* (9), 1174-1181.
33. Arnaut, L. G.; Pereira, M. M.; Dabrowski, J. M.; Silva, E. F.; Schaberle, F. A.; Abreu, A. R.; Rocha, L. B.; Barsan, M. M.; Urbanska, K.; Stochel, G.; Brett, C. M., Photodynamic therapy efficacy enhanced by dynamics: the role of charge transfer and photostability in the selection of photosensitizers. *Chem. Eur. J.* **2014**, *20* (18), 5346-5357.
34. Nitzan, Y.; Pechatnikov, I., Chapter 3 Approaches to Kill Gram-negative Bacteria by Photosensitized Processes. In *Photodynamic Inactivation of Microbial Pathogens: Medical and Environmental Applications*, The Royal Society of Chemistry: 2011; Vol. 11, pp 45-67.
35. Pereira, M. A.; Faustino, M. A. F.; Tomé, J. P. C.; Neves, M. G. P. M. S.; Tomé, A. C.; Cavaleiro, J. A. S.; Cunha, Â.; Almeida, A., Influence of external bacterial structures on the efficiency of photodynamic inactivation by a cationic porphyrin. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2014**, *13* (4), 680-690.
36. Cieplik, F.; Deng, D. M.; Crielaard, W.; Buchalla, W.; Hellwig, E.; Al-Ahmad, A.; Maisch, T., Antimicrobial photodynamic therapy - what we know and what we don't. *Crit. Rev. Microbiol.* **2018**, *44* (5), 571-589.

37. Cieplik, F.; Späth, A.; Regensburger, J.; Gollmer, A.; Tabenski, L.; Hiller, K.-A.; Bäumlner, W.; Maisch, T.; Schmalz, G., Photodynamic biofilm inactivation by SAPYR—An exclusive singlet oxygen photosensitizer. *Free Radical Biol. Med.* **2013**, *65*, 477-487.
38. Rothemund, P., Formation of porphyrins from pyrrole and aldehydes. *J. Am. Chem. Soc.* **1935**, *57* (10), 2010-2011.
39. Adler, A. D.; Longo, F. R.; Finarelli, J. D.; Goldmacher, J.; Assour, J.; Korsakoff, L., A simplified synthesis for meso-tetraphenylporphine. *J. Org. Chem.* **1967**, *32* (2), 476-476.
40. Lindsey, J. S.; Hsu, H. C.; Schreiman, I. C., Synthesis of tetraphenylporphyrins under very mild conditions. *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27* (41), 4969-4970.
41. Gonsalves, A. M. d. A. R.; Varejão, J. M. T. B.; Pereira, M. M., Some new aspects related to the synthesis of meso-substituted porphyrins. *J. Heterocycl. Chem.* **1991**, *28* (3), 635-640.
42. Silva, M.; Fernandes, A.; Bebiano, S. S.; Calvete, M. J. F.; Ribeiro, M. F.; Burrows, H. D.; Pereira, M. M., Size and ability do matter! Influence of acidity and pore size on the synthesis of hindered halogenated meso-phenyl porphyrins catalysed by porous solid oxides. *Chem. Commun.* **2014**, *50* (50), 6571-6573.
43. Henriques, C. A.; Pinto, S. M. A.; Aquino, G. L. B.; Pineiro, M.; Calvete, M. J. F.; Pereira, M. M., Ecofriendly Porphyrin Synthesis by using Water under Microwave Irradiation. *ChemSusChem* **2014**, *7* (10), 2821-2824.
44. Maugé, F.; Sahibed-Dine, A.; Gaillard, M.; Ziolek, M., Modification of the Acidic Properties of NaY Zeolite by H₂S Adsorption—An Infrared Study. *J. Catal.* **2002**, *207* (2), 353-360.
45. Emeis, C. A., Determination of Integrated Molar Extinction Coefficients for Infrared Absorption Bands of Pyridine Adsorbed on Solid Acid Catalysts. *J. Catal.* **1993**, *141* (2), 347-354.
46. Liu, L.; Floreancig, P. E., 2,3-Dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone-catalyzed reactions employing MnO₂ as a stoichiometric oxidant. *Org. Lett.* **2010**, *12* (20), 4686-4689.
47. Pavani, C.; Uchoa, A. F.; Oliveira, C. S.; Iamamoto, Y.; Baptista, M. S., Effect of zinc insertion and hydrophobicity on the membrane interactions and PDT activity of porphyrin photosensitizers. *Photochem. Photobio. Sci.* **2009**, *8* (2), 233-240.
48. Kobuke, Y.; Ogawa, K.; Kugimiya, S.-i. Poly(porphyrin) arrays having meso-dimeric imidazolyl porphyrin metal complexes as monomer units. US-6429310-B2, 2001.
49. Little, R. G.; Anton, J. A.; Loach, P. A.; Ibers, J. A., The synthesis of some substituted tetraarylporphyrins. *J. Heterocycl. Chem.* **1975**, *12* (2), 343-349.
50. Henriques, C. A.; Pinto, S. M. A.; Pina, J.; Serpa, C.; Fernandes, A.; Rossi, L. M.; Ribeiro, M. F.; Pereira, M. M.; Calvete, M. J. F., Cost-efficient method for unsymmetrical meso-aryl porphyrins and iron oxide-porphyrin hybrids prepared thereof. *Dalton Trans.* **2016**, *45* (41), 16211-16220.
51. Arsenault, G. P.; Bullock, E.; MacDonald, S. F., Pyrrromethanes and Porphyrins Therefrom. *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, *82* (16), 4384-4389.
52. DiMugno, S. G.; Lin, V. S. Y.; Therien, M. J., Catalytic conversion of simple haloporphyrins into alkyl-, aryl-, pyridyl-, and vinyl-substituted porphyrins. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115* (6), 2513-2515.
53. DiMugno, S. G.; Lin, V. S. Y.; Therien, M. J., Facile elaboration of porphyrins via metal-mediated cross-coupling. *J. Org. Chem.* **1993**, *58* (22), 5983-5993.
54. Aroso, R. T.; Calvete, M. J. F.; Pucelik, B.; Dubin, G.; Arnaut, L. G.; Pereira, M. M.; Dąbrowski, J. M., Photoinactivation of microorganisms with sub-micromolar concentrations of imidazolium metallophthalocyanine salts. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, *184*, 111740.
55. Lever, A. B. P., The Phthalocyanines. In *Advances in Inorganic Chemistry and Radiochemistry*, Emeléus, H. J.; Sharpe, A. G., Eds. Academic Press: 1965; Vol. 7, pp 27-114.
56. Tomoda, H.; Saito, S.; Shiraishi, S., Synthesis of metallophthalocyanines from phthalonitrile with strong organic bases. *Chem. Lett.* **1983**, *12* (3), 313-316.
57. Lobo, A. C. S.; Silva, A. D.; Tomé, V. A.; Pinto, S. M. A.; Silva, E. F. F.; Calvete, M. J. F.; Gomes, C. M. F.; Pereira, M. M.; Arnaut, L. G., Phthalocyanine Labels for Near-Infrared Fluorescence Imaging of Solid Tumors. *J. Med. Chem.* **2016**, *59* (10), 4688-4696.

58. McKeown, N. B., The Synthesis of Symmetrical Phthalocyanines. In *The Porphyrin Handbook*, Smith, K. M.; Guillard, R., Eds. Academic Press: Amsterdam, 2003; pp 61-124.
59. Stillman, M.; Mack, J.; Kobayashi, N., Theoretical aspects of the spectroscopy of porphyrins and phthalocyanines. *J. Porphyr. Phthalocya.* **2002**, *06* (04), 296-300.
60. Mack, J.; Stillman, M. J., Electronic structures of metal phthalocyanine and porphyrin complexes from analysis of UV-visible absorption and magnetic circular dichroism spectra and molecular orbital calculations. In *The Porphyrin Handbook: Phthalocyanines: Spectroscopic and Electrochemical Characterization*, Kadish, K. M.; Smith, K. M.; Guillard, R., Eds. Academic Press: New York, 2003; Vol. 16.
61. Claessens, C. G.; González-Rodríguez, D.; Torres, T., Subphthalocyanines: Singular Nonplanar Aromatic Compounds Synthesis, Reactivity, and Physical Properties. *Chem. Rev.* **2002**, *102* (3), 835-854.
62. Claessens, C. G.; González-Rodríguez, D.; Rodríguez-Morgade, M. S.; Medina, A.; Torres, T., Subphthalocyanines, Subporphyrazines, and Subporphyrins: Singular Nonplanar Aromatic Systems. *Chem. Rev.* **2014**, *114* (4), 2192-2277.
63. Tolbin, A. Y.; Tomilova, L. G., Subphthalocyanines and their analogues: methods for the synthesis and structure modification. *Russ. Chem. Rev.* **2011**, *80* (6), 531-551.
64. González-Rodríguez, D.; Torres, T., Peripheral Functionalization of Subphthalocyanines. *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, *2009* (12), 1871-1879.

Capítulo 3

Desenvolvimento de fotossensibilizadores “ideais” para aPDT

Introduzir um novo medicamento no mercado é um processo extremamente moroso e oneroso, uma vez que, segundo dados do último relatório da Federação Internacional de Fabricantes e Associações Farmacêuticas,¹ todo o processo de pesquisa e desenvolvimento (P&D) dura em média cerca de 12 anos e tem uma probabilidade de sucesso bastante baixa, inferior a 0,01 %. Estima-se que as indústrias farmacêuticas necessitem de um investimento de 2,5 mil milhões de euros para que um medicamento seja aprovado no mercado. Muito simplificado, um processo de P&D (Figura 3.1) é constituído por uma primeira etapa de investigação, onde se faz o *design* de novas moléculas. Este pode ser baseado em três diferentes estratégias: i) isolamento e modulação de compostos de origem natural; ii) definição do alvo terapêutico e sucessivo *screening* computacional de compostos disponíveis em bases de dados ou iii) *design* de novos compostos baseados no conhecimento das características que estes devem possuir para a sua potencial aplicação. Nas etapas seguintes, os compostos são caracterizados ao nível de todas as propriedades consideradas fulcrais para a aplicação pretendida, são feitos testes *in vitro* para avaliação das propriedades biológicas das moléculas obtidas e, por fim, testes em modelos animais (*in vivo*). Na última etapa do desenvolvimento são realizados estudos clínicos em humanos, divididos em diferentes fases. Após este longo processo de sucessiva seleção de compostos, se alguma das moléculas tiver sucesso, pode então ser submetida a entidades reguladoras para aprovação da sua comercialização.

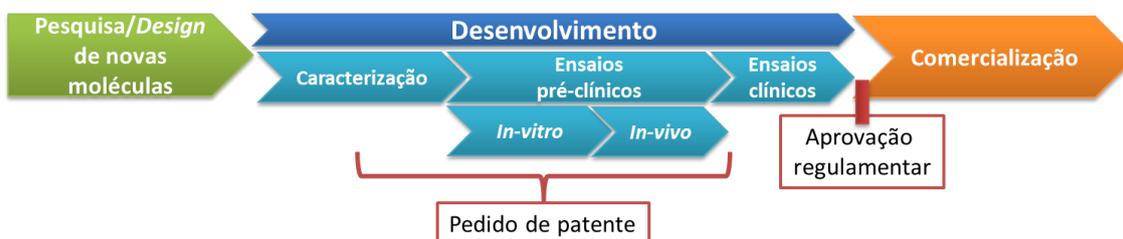


Figura 3.1- Esquema simplificado de um processo de P&D de um fármaco

No capítulo 2 desta Tese foi selecionado um conjunto de fotossensibilizadores de duas famílias distintas, com propriedades estruturais modeladas e adequadas para a sua potencial aplicação em infeções tópicas bacterianas. Consequentemente, prevê-se que as suas propriedades fotofísicas, fotoquímicas e biológicas sejam distintas. No capítulo 1 foram discutidas as propriedades “ideias” que um fotossensibilizador deve possuir para a sua aplicação em aPDT. Vale a pena recordar que é importante que este possua uma elevada absorção de luz, elevada capacidade de formação de ROS, elevada fotoestabilidade durante a irradiação, alguma hidrofiliicidade e/ou cargas positivas para aumentar a afinidade e capacidade de interação com as paredes bacterianas carregadas negativamente. Por outro lado, não deve ser citotóxico, nem fototóxico em células humanas, nas concentrações utilizadas em terapêutica e, embora ainda não seja consensual entre a comunidade científica, deve possuir um baixo peso molecular para facilitar a sua penetração em biofilmes.^{2,3} Neste sentido, ao longo deste capítulo serão apresentados e discutidos os diferentes estudos executados para determinar estas propriedades, assim como os estudos biológicos realizados para as diferentes moléculas sintetizadas, em bactérias planctónicas e biofilmes e em células eucarióticas. Por último, e com base numa análise global destes resultados será selecionado o nosso composto líder (*Lead compound*) para aplicação tópica em aPDT.

3.1- Avaliação de fotossensibilizadores bimodais em aPDT

Relativamente à família dos fotossensibilizadores bimodais, é de lembrar que foram sintetizadas duas porfirinas neutras (**2.2** e **2.3**), e suas correspondentes bacterioclorinas (**2.4** e **2.5**), substituídas numa ou nas quatro posições com a metanosulfonamida (Figura 3.2), de forma a obter um composto com atividade em aPDT após irradiação e *per si* (no escuro) devido ao grupo sulfonamida. Recorda-se que, com a sua modelação, pretendemos avaliar a influência nas suas propriedades do número de substituições e da redução do estado de oxidação do macrociclo.

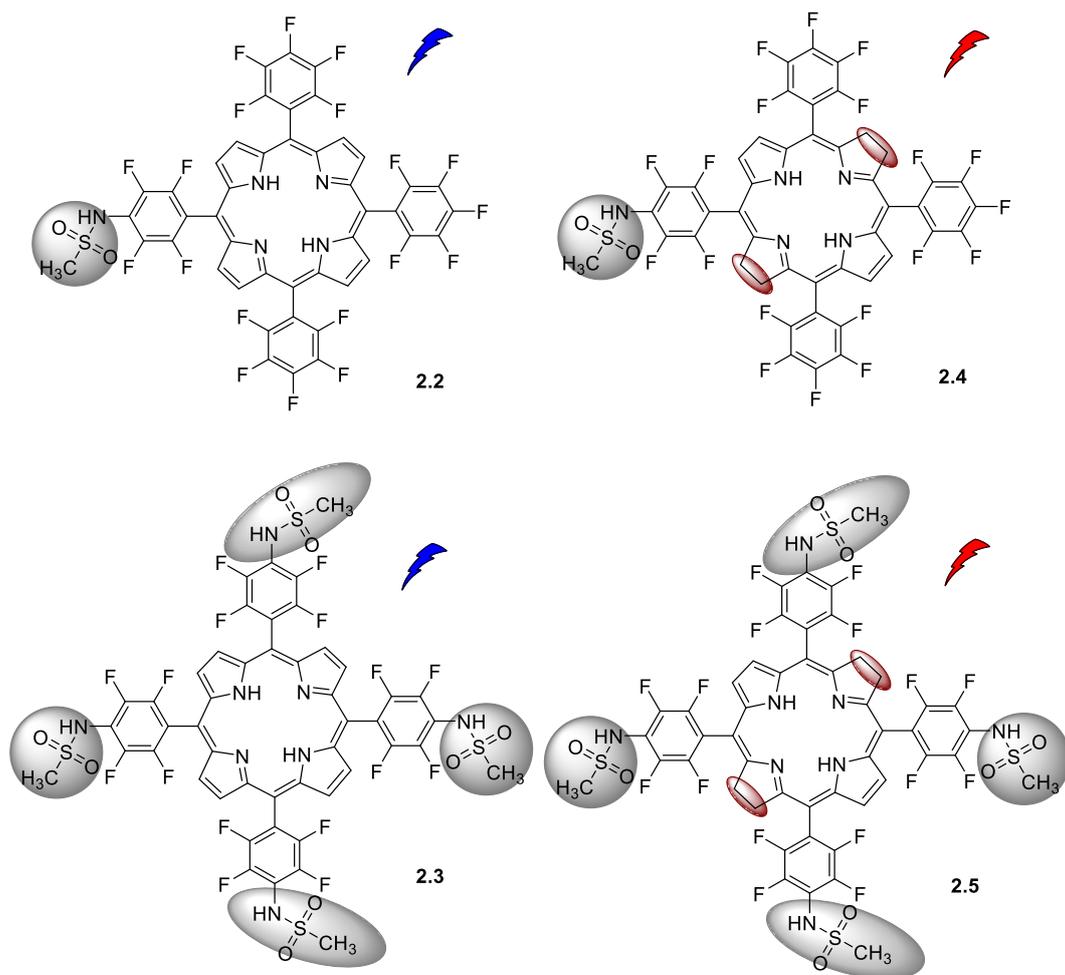


Figura 3.2- Compostos preparados da família dos fotossensibilizadores bimodais

3.1.1- Caracterização fotofísica e fotoquímica

Antes de se entrar propriamente na caracterização fotofísica e fotoquímica das diferentes moléculas, é importante compreender os fenómenos envolvidos no mecanismo de ação da terapia fotodinâmica. Na figura 3.3, encontra-se esquematizado o diagrama de Jablonski, que nos permite analisar os fenómenos de interação dos fotossensibilizadores, no nosso caso em particular macrociclos, com a luz. Quando uma molécula no seu estado fundamental (S_0) absorve luz, transita para um estado excitado ($S_1...S_n$) de maior energia. No entanto, apesar de esta transição ser possível para todos os estados, ocorre um decaimento, através de processos não radiativos, para o estado excitado de mais baixa energia (S_1), derivado do facto de os macrociclos obedecerem à regra de Kasha.⁴ O retorno deste para o estado fundamental singuleto (S_0) pode ocorrer de forma direta, através da emissão de luz (fluorescência), por transferência de energia (conversão interna) ou ainda de forma indireta, sofrendo conversão intersistemas para

o estado tripleto. Este estado pode decair não radiativamente por conversão interna, radiativamente mediante emissão de fosforescência ou reagir com o oxigênio do meio, gerando espécies reativas de oxigênio capazes de interagir com biomoléculas, conduzindo à morte das bactérias. Deste modo, um bom fotossensibilizador para terapia fotodinâmica deve possuir um baixo rendimento quântico de fluorescência e boa capacidade de geração de ROS, como por exemplo oxigênio singuleto.

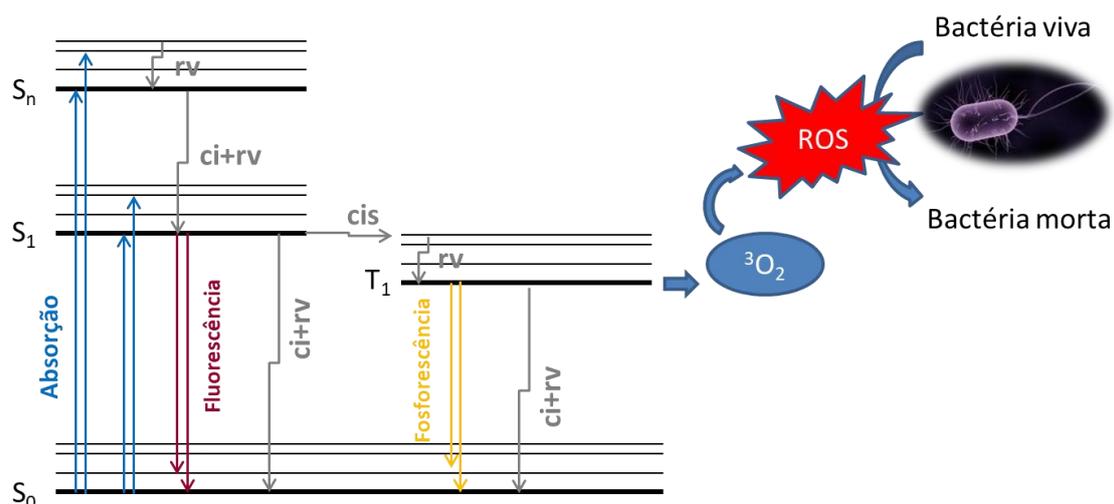


Figura 3.3- Diagrama de Jablonski simplificado onde se encontram representados os principais fenômenos radiativos e não-radiativos de um fotossensibilizador: absorção, fluorescência, relaxação vibracional (rv), conversão interna (ci), cruzamento intersistemas (cis), fosforescência e interação com o oxigênio molecular (estado tripleto).

O espectro de fluorescência típico de uma porfirina apresenta uma banda de maior energia (Q(0,0)) derivada da transição obtida do nível vibracional mais baixo do estado excitado para o nível vibracional mais baixo do estado fundamental. Além desta, pode ainda apresentar bandas adicionais resultantes das transições para níveis vibracionais superiores do estado eletrônico fundamental, Q(0,n), onde n representa o estado vibracional para o qual se dá a transição ($n = 0,1,2,\dots$).⁵ Nas bacterioclorinas, geralmente, estas são praticamente insignificantes.⁶

Para o cálculo do rendimento quântico de fluorescência (Φ_F) seguiu-se a metodologia proposta por Parker et al.⁷, em que se compara o espectro de fluorescência

da amostra com o de uma referência, cujas características fotofísicas sejam conhecidas. No caso das porfirinas, **2.2** e **2.3**, selecionou-se a TPP como padrão ($\phi_F=0,11^8$ em tolueno) e como solvente tolueno. Preparam-se soluções de cada amostra com uma absorvância aproximada de 0,1 na banda Soret e de seguida diluíram-se estas num fator de 1/10. As soluções foram desarejadas cerca de 10 min e, de seguida, efetuaram-se os respetivos espectros de emissão quer das porfirinas, quer da referência, excitando a 418 nm. Os espectros das porfirinas, **2.2** e **2.3**, foram semelhantes, verificando-se em todos eles que a banda correspondente à transição Q(0,0) é inferior em intensidade comparativamente à banda Q(0,1), inversamente ao que ocorre com a TPP (Figura 3.4). A presença de átomos de halogénio pode introduzir diferenças na geometria dos estados, aumentando a sobreposição entre a função de onda do nível vibracional zero do estado excitado e o primeiro nível vibracional do estado fundamental. Consequentemente, a probabilidade de ocorrerem transições entre estes aumenta, justificando assim, a alteração da intensidade relativa das bandas.⁹ Para as bacterioclorinas, **2.4** e **2.5**, a metodologia utilizada foi semelhante, no entanto, utilizou-se o iodeto de 1,1',3,3',3',3'-Hexametilindotricarbocianina (HITCI) como referência ($\phi_F=0,283^{10}$ em etanol) e excitou-se a 510 nm. Estes espectros de emissão apresentam apenas uma banda de elevada intensidade (Figura 3.4).

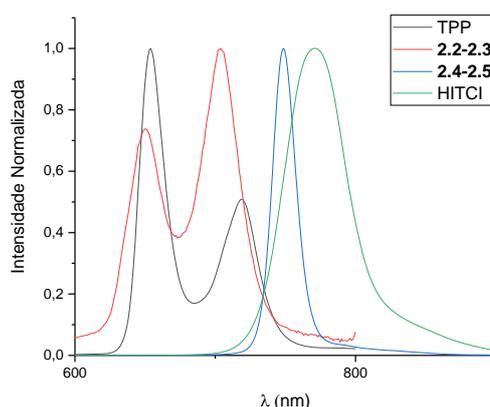


Figura 3.4- Espectro de fluorescência normalizado das referências (TPP e HITCI), de uma das porfirinas **2.2-2.3**, que apresentam o mesmo espectro em tolueno, e dos derivados reduzidos **2.4** e **2.5** em etanol

O rendimento quântico de fluorescência é definido como a razão entre o número de fótons emitidos por fluorescência e o número total de fótons absorvidos. Este pode ser calculado através da equação I. 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.

$$\phi F(\text{amostra}) = \frac{\text{Área}(\text{amostra})}{1 - 10^{-\text{Abs}(\text{amostra})}} * \frac{1 - 10^{-\text{Abs}(\text{ref})}}{\text{Área}(\text{ref})} * \frac{\eta^2(\text{amostra})}{\eta^2(\text{ref})} * \phi F(\text{ref}) \quad (I)$$

Como seria de esperar, devido à presença dos átomos de flúor,¹¹ os rendimentos quânticos de fluorescência obtidos para as porfirinas sintetizadas, apresentados na tabela 3.1, são relativamente baixos, sendo o valor mais elevado de $\phi_F = 0,035$ (entrada 1, Tabela 3.1). Esta característica revela-se favorável para a potencial aplicação dos compostos sintetizados em terapia fotodinâmica. Além disso, pela análise destes dados, podemos observar que a redução do estado de oxidação do macrociclo leva a valores mais elevados de ϕ_F , tal como descrito na literatura.¹²

Como referido no capítulo 1 desta Tese, o fotossensibilizador no estado triplete pode interagir com o oxigénio gerando ROS, quer por processos de transferência de eletrão (mecanismo tipo I), quer por processos de transferência de energia (mecanismo tipo II). Por norma, nas porfirinas o segundo mecanismo é dominante¹³. Para verificar este facto, foram calculados os rendimentos quânticos de formação de oxigénio singuleto (ϕ_Δ). A estratégia utilizada para o cálculo deste é semelhante à utilizada para o rendimento quântico de fluorescência, uma vez que também se considera uma referência, mas desta vez a fenalenona ($\phi_\Delta = 0,98$ ¹⁴ em tolueno). Neste caso é utilizada a técnica de fotólise por relâmpago, efetuando-se uma medição direta da emissão de fosforescência do oxigénio singuleto a 1270 nm para diferentes energias do pulso de laser. Foram preparadas soluções das amostras em tolueno com absorvância aproximada de 0,2 a 355 nm. Posteriormente, para os dados referentes a cada energia do laser é feito um ajuste exponencial, tal como demonstrado na figura 3.5.

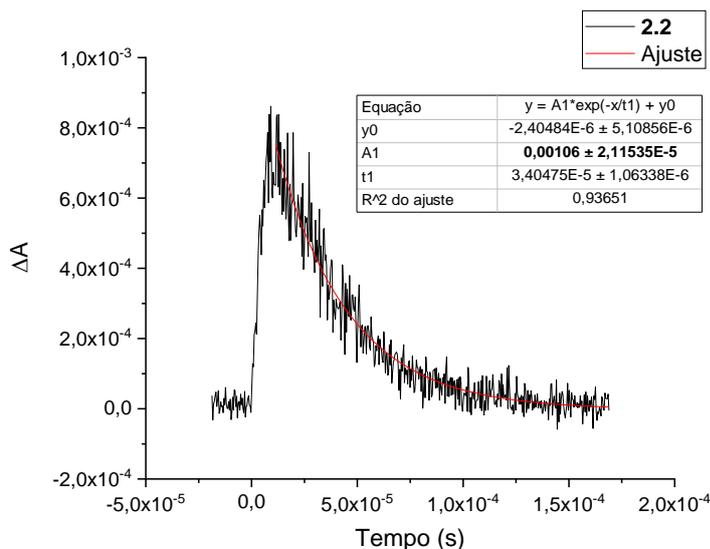


Figura 3.5- Emissão de fosforescência do oxigênio singuleto a 1270 nm para a energia relativa do laser de 6,6 tendo como exemplo a porfirina **2.2**

Da equação de ajuste obtida é retirado o valor do pré-exponencial (A) e o respetivo erro e construído um novo gráfico deste (A) em função da energia do laser (Figura 3.6). De seguida, procede-se a um ajuste linear dos valores e retira-se o respetivo declive da reta. O rendimento quântico de formação de oxigênio singuleto é definido como a razão entre o número de moléculas de oxigênio singuleto produzidas e o número total de fótons absorvidos pela amostra. Este pode ser calculado por um método comparativo através da equação II.

$$\phi\Delta(\text{amostra}) = \frac{\text{Declive}(\text{amostra})}{1 - 10^{-\text{Abs}(\text{amostra})}} * \frac{1 - 10^{-\text{Abs}(\text{ref})}}{\text{Declive}(\text{ref})} * \phi\Delta(\text{ref}) \quad (\text{II})$$

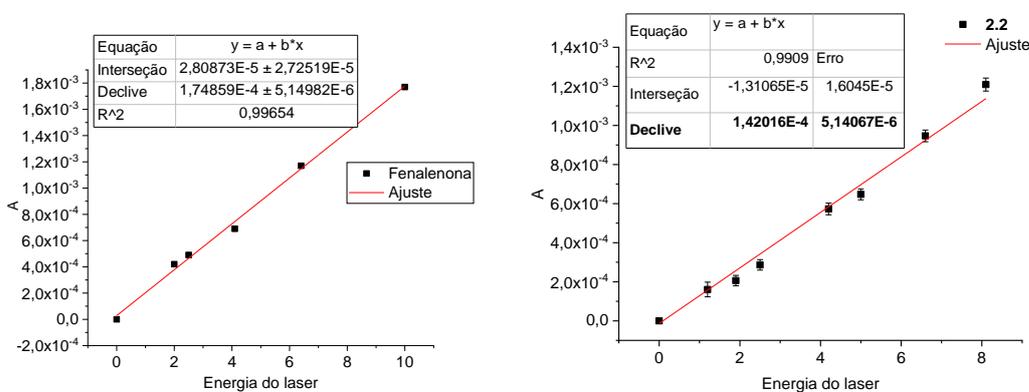


Figura 3.6- Ajuste linear do valor do pré-exponencial em função da energia do laser, tendo como exemplo a referência (fenalenona) e a porfirina **2.2**

Nesta família de compostos observamos uma ligeira diminuição dos rendimentos quânticos de formação de oxigênio singuleto com o aumento do número de substituições: **2.2** (porfirina monossubstituída, $\phi_{\Delta}=0,74$)>**2.3** (porfirina tetrassubstituída, $\phi_{\Delta}=0,70$); **2.4** (bacterioclorina monossubstituída, $\phi_{\Delta}=0,47$)>**2.5** (bacterioclorina tetrassubstituída, $\phi_{\Delta}=0,36$). Este fenómeno é atribuído à diminuição do efeito de átomo pesado, uma vez que perdemos flúores com as substituições.¹¹ Os dados encontram-se sumariados na tabela 3.1.

Um fotossensibilizador pode ser descrito com um tipo muito especial de catalisador, capaz de manter a capacidade de transformação química (ex. oxigênio molecular para oxigênio singuleto) enquanto absorve fotões e não se fotodecompõe. Neste sentido, é importante determinar o rendimento quântico de fotodecomposição (Φ_{Pd}) para avaliar a sua eficiência. Este é definido como a razão entre a taxa de transformação química do fotossensibilizador e a taxa de absorção de fotões e é uma boa medida da habilidade do fotossensibilizador gerar ROS antes do seu *bleaching*. Deste modo, este foi determinado pelo Doutor Fábio Schaberle do Grupo de Fotónica e Reatividade e os resultados encontram-se na tabela 3.1. As porfirinas **2.2** e **2.3** apresentam valores de $\Phi_{Pd}=10 \times 10^{-6}$ e 48×10^{-6} , respetivamente. A fotoestabilidade da bacterioclorina **2.5** é $\phi_{Pd} = 18 \times 10^{-6}$, similar aos valores previamente descritos para esta família de compostos.¹² A bacterioclorina **2.4** é a menos fotoestável com valores de 57×10^{-6} .

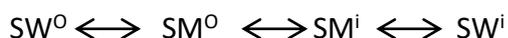
Sumariamente, verificou-se que os compostos possuem baixos rendimentos quânticos de fluorescência ($\phi_F \leq 0,21$) e rendimentos quânticos de formação de oxigênio singuleto adequados ($\phi_{\Delta} \geq 0,36$), revelando-se candidatos bastante promissores para aplicação como fotossensibilizador.

Tabela 3.1- Dados espectroscópicos, fotofísicos e fotoquímicos das porfirinas (em tolueno) e bacterioclorinas (em etanol) sintetizadas

Entrada	Composto	Absorção/ nm (log $\epsilon/M^{-1}cm^{-1}$)						Fluorescência λ_{max}/nm		ϕF	$\phi \Delta$	Φ_{PD} $\times 10^{-6}$
		B		Qy (1,0)	Qy (0,0)	Qx (1,0)	Qx (0,0)	Q (0,0)	Q (0,1)			
1	2.2	-----	411 (5,38)	505 (4,15)	Ombro	582 (3,65)	636 (3,82)	644	712	0,035	0,74	10
2	2.3	-----	413 (4,76)	509 (3,82)	Ombro	585 (3,45)	638 (2,80)	644	712	0,019	0,70	48
3	2.4	342 (5,16)	372 (5,18)	----	502 (4,55)	----	743 (5,03)	748	---	0,21	0,47	57
4	2.5	345 (5,19)	373 (5,20)	----	503 (4,79)	----	745 (5,12)	761	---	0,20	0,36	18

3.1.2- Determinação de coeficientes de partição octanol-água

A afinidade de um fármaco para a membrana celular condiciona todo o processo de absorção, biodistribuição, metabolização e excreção, pelo que é fundamental conseguirmos prevê-la. O processo de permeação consiste essencialmente na passagem de um meio extracelular aquoso (SW^o , do inglês *substrate in water*) para um meio hidrofóbico [lípidos membranares da monocamada externa (SM^o , do inglês *substrate into the membrane*) e interna (SM^i)], e de seguida deste para um meio aquoso intracelular (SW^i).



Para simular este processo e consequentemente prever o comportamento *in vivo* de permeação de fármacos nas membranas celulares recorre-se a diversos modelos experimentais, sendo o coeficiente de partição octanol-água o mais utilizado. O octan-1-ol simula os fosfolípidos membranares, uma vez que possui uma cadeia alquílica longa e um grupo funcional com características de aceitador e dador de ligações de hidrogénio. Além disso, dissolve uma vasta gama de compostos orgânicos, permite determinações espectroscópicas sem interferências e a sua pressão de vapor baixa origina medidas reproduzíveis. Como fase aquosa, neste caso, foi utilizado tampão fosfato PBS (do inglês *phosphate saline buffer*) com pH ajustado para 7,4, uma vez que o anel tetrapirrólico das porfirinas possui um carácter anfotérico e sabe-se que a protonação ou desprotonação destes grupos pode afetar o coeficiente de partição.¹⁵ Este modelo possui diversas limitações tais como a incapacidade de simular a ação de proteínas, que funcionam como transportadores e recetores membranares e a dificuldade em adaptar o octanol para refletir membranas com diferentes composições.¹⁶ No entanto, serve como uma primeira aproximação para obter dados sobre a anfifilicidade dos compostos.

O coeficiente de partição define-se pela razão entre a concentração na fase orgânica (C_o) e na fase aquosa (C_w). Existem na literatura dois métodos para a determinação de coeficientes de partição. O primeiro é essencialmente aplicado na determinação dos coeficientes de partição de analitos neutros e recorre à utilização de HPLC munido de uma coluna de fase reversa e utilizando como fase móvel a água.¹⁷ O segundo, denominado por “*shake-flash method*”, consiste na agitação do soluto numa mistura de PBS e octan-1-ol, seguindo-se a quantificação da concentração do composto

nas duas fases por técnicas espectroscópicas UV-Vis ou de fluorescência, após construídas as curvas de calibração com os padrões apropriados.^{18,19} Neste trabalho foi utilizado o segundo método recorrendo à espectroscopia UV-Vis. Deste modo, o composto foi dissolvido num volume definido de octan-1-ol previamente saturado com PBS e em seguida, adicionou-se a este o mesmo volume de PBS saturado com octan-1-ol. Agitou-se a mistura vigorosamente e centrifugou-se. Após o tratamento necessário a cada uma das fases, descrito em pormenor no capítulo experimental (Capítulo 6), efetuaram-se os respetivos espectros UV-Vis. De acordo com a lei de Beer-Lambert, a absorvância é diretamente proporcional à concentração, pelo que podemos aplicar a fórmula para o cálculo do logP, com as alterações necessárias: $\log P_{OW} = \log(Abs_{n-oct}/Abs_{PBS})$, assumindo que o coeficiente de absorvidade molar é igual nos dois meios. Na tabela 3.2, apresentam-se os valores do logaritmo da razão entre a concentração na fase orgânica e a concentração na fase aquosa para os compostos avaliados. Para a porfirina **2.6** não foi possível calcular o valor através desta metodologia, o que indica que esta possui $\log P > 3$ (entrada 1, Tabela 3.2).

Tabela 3.2- Valores de LogP dos compostos avaliados

Entrada	Composto	LogP
1	2.2	>3
2	2.3	0,94
3	2.4	2,19
4	2.5	1,02

Os resultados obtidos revelam que através do número de funcionalizações com grupos sulfonamida, conseguimos modelar significativamente a anfifilicidade das moléculas (entrada 1 e 2, Tabela 3.2). As alterações no coeficiente de partição das porfirinas (**2.2** e **2.3**) e dos seus derivados reduzidos (**2.4** e **2.5**) não são significativas, tal como seria de esperar, dado que as modificações na estrutura do composto são mínimas e não ocorrem em grupos que influenciam significativamente a anfifilicidade. A diferença entre os compostos **2.2** e **2.4** deve-se a dificuldade de deteção, uma vez que quando os coeficientes de partição são superiores a 2, a amostra presente na fração aquosa é tão diminuta que se torna difícil o seu cálculo.

Em trabalhos anteriores do grupo, descreveu-se a 5,10,15,20-*tetrakis*(2,6-difluoro-5-*N*-metilsulfamoilfenil)porfirina, na qual a *N*-metilsulfonamida se encontra ligada ao anel fenílico pelo átomo de enxofre, com um $\log P=2,74$.²⁰ A porfirina **2.3** sintetizada no âmbito do trabalho apresentado nesta dissertação é constituída pela mesma sulfonamida, todavia, a ligação ao anel fenílico ocorre de modo inverso. Surpreendentemente, no nosso estudo o efeito da inversão referida provoca uma diminuição abrupta no coeficiente de partição ($\log P=0,94$), mesmo com a presença adicional de dois átomos de flúor em cada anel fenílico que, segundo dados da literatura, deveriam aumentar a lipofilicidade.²¹ Esta alteração no $\log P$ pode ser interpretada pela acidez relativa do próton NH no composto **2.3**, cuja carga negativa é muito mais estabilizada, uma vez que se encontra em ressonância com o grupo sulfóxido e com o anel aromático, diferindo do descrito na literatura.²⁰

3.1.3- Avaliação da atividade antibacteriana

Estes estudos foram realizados por Carolina S. Vinagreiro, na sua deslocação ao grupo de bioinorgânica e fotoquímica da *Jagiellonian University*, em Cracóvia na Polónia.

Para determinar e comparar os efeitos antibacterianos de porfirinas (**2.2** e **2.3**) e bacterioclorinas (**2.4** e **2.5**), seleccionaram-se bactérias Gram-negativo e Gram-positivo de 2 estirpes distintas: *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. O protocolo (Figura 3.7) iniciou-se pela preparação de uma suspensão de cada estirpe bacteriana em estudo a partir de colónias puras em Muller Hinton, de forma a alcançar um padrão de turvação equivalente ao padrão de 0,5 da escala de McFarland, que corresponde a $1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colónias (UFC)/mL. De seguida, várias placas de 96 poços estéreis foram preparadas com poços contendo diferentes concentrações dos fotossensibilizadores **2.2-2.5** (entre 1 a 100 μM), aos quais foram adicionados 10 μL do inóculo anteriormente preparado. As placas foram colocadas em agitação durante 1 hora no escuro. De seguida, um grupo de células foi exposto à luz (10 J/cm^2) e o outro permaneceu no escuro. Após irradiação, as amostras são diluídas em PBS, agitadas e adicionadas a placas de Petri. Por último, as placas foram incubadas na estufa a 37 °C durante 18 a 24 horas. Após este período, a viabilidade das bactérias foi avaliada pela contagem do número de colónias formadas (UFC/mL). Para cada composto, o ensaio

foi feito em duplicado e reproduzido, em três ensaios independentes, e os resultados encontram-se sumariados na figura 3.8.

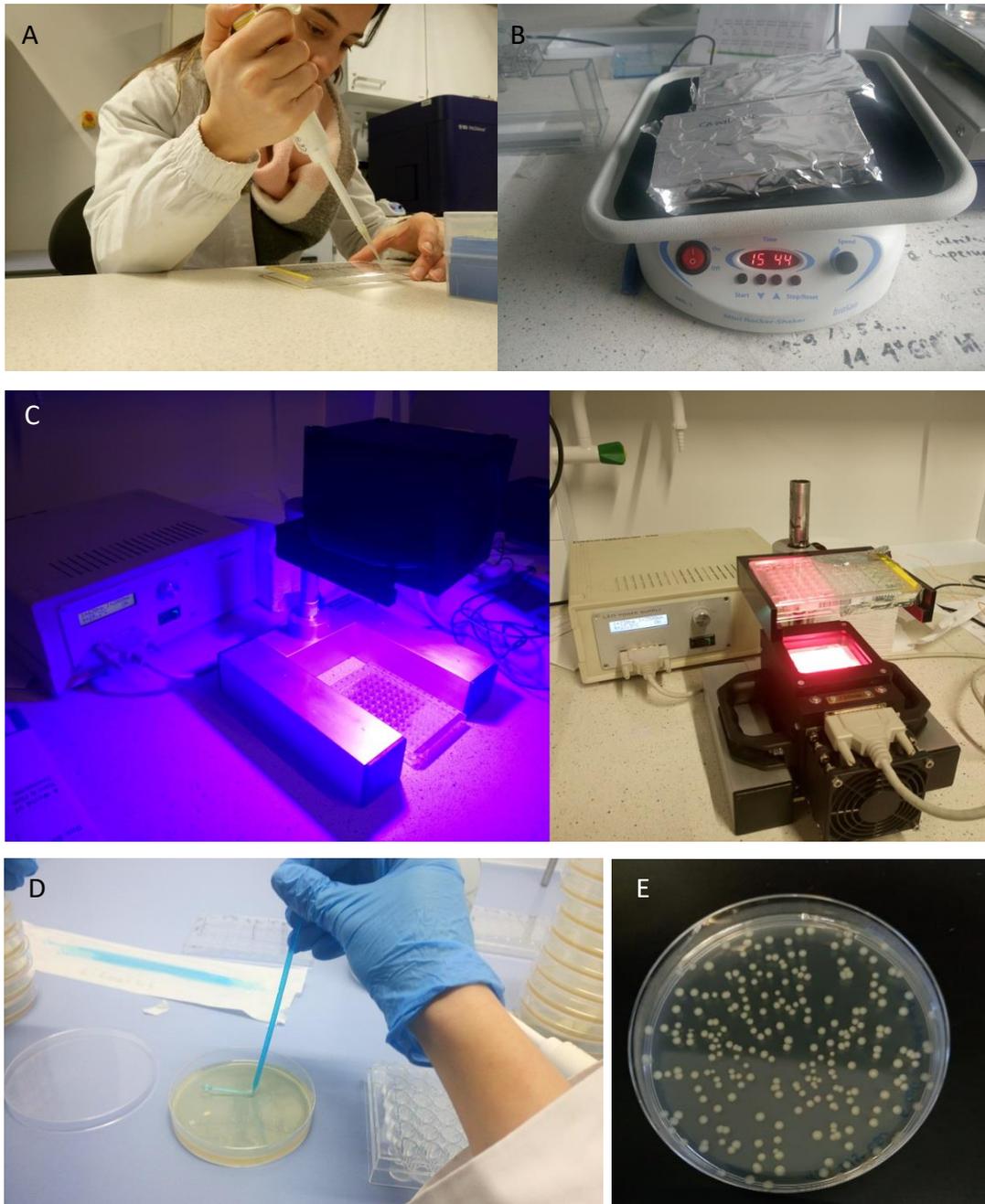


Figura 3.7- Fotografias dos diferentes passos do protocolo experimental: A) Adição do inóculo por Carolina S. Vinagreiro; B) Incubação no escuro; C) Irradiação da placa de 96 poços (porfirinas, luz azul e bacterioclorinas, luz vermelha); D) Adição das amostras à placa de Petri; E) Placa de Petri obtida para *E. coli* ATCC 25922 com 10 μ M do composto **2.3**

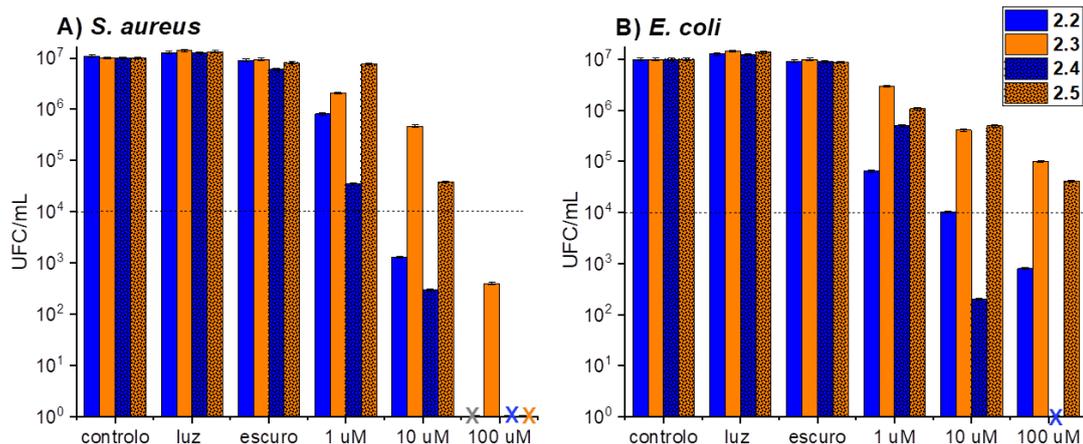


Figura 3.8- Efeito da inativação fotodinâmica em função da concentração em A) *S. aureus* ATCC 29213; B) *E. coli* ATCC 25922. Os resultados indicados como toxicidade no escuro são para a concentração máxima (100 μ M)

Fazendo uma observação comparativa, pode notar-se um efeito bactericida significativamente mais elevado para os PSs monossustituídos **2.2** e **2.4** do que para os tetrassustituídos **2.3** e **2.5**, assim como uma inativação maior causada pelas bacterioclorinas do que pelas porfirinas correspondentes. O PS mais ativo revelou ser a bacterioclorina **2.4**, uma vez que a incubação com 100 μ M deste fotossensibilizador, seguida de irradiação, causou uma redução de 7 \log_{10} na viabilidade de ambas as espécies (*S. aureus* e *E. coli*) (Figura 3.8). Além disso, 100 μ M de **2.3** e **2.5** foram necessários para atingir 4 \log_{10} e 7 \log_{10} de fotoinativação de *S. aureus* ATCC 29213 (Figura 3.8, A), respetivamente, indicando que esta é a estirpe mais sensível ao tratamento aPDT com estes compostos. Relativamente à porfirina tetrassustituída **2.3**, geralmente apenas uma redução de 1 \log_{10} foi possível para ambas as estirpes. Em concentrações inferiores não se observou inativação total em nenhuma das estirpes analisadas.

Por outro lado, a incubação no escuro com fotossensibilizadores em concentrações abaixo de 100 μ M só demonstrou efeito sobre *S. aureus* ATCC 29213 (Figura 3.9). Como se pode observar, a bacterioclorina **2.5** só teve efeito na concentração mais alta (100 μ M), enquanto a correspondente porfirina **2.3** demonstrou uma atividade crescente com a concentração. Mais uma vez, a porfirina **2.2** foi a mais ativa, causando uma redução de 1 \log_{10} com apenas 10 μ M. Como mencionado anteriormente, o grupo

sulfonamida constituinte destes fotossensibilizadores pode atuar como inibidor competitivo da enzima diidropteroato sintase, envolvida na síntese do folato. Assim, a atividade antibacteriana no escuro poderá ser devido às propriedades antibacterianas intrínsecas do grupo sulfonamida.

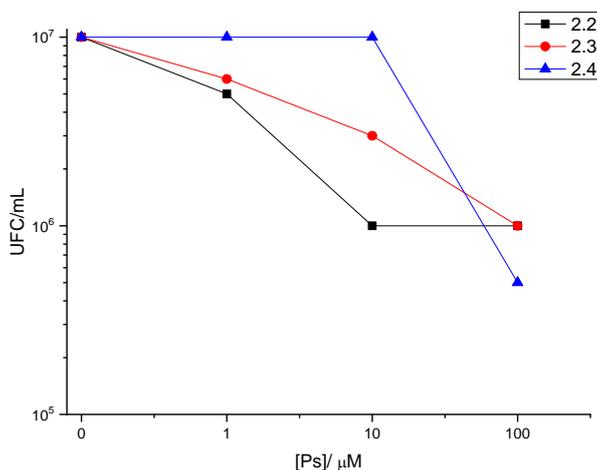


Figura 3.9- Toxicidade no escuro em função da dose de fotossensibilizador para a estirpe *Staphylococcus aureus* ATCC 29213

Como mencionado anteriormente, a distribuição celular de um fotossensibilizador influencia a sua toxicidade durante a inativação bacteriana. Portanto, para racionalizar o efeito bactericida de cada fotossensibilizador, avaliámos a sua internalização nas células bacterianas por microscopia de fluorescência. Para esta experiência, as suspensões de *E. coli* ATCC 25922 e *S. aureus* ATCC 29213 foram incubadas durante 1 hora com os fotossensibilizadores (5 μM) no escuro à temperatura ambiente. Após este período de incubação, o fotossensibilizador não ligado foi lavado por centrifugação e as células ressuspendidas em PBS sem Ca^{2+} e Mg^{2+} . Os sedimentos foram dissolvidos em SDS a 10% durante pelo menos 24 horas e os lisados foram utilizados para medições de fluorescência.

Os resultados apresentados na figura 3.10 demonstram que as porfirinas apresentaram maior internalização celular do que as correspondentes bacterioclorinas. Essa tendência tem sido relatada para células eucarióticas cancerígenas e não-cancerígenas,^{22,23} e pode estar relacionada com a não planaridade da bacterioclorina, que dificulta sua passagem através da membrana. Relativamente às porfirinas, a introdução

de grupos sulfonamida, que tornam a molécula mais hidrofílica (**2.3**), resultou numa menor internalização para ambas as classes de microorganismos. Esse comportamento é esperado, uma vez que as paredes celulares são constituídas por lipopolissacarídeos e, conseqüentemente, as moléculas anfífilas conseguem ter uma maior permeabilidade membranar.

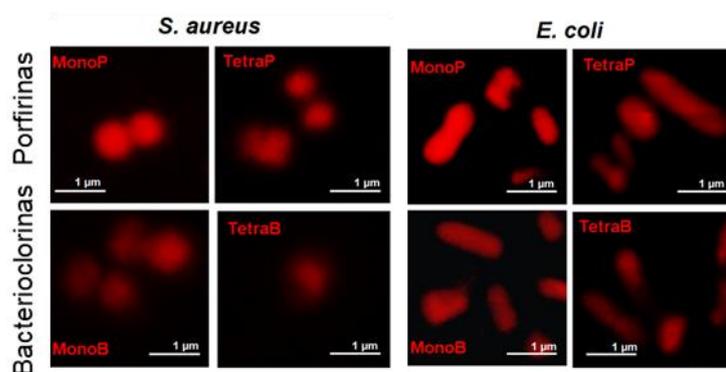
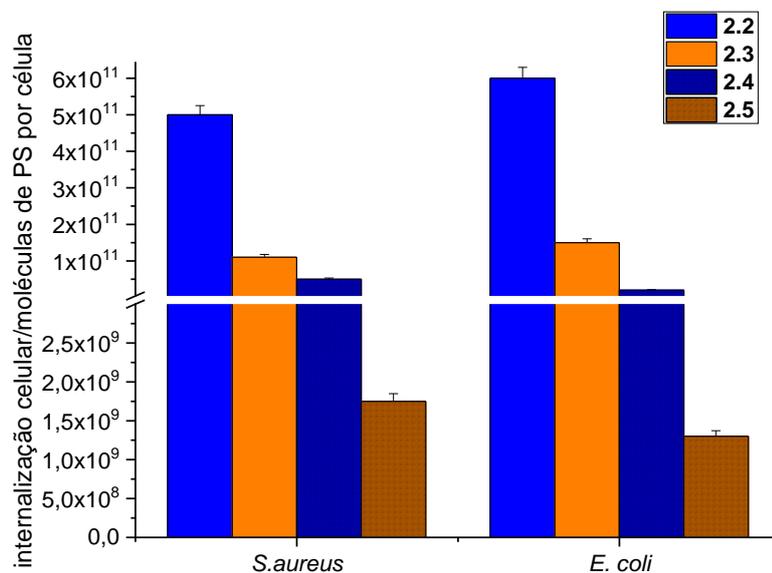


Figura 3.10- Dados de internalização celular para as porfirinas **2.2** (MonoP) e **2.3** (TetraP) e as bacterioclorinas **2.4** (MonoB) e **2.5** (TetraB)

Estes resultados podem explicar a atividade antibacteriana superior da porfirina **2.2** em relação à **2.3**, embora não justifiquem a atividade antibacteriana geralmente superior das bacterioclorinas em relação às suas porfirinas correspondentes.

Assim, numa tentativa de compreender estes resultados, decidiu-se avaliar a natureza das ROS geradas em solução por cada fotossensibilizador no interior de uma

célula bacteriana (*S. aureus* ATCC 29213), utilizando sondas específicas sensíveis a radicais hidroxilo, como a 3'-(*p*-hidroxifenil) fluoresceína (HPF) e 3'-(*p*-aminofenil) fluoresceína (APF) e a oxigênio singuleto, como o *Singlet Oxygen Sensor Green* (SOSG). Como representado na figura 3.11, as porfirinas praticamente não geram radicais OH·, por outro lado as bacterioclorinas são capazes de o gerar em grandes quantidades. Essa capacidade da bacterioclorina em produzir oxigênio singuleto e radical hidroxilo em altos níveis é a principal razão para sua maior atividade antibacteriana comparativamente com a atividade da porfirina estruturalmente semelhante.

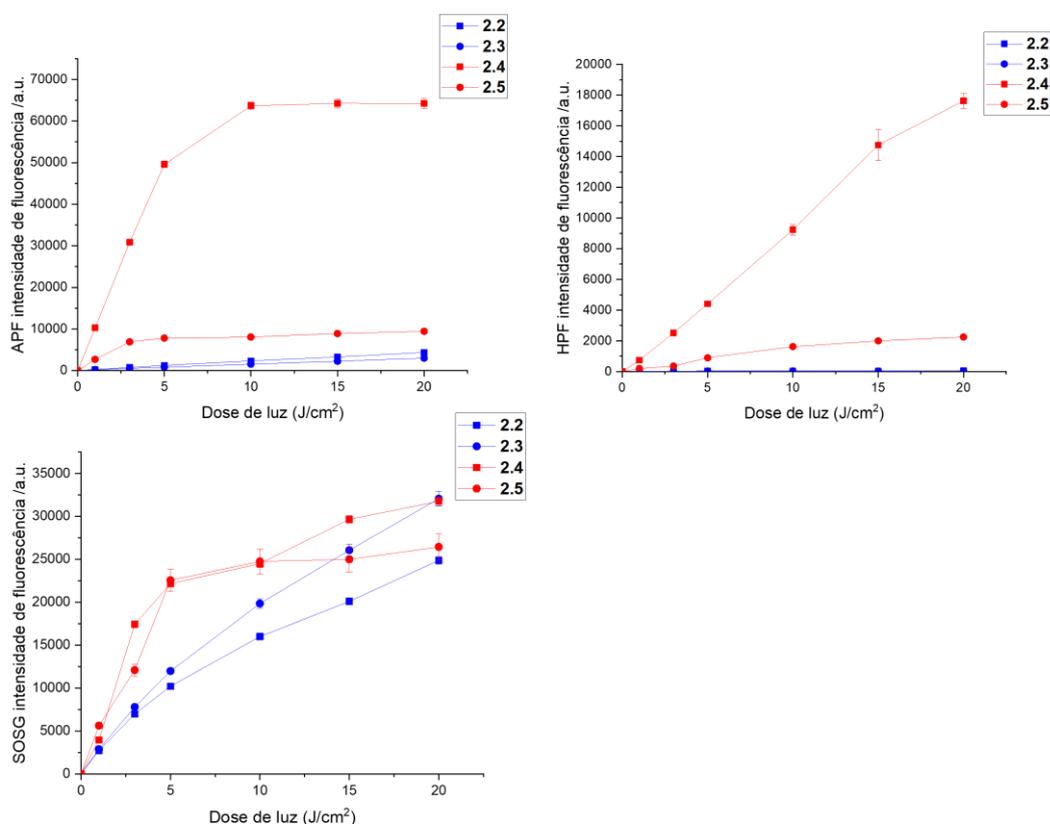


Figura 3.11- Intensidade de fluorescência das sondas de ROS no interior da bactéria *S. aureus*

3.1.4-Estudos de cito e fototoxicidade

Estudos de citotoxicidade foram realizados numa linha imortalizada de queratinócitos humanos (HaCaT), células constituintes da nossa pele, uma vez que, tal como referido, se pretende uma utilização tópica destes compostos. As células foram plaqueadas com uma concentração de 5.000 células por poço. De seguida, as células foram incubadas com diferentes concentrações do potencial fármaco (0-100 μ M). Células controlo, sem adição do composto, são incubadas nas mesmas condições. Passado 24

horas, remove-se o PS, lavam-se as células com PBS e avalia-se a viabilidade celular com recurso ao método do MTT. Basicamente, neste método, células viáveis com metabolismo ativo convertem o reagente MTT em um produto de coloração roxa (formazan), enquanto células mortas não são capazes de realizar essa conversão. Foram realizados três ensaios independentes, cada um com poços em triplicado. A análise dos resultados encontra-se em registo gráfico na figura 3.12.

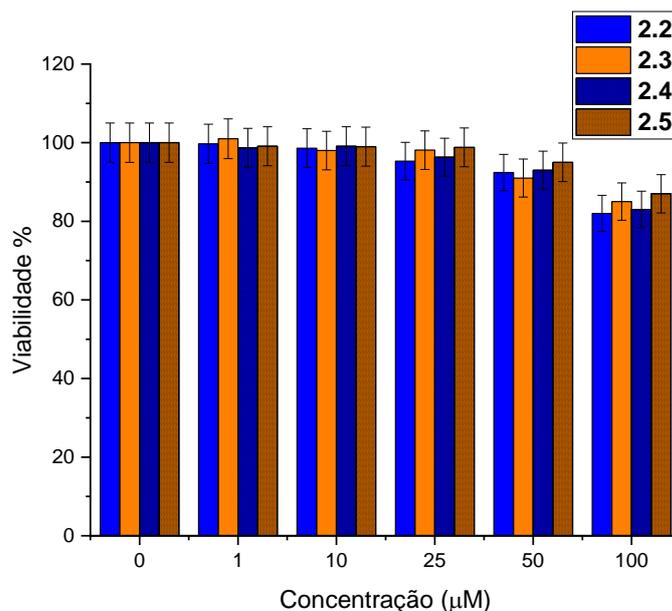


Figura 3.12- Citotoxicidade no escuro dos fotossensibilizadores **2.2-2.5** realizada com a linha celular HaCaT

Na figura observa-se que foi possível obter taxas de viabilidade celular próximas de 100% para concentrações até 25 µM para todos os fotossensibilizadores. Além disso, verifica-se que uma similaridade na toxicidade destes. No entanto, observa-se também que os compostos na concentração de 100 µM, aquela em que se observou inativação total de bactérias (7 log₁₀, Figura 3.8), apresentam toxicidade, com uma diminuição de cerca de 20% na viabilidade celular.

A fototoxicidade foi realizada nas mesmas condições, usando a fonte de luz descrita acima, com uma dose de luz de 10 J/cm² e os dados encontram-se compilados na figura 3.13. Observa-se uma diminuição da viabilidade celular nas concentrações mais baixas utilizadas, atingindo uma diminuição de 20% no caso da porfirina e bacterioclorina monosubstituída **2.2** e **2.4** e 40-50% no caso da porfirina e a bacterioclorina

tetrasubstituída **2.3** e **2.5**, com a concentração de 100 μM . Desta forma, podemos concluir que os compostos apresentam cito e fototoxicidade nas concentração necessárias para uma inativação total de *S. aureus* e *E. coli*.

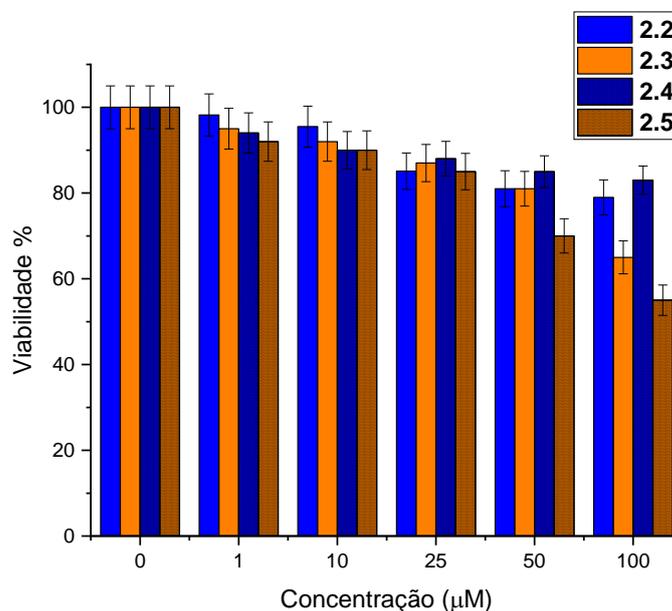


Figura 3.13- Fototoxicidade dos fotossensibilizadores **2.2-2.5** realizada com a linha celular HaCaT.

Uma dose de luz de 10 J/cm^2 foi utilizada para as porfirinas e para as bacterioclorinas

Dado que os resultados planctônicos obtidos com os fotossensibilizadores bimodais não foram muito promissores, não prosseguimos os estudos com esta família em bactérias multirresistente e biofilmes.

3.2- Avaliação de fotossensibilizadores catiónicos do tipo imidazolil porfirinas

Relativamente a esta família, começa-se por relembrar as estruturas dos fotossensibilizadores catiónicos sintetizados, representadas na figura 3.14. Recordar-se que com a sua modelação pretendemos avaliar a influência nas suas propriedades da presença ou ausência de um metal central; do número de cargas positivas (2 ou 4) e da diferença de pesos moleculares (563,96 a 754,20 Da).

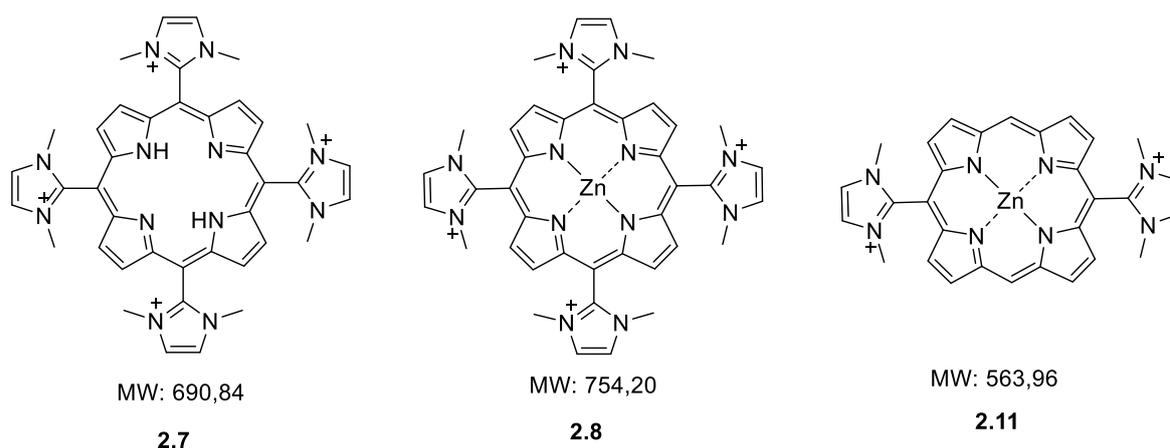


Figura 3.14- Compostos preparados da família dos fotossensibilizadores catiónicos do tipo imidazolil porfirinas

3.2.1- Caracterização fotofísica e fotoquímica

Uma vez que a natureza de um espectro de emissão por fluorescência de porfirinas já foi discutida no ponto 3.1.1, passa-se de imediato à sua análise. Deste modo, observa-se que os espectros de emissão dos complexos metálicos, **2.8** e **2.11**, foram semelhantes, observando-se que a banda correspondente à transição Q(0,0) é superior em intensidade relativamente à banda Q(0,1), inversamente ao que ocorre com a TPP e com a porfirina de base livre **2.7** (Figura 3.15). A presença de um metal central pode induzir diferenças na geometria dos estados, aumentando a sobreposição entre a função de onda do nível vibracional zero do estado excitado e o primeiro nível vibracional do estado fundamental. Consequentemente, a probabilidade de ocorrerem transições entre estes aumenta, justificando assim a alteração da intensidade relativa das bandas.

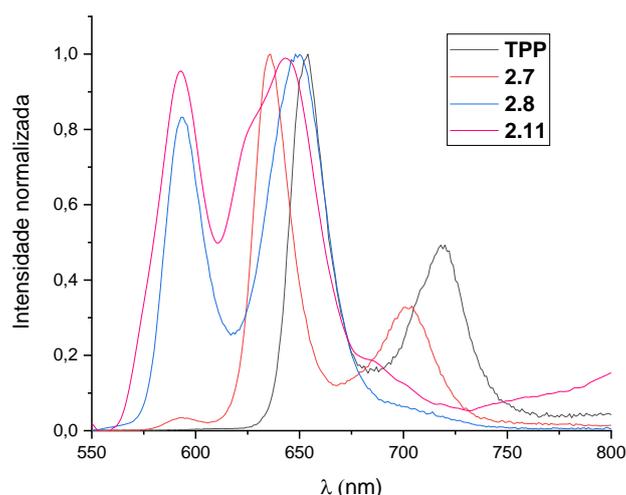


Figura 3.15- Espectros de fluorescência normalizados da referência em tolueno e das porfirinas **2.7**, **2.8** e **2.11** em PBS e PBS/DMSO (0,6%), respectivamente, com excitação a 418 nm

Os rendimentos quânticos de fluorescência e de formação de oxigênio singuleto das porfirinas foram determinados usando as metodologias previamente descritas e encontram-se apresentados na tabela 3.3.

Relativamente aos rendimentos quânticos de fluorescência, estes são relativamente baixos, sendo o valor mais elevado obtido para a porfirina **2.7** $\phi_F = 0,14 \pm 0,04$ (Tabela 3.3, entrada 3), comportamento expectável uma vez que esta porfirina é uma base livre. Por outro lado, tal com esperado, os rendimentos quânticos de formação de oxigênio singuleto seguem a ordem inversa dos rendimentos quânticos de fluorescência, obtendo-se o valor mais elevado para a porfirina não simétrica **2.11** $\phi_\Delta = 0,75$ (Tabela 3.3, entrada 6). Obedecendo ao efeito de átomo pesado,¹¹ ambos os complexos metálicos, **2.8** e **2.11**, apresentam valores superiores à base livre **2.7**.

Adicionalmente, foi realizada uma experiência para o cálculo do rendimento quântico de fotodegradação, verificando-se que ambos os fotossensibilizadores possuem elevada fotoestabilidade mesmo quando comparados com **Zn-TMPyP** descrita como muito fotoestável²⁴ ($\phi_{Pd} = 4 \times 10^{-5}$ e 8×10^{-6} , respectivamente para **2.7** e **2.11**).

Tabela 3.3- Dados espectroscópicos, fotofísicos e fotoquímicos das porfirinas sintetizadas, PBS ou PBS/DMSO (0,6%),

Entrada	Composto	Absorção/ nm (log $\epsilon/M^{-1}cm^{-1}$)					Fluorescência λ_{max}/nm		ϕ_F	ϕ_{Δ}	ϕ_{Pd}
		B	Qy (1,0)	Qy (0,0)	Qx (1,0)	Qx (0,0)	Q (0,0)	Q (0,1)			
1	2.6	420 (5,31)	513 (4,14)	552 (ombro)	587 (3,67)	658 (3,59)	-	-	-	-	-
2	2.7	407 (5,22)	507 (4,17)	541 (3,73)	579 (3,79)	630 (3,78)	636	701	$0,14 \pm 0,04$	$0,18 \pm 0,01$	4×10^{-5}
3	2.9	406 (4,83)	500 (3,75)	535 (3,54)	573 (3,37)	627 (3,12)	-	-	-	-	-
		B	Q (1,0)		Q (0,0)		Q (0,0)	Q (0,1)	ϕ_F	ϕ_{Δ}	
4	2.8	417 (5,43)	556 (4,23)		586 (4,03)		593	648	$0,13 \pm 0,03$	$0,44 \pm 0,01$	-
5	2.10	415 (4,29)	545 (3,14)		581 (2,94)		-	-	-	-	-
6	2.11	406 (4,37)	540 (3,09)		573 (3,34)		593	644	$0,10 \pm 0,02$	$0,75 \pm 0,09$	8×10^{-6}

3.2.2- Determinação de coeficientes de partição

O cálculo do coeficiente de partição desta família de compostos foi efetuado usando uma metodologia similar à descrita no ponto 3.1.2, com exceção de que neste caso optou-se por se calcular a concentração através da medição da fluorescência. Esta mudança no protocolo deveu-se a uma necessidade de aumentar a sensibilidade da técnica, uma vez que, como os compostos são catiónicos, se previa uma reduzida concentração na fração do octan-1-ol. Na tabela 3.4 apresentam-se os valores determinados.

Tabela 3.4 - Valores de logP dos compostos avaliados

Entrada	Composto	LogP
1	2.8	-1,81 +/- 0,41
2	2.11	-1,16 +/- 0,08

Os resultados obtidos revelam que, tal como esperado, o número de cargas positivas aumenta a hidrofiliabilidade do fotossensibilizador (2 cargas **2.11** (Tabela 3.4, entrada 2) < 4 cargas **2.8** (Tabela 3.4, entrada 1)). No entanto, ambas as porfirinas catiónicas apresentam valores de coeficientes de partição negativos.

3.2.3- Avaliação da atividade antibacteriana

Para avaliar a atividade antibacteriana das porfirinas catiónicas com diferentes pesos moleculares, ausência ou presença de Zn(II) e número de cargas positivas selecionaram-se três espécies bacterianas, uma Gram-positivo e duas Gram-negativo. Esta escolha foi efetuada tendo em conta a elevada incidência de infeções causadas por essas bactérias e/ou a elevada prevalência de resistências aos antibióticos em determinadas espécies dessas bactérias a nível local e global, de acordo com a lista prioritária emitida pela Organização Mundial de Saúde.²⁵ Assim, na avaliação da atividade antibacteriana usaram-se estirpes da American Type Culture Collection (ATCC), nomeadamente *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. Para a realização destes estudos foi

utilizado, como fonte de irradiação, um LED desenhado e construído no Departamento de Química da Universidade de Coimbra, com um máximo de emissão a 415 nm e com uma potência constante de 4 mW/cm² (Figura 3.16 -B).

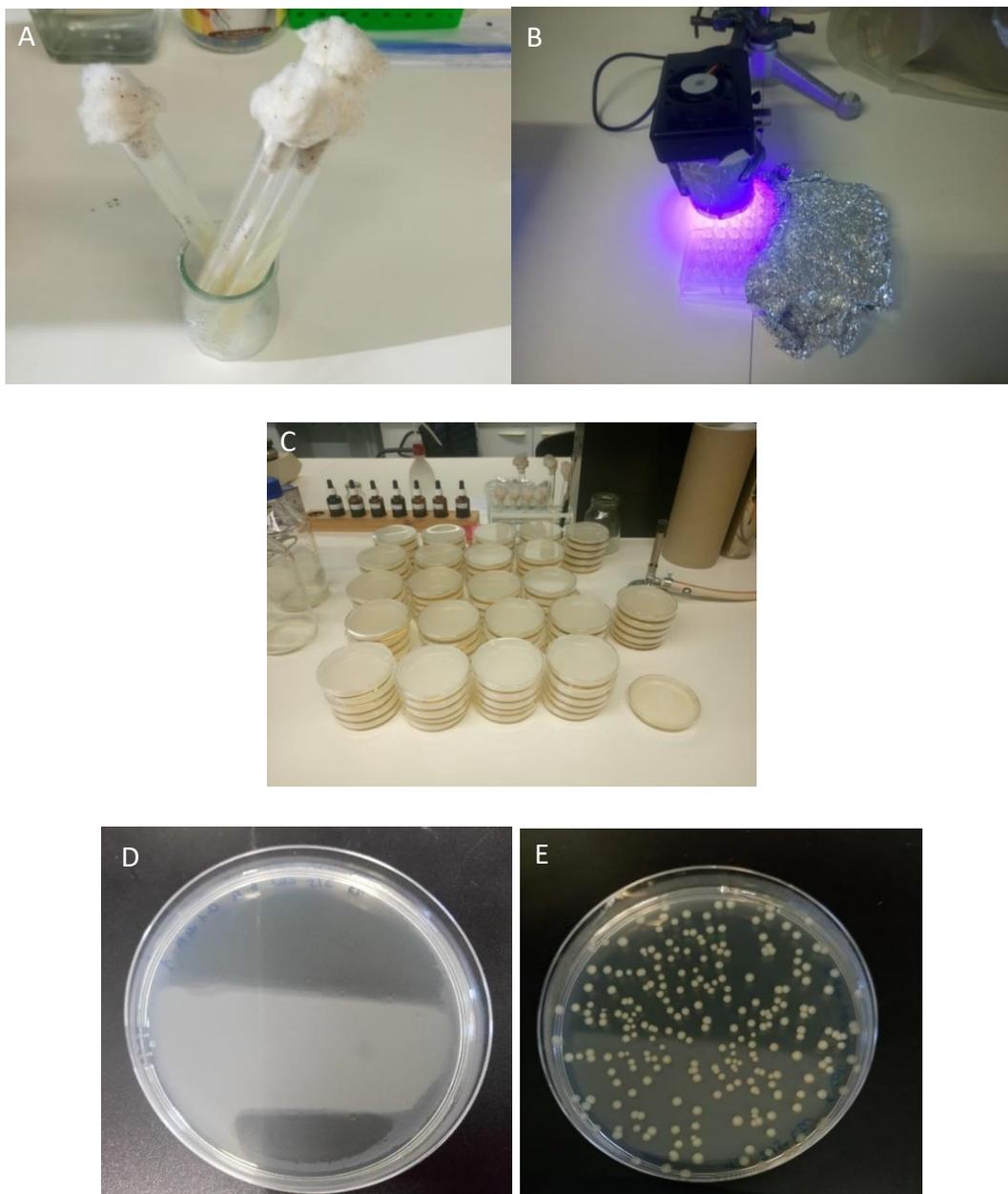


Figura 3.16- Fotografias dos diferentes passos do protocolo experimental: (A) crescimento das colónias puras; (B) irradiação da placa de 96 poços; (C) preparação das placas de Petri utilizadas nos estudos; (D) placa de Petri obtida para *E. coli* ATCC 25922 com 100 nM do composto **2.8**; (E) placa de Petri obtida para *E. coli* ATCC 25922 com 10 nM do composto **2.8**

Os estudos foram iniciados pela otimização do tempo de incubação, usando como modelo o fotossensibilizador **2.8** e as estirpes *E. coli* ATCC 25922 e *S. aureus* ATCC 29213. Seguindo o protocolo experimental descrito na secção 3.1.3 (Figura 3.16), o fotossensibilizador foi incubado no escuro, com 1 μM de **2.8**, por diferentes tempos (15-60 minutos) e de seguida irradiado com luz azul (415 nm, dose de luz 1,36 J/cm^2) usando a fonte de luz descrita acima. Observou-se que para obter uma inativação completa das bactérias de ambas as estirpes, é necessária uma incubação mínima de 60 minutos (Figura 3.17), tendo-se seleccionado este tempo de incubação para os estudos subsequentes.

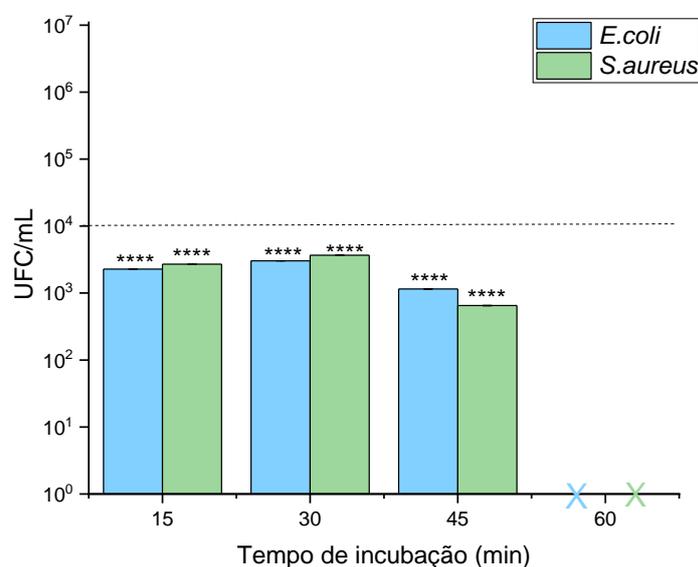


Figura 3.17- Otimização do tempo de incubação com 1 μM de **2.8** e dose de luz de 2 J/cm^2 a 415 nm

Após otimizar o tempo de incubação, suspensões das bactérias, em PBS, foram tratadas com diferentes concentrações dos fotossensibilizadores **2.7**, **2.8** e **2.11** (entre 0 e 1 μM), tal como descrito no protocolo anterior. Para cada composto, o ensaio foi realizado em duplicado e reproduzido, em três ensaios independentes, e os resultados encontram-se sumariados na figura 3.18.

O fotossensibilizador **2.8** demonstrou um efeito bactericida relativamente forte, sem precedentes, causando a eliminação completa de todas as estirpes de bactérias testadas, quer Gram-negativo quer Gram-positivo, a concentrações de 1 e 0,1 μM

(redução 7 \log_{10} , Figura 3.18 -B). Este nível de redução corresponde a um agente de desinfecção de alto nível de acordo com os parâmetros da FDA.²⁶ Por outro lado, a sua correspondente base livre **2.7** também conseguiu atingir este elevado nível de inativação bacteriana com 1 μM mas não em concentrações inferiores, demonstrando a importância da presença do Zn(II) como metal central para uma inativação mais eficaz (Figura 3.18-A). Tal como se pode verificar na tabela 3.3, a produção de oxigénio singuleto na porfirina metalada **2.8** é 2,4 vezes superior ao da desmetalada.

Interessantemente, uma redução de 3,5-5,5 \log_{10} foi ainda observada com apenas 10 nM do PS **2.8** (Figura 3.18-B).

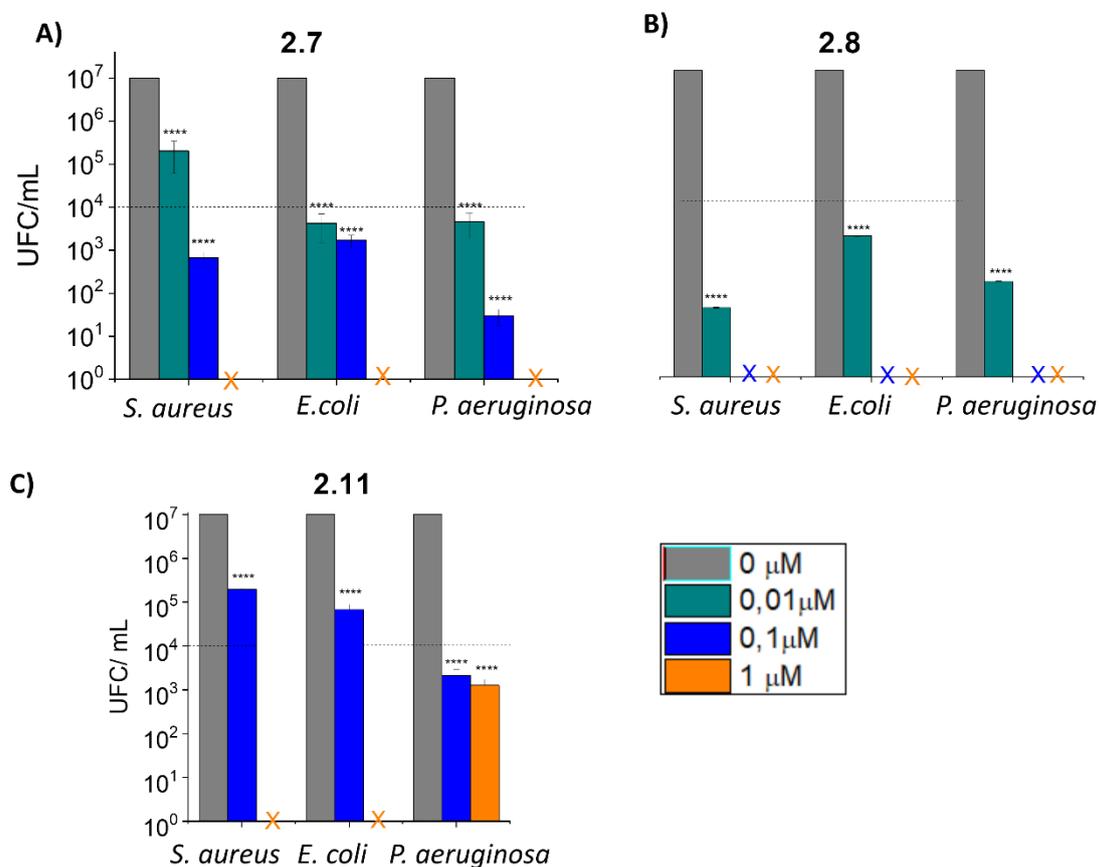


Figura 3.18- Resultados planctónicos de aPDT para várias concentrações dos fotossensibilizadores (A) **2.7** (B) **2.8** (C) **2.11** com um tempo de incubação de 60 minutos e uma dose de luz de 1,36 J/cm²

Relativamente ao fotossensibilizador com menor número de cargas e peso molecular, PS **2.11**, uma total inativação foi observada para *S. aureus* ATCC 29213 e *E. coli* ATCC 25922, com concentrações de 1 μM (redução 7 \log_{10} , Figura 3.18 -C), atingindo

o limiar de deteção dos nossos métodos. Adicionalmente uma redução de 1,5-2 \log_{10} foi observada para as mesmas estirpes com 100 nM. O fotossensibilizador foi menos ativo contra a estirpe de *P. aeruginosa* ATCC 27853, demonstrando uma inativação de 3,5 \log_{10} com 0,1 μM . Colocou-se a hipótese de no caso da estirpe de *P. aeruginosa* esta diminuição de atividade ser devida à produção de um pigmento de cor verde, uma vez que várias evidências na literatura apontam para a sua capacidade em inativar a produção de ROS.^{27,28} No entanto, não foi possível obter uma estirpe em que não ocorre a produção deste pigmento para corroborar esta teoria.

Deste modo, podemos concluir que nas estirpes avaliadas em fase planctónica o fotossensibilizador **2.8**, com quatro cargas positivas e metal central zinco, apresenta-se como um dos fotossensibilizadores mais eficientes para inativação bacteriana, em solução, descrito até ao momento na literatura.

Estes resultados extremamente promissores encorajaram a expansão do estudo para bactérias multirresistentes, para ambos os complexos metálicos **2.8** e **2.11**. Assim, estirpes resistentes foram recolhidas do Centro Hospitalar da Universidade de Coimbra, tendo-se selecionado cinco estirpes: duas de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA, Sa1CHUC e Sa2CHUC) coletadas da pele de um paciente queimado e outra resultante de uma infeção cirúrgica abdominal, respetivamente (ambas resistentes a todos os antibióticos beta-lactâmicos e também a quinolonas); *Acinetobacter baumannii* 141HUC isolada da pele de um paciente queimado e altamente resistente a todos os antibióticos beta-lactâmicos e também a carbapenemos, quinolonas, gentamicina e netilmicina; *Escherichia coli* 189 resistente a todos os antibióticos beta-lactâmicos e à colistina e *Klebsiella pneumonia* 6 (infeções do trato urinário e do trato respiratório), considerada extremamente resistente a todos os antibióticos beta-lactâmicos, aminoglicosídeos e quinolonas.

O protocolo experimental foi similar ao descrito anteriormente, com o reforço da proteção individual, e os resultados encontram-se sintetizados na figura 3.19. Mais uma vez, o PS **2.8** demonstrou um extraordinário efeito bactericida causando a morte completa de todas as estirpes multirresistentes na concentração de 1 μM (redução de 7 \log_{10}). Curiosamente, uma redução de cerca de 3 \log_{10} foi observada para todas as estirpes com apenas 100 nM. Por outro lado, o fotossensibilizador **2.11** produziu uma

eliminação completa das estirpes MRSA Sa1CHUC e ACI141 Hu na concentração de 1 μM (redução de 7 \log_{10}), no entanto, nas restantes espécies apenas se observou uma redução de 4,5 \log_{10} .

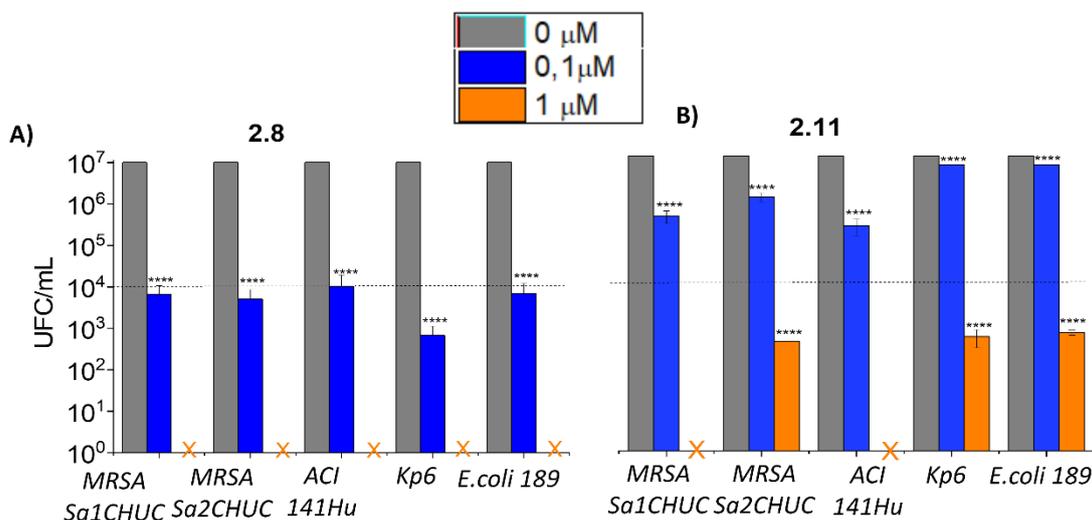


Figura 3.19- Resultados planctônicos de aPDT para várias concentrações dos fotossensibilizadores (A) 2.8 (B) 2.11 com um tempo de incubação de 60 minutos e uma dose de luz de 1,36 J/cm² em bactérias multirresistentes

Vários autores relataram a eficiência antibacteriana de porfirinas catiónicas, tal como descrito nas tabelas 1.1 e 1.2 do capítulo 1. Todavia, os resultados descritos são difíceis de serem comparados com os obtidos neste trabalho, principalmente devido à utilização de diferentes sistemas de irradiação e doses de luz. No entanto, empregando doses relativamente superiores (6 J/cm²) às utilizadas neste trabalho (1,36 J/cm²) e 7,81 μM de uma porfirina substituída em quatro posições com o resíduo lisina, Liu²⁹ descreveu uma inativação total de MRSA, *P. aeruginosa* e *E. coli* (7 \log_{10}). Além disso, a fotoinativação mediada por uma porfirina dicatiónica não simétrica (XF73) apresentou uma redução >5,8 e 4,5 \log_{10} de CFU quando *S.aureus* e *E.coli*, respetivamente, foram tratadas com 10 μM do fotossensibilizador XF73 e uma dose de luz de 13,7 J/cm².³⁰ Por outro lado, com a mesma dose de luz (13,7 J/cm²), Reddi³¹ relatou uma inativação total de *S. aureus* (7 \log_{10}) e uma inativação parcial de *E. coli* (5 \log_{10}) mediada por 0,5 e 15 μM , respetivamente, de 5-(4-carboxifenil)-10,15,20-triquis(4-piridil)porfirina. Os

restantes autores empregam doses de luz ou concentração de fotossensibilizador superiores.³²⁻⁵⁵

De acordo com o nosso conhecimento, uma fotoinativação total ($7 \log_{10}$) de bactérias, Gram-positivas e Gram-negativas, com concentrações tão baixas de fotossensibilizador (100 nM-1 μ M) e doses de luz (1,36 J/cm²) é um dos melhores resultados descritos na literatura até Setembro de 2019.

Tal como abordado no capítulo 1 desta tese, outra questão complexa considerada crítica pela OMS são as infecções causadas por bactérias com formação de biofilmes, uma vez que estas podem ser 10-1000 vezes mais resistentes aos agentes antimicrobianos que as bactérias planctónicas e, conseqüentemente, extremamente difíceis de erradicar.⁵⁶ Neste sentido, para avaliar a atividade antibacteriana em biofilmes dos fotossensibilizadores sintetizados, foi feita uma deslocação ao grupo do professor Vanderlei Bagnato em São Carlos, Brasil. Para este fim, selecionou-se a estirpe Gram-positivo de *Staphylococcus aureus* ATCC 25925. Para a avaliação da suscetibilidade de biofilmes à fotossensibilização, foi desenhada e construída pelo Laboratório de Suporte Técnico do Instituto de Física de São Carlos (Universidade de São Paulo) uma Biotable[®]. Esta é composta por 24 lâmpadas LED e emite luz em comprimentos de onda entre 400-700 nm, com uma potência constante de 30 mW/cm² (Figura 3.20).



Figura 3.20- Protótipo da Biotable[®] construída no decurso deste trabalho

A primeira fase da formação do biofilme consiste na adesão da bactéria a uma superfície. Neste sentido, suspensões bacterianas (preparadas previamente, tal como descrito detalhadamente no capítulo 6 desta Tese) foram inoculadas em placas de 24 poços de poliestireno por 24 horas a 37 °C. Após a formação dos biofilmes, estes foram incubados no escuro com concentrações e tempos de incubação otimizados para cada fotossensibilizador (5,2 nM, 30 minutos e 1 µM, 60 minutos para **2.8** e **2.11**, respetivamente). De seguida, uma das placas é iluminada com recurso à Biotable® e a outra mantida no escuro. Após irradiação ou incubação no escuro, as amostras são raspadas e diluídas em PBS, agitadas e colocadas em placas de Petri. As placas são incubadas na estufa a 37 °C durante 24 horas. Após este período, a viabilidade das bactérias foi avaliada pela contagem do número de colónias formadas (UFC/mL). Para cada composto o ensaio foi realizado em triplicado e reproduzido em três ensaios independentes. Os resultados encontram-se sumariados na figura 3.21.

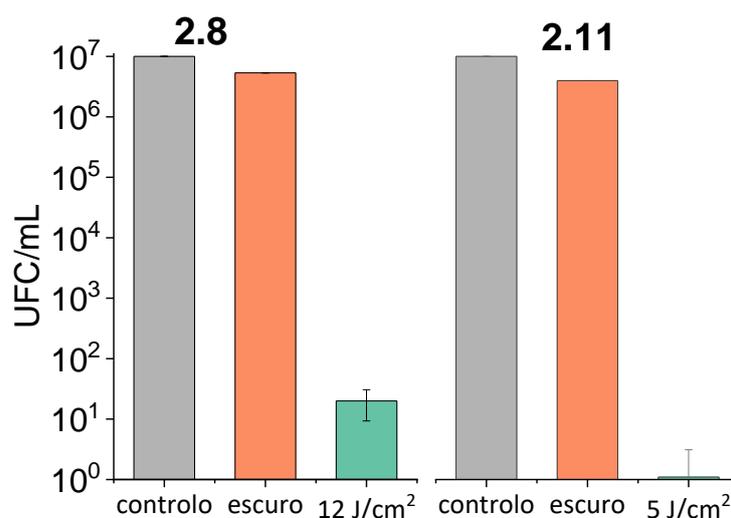


Figura 3.21- Resultados de aPDT em biofilmes de *S. aureus* ATCC 25925 para várias doses de luz (A) **2.8** (B) **2.11** sob irradiação com uma Biotable®, que emite luz em comprimentos de onda entre 400-700 nm, com uma potência constante de 30 mW/cm².

Uma inativação de 5,7 log₁₀ foi observada para o PS **2.8** com apenas 1 µM e uma dose de luz de 12 J/cm². No entanto, extraordinariamente, observou-se uma inativação praticamente completa (6,9 log₁₀) com a menor concentração testada do PS **2.11** (5,2 nM) e uma dose de luz de apenas 5 J/cm².

Os resultados obtidos na inativação de biofilmes com os compostos desenvolvidos no decorrer do trabalho descrito nesta Tese são os melhores descritos até ao momento. Previamente, Cunha⁵⁷ reportou a inativação de 6,3 log₁₀ com doses de fotossensibilizador (5,10,15,20-*tetraquis*(*N*-metil-4-piridil)porfirina, 20 μM) e intensidade de luz bastante superior (64,9 J/cm²). Outros dois estudos realizados em biofilmes de *S. aureus* ATCC 25925 não conseguiram atingir inativações superiores a 3 log₁₀. Speziale⁵⁸ descreveu a redução em 1,2 log₁₀ na viabilidade de biofilmes com 10 μM de 5,10,15,20-*tetraquis*(*N*-metil-4-piridil)porfirina aplicando uma dose de luz entre 150-200 J/cm². Recentemente, Casas⁴⁵ relatou a inativação de 3 log₁₀ com 20 μM de uma porfirina neutra, 5,10,15,20-*tetraquis*[4-(3-*N,N*-dimetilamoniopropoxi)fenil]porfirina, com uma dose de luz de 180 J/cm².

Face aos extraordinários resultados obtidos, decidiu-se realizar microscopia confocal dos biofilmes de *S. aureus*, de forma a estudar as características dos biofilmes formados e compreender as diferenças observadas na atividade de ambas as porfirinas. Deste modo, os biofilmes foram colocados a crescer durante 24 horas, em placas adequadas à observação em microscopia, tal como se observa na figura 3.22.

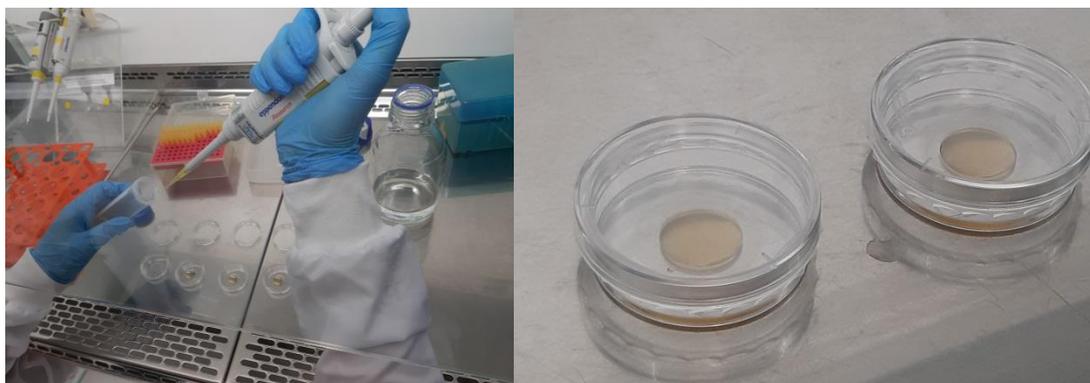


Figura 3.22- Protocolo experimental para o crescimento de biofilmes em placas de microscopia confocal

Primeiramente, observaram-se as placas ao microscópio, tendo sido possível identificar a formação de biofilmes com espessura média de 20 μm, encontrando-se um deles representado na figura 3.23.

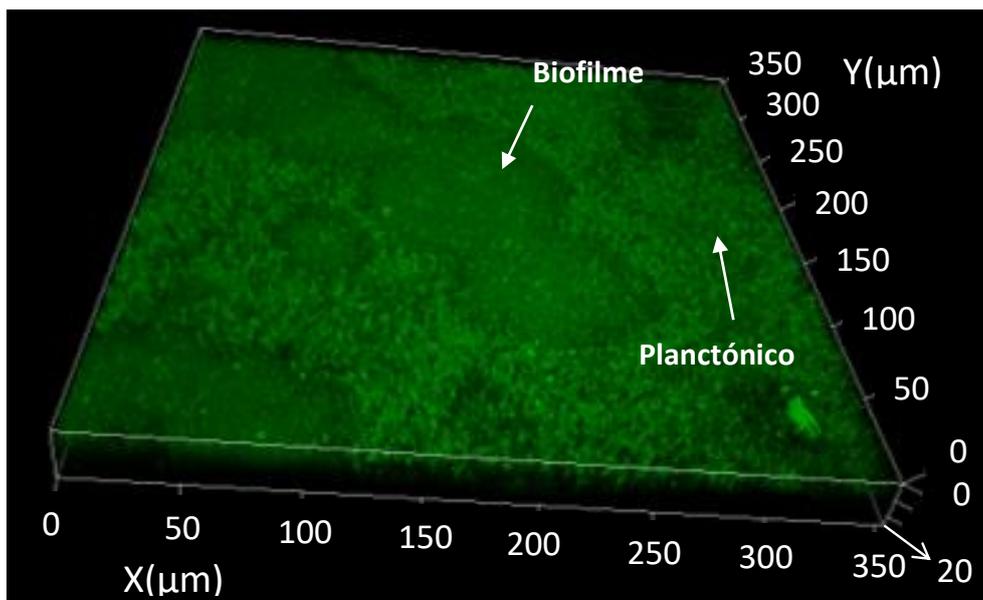


Figura 3.23- Imagens 3D de microscopia confocal do biofilme de *S. aureus* formado

De seguida, soluções de 1 μM de ambos os compostos foram adicionados a placas independentes e a intensidade de fluorescência no interior do biofilme foi seguida ao longo do tempo de incubação de cada composto (30 min e 1 h para os fotossensibilizadores, **2.8** e **2.11**, respetivamente), representado no gráfico da figura 3.24. Não foi possível utilizar a concentração de 5,2 nM para este estudo no caso do composto **2.11** devido à dificuldade em detetar fluorescência (é de notar que, para além da baixa concentração, este possui baixo rendimento quântico de fluorescência, $\phi_F=0,10 \pm 0,02$, Tabela 3.3). Tal como se observa na figura 3.24, no caso do composto **2.11**, a intensidade de fluorescência no interior do biofilme aumenta bastante mais em relação ao composto **2.8**, demonstrando uma elevada acumulação deste composto no interior dos biofilmes.

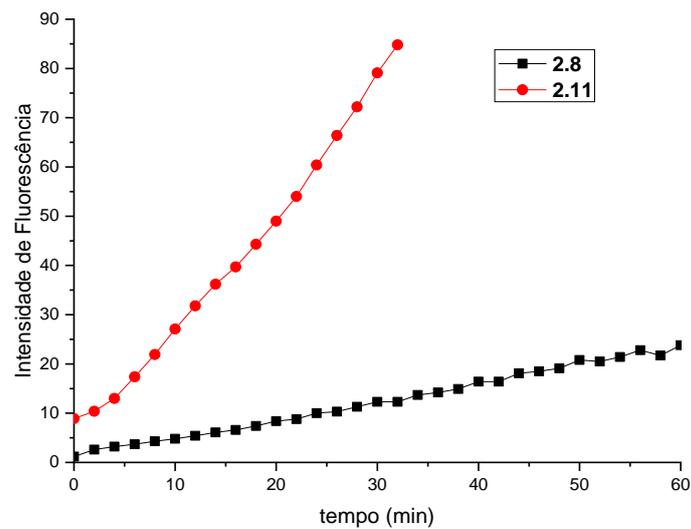
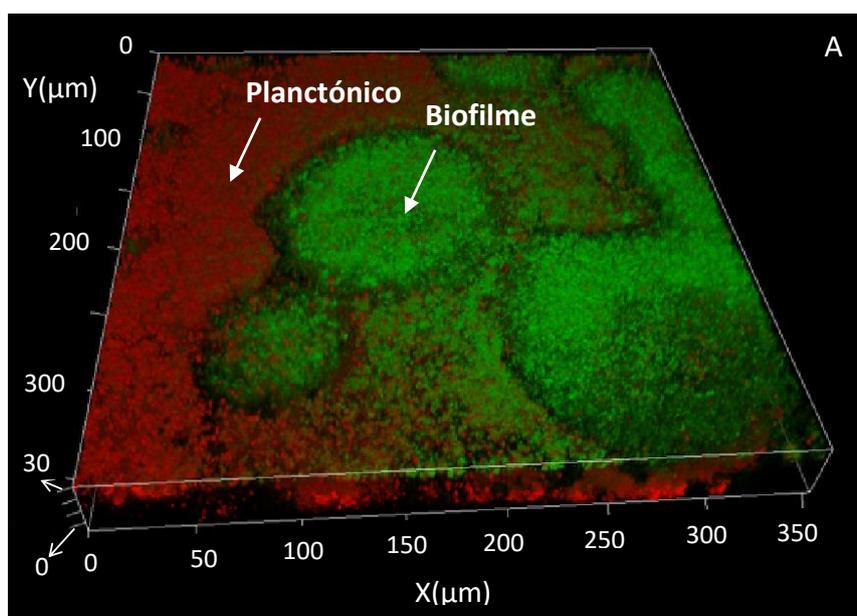


Figure 3.24- Intensidade de fluorescência no interior dos biofilmes monitorizada por microscopia confocal durante o período de incubação de cada fotossensibilizador

Foram ainda adquiridas imagens 3D após o tempo de incubação, que se encontram na figura 3.25, A e B, e gravados vídeos que acompanham este tempo. Nestas, observa-se de uma forma clara e visual a diferença de localização preferencial de cada composto, sendo que o fotossensibilizador **2.8** se localiza maioritariamente na zona planctónica e o **2.11** no interior do biofilme.



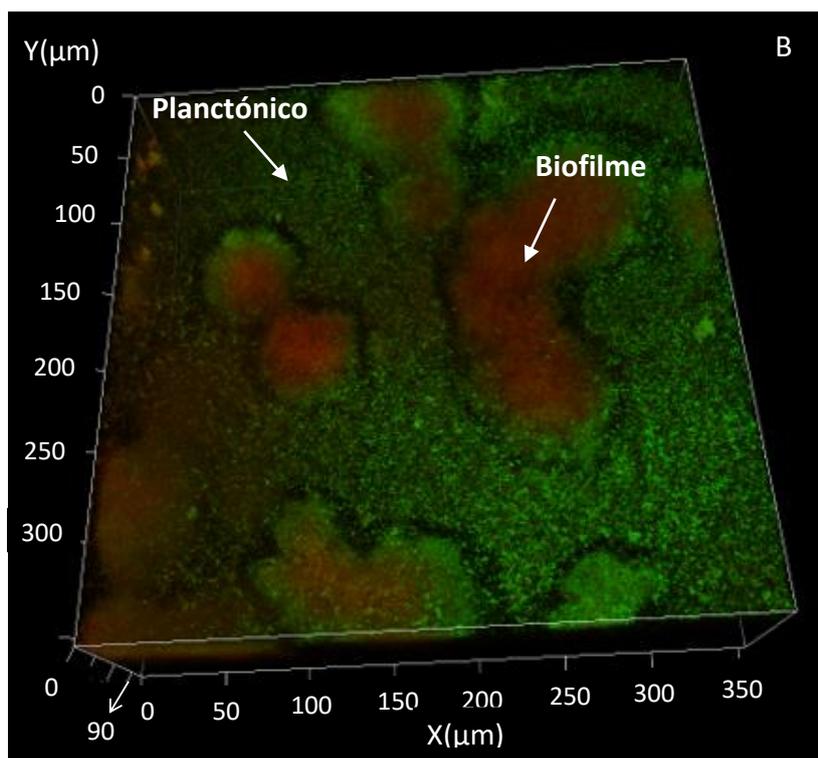


Figura 3.25- Imagens 3D de microscopia confocal do fotossensibilizador (A) **2.8** e (B) **2.11** após o período de incubação em biofilmes de *S. aureus*

Desta forma, a microscopia confocal permitiu-nos compreender a diferença na inativação bacteriana observada, demonstrando que o fotossensibilizador **2.11** possui uma maior atividade devido à sua capacidade de difusão e penetração em biofilmes. Formulou-se a hipótese destes resultados serem atribuídos ao menor peso molecular, conjugado com a redução do número de cargas e consequente aumento da anfifilicidade. Para racionalizar estes dados, foram efetuados cálculos computacionais que se descrevem na secção seguinte.

3.2.5- Comparação com o melhor fotossensibilizador descrito na literatura

Face aos extraordinários resultados obtidos no decorrer do trabalho, decidimos realizar uma comparação crítica com o fotossensibilizador mais estudado em aPDT e que apresenta dos melhores resultados descritos até ao momento em biofilmes, a **Zn-TMPyP** (Figura 3.26). Tal como referido acima, a **Zn-TMPyP** é responsável pela inativação de $6,3 \log_{10}$ em biofilmes de *S. aureus* com $20 \mu\text{M}$ de fotossensibilizador e doses de luz de $64,9 \text{ J/cm}^2$.⁵⁷

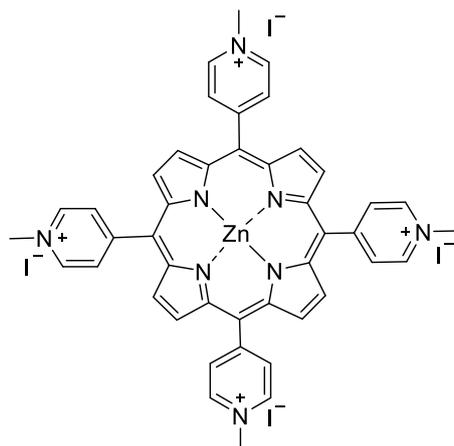


Figura 3.26- Estrutura da **Zn-TMPyP**, usada como comparativo neste trabalho

Os estudos comparativos iniciaram-se pela realização de ensaios com bactérias em solução, quer de estirpes ATCC, quer multirresistentes coletadas no Hospital da Universidade de Coimbra, utilizando exatamente o mesmo protocolo previamente descrito para os fotossensibilizadores desenvolvidos no decorrer deste trabalho (60 minutos de incubação e uma dose de luz de $1,36 \text{ J/cm}^2$). A concentração selecionada foi de $1 \mu\text{M}$, uma vez que foi a concentração necessária para o PS **2.8** inativar todas as estirpes bacterianas (Figura 3.18 e 3.19). Os resultados encontram-se sumarizados na figura 3.27.

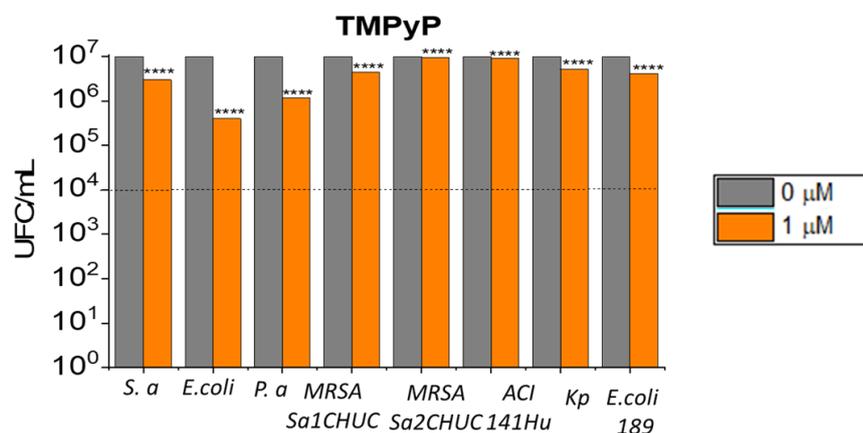
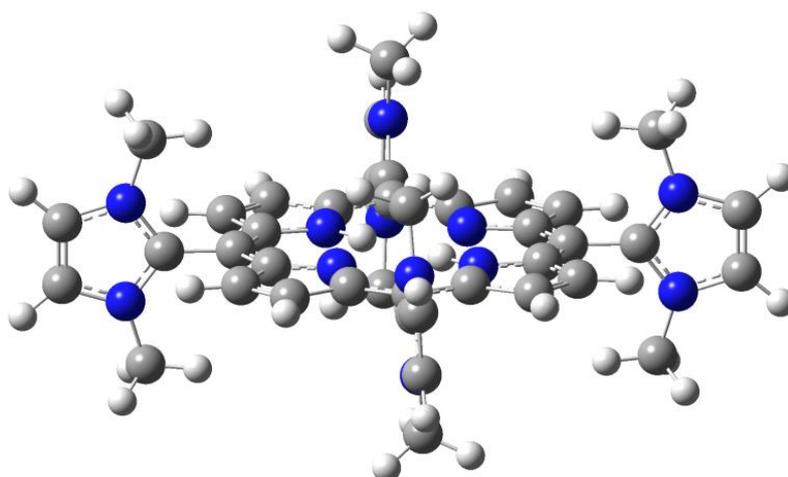


Figura 3.27- Resultados planctónicos de aPDT para a **Zn-TMPyP** com um tempo de incubação de 60 minutos e uma dose de luz de $1,36 \text{ J/cm}^2$

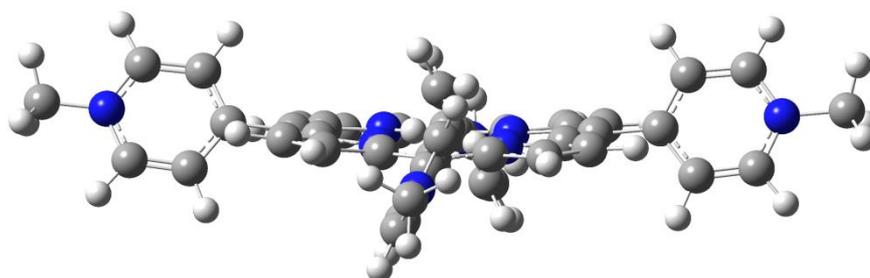
Como se pode observar na figura 3.27, na mesma concentração que o PS **2.8** consegue inativar todas as estirpes bacterianas ($1 \mu\text{M}$), a **Zn-TMPyP** provoca uma

redução de apenas 0,5-1,5 \log_{10} em estirpes ATCC e de 0-0,5 \log_{10} em bactérias multirresistentes, sendo este um efeito praticamente nulo.

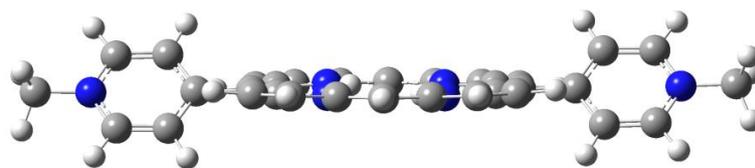
Numa tentativa de racionalização destas diferenças tão notórias entre os fotossensibilizadores desenvolvidos no decorrer do trabalho apresentado nesta Tese e o descrito na literatura, realizaram-se cálculos de DFT. Os cálculos foram realizados pelo laboratório de Sistemas Multicomponentes do Centro de Química de Coimbra no Departamento de Química da FCTUC, pelo Prof. Doutor Alberto Canelas Pais e pela Doutora Sandra C.C. Nunes. As estruturas foram otimizadas no nível de teoria de DFT, usando o híbrido funcional B3LYP e a base de funções convencional 6-31G (d, p). Nas figuras 3.28 e 3.29 apresentam-se as estruturas moleculares dos complexos de base livre e das metaloporfirinas catiónicas otimizadas.



2.7

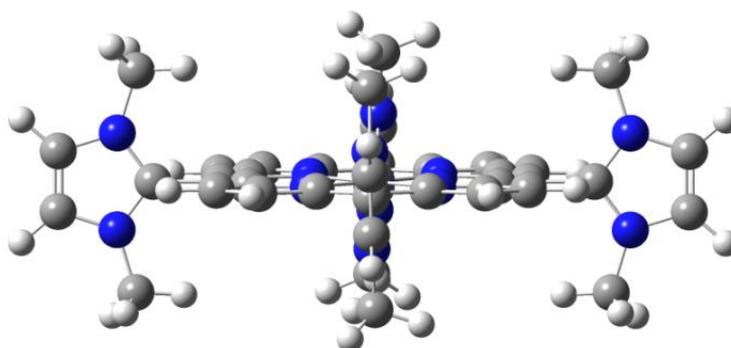


TMPyP

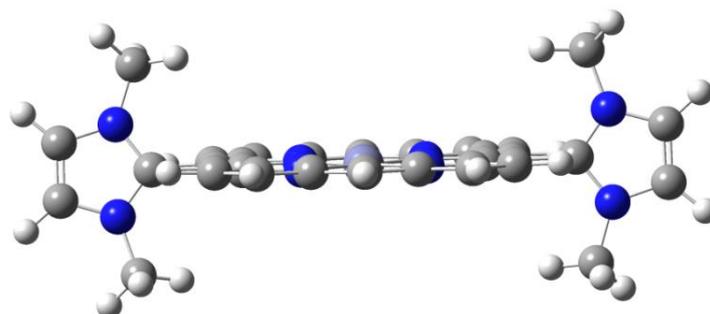


DMPyP

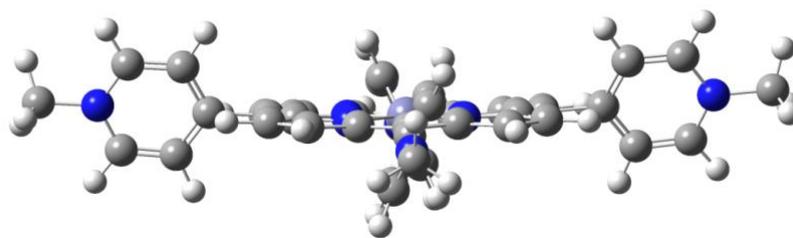
Figura 3.28- Estruturas moleculares de porfirina catiónicas de base livre otimizadas ao nível B3LYP/6-31G(d,p)



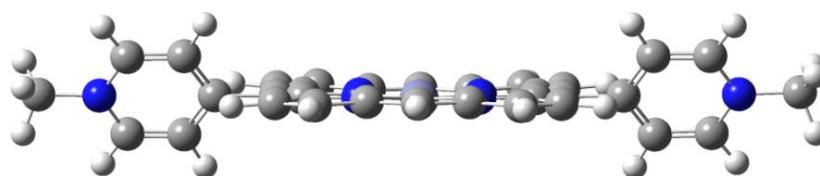
2.8



2.11



Zn-TMPyP



Zn-DMPyP

Figura 3.29- Estruturas moleculares de complexos de zinco de porfirina catiónicas otimizadas ao nível B3LYP/6-31G(d,p)

Os valores dos ângulos diedros que definem a orientação relativa do anel aromático dos substituintes relativamente ao macrociclo central, calculados utilizando o programa Gaussian, encontram-se na tabela 3.5.

Tabela 3.5-Ângulos diedros calculados pelo *Gaussian*, que indicam a orientação do anel substituinte relativamente ao macrociclo, em cada uma das posições *meso* das porfirinas.

Posição no macrociclo	2.8	2.10	2.11	Zn-TMPyP	DMPyP	Zn-DMPyP
5	92,2 °	-97,3 °	82,5 °	65,6 °	-50,8 °	55,0 °
10	92,7 °	-	-	69,1 °	-	-
15	87,2 °	103,0 °	101,9 °	65,4 °	50,8 °	124,8 °
20	91,0 °	-	-	115,0 °	-	-

Os cálculos revelaram que o substituinte 1,3-dimetilimidazol-2-il leva a ângulos diédricos muito próximos de 90 °, ao passo que tais ângulos em porfirinas com substituintes *N*-metilpiridil são muito menores. Isto significa que o anel imidazole é quase ortogonal ao macrociclo, não sendo o mesmo verdade para o anel piridil.

As figuras 3.30 e 3.31 apresentam as cargas de Mulliken para as porfirinas catiónicas de base livre e os respectivos complexos de zinco (II). Estes cálculos revelam que os átomos de hidrogénio dos grupos metilo ligados aos átomos de azoto do anel imidazole têm uma densidade de carga positiva notavelmente elevada. Por exemplo, para o fotossensibilizador **2.8** a carga de Mulliken em tais átomos de hidrogénio é: 0,20; 0,20 e 0,15 para um metilo, e 0,20; 0,15; 0,20 para o metilo no outro lado do macrociclo, e valores muito semelhantes são encontrados para os outros três anéis imidazole. Além disso, os átomos de hidrogénio estão localizados acima e abaixo do plano do macrociclo, rodeando-o, o que é consequência da ortogonalidade entre o grupo imidazole e o macrociclo. Para a **Zn-TMPyP**, cargas similares estão presentes nos átomos de hidrogénio dos grupos metilo ligados ao átomo de nitrogénio do anel piridil: 0,20, 0,20 e 0,19. No entanto, esses átomos de hidrogénio estão distantes do macrociclo e direcionados para longe dele.

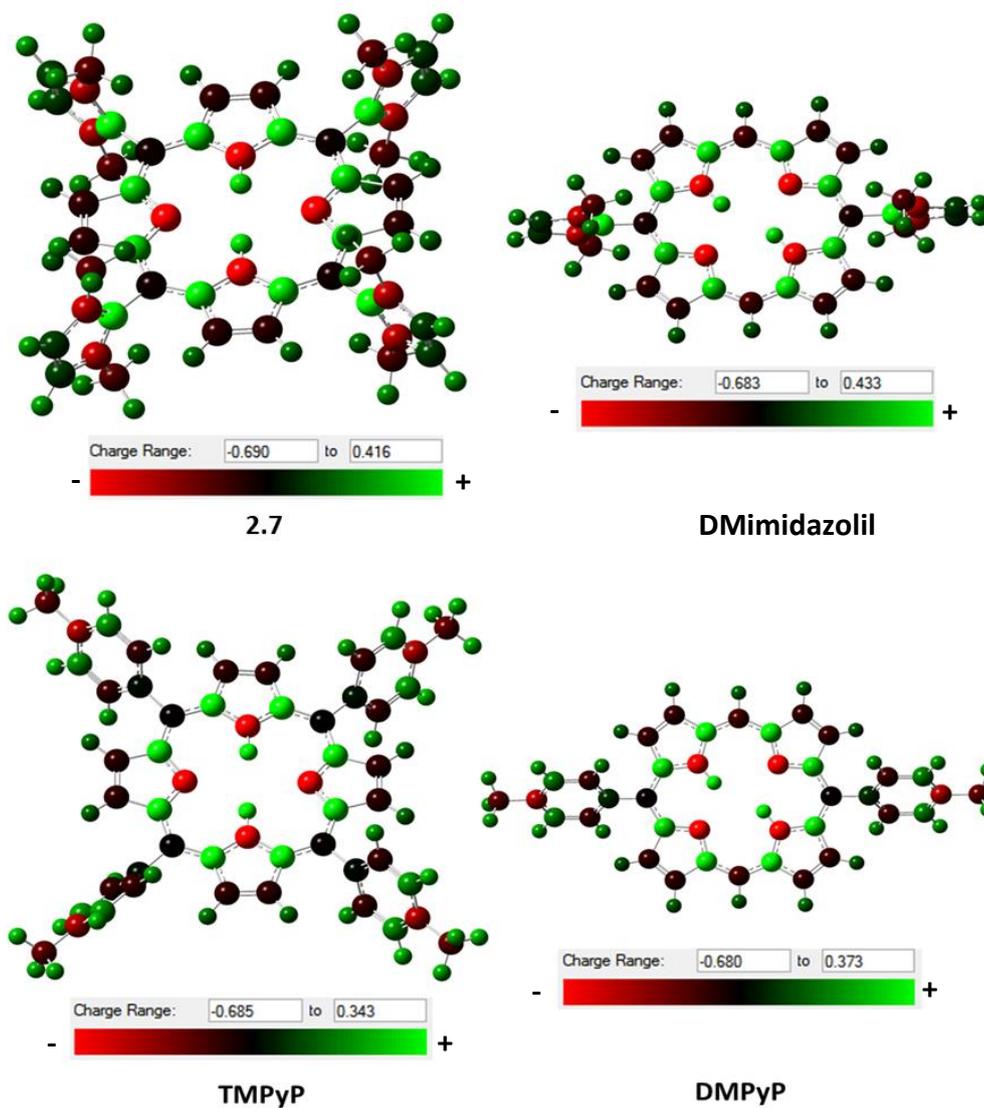


Figura 3.30 -Cargas de Mulliken de porfirinas catiónicas de base livre otimizadas ao nível B3LYP/6-31G(d,p)

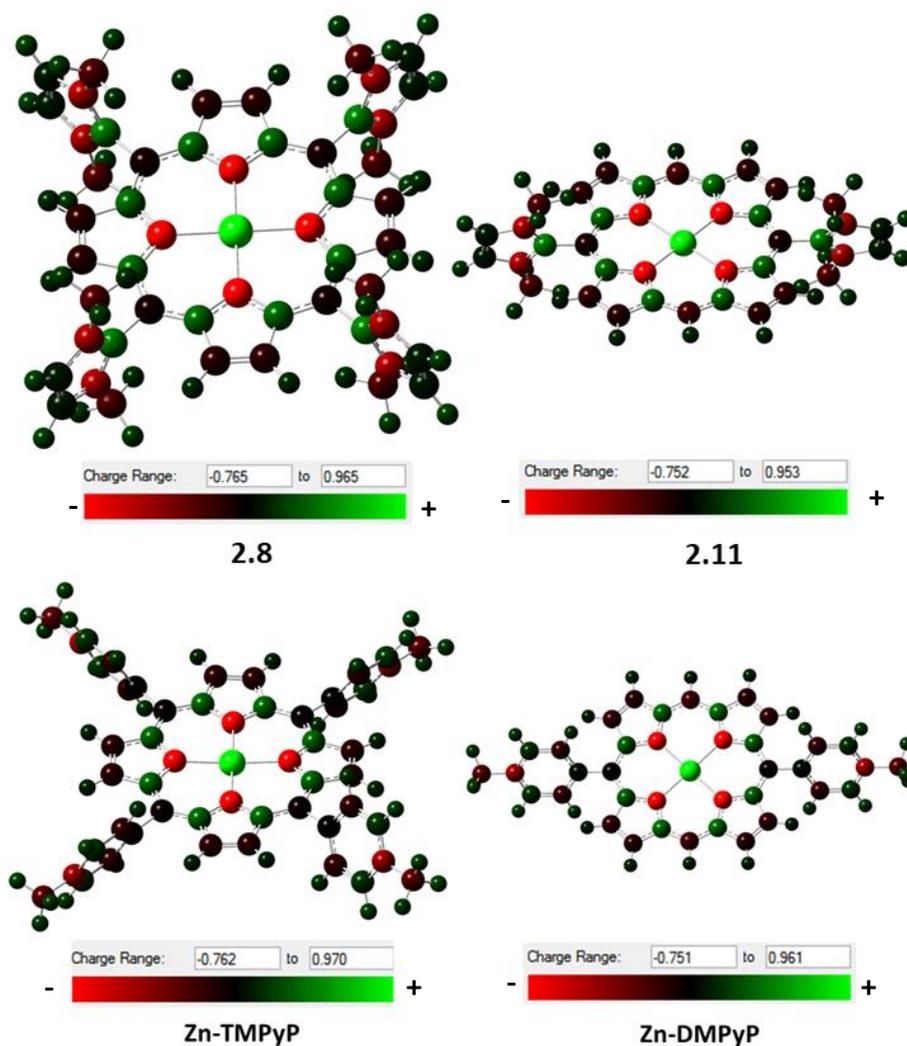


Figura 3.31 -Cargas Mulliken de complexos de zinco (II) de porfirinas catiónicas otimizadas ao nível B3LYP/6-31G(d,p)

Por fim, os dados obtidos foram corroborados pelos mapas de densidade eletrónica para os diversos compostos sem os seus contra iões (Figura 3.32). Nestes, observou-se que os fotossensibilizadores **2.8** e **2.11** apresentam uma densidade de carga positiva em redor do macrociclo significativamente superior que a **Zn-TMPyP**.

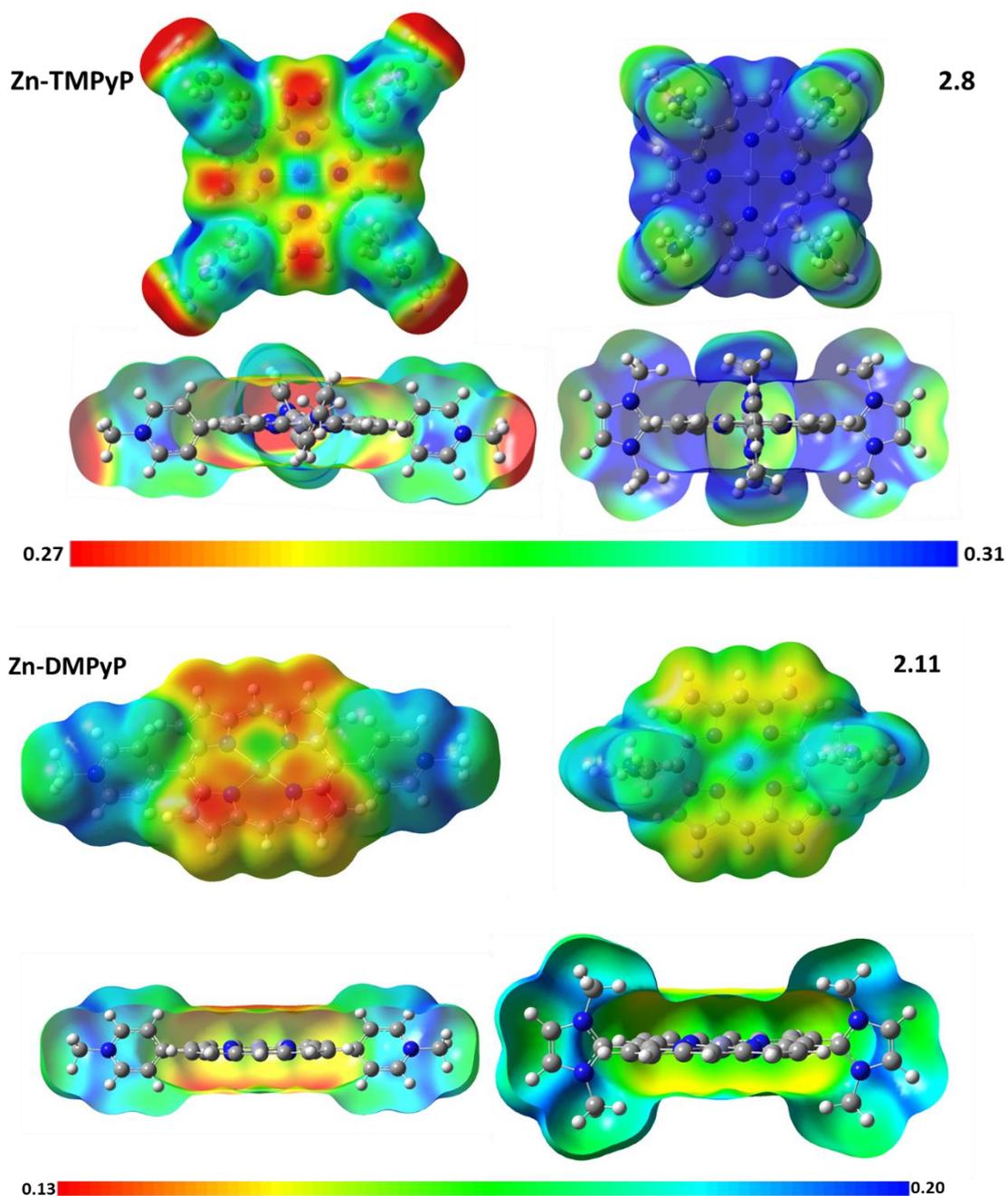


Figura 3.32- Densidade eletrónica dos fotossensibilizadores **Zn-TMPyP**, **Zn-DMPyP**, **2.8** e **2.11** sem os seus contra iões, usando o método B3LYP/6-31G(d,p) representado através do potencial electrostático, (*isovalue*=0,0004).

Desta forma podemos colocar como hipótese que, tanto a geometria ótima do substituinte 1,3-dimetilimidazol-2-il em relação ao macrociclo (90 °), como a densidade de carga em redor do macrociclo contribuem para a amplificação da sua interação com as membranas bacterianas e consequentemente aumento da sua atividade. Este estudo

também realça a relevância do recurso a cálculos computacionais para melhorar o *design* de novos fotossensibilizadores. Tal facto é de grande importância para o desenvolvimento da indústria farmacêutica.

Adicionalmente, realizaram-se também estudos em microscopia confocal de modo a determinar a localização preferencial da **Zn-TMPyP**, tendo-se observado que esta, tal como o PS **2.8**, de maior peso molecular e 4 cargas positivas, permanece na parte planctónica do biofilme, sendo por isso necessário uma concentração superior de dose de luz e de composto para a inativação destes ($20\ \mu\text{M}$ e doses de luz de $64,9\ \text{J}/\text{cm}^2$) (Figura 3.33).⁵⁷

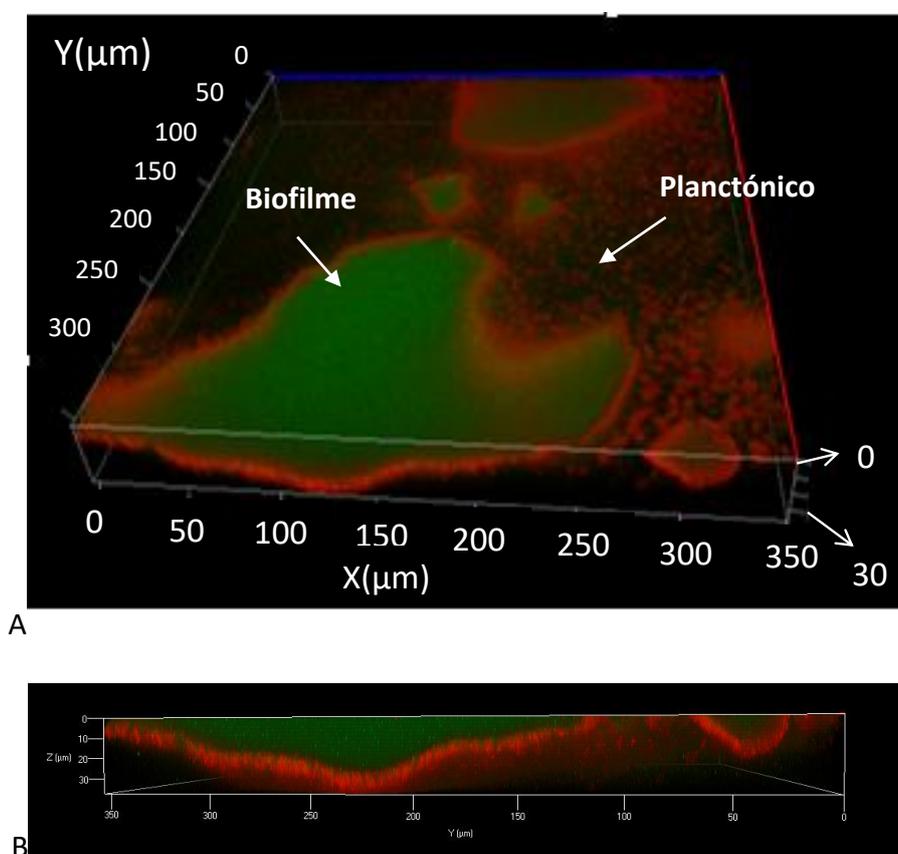


Figura 3.33- Imagens 3D de microscopia confocal do fotossensibilizador **Zn-TMPyP** após 60 minutos de incubação em biofilmes de *S. aureus* (A) secção de corte (B) parede do biofilme.

Estes estudos comparativos reforçam que os resultados obtidos no decorrer do trabalho desenvolvido nesta Tese, com doses de luz e de composto tão baixos, são muito

promissores e dos melhores descritos até ao momento, estando por isso numa posição privilegiada para demonstrar a eficácia da aPDT como uma forma alternativa para a resolução da problemática das infeções causadas por bactérias multirresistentes.

3.2.6- Estudos de cito e fototoxicidade

Devido aos resultados promissores obtidos nos estudos em bactérias, a toxicidade no escuro foi realizada nas duas linhas celulares representativas da nossa pele: Fibroblastos (HDFn) e Queratinócitos (HaCaT). As células foram plaqueadas com uma concentração de 5,000 células por poço. De seguida, as células foram incubadas com diferentes concentrações do potencial fármaco (5,2 nM; 1 µM; 2,8 µM; 7,15 µM e 10 µM). Células controlo, sem adição do composto, são incubadas nas mesmas condições. Passado 24 horas, remove-se a porfirina, lavam-se as células com PBS e avalia-se a viabilidade celular com recurso ao método do MTT, de acordo com o referido no ponto 3.1.4 e, mais detalhadamente, no capítulo 6. Foram realizados três ensaios independentes, cada um com poços em triplicado. A análise dos resultados encontra-se em registo gráfico na figura 3.34. As flutuações apresentadas devem-se à variabilidade característica deste tipo de ensaios.

Verifica-se que nenhum dos compostos é tóxico, quer em fibroblastos quer em queratinócitos, nas concentrações utilizadas nos estudos em bactérias planctónicas (10 nM-1 µM) e biofilmes (5,2 nM-1 µM). Adicionalmente, a linha celular dos queratinócitos é mais sensível ao composto **2.11**, observando-se o aparecimento de sinais de toxicidade em concentrações $\geq 2,8$ µM (Viabilidade média 90%).

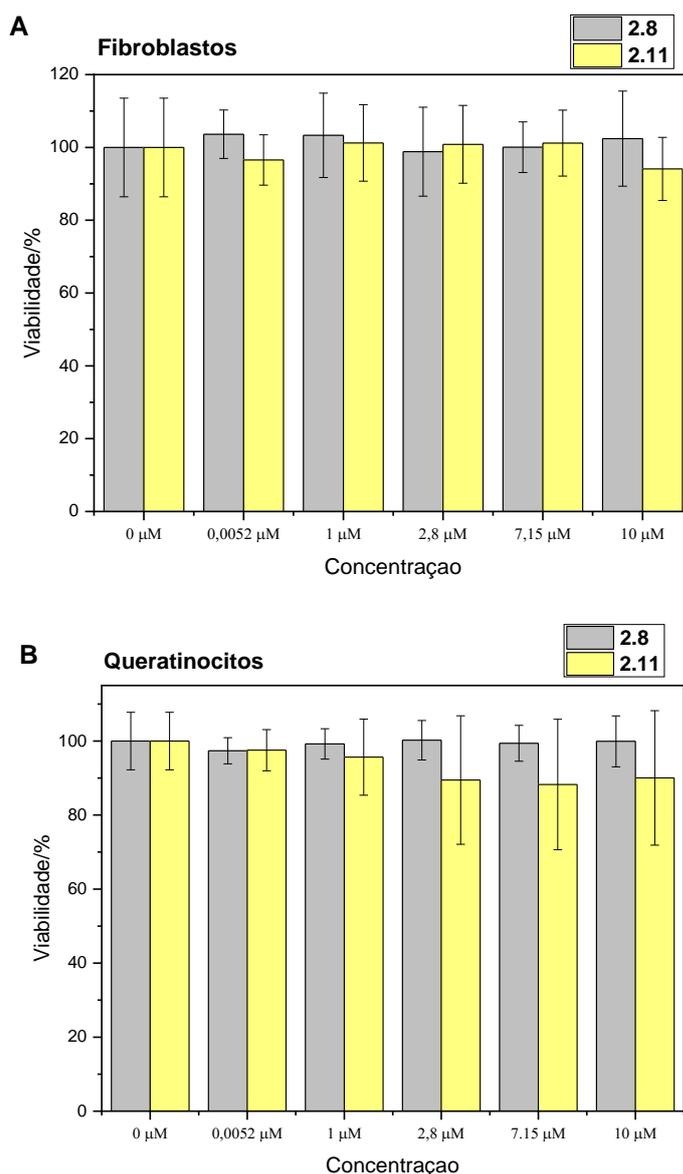


Figura 3.34- Citotoxicidade no escuro das porfirinas **2.8** e **2.11** realizada em (A) Fibroblastos (HDFn) (B) Queratinócitos (HaCaT)

Uma vez que a terapia fotodinâmica antimicrobiana recorre à irradiação da zona afetada, no caso da aplicação pretendida na pele humana, é de elevado interesse avaliar a fototoxicidade dos potenciais fármacos. Neste sentido, foi realizado um estudo usando os mesmos tempos de incubação (30 min e 1 h **2.8** e **2.11**, respetivamente) e doses de luz (Biotable®, 12 J/cm² e 5 J/cm² para as porfirinas **2.8** e **2.11**, respetivamente) usados nos estudos de avaliação da atividade antibacteriana em biofilmes. Mais uma vez, a viabilidade celular foi determinada com recurso ao método do MTT e os resultados encontram-se compilados na figura 3.35. Tendo em conta que concentrações de 5,2 nM

do composto **2.11** permitiram uma fotoinativação praticamente total de biofilmes bacterianos, podemos concluir que existe um certo grau de seletividade na interação do fotossensibilizador com as membranas das bactérias, o que permite estabelecer uma janela terapêutica de várias ordens de grandeza. Também com irradiação se observa a maior sensibilidade dos queratinócitos ao composto **2.11**, apesar de em concentrações mais de 1000 x superiores à necessária para eliminação dos biofilmes.

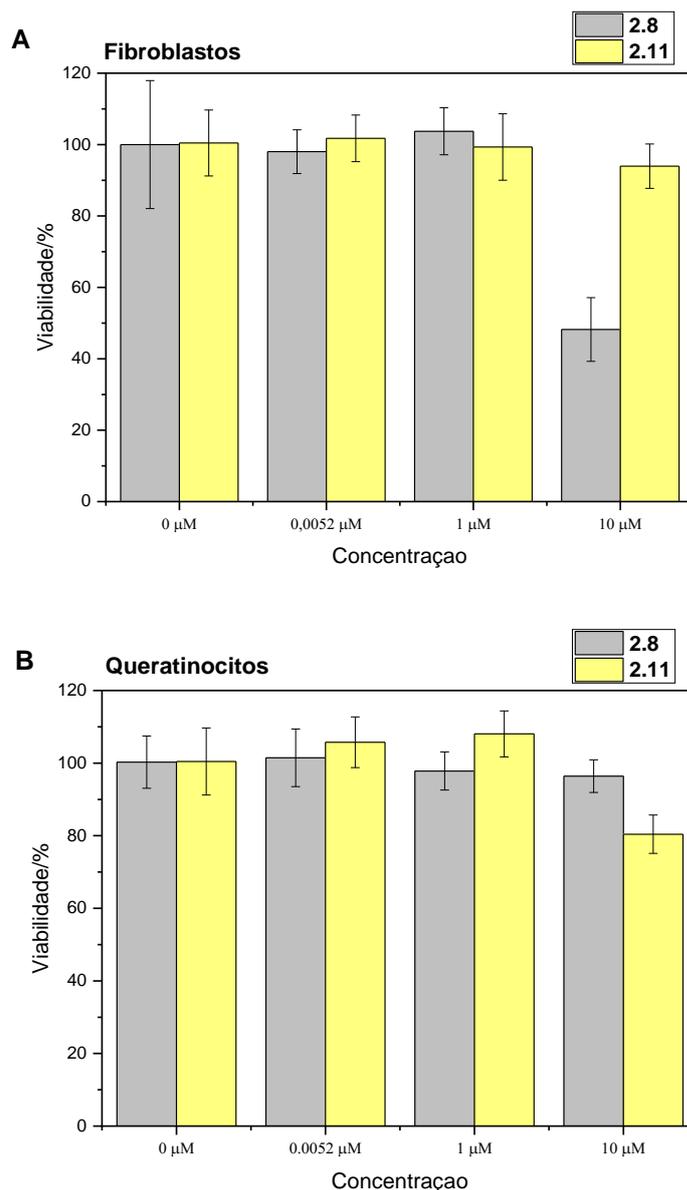


Figura 3.35- Fototoxicidade das porfirinas **2.8** e **2.11** realizada em (A) Fibroblastos (HDFn) (B) Queratinócitos (HaCaT). Uma dose de luz de 12 J/cm² e 5 J/cm² foi utilizada para as porfirinas **2.8** e **2.11**, respetivamente.

Desta forma, podemos concluir que, tanto no escuro como com luz, nenhum dos fotossensibilizadores apresenta toxicidade nas linhas celulares do tecido alvo nas concentrações necessárias para a sua potencial aplicação.

3.3- Conclusão e seleção do composto Líder (Lead compound)

Como foi discutido no capítulo 1 e no texto introdutório deste capítulo, um fotossensibilizador “ideal” para a ser aplicado em aPDT, deve possuir as seguintes propriedades: 1) elevada capacidade de absorção de luz (elevados valores de ϵ); 2) elevada capacidade de formação de ROS; 3) elevada fotoestabilidade durante a irradiação; 4) alguma hidrofiliabilidade e/ou cargas positivas para aumentar a afinidade e capacidade de interação com as paredes bacterianas carregadas negativamente; 5) não ser citotóxico nem fototóxico em células humanas nas concentrações e doses de luz utilizadas em terapêutica e 6) capacidade de difusão em biofilmes.

Relativamente à família II (fotossensibilizadores bimodais), foi discutido no capítulo 2 e resumido na tabela 3.1 do presente capítulo a sua elevada capacidade de absorção da luz no caso das porfirinas, com máximos a 411-413 nm ($2,4 \times 10^5$ e $5,8 \times 10^4$ $M^{-1}cm^{-1}$), e no caso das bacterioclorinas, com máximos entre 743-745 nm e com valores de ϵ na ordem dos 10^5 $M^{-1}cm^{-1}$. Além disso, observou-se uma elevada formação de oxigénio singuleto por parte das porfirinas, $\phi_{\Delta} = 0,70-0,74$, assim como uma fotoestabilidade adequada ($\phi_{\Delta} = 10$ e 48×10^{-6}). O cálculo dos coeficientes de partição permitiu demonstrar uma grande influência do número de substituições com grupos sulfonamida na anfifilicidade das moléculas, sendo que um maior grau de substituição com estas moléculas mais polares levou a um aumento da hidrofiliabilidade do fotossensibilizador ($\log P = 0,94$ e >3 , para os PSs **2.2** e **2.3**, respetivamente). Como seria de esperar, o grau de redução do macrociclo tem uma influência mínima nos valores de $\log P$. Ao realizarmos os estudos planctónicos em bactérias, observamos uma baixa atividade quer em estirpes Gram-positivo quer Gram-negativo, conseguindo apenas o composto **2.2** reduzir colónias de bactérias *S. aureus* em 7 ordens de grandeza ($7 \log_{10}$) com a concentração elevada de 100 μM e 10 J/cm^2 de dose de luz. Dado que os resultados em bactérias planctónicas obtidos com esta família de fotossensibilizadores bimodais não foram promissores, não prosseguimos os estudos em bactérias multirresistentes e biofilmes.

Por outro lado, na família III (fotossensibilizadores catiónicos do tipo imidazolil porfirinas) observou-se uma formação de oxigénio singuleto mais baixa ($\phi_{\Delta} = 0,18$ e $0,44$, para os PSs **2.7** e **2.8**), estando apenas ao nível da família anterior o PS **2.11**, $\phi_{\Delta} = 0,75$. A nível de fotoestabilidade, todas exibem valores elevados, superiores à **TMPyP** descrita na literatura como muito fotoestável ($\phi_{Pd} = 4 \times 10^{-5}$ e 8×10^{-6} , respetivamente para **2.8** e **2.11**). Os resultados obtidos para os coeficientes de partição revelam que, tal como esperado, a presença de cargas positivas aumenta a hidrofiliicidade do fotossensibilizador, apresentando ambas as porfirinas **2.8** e **2.11** valores de coeficientes de partição negativos ($-1,81$ e $-1,16$). De seguida, realizaram-se estudos em bactérias planctónicas, observando-se uma inativação bacteriana extremamente elevada para o fotossensibilizador **2.8**, com maior peso molecular, quatro cargas e metal central zinco (II), inativando bactérias de todas as estirpes com 1000 e 100 nM (redução de $7 \log_{10}$ UFCs). Com resultados tão promissores, avançamos para estudos em bactérias multirresistentes coletadas de pacientes do Hospital da Universidade de Coimbra. Os graus de inativação obtidos foram excelentes, sendo que o PS **2.8** inativa todas as estirpes com uma concentração de 1 μ M, demonstrando a premissa original de que a aPDT tem potencial para ser aplicada com sucesso em estirpes com resistência aos antibióticos atuais. Deste modo, prosseguimos com a avaliação em biofilmes da estirpe *S. aureus* ATCC 25925 e, curiosamente, observou-se uma clara inversão dos resultados, sendo que o composto com menor peso molecular e apenas duas cargas, **2.11**, apresentou um efeito microbicida praticamente total ($6,9 \log_{10}$) com apenas 5,2 nM de composto. Estudos de microscopia confocal ajudaram-nos a perceber o porquê desta inversão, revelando uma diferença na localização preferencial de cada composto, sendo que o fotossensibilizador **2.8** se localiza maioritariamente na zona planctónica, enquanto que o **2.11** tem a capacidade de difundir para o interior do biofilme. Adicionalmente, verifica-se que nenhum dos compostos é tóxico no escuro em linhas celulares representativas da pele (HDFn – fibroblastos; HaCaT – queratinócitos), nas concentrações utilizadas nos estudos em bactérias planctónicas e biofilmes (5,2 nM-1 μ M). A nível da fototoxicidade, observou-se uma maior sensibilidade dos queratinócitos ao composto **2.11**, apesar de em concentrações mais de 1000 x superiores às necessárias para eliminação dos biofilmes (10 μ M). Assim, tendo em conta que a concentração de 5,2 nM do composto **2.11** permitiu uma fotoinativação praticamente

total de biofilmes bacterianos ($6,9 \log_{10}$), podemos concluir que existe um certo grau de seletividade na interação do fotossensibilizador com as membranas das bactérias, o que permite estabelecer uma janela terapêutica de várias ordens de grandeza.

De facto, a transposição dos estudos *in vitro* para modelos *in vivo* e, posteriormente, para aplicação clínica implica um aumento considerável na complexidade dos sistemas biológicos. Os estudos iniciais em culturas planctónicas de bactérias constituem um bom modelo para um ensaio preliminar/*screening* sobre quais os fotossensibilizadores que são, à partida, mais promissores e quais não possuem características estruturais/fotoquímicas que lhes conferem atividades antimicrobianas satisfatórias. A transposição dos nossos estudos para biofilmes introduziu um grau de complexidade adicional ao sistema, visto que a estrutura heterogénea dos biofilmes, apresentada e explicitada no capítulo 1 desta Tese, irá alterar a acessibilidade/permeação dos fotossensibilizadores, o que dá uma enorme relevância a fatores como o peso molecular ou a anfifilicidade, algo que não seria possível constatar nos ensaios preliminares que efetuamos em culturas planctónicas.

Com base nos resultados resumidos acima, podemos selecionar como *Lead compound* o composto que se apresenta como um dos fotossensibilizadores mais eficientes para inativação bacteriana descrito até ao momento na literatura, facto reforçado pelos estudos comparativos com a **TMPyP**, o fotossensibilizador **2.11**. A figura 3.36 sumariza, assim, as etapas de desenvolvimento realizadas até ao momento.

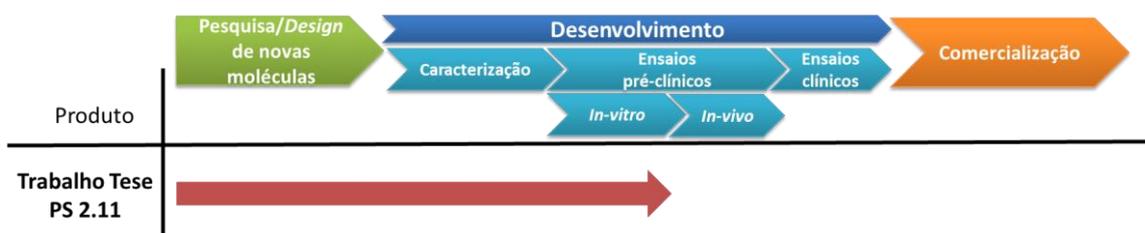


Figura 3.36- Etapa de desenvolvimento do fotossensibilizador antibacteriano descrito no decorrer desta Tese

No decorrer desta Tese, um grande trabalho foi desenvolvido na síntese, caracterização e avaliação *in vitro* de novos fotossensibilizadores. No entanto, após esta seleção do *Lead Compound* (PS **2.11**) ainda existe um grande caminho pela frente. O primeiro passo consistiu na proteção de inovação com um pedido de patente em

Portugal do composto e seus derivados para a sua aplicação na fotoinativação de microrganismos.⁵⁹

O passo seguinte consistirá na síntese do composto em escala multi-grama (*scale-up*) e sua realização em condições GMP (do inglês, *Good manufacturing practices*). Para este aspeto será necessária uma otimização do método de síntese, de modo a reduzir a quantidade de solvente e de agente oxidante (DDQ) utilizados no primeiro passo reacional, ou mesmo a substituição destes por alternativas ambiental e economicamente mais sustentáveis. Em particular, a remoção do DDQ leva a um grande dispêndio de solventes e tempo, além da elevada toxicidade associada ao reagente e produtos de hidrólise resultante das lavagens. O recurso ao método de água/micro-ondas abordado no capítulo 2 poderá ser uma solução.

De seguida, será necessário selecionar o modelo animal mais adequado e realização de um estudo de transposição de doses de fotossensibilizadores e luz, uma vez que estudos reportam o uso de concentrações 5-10 vezes superiores *in vivo* comparativamente a *in vitro*, bem como o aumento significativo de doses de luz.⁶⁰ Este facto pode ser uma consequência de i) dispersão/absorção da luz nos tecidos, levando a que chegue uma menor intensidade de luz ao fotossensibilizador; ii) menor difusão do fotossensibilizador nos tecidos cutâneos devido à morfologia da pele, que lhe confere um efeito protetor; iii) a quantidade de O₂ em tecidos poder ser menor que em solução, diminuindo o rendimento quântico de formação de ROS.

Com a introdução de ensaios *in vivo*, a seletividade dos compostos para a fotoinativação de microrganismos torna-se um fator mais relevante dado que, apesar de se tratar de uma aplicação tópica, é necessário evitar a destruição dos tecidos circundantes do hospedeiro. Segundo os dados obtidos pelos autores da publicação supracitada, existia uma dose de luz ideal para efetuar o tratamento, de tal modo a que ocorresse diminuição da infeção bacteriana sem aumentar a área do tecido cicatrizante. Doses de luz muito elevadas geravam efeitos indesejados no tratamento, na medida em que atrasavam a cicatrização.

Pelas considerações efetuadas, é fácil perceber as vantagens terapêuticas que o fotossensibilizador **2.11** possui, uma vez que apresenta características mais favoráveis

ao nível de anfifilicidade e tamanho para difundir pelos tecidos e, assim, manter a sua eficácia mesmo em sistemas biológicos mais complexos, tal como acontece nos ensaios *in vivo*. Além disso, apresentou um alargado espectro de ação microbicida a baixas concentrações (5,2-1000 nM), o que aumentará a sua capacidade de tratar infeções causadas por múltiplas estirpes bacterianas. As baixas concentrações e doses de luz necessárias para uma inativação de 7 ordens de grandeza levam a que: i) a sua aplicação em áreas extensas, como por exemplo queimaduras, se torne economicamente viável; ii) diminua os danos em tecidos humanos e, conseqüentemente, reduza o tempo de cicatrização e a área do tecido cicatrizante; iii) apesar de o tratamento exigir uma fonte de luz localizada, tempos de irradiação baixos permitem a aplicação do tratamento de forma mais célere em áreas extensas, com maior *compliance* por parte dos doentes e médicos.

3.4-Referências

1. DiMasi, J. A.; Grabowski, H. G.; Hansen, R. W., Innovation in the pharmaceutical industry: New estimates of R&D costs. *J. Health Econ.* **2016**, *47*, 20-33.
2. Cieplik, F.; Späth, A.; Regensburger, J.; Gollmer, A.; Tabenski, L.; Hiller, K.-A.; Bäumlner, W.; Maisch, T.; Schmalz, G., Photodynamic biofilm inactivation by SAPYR—An exclusive singlet oxygen photosensitizer. *Free Radical Biol. Med.* **2013**, *65*, 477-487.
3. Cieplik, F.; Deng, D. M.; Crielaard, W.; Buchalla, W.; Hellwig, E.; Al-Ahmad, A.; Maisch, T., Antimicrobial photodynamic therapy - what we know and what we don't. *Crit. Rev. Microbiol.* **2018**, *44* (5), 571-589.
4. Kasha, M., Characterization of electronic transitions in complex molecules. *Discuss. Faraday Soc.* **1950**, *9* (0), 14-19.
5. Gensch, T.; Viappiani, C., Time-resolved photothermal methods: accessing time-resolved thermodynamics of photoinduced processes in chemistry and biology. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2003**, *2* (7), 699-721.
6. Taniguchi, M.; Cramer, D. L.; Bhise, A. D.; Kee, H. L.; Bocian, D. F.; Holten, D.; Lindsey, J. S., Accessing the near-infrared spectral region with stable, synthetic, wavelength-tunable bacteriochlorins. *New J. Chem.* **2008**, *32* (6), 947-958.
7. Parker, C. A.; Rees, W. T., Correction of fluorescence spectra and measurement of fluorescence quantum efficiency. *Analyst* **1960**, *85* (1013), 587-600.
8. Murov, S. L.; Hug, G. L.; Carmichael, I., *Handbook of photochemistry*. M. Dekker: New York, 1993.
9. Pinto, S. M. A. Estudos de transferência de energia entre um polieletrólito e porfirinas hidrofílicas em sistemas self-assembly. Universidade de Coimbra, 2008.
10. Rurack, K.; Spieles, M., Fluorescence Quantum Yields of a Series of Red and Near-Infrared Dyes Emitting at 600–1000 nm. *Anal. Chem.* **2011**, *83* (4), 1232-1242.
11. Azenha, E. G.; Serra, A. C.; Pineiro, M.; Pereira, M. M.; Seixas de Melo, J.; Arnaut, L. G.; Formosinho, S. J.; Gonsalves, A. M. d. A. R., Heavy-atom effects on metalloporphyrins and polyhalogenated porphyrins. *Chem. Phys.* **2002**, *280*, 177-190.
12. Arnaut, L. G.; Pereira, M. M.; Dąbrowski, J. M.; Silva, E. F. F.; Schaberle, F. A.; Abreu, A. R.; Rocha, L. B.; Barsan, M. M.; Urbańska, K.; Stochel, G.; Brett, C. M. A., Photodynamic Therapy Efficacy Enhanced by Dynamics: The Role of Charge Transfer and Photostability in the Selection of Photosensitizers. *Chem. Eur. J.* **2014**, *20* (18), 5346-5357.
13. Tanielian, C.; Wolff, C., Porphyrin-Sensitized Generation of Singlet Molecular Oxygen: Comparison of Steady-State and Time-Resolved Methods. *J. Phys. Chem.* **1995**, *99* (24), 9825-9830.
14. Schmidt, R.; Tanielian, C.; Dunsbach, R.; Wolff, C., Phenalenone, a universal reference compound for the determination of quantum yields of singlet oxygen O₂(¹Δ_{g) sensitization. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **1994**, *79* (1), 11-17.}
15. Čunderliková, B.; Kaalhus, O.; Čunderlik, R.; Mateášik, A.; Moan, J.; Kongshaug, M., pH-Dependent modification of lipophilicity of porphyrin-type photosensitizers. *Photochem Photobiol.* **2004**, *79* (3), 242-247.
16. Ribeiro, M. M. B.; Melo, M. N.; Serrano, I. D.; Santos, N. C.; Castanho, M. A. R. B., Drug-lipid interaction evaluation: why a 19th century solution? *Trends Pharmacol. Sci.* **2010**, *31* (10), 449-454.
17. Péhourcq, F.; Thomas, J.; Jarry, C., A microscale HPLC method for the evaluation of octanol-water partition coefficients in a series of new-2-amino-2-oxazolines. *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.* **2000**, *23* (3), 443-453.
18. Collander, R.; Lindholm, M.; Haug, C. M.; Stene, J.; Sörensen, N. A., The Partition of Organic Compounds Between Higher Alcohols and Water. *Acta Chem. Scand.* **1951**, *5*, 774-780.

19. Hansch, C.; Fujita, T., ρ - σ - π Analysis. A Method for the Correlation of Biological Activity and Chemical Structure. *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86* (8), 1616-1626.
20. Gonçalves, N. P. F. Metilação de porfirinas para marcação com carbono-11 e potencial aplicação em imagiologia PET. Universidade de Coimbra, 2010.
21. Smart, B. E., Characteristics of C-F Systems. In *Organofluorine Chemistry: Principles and Commercial Applications*, Banks, R. E.; Smart, B. E.; Tatlow, J. C., Eds. Springer US: Boston, MA, 1994; pp 57-88.
22. Dąbrowski, J. M.; Arnaut, L. G.; Pereira, M. M.; Monteiro, C. J. P.; Urbańska, K.; Simões, S.; Stochel, G., New Halogenated Water-Soluble Chlorin and Bacteriochlorin as Photostable PDT Sensitizers: Synthesis, Spectroscopy, Photophysics, and in vitro Photosensitizing Efficacy. *Chemmedchem* **2010**, *5* (10), 1770-1780.
23. Dąbrowski, J. M.; Pereira, M. M.; Arnaut, L. G.; Monteiro, C. J. P.; Peixoto, A. F.; Karocki, A.; Urbańska, K.; Stochel, G., Synthesis, Photophysical Studies and Anticancer Activity of a New Halogenated Water-Soluble Porphyrin. *Photochem. Photobiol.* **2007**, *83* (4), 897-903.
24. da Silva, E. F. F.; Pimenta, F. M.; Pedersen, B. W.; Blaikie, F. H.; Bosio, G. N.; Breitenbach, T.; Westberg, M.; Bregnhøj, M.; Etzerodt, M.; Arnaut, L. G.; Ogilby, P. R., Intracellular singlet oxygen photosensitizers: on the road to solving the problems of sensitizer degradation, bleaching and relocalization. *Integr. Biol.* **2016**, *8* (2), 177-193.
25. World Health Organization, *Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics*; Geneva, 2017.
26. FDA Class II Special Controls Guidance Document: Medical Washers and Medical Washer-Disinfectors. Guidance for the Medical Device Industry and FDA Review Staff.
27. Vareechon, C.; Zmina, S. E.; Karmakar, M.; Pearlman, E.; Rietsch, A., Pseudomonas aeruginosa Effector ExoS Inhibits ROS Production in Human Neutrophils. *Cell Host Microbe* **2017**, *21* (5), 611-618.e5.
28. Orlandi, V. T.; Bolognese, F.; Chiodaroli, L.; Tolker-Nielsen, T.; Barbieri, P., Pigments influence the tolerance of Pseudomonas aeruginosa PAO1 to photodynamically induced oxidative stress. *Microbiology* **2015**, *161* (12), 2298-2309.
29. Meng, S.; Xu, Z. P.; Hong, G.; Zhao, L. H.; Zhao, Z. J.; Guo, J. H.; Ji, H. Y.; Liu, T. J., Synthesis, characterization and in vitro photodynamic antimicrobial activity of basic amino acid-porphyrin conjugates. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *92*, 35-48.
30. Maisch, T.; Bosl, C.; Szeimies, R. M.; Lehn, N.; Abels, C., Photodynamic effects of novel XF porphyrin derivatives on prokaryotic and eukaryotic cells. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2005**, *49* (4), 1542-1552.
31. Dosselli, R.; Ruiz-Gonzalez, R.; Moret, F.; Agnolon, V.; Compagnin, C.; Mognato, M.; Sella, V.; Agut, M.; Nonell, S.; Gobbo, M.; Reddi, E., Synthesis, Spectroscopic, and Photophysical Characterization and Photosensitizing Activity toward Prokaryotic and Eukaryotic Cells of Porphyrin-Magainin and -Boforin Conjugates. *J. Med. Chem.* **2014**, *57* (4), 1403-1415.
32. Alenezi, K.; Tovmasyan, A.; Batinic-Haberle, I.; Benov, L. T., Optimizing Zn porphyrin-based photosensitizers for efficient antibacterial photodynamic therapy. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **2017**, *17*, 154-159.
33. Alves, E.; Carvalho, C. M. B.; Tome, J. P. C.; Faustino, M. A. F.; Neves, M.; Tome, A. C.; Cavaleiro, J. A. S.; Cunha, A.; Mendes, S.; Almeida, A., Photodynamic inactivation of recombinant bioluminescent Escherichia coli by cationic porphyrins under artificial and solar irradiation. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, *35* (11), 1447-1454.
34. Alves, E.; Costa, L.; Carvalho, C. M. B.; Tome, J. P. C.; Faustino, M. A.; Neves, M.; Tome, A. C.; Cavaleiro, J. A. S.; Cunha, A.; Almeida, A., Charge effect on the photoinactivation of Gram-negative and Gram-positive bacteria by cationic meso-substituted porphyrins. *BMC Microbiol.* **2009**, *9*, 1-13.
35. Arrojado, C.; Pereira, C.; Tome, J. P. C.; Faustino, M. A. F.; Neves, M.; Tome, A. C.; Cavaleiro, J. A. S.; Cunha, A.; Calado, R.; Gomes, N. C. M.; Almeida, A., Applicability of photodynamic antimicrobial chemotherapy as an alternative to inactivate fish pathogenic

- bacteria in aquaculture systems. *Photochemical & Photobiological Sciences* **2011**, *10* (10), 1691-1700.
36. Banfi, S.; Caruso, E.; Buccafurni, L.; Battini, V.; Zazzaron, S.; Barbieri, P.; Orlandi, V., Antibacterial activity of tetraaryl-porphyrin photosensitizers: An in vitro study on Gram negative and Gram positive bacteria. *J. Photoch. Photobio. B* **2006**, *85* (1), 28-38.
37. Caminos, D. A.; Spesia, M. B.; Durantini, E. N., Photodynamic inactivation of *Escherichia coli* by novel meso-substituted porphyrins by 4-(3-N,N,N-trimethylammoniumpropoxy)phenyl and 4-(trifluoromethyl)phenyl groups. *Photoch. Photobio. Sci.* **2006**, *5* (1), 56-65.
38. Caminos, D. A.; Spesia, M. B.; Pons, P.; Durantini, E. N., Mechanisms of *Escherichia coli* photodynamic inactivation by an amphiphilic tricationic porphyrin and 5,10,15,20-tetra(4-N,N,N-trimethylammoniumphenyl) porphyrin. *Photoch. Photobio. Sci.* **2008**, *7* (9), 1071-1078.
39. Costa, D. C. S.; Gomes, M. C.; Faustino, M. A. F.; Neves, M.; Cunha, A.; Cavaleiro, J. A. S.; Almeida, A.; Tome, J. P. C., Comparative photodynamic inactivation of antibiotic resistant bacteria by first and second generation cationic photosensitizers. *Photoch. Photobio. Sci.* **2012**, *11* (12), 1905-1913.
40. Fayyaz, F.; Rahimi, R.; Rassa, M.; Maleki, A., Efficient photo-oxidation of phenol and photo-inactivation of bacteria by cationic tetrakis(trimethylanilinium)porphyrins. *Water Sci. Tech-W Sup.* **2015**, *15* (5), 1099-1105.
41. Ferro, S.; Ricchelli, F.; Monti, D.; Mancini, G.; Jori, G., Efficient photoinactivation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by a novel porphyrin incorporated into a polycationic liposome. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2007**, *39* (5), 1026-1034.
42. Gyulkhandanyan, G. V.; Ghazaryan, R. K.; Paronyan, M. H.; Ulikhanyan, G. I.; Gyulkhandanyan, A. G.; Sahakyan, L. A., Antimicrobial activity of new porphyrins of synthetic and natural origin. In *Mechanisms for Low-Light Therapy VII*, Hamblin, M. R.; Anders, J.; Carroll, J. D., Eds. 2012; Vol. 8211.
43. Gyulkhandanyan, G. V.; Paronyan, M. H.; Hovsepyan, A. S.; Ghazaryan, R. K.; Tovmasyan, A. G.; Gyulkhandanyan, A. G.; Gyulkhandanyan, A. G.; Amelyan, G. V., Photodynamic inactivation of Gram (-) and Gram (+) microorganisms by cationic porphyrins and metalloporphyrins. In *12th World Congress of the International Photodynamic Association: Photodynamic Therapy: Back to the Future*, Kessel, D. H., Ed. 2009; Vol. 7380.
44. Lazzeri, D.; Rovera, M.; Pascual, L.; Durantini, E. N., Photodynamic studies and photoinactivation of *Escherichia coli* using meso-substituted cationic porphyrin derivatives with asymmetric charge distribution. *Photochem. Photobiol.* **2004**, *80* (2), 286-293.
45. Mamone, L.; Ferreyra, D. D.; Gandara, L.; Di Venosa, G.; Vallecorsa, P.; Saenz, D.; Calvo, G.; Batlle, A.; Buzzola, F.; Durantini, E. N.; Casas, A., Photodynamic inactivation of planktonic and biofilm growing bacteria mediated by a meso-substituted porphyrin bearing four basic amino groups. *J. Photoch. Photobio. B* **2016**, *161*, 222-229.
46. Nitzan, Y.; Dror, R.; Ladan, H.; Malik, Z.; Kimel, S.; Gottfried, V., Structure-activity relationship of porphines for photoinactivation of bacteria. *Photochem. Photobiol.* **1995**, *62* (2), 342-347.
47. Orlandi, V. T.; Caruso, E.; Tettamanti, G.; Banfi, S.; Barbieri, P., Photoinduced antibacterial activity of two dicationic 5,15-diarylporphyrins. *J. Photoch. Photobio. B* **2013**, *127*, 123-132.
48. Sabbahi, S.; Ben Ayed, L.; Boudabbous, A., Cationic, anionic and neutral dyes: effects of photosensitizing properties and experimental conditions on the photodynamic inactivation of pathogenic bacteria. *J. Water Health* **2013**, *11* (4), 590-599.
49. Spesia, M. B.; Lazzeri, D.; Pascual, L.; Rovera, M.; Durantini, E. N., Photoinactivation of *Escherichia coli* using porphyrin derivatives with different number of cationic charges. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **2005**, *44* (3), 289-295.
50. Steenkeste, K.; Tfibel, F.; Perree-Fauvet, M.; Briandet, R.; Fontaine-Aupart, M. P., Tracking the Photosensitizing Antibacterial Activity of Mono(acridyl)bis(arginyl)porphyrin (MABAP) by Time-Resolved Spectroscopy. *J. Phys. Chem. A* **2010**, *114* (9), 3334-3339.

51. Thomas, M.; Craik, J. D.; Tovmasyan, A.; Batinic-Haberle, I.; Benov, L. T., Amphiphilic cationic Zn-porphyrins with high photodynamic antimicrobial activity. *Future Microbiol.* **2015**, *10* (5), 709-724.
52. Tome, J. P. C.; Neves, M.; Tome, A. C.; Cavaleiro, J. A. S.; Soncin, M.; Magaraggia, M.; Ferro, S.; Jori, G., Synthesis and antibacterial activity of new poly-S-lysine-porphyrin conjugates. *J. Med. Chem.* **2004**, *47* (26), 6649-6652.
53. Xing, C. F.; Xu, Q. L.; Tang, H. W.; Liu, L. B.; Wang, S., Conjugated Polymer/Porphyrin Complexes for Efficient Energy Transfer and Improving Light-Activated Antibacterial Activity. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (36), 13117-13124.
54. Yuan, Y.; Liu, Z. Q.; Jin, H.; Sun, S.; Liu, T. J.; Wang, X.; Fan, H. J.; Hou, S. K.; Ding, H., Photodynamic antimicrobial chemotherapy with the novel amino acid-porphyrin conjugate 4I: In vitro and in vivo studies. *PLoS ONE* **2017**, *12* (5), e0176529.
55. Prasanth, C. S.; Karunakaran, S. C.; Paul, A. K.; Kussovski, V.; Mantareva, V.; Ramaiah, D.; Selvaraj, L.; Angelov, I.; Avramov, L.; Nandakumar, K.; Subhash, N., Antimicrobial Photodynamic Efficiency of Novel Cationic Porphyrins towards Periodontal Gram-positive and Gram-negative Pathogenic Bacteria. *Photochem. Photobiol.* **2014**, *90* (3), 628-640.
56. Mah, T.-F. C.; O'Toole, G. A., Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol.* **2001**, *9* (1), 34-39.
57. Beirão, S.; Fernandes, S.; Coelho, J.; Faustino, M. A. F.; Tomé, J. P. C.; Neves, M. G. P. M. S.; Tomé, A. C.; Almeida, A.; Cunha, A., Photodynamic Inactivation of Bacterial and Yeast Biofilms With a Cationic Porphyrin. *Photochem. Photobiol.* **2014**, *90* (6), 1387-1396.
58. Di Poto, A.; Sbarra, M. S.; Provenza, G.; Visai, L.; Speziale, P., The effect of photodynamic treatment combined with antibiotic action or host defence mechanisms on *Staphylococcus aureus* biofilms. *Biomaterials* **2009**, *30* (18), 3158-3166.
59. Vinagreiro, C. S.; Pereira, M. M.; Arnaut, L. G.; Blanco, K. C.; Inada, N. M.; Bagnato, V. S. Small cationic ortho-5,15-di-heteroaryl-porphyrins derivatives and their applications in photoinactivation of microorganisms PT 20191000032263, 2019.
60. Xu, Z.; Gao, Y.; Meng, S.; Yang, B.; Pang, L.; Wang, C.; Liu, T., Mechanism and In Vivo Evaluation: Photodynamic Antibacterial Chemotherapy of Lysine-Porphyrin Conjugate. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, 242.

Capítulo 4

Design/síntese e avaliação da atividade antibacteriana de complexos de Ferro (II)

Durante as últimas duas décadas, o número de agentes antibacterianos desenvolvidos e introduzidos no mercado foi diminuto e insuficiente face aos múltiplos desafios encontrados pela crescente aquisição de resistência pelos agentes patogênicos.¹ Deste modo, o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas, que utilizam simultaneamente múltiplos mecanismos de ação, com o objetivo de dificultar a aquisição de resistência por parte das bactérias é urgente e crucial. Neste sentido, compostos organometálicos têm surgido como promissores candidatos para superar a questão da resistência, uma vez que os metais podem não apenas modular a anfifilicidade das moléculas e conseqüente interação com as membranas, influenciando o seu perfil de *uptake*, mas também promover a geração de espécies reativas de oxigênio, que podem contribuir para eliminar as bactérias por diferentes mecanismos.² Complexos metálicos baseados em carbenos *N*-heterocíclicos (NHC) têm sido amplamente explorados em química organometálica e catálise homogênea e recentemente foram também relatados como moléculas promissoras para várias aplicações medicinais.^{3, 4} Tal como referenciado na tabela 1.4 desta Tese, vários complexos metálicos NHC de prata (1 a 100 µg/mL),⁵⁻²⁴ paládio (5 a 11 mm),²⁵ ouro (2 a 800 µg/mL),^{22, 26-29} rutênio (6,25 a 1000 µg/mL) e ródio (5 a > 1000 µg/mL)³⁰ com atividade antibacteriana foram descritos. O ferro pela sua baixa toxicidade e baixo custo, e por ser amplamente reconhecido como agente antibacteriano,³¹⁻⁸³ tem vindo a ser estudado paralelamente, tal como descrito na revisão da literatura apresentada no capítulo 1.

Com base nesta contextualização, neste capítulo descreve-se a síntese de complexos de ferro (II) contendo ligandos do tipo carbenos *N*-heterocíclicos funcionalizados com diferentes grupos com o objetivo de obter compostos com diferentes anfifilicidades que possam atuar como agentes antibacterianos. De forma a averiguar a potencial aplicação referida, realizou-se avaliação da atividade

antibacteriana em estirpes Gram-positivas e Gram-negativas do composto *per si* e, no contexto de terapia dual, em combinação com fotossensibilizadores preparados no capítulo 2 desta Tese.

4.1- Complexos de Ferro (II) baseados em carbenos *N*-heterocíclicos (NHCs)

Alguns dos complexos de ferro (II) baseados em NHCs foram preparados em colaboração com a Rita Lopes, no âmbito da sua Tese de doutoramento supervisionada pela professora Beatriz Royo do Instituto de Tecnologia Química e Biológica (ITQB), cujo interesse era unicamente a aplicação destes complexos metálicos em reações catalíticas.⁸⁴

4.1.1- Síntese de pró-ligandos NHCs

O trabalho apresentado nesta secção iniciou-se com a síntese do pró-ligando não substituído, aqui designado por Cp*-NHC **4.2** (Figura 4.1), que servirá de base às posteriores modelações estruturais, tendo em vista a preparação de uma família de compostos com diferentes anfilicidades. Devido à instabilidade de um dos reagentes necessários para a sua síntese, o fulveno **4.1** tem de ser sintetizado *in situ*.

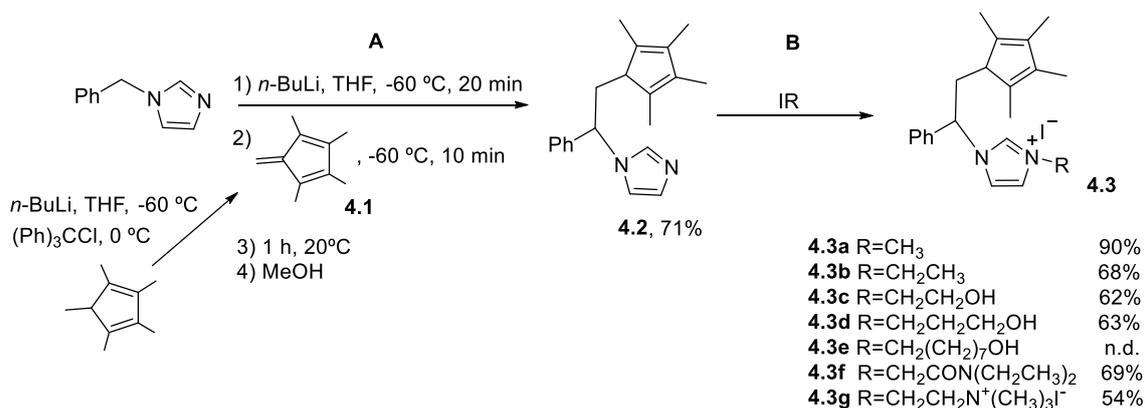


Figura 4.1- Síntese de pró-ligandos do tipo benzil Cp*-NHC

Assim, numa experiência tipo, uma solução de pentametilciclopentadieno dissolvido em THF rigorosamente seco com sódio, foi colocado num tubo de *Schlenk* em atmosfera inerte (árgon) e, de seguida, arrefecida até à temperatura de -60 °C e a base *n*-BuLi (2,5 M em hexano) adicionada gota a gota com uma seringa. A reação

permaneceu em agitação por 20 minutos, seguindo-se a adição de cloreto de tritilo. Após este processo, observa-se uma mudança de tonalidade de bege para amarelo claro. A mistura final é deixada em agitação durante 12 horas a uma temperatura de 4 °C, protegida da luz, obtendo-se ao final deste tempo uma solução laranja. Após este período, segue-se uma metodologia similar para a desprotonação do benzilimidazole.



Figura 4.2- (A) Adição via cânula ao benzilimidazole previamente desprotonado, alterando a cor da solução de vermelho vivo (B) para vermelho escuro (C)

Um tubo de *Schlenk* em atmosfera inerte contendo uma solução de benzilimidazole dissolvido em THF seco foi arrefecido até à temperatura de -60 °C e *n*-BuLi adicionado lentamente. A reação permaneceu em agitação por 20 minutos e, de seguida, o fulveno **4.1** preparado anteriormente é adicionado via cânula ao benzilimidazole previamente desprotonado com *n*-BuLi (Figura 4.1 e 4.2- A), observando-se uma alteração da cor da solução de vermelho vivo (Figura 4.2- B) para

vermelho escuro (Figura 4.2- C). Em seguida, retirou-se o banho de arrefecimento (acetona/isopropanol/azoto líquido) e a temperatura subiu lentamente até atingir a temperatura ambiente, permanecendo sob agitação durante 1 hora. Após este período, metanol foi adicionado e o solvente removido sob vácuo. O crude reacional foi purificado por cromatografia em coluna utilizando gel de sílica como fase estacionária e uma mistura de hexano/acetato de etilo (1:4) como eluente. O produto **4.2**, de cor amarelo pálido foi obtido com um rendimento de 71%.

Na figura 4.3 encontra-se representado o espectro de RMN de ^1H do composto **4.2**. Neste, observa-se o típico desdobramento dos sinais atribuído à mistura de tautómeros, resultante das diferentes posições das duplas ligações no anel ciclopentadienil e da presença de prótons diastereotópicos.⁸⁵ O espectro de RMN de ^1H apresenta 6 regiões características: um conjunto de sinais em forma de duplete a aproximadamente 0,8 ppm atribuídos à ressonância dos grupos metilo do ciclopentadieno (H1) que acoplam com o próton do anel (H3), quando se encontram em posição geminal com este; um conjunto de singuletos entre 1,2-2,06 ppm atribuídos aos grupos metilo do anel Cp* (H2) quando se encontram em posição vinílica; um conjunto de sinais, entre 2,2-2,6 ppm correspondentes ao próton do anel Cp* resultante dos diferentes tautómeros (H3); um conjunto de sinais entre 2,8-3,2 ppm resultante do grupo CH₂ do espaçador alquílico (H4); um conjunto de sinais entre 4,8-5,2 ppm resultantes do CH do espaçador alquílico (H5) e, por fim, um último conjunto de sinais entre 6,7-7,5 ppm atribuído aos prótons aromáticos do grupo imidazole, bem como aos prótons do anel fenílico (H6,7,8,9).

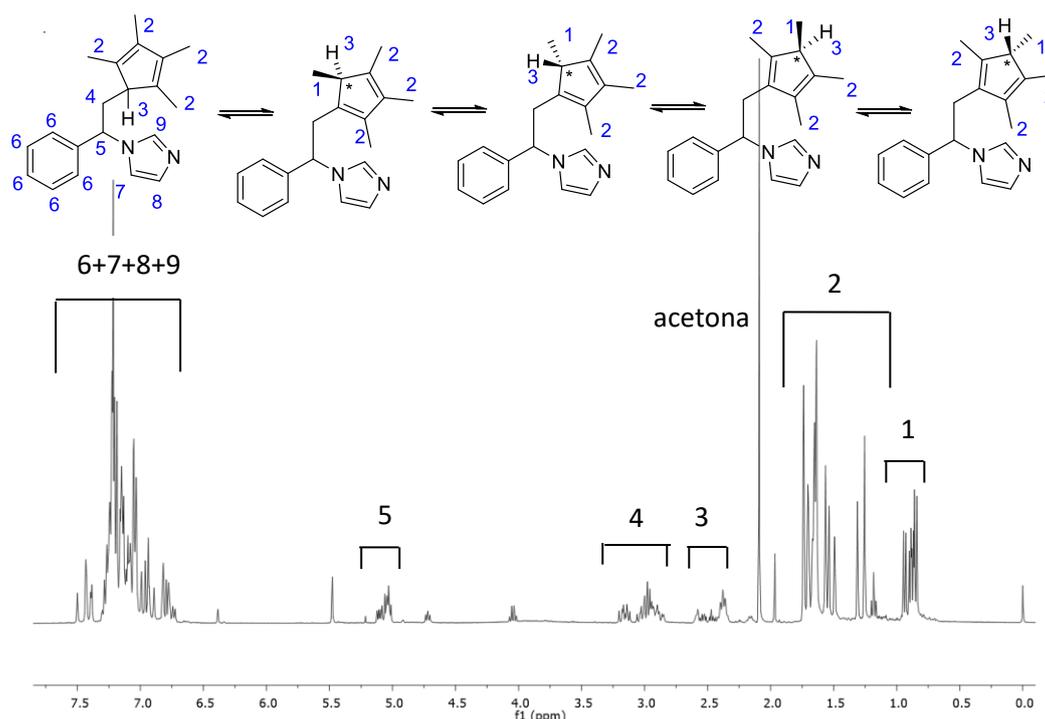


Figura 4.3- Espectro de RMN de ^1H do composto **4.2** em CDCl_3

No sentido de desenhar/preparar pró-ligandos com potencial afinidade para bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, selecionaram-se haletos de alquila de estruturas variadas (**a-g**) (Figura 4.1 B). Em primeiro lugar, preparou-se o pró-ligando NHC **4.3a**, contendo um simples grupo metilo (apolar), por reação do pró-ligando **4.2** dissolvido em acetona com iodeto de metilo à temperatura ambiente (Figura 4.1 B). O término da reação foi observado após 12 horas por TLC. O solvente é evaporado sob vácuo e o sólido resultante lavado sucessivamente com éter dietílico e hexano. Após secagem, sob vácuo, obteve-se o pró-ligando **4.3a** com um rendimento de 90%. Para avaliar o efeito do tamanho de cadeia apolar, seguiu-se um procedimento idêntico, mas fazendo reagir o pró-ligando **4.2** com iodoetano a uma temperatura de 50 °C, tendo-se obtido o pró-ligando **4.3b** com um rendimento de 68%.

O interesse em encontrar novas metodologias envolvendo processos mais sustentáveis conduziu a uma otimização deste processo sintético. Duas estratégias foram seguidas, utilizando a funcionalização com iodoetano como modelo, à temperatura descrita de 50 °C:

i) Reação sem solvente, adicionando um excesso do haleto de alquila necessário para a dissolução do composto (150 equivalentes). O rendimento obtido foi similar ao convencional, mas observou-se uma diminuição do tempo reacional de 72 para 36 horas. No entanto, esta estratégia apresenta um incremento no impacto ambiental (Figura 4.4, método 2).

ii) No sentido de otimizar a reação indo ao encontro de estratégias próximas dos princípios da química verde, nesta Tese desenvolveram-se ainda estudos pioneiros de utilização de micro-ondas ou ultrassons como fonte de aquecimento com menor consumo energético: Mantendo a mesma concentração e excesso de agente alquilante, sob ultrassons, obteve-se um rendimento de 77%, após 6 horas de reação (Figura 4.4, método 3). Usando radiação micro-ondas (P = 100 W) e temperaturas variáveis, obteve-se um rendimento de 81% após 15 minutos (Figura 4.4, método 4). Tentou-se reduzir o excesso de eletrófilo, no entanto, o rendimento reduziu para valores similares ao método convencional (Figura 4.4, método 5).

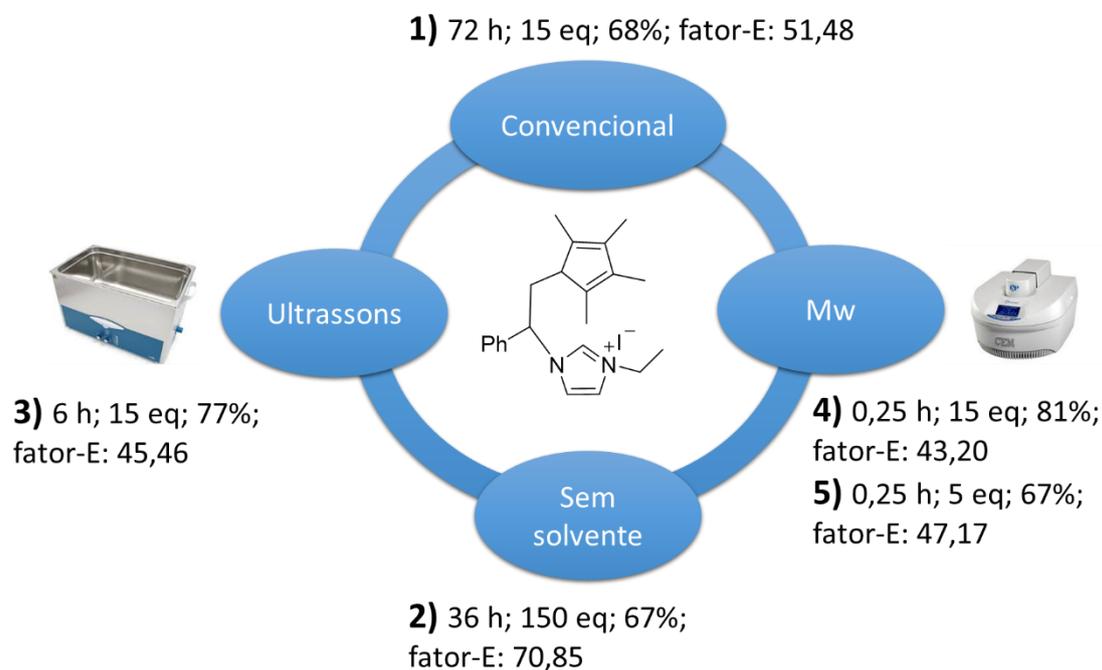


Figura 4.4- Otimização do processo sintético usando o pró-ligando **4.3b** como modelo

O elevado rendimento, assim como o baixo impacto ambiental, avaliado pelo fator E, reforçam a escolha do método 4, utilizando aquecimento micro-ondas e um excesso de 15 equivalente de eletrófilo, como a melhor metodologia.

No sentido de avaliar o efeito da polaridade dos NHCs na sua atividade antibacteriana, os estudos prosseguiram com a reação do pró-ligando **4.2** com 2-iodoetanol, 3-iodo-1-propanol, 8-cloro-1-octanol, 2-iodo-*N,N*-dietilacetamida e cloreto de (2-cloroetil)trimetilamónio. O cloreto de (2-cloroetil)trimetilamónio foi selecionado com o objetivo de se obter um complexo de ferro catiónico, potencialmente mais seletivo/ativo para as bactérias Gram-negativas, pelas razões explicitadas no capítulo 1 desta Tese.

A 2-iodo-*N,N*-dietilacetamida exige um passo prévio de preparação, em que a 2-cloro-*N,N*-dietilacetamida é colocada em agitação com KI, à temperatura ambiente durante 24 horas, de modo a que ocorra a troca do halogénio de cloro para iodo. O mesmo se realiza no caso do 8-cloro-1-octanol. Por outro lado, no caso do cloreto de (2-cloroetil)trimetil amónio é necessário o uso de DMF como solvente e de temperaturas superiores, na ordem dos 80 °C. Concomitantemente, adicionou-se 5 equivalente de KI ao meio reacional. Posteriormente, os sais foram filtrados e o composto precipitado com uma mistura de diclorometano/hexano. Os correspondentes pró-ligandos derivados do imidazole **4.3c-g** foram obtidos com rendimentos compreendidos entre 54-69%.⁸⁶ O composto **4.3g** obteve-se sempre com rendimentos muito baixos, que atribuímos à sua preferencial partição para a fase do octanol, usado em excesso, devido à semelhança estrutural entre ambos. Decidiu-se por este motivo não proceder à preparação do complexo metálico e subsequente avaliação antibacteriana.

A metodologia otimizada acima foi testada para os restantes haletos de alquilo e os resultados encontram-se sumariados na tabela 4.1. No caso da acetamida, o rendimento foi semelhante ao do método convencional sendo de realçar, no entanto, a redução drástica do tempo reacional, de 96 horas para apenas 15 minutos (Tabela 4.1, entrada 1). No entanto, esta estratégia mostrou-se ineficaz para álcoois, tal como se observa no exemplo do 3-iodo-1-propanol, onde ocorre a formação de uma maior

quantidade de produtos secundários, possivelmente relacionados com reações do próprio nucleófilo (intra e intermoleculares) (Tabela 4.1, entrada 2).

Tabela 4.1- Comparação entre método convencional e método otimizado por micro-ondas (o rendimento indicado é o rendimento isolado)

Entrada	Haleto de Alquila	Convencional		Micro-ondas	
		Tempo (h)	η	Tempo (h)	η
1	2-iodo- <i>N,N</i> -dietilacetamida	96	69%	0,25	68%
2	3-iodo-1-propanol	72	62%	0,25	20%

Todos os pró-ligandos NHCs foram caracterizados por espectroscopia de RMN de ^1H e de ^{13}C e os novos por espectrometria de massa (capítulo 6), apresentando-se em seguida, como exemplo selecionado, o espectro de RMN de ^1H para o composto **4.3b** (Figura 4.5). A formação dos sais catiónicos é facilmente confirmada por RMN protónico, devido ao aparecimento de um sinal entre 9-11 ppm, correspondente ao desvio do próton $\text{N}=\text{CH}-\text{N}$, assinalado com o número 9 na figura 4.5.

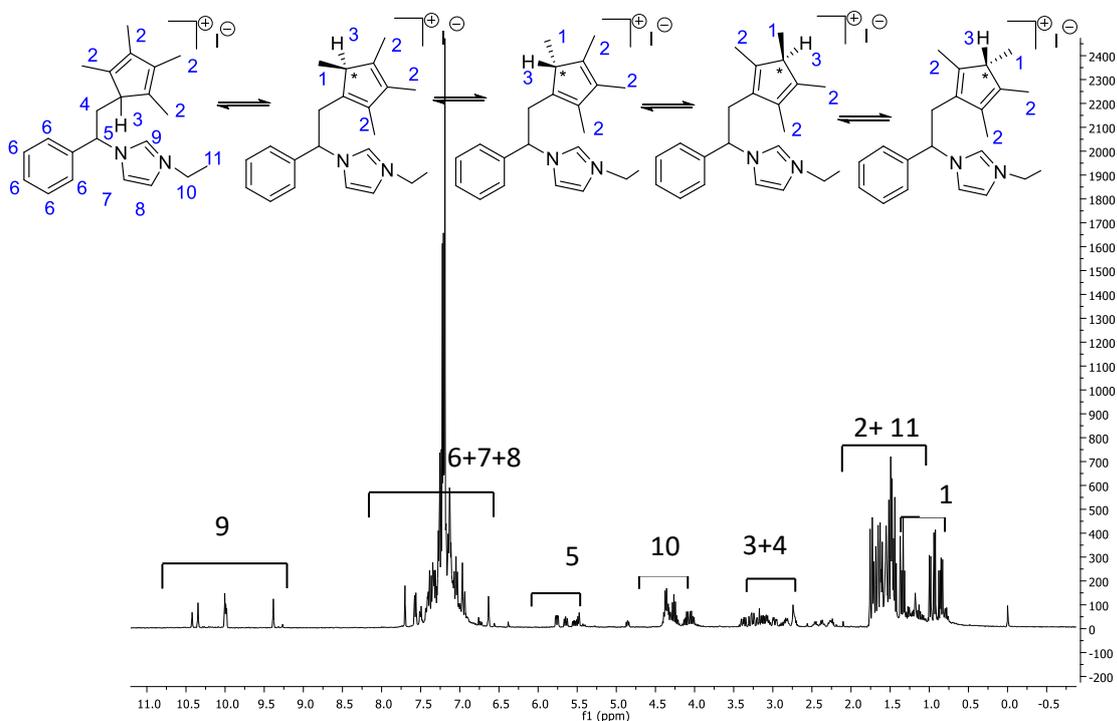


Figura 4.5 Espectro de RMN de ^1H do composto **4.3b** em CDCl_3

Através de uma análise detalhada da literatura, podemos constatar que, até ao momento, apenas foram preparados Cp*-NHC a partir de imidazóis benzílicos e alquílicos.^{85, 87} Dado que o nosso objetivo consiste na preparação de derivados com diferentes anfilicidades e massas moleculares, de modo a avaliar e comparar atividades antibacterianas, decidiu-se testar a síntese partindo de outros precursores. Tendo em conta que grupos estabilizadores de carbaniões, quer por ressonância (Ph), quer por serem atratores de elétrons, são preferenciais para o sucesso da reação e que pretendíamos grupos adequados para futuras funcionalizações e preparação de compostos bimodais, selecionaram-se dois reagentes comerciais: o 2-(1*H*-imidazol-1-il)acetonitrilo e o 2-(1*H*-imidazol-1-il)acetato de metilo. No entanto, era necessário ter outro ponto em atenção, uma vez que nas reações de desprotonação é utilizada uma base forte com baixo impedimento estérico, capaz de reagir com os grupos funcionais selecionados. Deste modo, decidiu-se substituir esta base por uma base com maior impedimento estérico, nomeadamente, a di-isopropilamida de lítio (LDA). Os passos reacionais foram semelhantes aos descritos anteriormente e apresentam-se na figura 4.6.

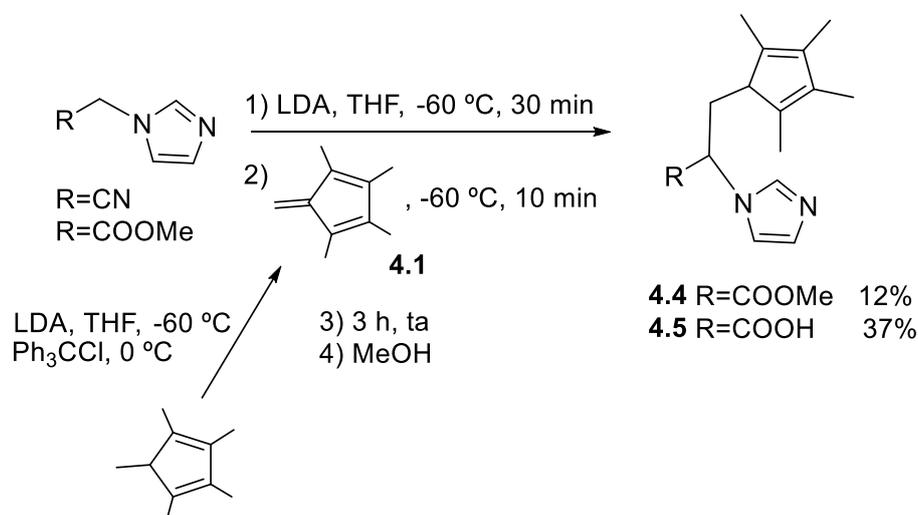


Figura 4.6- Síntese de pró-ligandos do tipo Cp*-NHC

No caso da reação do 2-(1*H*-imidazol-1-il)acetonitrilo com o fulveno **4.1**, o crude foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel, usando como eluente hexano/acetato de etilo (1:4), tendo-se apenas isolado uma fração com rendimento de 12%. Realizou-se a sua caracterização completa de modo a identificar o produto obtido

e os dados encontram-se descritos no capítulo 6. A presença de um sinal atípico para os grupos funcionais constituintes do produto pretendido, com desvio de 170 ppm no RMN de ^{13}C , conduziu-nos à realização de infravermelho por reflexão total atenuada (do inglês *attenuated total reflectance*, ATR) de modo a perceber que modificações estruturais ocorreram na molécula. Pela análise do espectro obtido, representado na figura 4.7, observou-se um sinal a $1746,82\text{ cm}^{-1}$, atribuído à vibração de um grupo carbonilo ($\text{C}=\text{O}$) e nenhum sinal correspondente ao grupo nitrilo, com frequências típicas compreendidas entre $2200\text{-}2300\text{ cm}^{-1}$. A ligação dupla $\text{C}=\text{O}$ dá origem a bandas intensas muito características neste tipo de espectros e a sua posição permite obter informações estruturais sobre o grupo funcional no qual o carbonilo se encontra inserido, uma vez que a banda é fortemente afetada pela vizinhança imediata.⁸⁸ Neste sentido, os valores obtidos apontariam para a presença de um grupo éster ($\nu=1746,82\text{ cm}^{-1}$), pelo que se realizou análise de massa por ESI-MS para confirmar. O espectro de massa ESI obtido no modo positivo apresenta um pico maioritário com $m/z=275,1$ e carga $+1$, correspondente ao composto contendo um grupo éster metílico $[\text{M}+\text{H}]^+$, provavelmente resultante da reação de esterificação com o metanol utilizado no decorrer da reação.

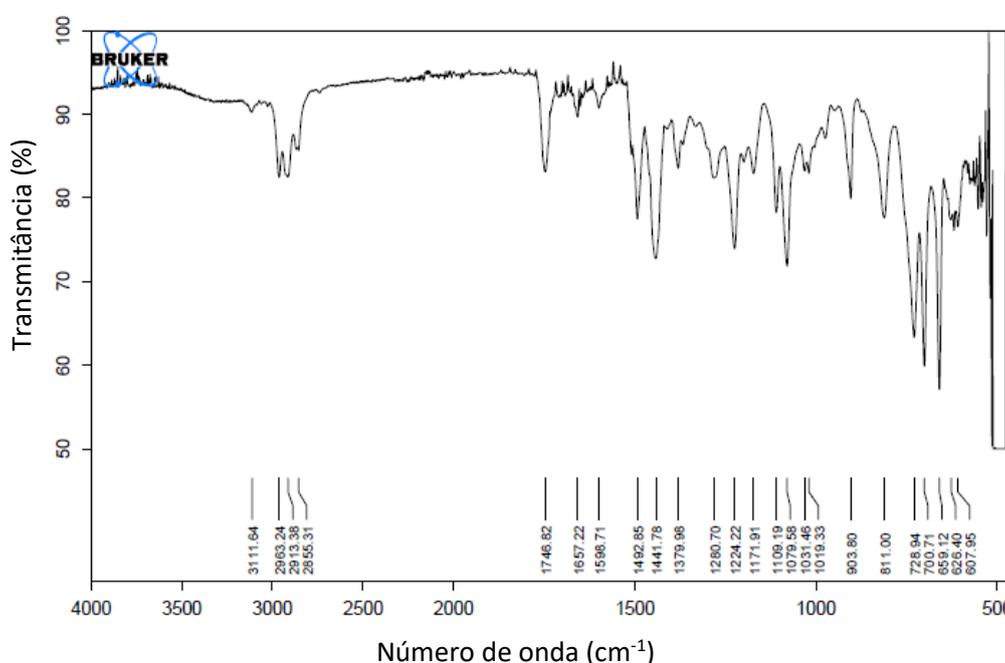


Figura 4.7- Espectro de infravermelho do composto **4.4**

No caso da reação do 2-(1*H*-imidazol-1-il)acetato de metilo com o fulveno **4.1**, o crude foi purificado por lavagem com diclorometano e de seguida, por cromatografia de

fase reversa usando como eluente primeiramente água e de seguida água/metanol (1:1). Devido à complexidade dos espectros de RMN de próton e carbono decorrentes da presença de tautómeros, a análise dos mesmos revelou-se pouco eficiente na identificação estrutural e por isso optou-se também por realizar infravermelho por ATR. O espectro encontra-se representado na figura 4.8. Neste, observa-se duas bandas típicas: uma banda larga a $3381,05\text{ cm}^{-1}$ atribuída à vibração de alongação da ligação O-H e uma banda intensa a $1620,74\text{ cm}^{-1}$ que diz respeito à vibração do grupo carbonilo, sugerindo assim a presença de um grupo ácido carboxílico. Esta informação foi corroborada por espectrometria de massa, recorrendo à técnica de ESI-MS ($261,1599\text{ m/z}$).

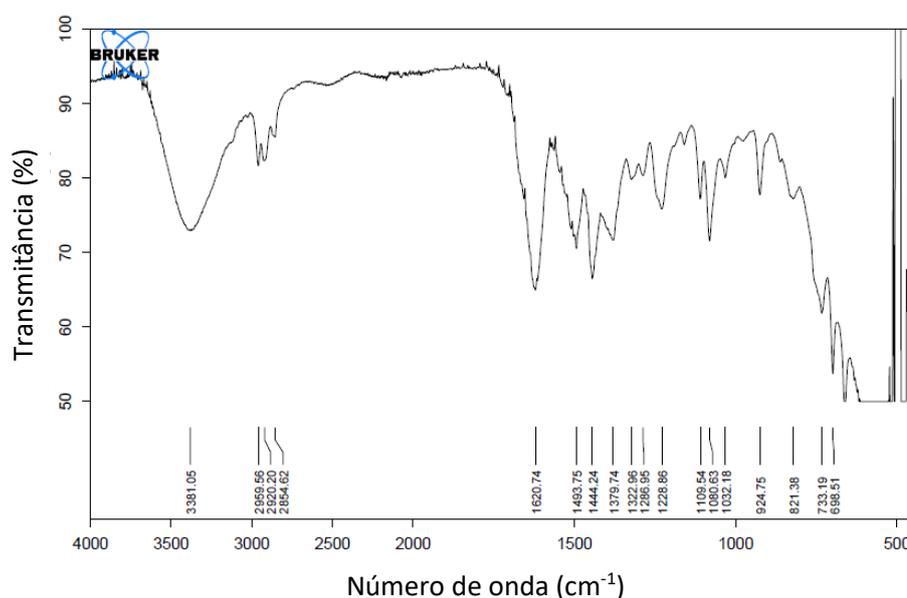


Figura 4.8- Espectro de infravermelho do composto **4.5**

Após a síntese, purificação e respetiva caracterização de cada um dos pró-ligandos, procedeu-se à síntese dos seus complexos de ferro correspondentes.

4.1.2- Síntese de complexos de ferro (II)- Cp*-NHC

Após a síntese dos diversos pró-ligandos, avançou-se para a preparação dos respetivos complexos de ferro (II) (Figura 4.9). Numa experiência modelo, num tubo de *Schlenk* em atmosfera inerte, contendo o $\text{Fe}_3(\text{CO})_{12}$, adicionou-se o pró-ligando pretendido, em tolueno seco. A reação foi agitada a $110\text{ }^\circ\text{C}$ durante 12 horas, observando-se uma mudança de cor de amarelo acastanhado para verde. A solução de

tolueno foi recolhida usando uma cânula com celite e finalmente evaporada a pressão reduzida. O sólido resultante foi lavado com hexano seco e o solvente coletado pelo mesmo método. Os complexos foram obtidos com rendimentos compreendidos entre 68-90%. A evidência de metalação foi confirmada pelo desaparecimento dos sinais entre 9-11 ppm no RMN de ^1H e pelo aparecimento do sinal característico do carbeno a aproximadamente 195 ppm no RMN de ^{13}C .⁸⁹ Ao ocorrer a formação do complexo, estabelece-se uma coordenação entre o anel ciclopentadienil e o ferro, eliminando a possibilidade de existência de tautômeros (Figura 4.10). Neste sentido, a complexidade do espectro diminui, passando a observar-se sinais bem definidos. Adicionalmente, o espectro de infravermelho por ATR demonstrou a presença da banda típica correspondente à vibração Fe-CO, a aproximadamente 1900 cm^{-1} . A caracterização detalhada encontra-se descrita no capítulo 6 desta Tese.

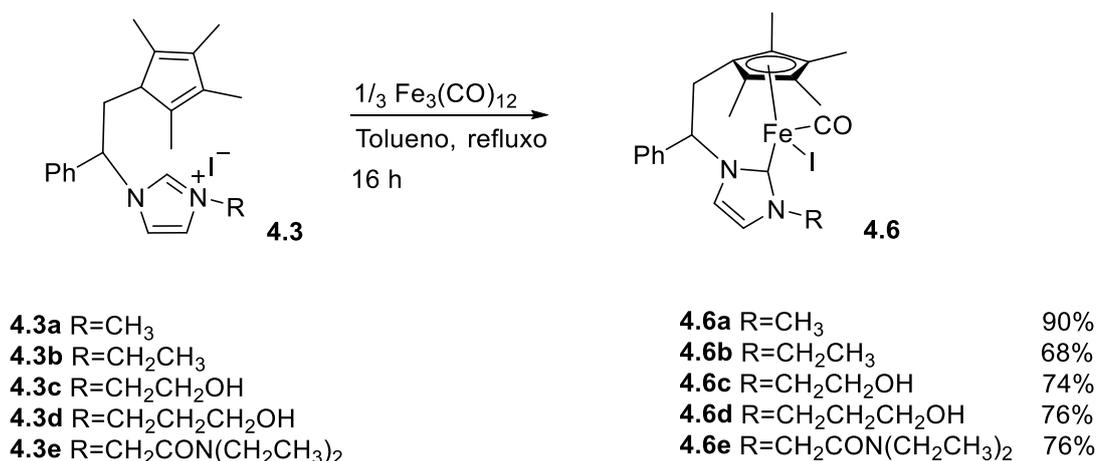


Figura 4.9- Estrutura dos complexos de Fe (II)- Cp*-NHC

A título de exemplo, encontra-se representado na figura 4.10 o espectro de RMN de ^1H do complexo **4.6b**. Este apresenta 11 sinais característicos: um sinal em forma de multipletto entre 7,64-7,51; dois sinais em forma de dupletto a 7,13 ppm e 6,48 ppm; um sinal em forma de duplo dupletto a 6,07 ppm; um sinal em forma de multipletto entre 4,36-4,21; um sinal em forma de multipletto entre 3,05-2,92; um sinal em forma de singuleto a 2,40 ppm; um sinal em forma de singuleto a 1,81 ppm; um sinal em forma de singuleto a 1,76 ppm; um sinal em forma de tripleto a 1,35 ppm e por fim um sinal em forma de singuleto a 0,96 ppm. Os quatro singuletos com desvios químicos entre 0,96 e 2,40 ppm são atribuídos aos grupos metílicos do ciclopentadieno (H1,2,3 e 4). O

triplete a 1,35 ppm corresponde ao grupo CH₃ do grupo etilo ligado ao azoto (H11). Por outro lado, o sinal referente ao grupo CH₂ diretamente ligado ao azoto do imidazole apresenta um desvio maior devido à sua proximidade a este átomo eletroatrator ($\delta = 4,36-4,21$ ppm, H10). Os sinais a 3,05-2,92 ppm (H5) e 6,06 ppm (H6) são atribuídos à ponte alquílica, correspondendo aos prótons do grupo CH₂ e CH, respetivamente. Pode observar-se que, no complexo de ferro, os dois prótons do grupo CH₂ não são equivalentes, encontrando-se em diferentes ambientes químicos, uma vez que o sinal referente ao próton que acopla com ele, do grupo CH, se apresenta como um duplo duplete ($J = 11,8; 2,6$ Hz), além de que o seu próprio sinal adquire a forma de multipletto. Os dois dupletos, a 7,13 ppm e 6,48 ppm, são atribuídos aos prótons aromáticos do grupo imidazole (H8 e H9). Por fim, o sinal em forma de multipletto entre 7,63-7,53 corresponde aos prótons aromáticos do grupo fenilo (H7).

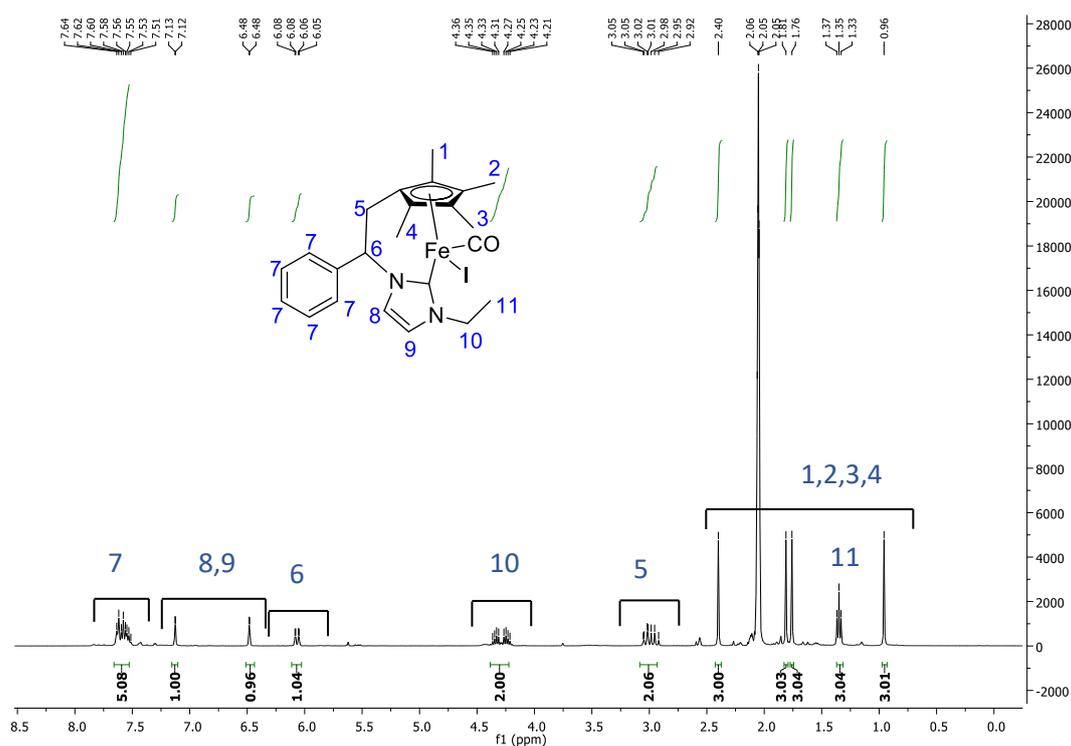


Figura 4.10- Espectro de RMN ¹H do complexo **4.6b** em acetona deuterada

Na figura 4.11, encontra-se representado a título de exemplo o espectro de infravermelho do complexo **4.6e**. Neste evidencia-se duas bandas intensas a 1601,33 cm⁻¹ e a 1924,62 cm⁻¹, correspondentes à vibração da ligação C=O do grupo amida e do ligando do ferro (CO), respetivamente. No caso do grupo amida, ocorre conjugação do grupo C=O com o sistema π adjacente (N) fazendo baixar a sua frequência de vibração.

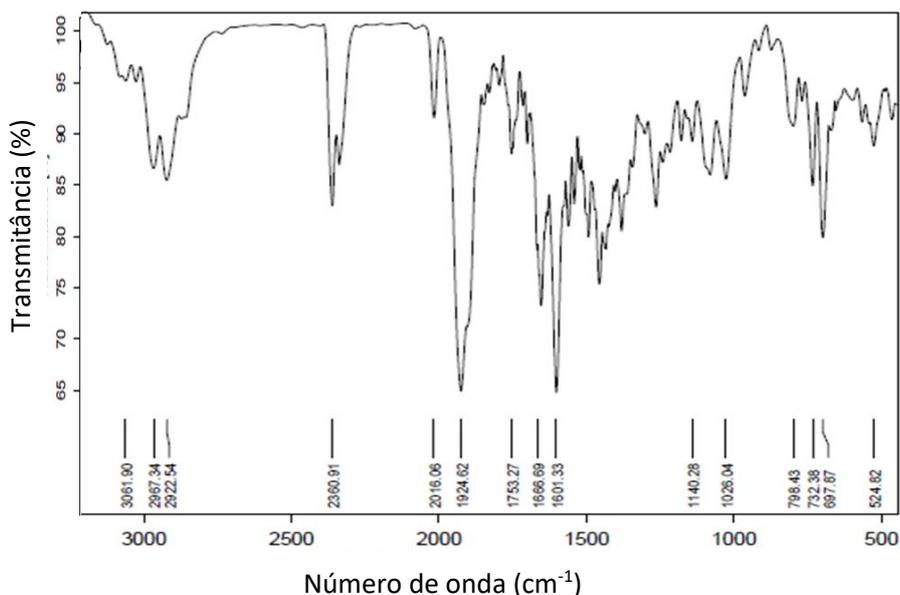


Figura 4.11- Espectro de infravermelho do complexo **4.6e**

Estudos preliminares de complexação dos Cp*-NHC com funcionalizações éster (**4.4**) e ácido (**4.5**) não permitiram obter os resultados pretendidos, pelo que a procura de estratégias alternativas continua a decorrer.

Tal como referido, o nosso objetivo era a modelação desta família de compostos para potencial aplicação como agentes antibacterianos *per si* ou combinados com PDT e, neste sentido, os complexos metálicos preparados foram avaliados e os resultados encontram-se apresentados e discutidos nas secções seguintes.

4.1.3- Avaliação da atividade antibacteriana

Após uma análise detalhada da literatura, verificámos que nunca antes um complexo de ferro (II)- Cp*-NHC fora avaliado quanto à sua atividade antibacteriana, sendo apenas usados em catálise.⁸⁹⁻⁹¹ Deste modo, para avaliar a atividade antibacteriana destes selecionaram-se duas estirpes bacterianas da American Type Culture Collection (ATCC), nomeadamente, uma Gram-positiva - *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e uma Gram-negativa- *Escherichia coli* ATCC 25922 como modelos, de acordo com a lista prioritária emitida pela Organização Mundial de Saúde.⁹²

A suscetibilidade bacteriana aos compostos previamente preparados foi determinada utilizando o método de microdiluição em caldo Muller Hinton (MH) com

uma placa estéril de 96 poços, segundo as normas do Instituto de Padrões Clínicos Laboratoriais.⁹³ Primeiramente, preparou-se uma suspensão de cada estirpe bacteriana em estudo a partir de colónias puras de uma cultura de 18-24 h/37 °C em 5 mL de água esterilizada, de forma a alcançar uma turvação equivalente ao padrão de 0,5 da escala de McFarland, que corresponde a aproximadamente $1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colónias (UFC)/mL e, de seguida, realizou-se uma diluição de 1/20 em água. Por sua vez, as diluições dos compostos foram feitas em caldo MH, sendo pipetados inicialmente, 100 µL de caldo MH para cada poço em toda a placa e posteriormente 100 µL (de uma solução stock de 1 mg/mL) dos diferentes compostos em estudo, apenas no primeiro poço de cada linha da placa. Seguidamente, efetuou-se uma diluição de 1:2, retirando 100 µL do primeiro poço para o segundo da mesma linha, e assim sucessivamente, tendo posteriormente sido adicionados 10 µL do inóculo anteriormente preparado a todos os poços contendo o composto em estudo. Foram utilizados três controlos: o controlo de esterilidade com 100 µL de caldo MH; o controlo de crescimento positivo (100 µL de caldo MH e 10 µL da suspensão bacteriana) e, por fim, o controlo positivo com DMSO, com 100 µL de caldo MH, 100 µL de DMSO e 10 de µL suspensão bacteriana (Figura 4.12).

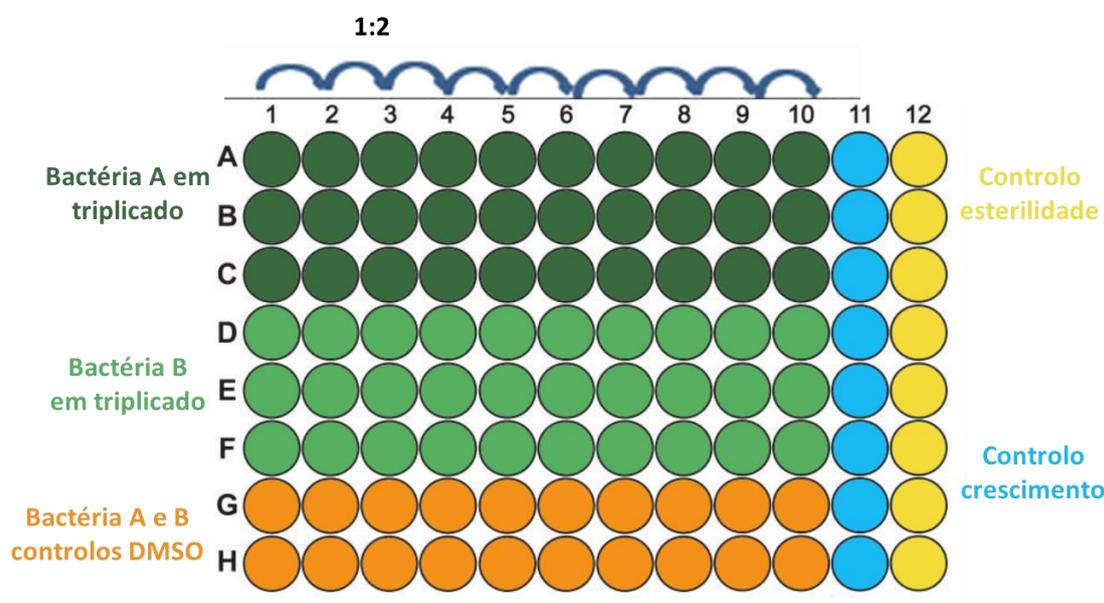
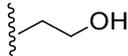
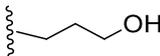
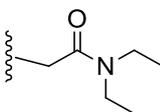


Figura 4.12- Representação esquemática do ensaio por microdiluição realizado para determinação da suscetibilidade bacteriana aos compostos sintetizados

Por último, as placas foram incubadas na estufa a 35 °C durante 18 a 24 horas. Após este período, efetuou-se a leitura dos resultados, observando-se a presença ou ausência de turvação, que indica a presença ou ausência de crescimento bacteriano, respetivamente. A menor concentração de composto com o qual se observa ausência de turvação corresponde à concentração mínima inibitória (CMI). Para cada composto, o ensaio foi feito em triplicado e reproduzido em três ensaios independentes e os resultados encontram-se sumariados na tabela 4.2.

Tabela 4.2- Valores de CMI obtidos para os compostos selecionados

Compostos	R	CMI (µg/mL)	
		Sa	Ec
4.6a		20	500
4.6b		8	8
4.6c		8	62.5
4.6d		8	125
4.6e		>32	n.d.

Abreviaturas: CMI: concentração mínima inibitória (µg/mL); Ec: *Escherichia coli* ATCC 25922; Sa: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213; n.d. não determinado

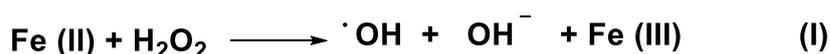
Pela análise da tabela 4.2 observa-se um efeito significativo da cadeia lateral do Fe (II) -NHC na atividade antibacteriana, quer em bactérias Gram-negativas quer Gram-positivas. Relativamente à *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, um resultado notável, CMI=8 µg/mL, foi obtido para os complexos com grupos hidroxilo anfifílicos presentes na cadeia lateral (**4.6c** e **4.6d**, Tabela 4.2, entrada 3 e 4). O mesmo resultado foi obtido para o complexo com um grupo etilo hidrofóbico (**4.6b**, Tabela 4.2, entrada 2). Por outro lado, a presença do grupo metilo hidrofóbico (**4.6a**, Tabela 4.2, entrada 1) ou dimetilacetamida (**4.6e**, Tabela 4.2, entrada 5) leva a uma diminuição significativa da sua atividade, obtendo-se CMIs de 20 e > 32 µg/mL, respetivamente.

Em seguida, prosseguiu-se com os estudos de avaliação da atividade antibacteriana dos compostos mais promissores contra uma estirpe de *Escherichia coli* ATCC 25922. Os resultados demonstraram um efeito significativo da alteração de um carbono na cadeia alquílica hidrofóbica (metilo **4.6a** e etilo **4.6b**, Tabela 4.2, entrada 1 e 2) ou na cadeia alquílica de grupos hidroxilo anfifílicos (etanol **4.6c** e propanol **4.6d**, Tabela 4.2, entrada 3 e 4), obtendo-se CMIs de 500 a 8 µg/mL e 62,5 a 125 µg/mL, respetivamente.

Entre os compostos testados, o complexo mais lipofílico (**4.6b**) foi encontrado como sendo o mais ativo contra ambas as estirpes (8 µg/mL, Tabela 4.2, entrada 2). Este efeito da cadeia lateral também foi observado por Ozdemir¹⁷ e Karatas²⁴ e colaboradores em complexos Ag (I) -NHC, sendo os complexos mais ativos também os mais lipofílicos.

4.1.4- Estudos mecanísticos preliminares

Um dos mecanismos de toxicidade de complexos metálicos mais extensivamente estudados relaciona-se com a sua atividade redox.^{94, 95} A capacidade de oxidação de complexos de Fe (II) a Fe (III) foi previamente avaliada, tendo-se demonstrado que na presença de AgBF₄ em diclorometano era possível a sua formação.⁹⁶ No entanto, nenhum estudo foi efetuado mimetizando as condições biológicas. Neste sentido, e numa tentativa de perceber se o mecanismo de ação destes complexos poderia ser do tipo Fenton (Eq. I), começamos por explorar a capacidade destes complexos formarem radicais $\cdot\text{OH}$ na presença de peróxido de hidrogénio, comumente encontrado em condições biológicas, usando duas estratégias: a primeira consistindo na avaliação do estado de oxidação do metal e a segunda na deteção de espécies reativas de oxigénio (ROS).



Neste sentido, primeiramente espectros UV-Vis foram adquiridos entre cada adição de H₂O₂ a uma solução do complexo **4.6b** e encontram-se representados na figura 4.13, A. Como se pode observar, ocorrerem alterações significativas na forma do espectro após a adição de quantidades sucessivamente crescentes de H₂O₂. Ocorreu o

desaparecimento da banda pouco definida entre 400-450 nm e o aparecimento de uma nova banda intensa com máximo a 355 nm. Estas alterações significativas na forma do espectro podem ser atribuídas à alteração do estado de oxidação do metal. Estudos de ressonância eletrônica paramagnética (EPR) corroboraram esta evidência, uma vez que a solução do complexo **4.6b** não apresenta qualquer sinal, um comportamento típico de complexos de Fe (II) de spin baixo (Figura 4.13, B) e após a adição de H₂O₂, observa-se o aparecimento de um sinal típico de um complexo de Fe (III) (Figura 4.13, C).

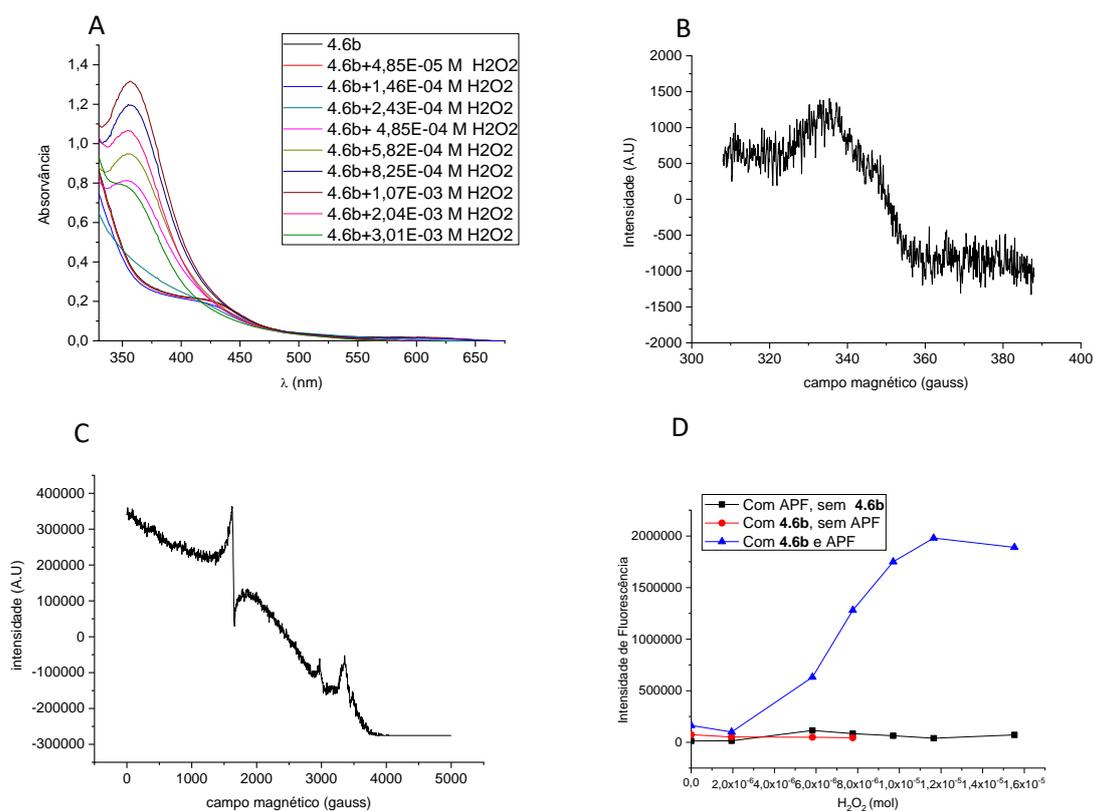


Figura 4.13- A- Espectros de absorção do complexo **4.6b** com adições progressivas de H₂O₂; B- EPR do complexo **4.6b** a 20 °C; C- EPR do complexo **4.6b** após adição de H₂O₂ a 20 °C D- Espectros de fluorescência do complexo **4.6b** com adições progressivas de H₂O₂ e respetivos controlos.

Seguidamente, para avaliar a formação de radicais hidroxilo, utilizou-se a 3'-(*p*-aminofenil) fluoresceína (APF), uma sonda indicadora destes radicais. Esta sonda é não fluorescente *per si* até que reage com radicais hidroxilo, deste modo, a formação de ROS pode ser observada através do aparecimento de fluorescência, após adições progressivas de H₂O₂. A análise destes dados, representados na figura 4.13, D confirmam

a formação de radicais hidroxilo. Com base nestes resultados, podemos concluir que os complexos metálicos possuem a capacidade de se oxidar na presença de peróxido de hidrogénio, formando ROS.

Adicionalmente, foi realizada uma experiência com glutatona, um conhecido redutor biológico, de modo a verificar se era possível retornar ao estado oxidativo Fe (II), reiniciando o ciclo oxidativo e consequentemente aumentando a quantidade de ROS gerados. Com este intuito, foram adquiridos espectros UV-Vis entre cada adição de glutatona a uma solução do complexo **4.6b** previamente oxidada pela adição de H₂O₂ ($1,46 \times 10^{-4}$ M, Figura 4.14). Como se pode observar, após a adição de $4,85 \times 10^{-4}$ M de glutatona observa-se o desaparecimento da banda típica do complexo de Fe (III), a 355 nm. De seguida, após adicionar novamente $4,85 \times 10^{-4}$ M de H₂O₂, esta banda retorna a observar-se, alterando o espectro para o comportamento típico de Fe (III).

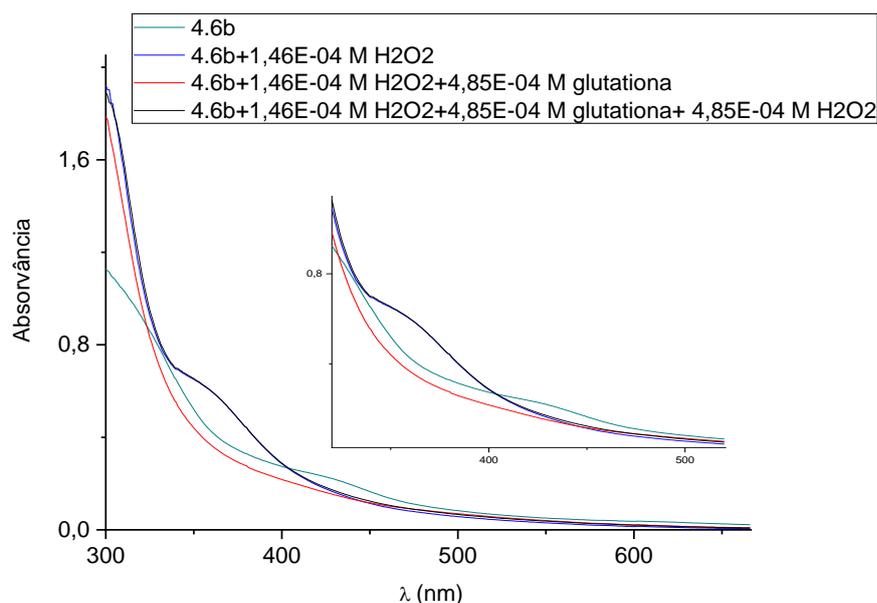


Figura 4.14- Avaliação da reversibilidade da oxidação do complexo **4.6b** por adição de glutatona

Após este estudo, seria importante verificar se o mesmo comportamento se observa nas diferentes estirpes bacterianas. Neste sentido, foi realizado um ensaio utilizando duas sondas específicas sensíveis a radicais hidroxilo, 3'-(*p*-hidroxilfenil) fluoresceína (HPF) e APF e as duas estirpes de bactérias anteriormente referidas (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e *Escherichia coli* ATCC 25922), utilizando

concentrações do complexo **4.6b** entre 0-250 µg/mL. No entanto, nesta experiência não foi possível detetar qualquer sinal de fluorescência das sondas. Estes estudos apontam no sentido que as estirpes bacterianas não produzem H₂O₂ em concentração suficiente para que ocorra a oxidação do ferro e conseqüente formação de ROS.

Como referido na literatura, concentrações de 5,2 mM de H₂O₂ têm efeito bacteriostático em estirpes de *Staphylococcus aureus*.⁹⁷ Neste sentido, planeou-se uma experiência em que se adicionou uma concentração de peróxido de hidrogénio ligeiramente inferior, concomitantemente com a determinação da CMI para o composto **4.6b**, de modo a observar se estas concentrações poderiam ser suficientes para induzir a oxidação dos complexos metálicos. Nenhuma alteração da CMI foi notada neste estudo. Observando os nossos resultados anteriores explicitados na figura 4.13 A e D, podemos verificar que a quantidade de H₂O₂ adicionada (<5 mM), é inferior ao necessário para começar a observar o efeito (48,5 mM).

Com base nos resultados obtidos, podemos concluir que o mecanismo de ação dos complexos metálicos preparados não aponta para que seja resultado da produção de ROS. Estudos adicionais avançados seriam necessários de modo a determinar que outros mecanismos podem estar envolvidos na sua atividade antibacteriana. Todavia, estes encontram-se fora do âmbito deste trabalho de investigação, não sendo objetivo desta Tese.

4.1.5- Terapia Dual

Como referido no capítulo 1 desta Tese, a melhor maneira de evitar a resistência bacteriana é conjugar múltiplos mecanismos de ação, de modo a que sejam necessárias múltiplas mutações nos diversos alvos para gerar resistência, diminuindo drasticamente a sua probabilidade de ocorrência. Deste modo, decidimos testar a conjugação destes agentes antibacterianos no escuro com os fotossensibilizadores (PSs) neutros, **2.2** e **2.3**, e com o PS catiónico mais eficaz em estudos planctónicos, o PS **2.8**, preparados no capítulo 2. Em relação aos PSs neutros, a uma placa de 96 poços adicionou-se a solução do complexo **4.6b** na sua concentração mínima inibitória (8 µg/mL) ou apenas PBS, no caso do controlo (sem adição de PS, nem complexo de ferro) e dos poços que irão ter apenas PS (10 µM), e *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 (10 µL). Deixou-se em agitação

por 12 horas e, de seguida, o fotossensibilizador foi adicionado (10 μ M), incubado por uma hora, e a placa foi irradiada com luz LED de 420 nm, com a dose de luz previamente otimizada (Capítulo 3, 10 J/cm²).

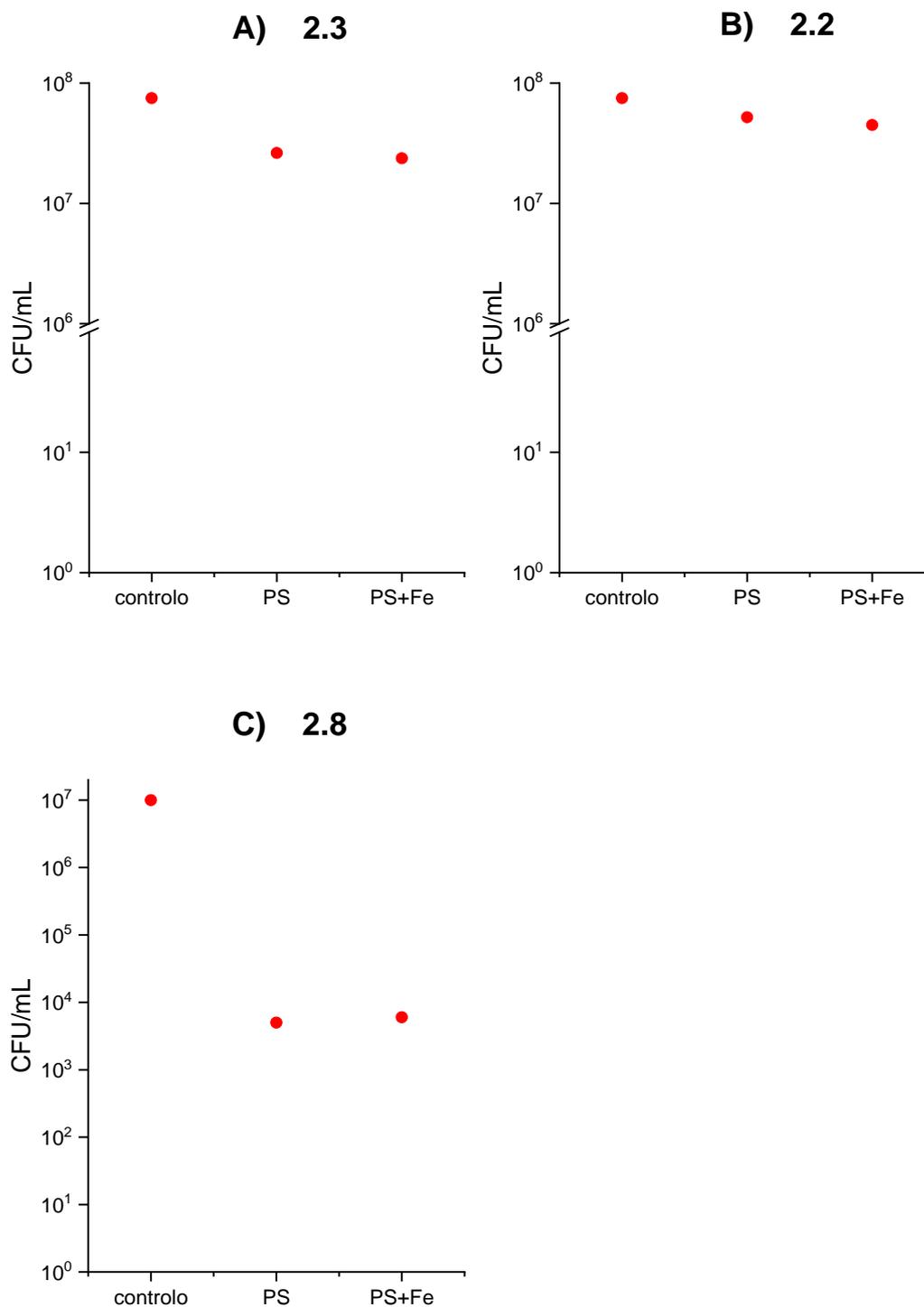


Figura 4.15- Terapia dual usando o complexo **4.6b** e os PSs **2.2** e **2.3** (10 μ M) em *S. aureus* ATCC 29213 e o PS **2.8** (10 nM) em *E. coli* ATCC 25922

Com o fotossensibilizador catônico, utilizou-se o mesmo protocolo, com exceção da concentração de PS (10 nM) e da estirpe, que foi *Escherichia coli* ATCC 25922. A viabilidade das bactérias foi avaliada pela contagem do número de colônias formadas após 24 horas a 37 °C, no escuro e os resultados encontram-se na figura 4.15.

Como se pode observar, a diferença na viabilidade bacteriana, na ausência ou presença do complexo metálico, não foi significativa. Deste modo, podemos concluir que a administração do complexo de ferro **4.6b** concomitantemente com o fotossensibilizador não resulta num efeito sinérgico na sua atividade antibacteriana.

4.1.6 - Conclusão

O objetivo central deste capítulo consistiu na síntese de novos complexos de ferro (II) baseados em carbenos N-heterocíclicos funcionalizados com múltiplos grupos com o fim de obter compostos com diferentes anfifilicidades e propriedades que possam atuar como antibacterianos. Para este efeito, começou por se sintetizar o pró-ligando mais simples, o Cp*-NHC **4.2**, que serviu de base para posteriores modelações estruturais com diferentes haletos de alquila selecionados de acordo com as características pretendidas. Obtiveram-se os pró-ligandos **4.3a-g** com rendimentos entre 54-90%. O interesse em encontrar novas metodologias envolvendo processos mais sustentáveis conduziu a uma otimização deste processo sintético, utilizando como modelo o pró-ligando **4.3b**. A metodologia utilizando radiação micro-ondas permitiu um aumento do rendimento (68% para 81%), uma diminuição drástica do tempo reacional (72 horas para 15 minutos) e uma redução no impacto ambiental, avaliada pelo fator-E (51,48 para 43,20). Adicionalmente, Cp*-NHC com funcionalizações éster (**4.4**) e ácido (**4.5**) foram sintetizados pela primeira vez.

Complexos de ferro (II) correspondentes a cada pró-ligando (**4.6a-e**) foram sintetizados com rendimentos entre os 68-90%. Estes foram avaliados quanto à sua atividade antibacteriana em estirpes Gram-positivo (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213) e Gram-negativo (*Escherichia coli* ATCC 25922), demonstrando um efeito significativo da cadeia lateral do Fe (II) -NHC. O complexo mais lipofílico (**4.6b**) foi encontrado como sendo o mais ativo contra ambas as estirpes (8 µg/mL).

Estudos mecanísticos preliminares foram realizados, tendo-se provado a capacidade de oxidação a ferro (III) em solução com adição de peróxido de hidrogénio e consequente formação de radicais hidroxilo. No entanto, estudos realizados em bactérias demonstraram que a quantidade de peróxido presente não é suficiente para a observação deste efeito e que o mecanismo de ação dos complexos metálicos preparados não passa pela sua atividade redox.

Por fim, realizou-se uma experiência de terapia dual em *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 através da combinação do complexo de ferro **4.6b** com aPDT, utilizando fotossensibilizadores bimodais preparados no capítulo 2 desta Tese, **2.2** e **2.3** e em *Escherichia coli* ATCC 25922 utilizando o fotossensibilizador catiónico **2.8**. Observou-se que a diferença na viabilidade bacteriana, na ausência ou presença do complexo metálico, não foi significativa. Deste modo, podemos concluir que a administração do complexo de ferro concomitantemente com o fotossensibilizador não potencia a sua atividade antibacteriana.

Em suma, os resultados obtidos neste capítulo são um bom ponto de partida e abrem o caminho para o desenvolvimento de novos complexos de ferro-NHC, com o *design* e modulação estrutural apropriados para aumentar a sua atividade antibacteriana, e desenvolver novos antibióticos com outros mecanismos de ação.

4.1.7- Referências

1. Butler, M. S.; Blaskovich, M. A. T.; Cooper, M. A., Antibiotics in the clinical pipeline at the end of 2015. *J. Antibiot.* **2017**, *70* (1), 3-24.
2. Gasser, G.; Metzler-Nolte, N., The potential of organometallic complexes in medicinal chemistry. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2012**, *16* (1), 84-91.
3. Hindi, K. M.; Panzner, M. J.; Tessier, C. A.; Cannon, C. L.; Youngs, W. J., The Medicinal Applications of Imidazolium Carbene Metal Complexes. *Chem. Rev.* **2009**, *109* (8), 3859-3884.
4. Oehninger, L.; Rubbiani, R.; Ott, I., N-Heterocyclic carbene metal complexes in medicinal chemistry. *Dalton Trans.* **2013**, *42* (10), 3269-3284.
5. Achar, G.; Agarwal, P.; Brinda, K. N.; Małeck, J. G.; Keri, R. S.; Budagumpi, S., Ether and coumarin-functionalized (benz)imidazolium salts and their silver(I)-N-heterocyclic carbene complexes: Synthesis, characterization, crystal structures and antimicrobial studies. *J. Organomet. Chem.* **2018**, *854*, 64-75.
6. Aher, S.; Das, A.; Muskawar, P.; Osborne, J.; Bhagat, P., Synthesis, Characterization and Antimicrobial properties of Methylbenzyl and Nitrobenzyl containing Imidazolium-based Silver N-Heterocyclic Carbenes. *J. Mol. Liq.* **2017**, *233*, 270-277.
7. Aher, S.; Das, A.; Muskawar, P.; Osborne, J.; Bhagat, P., Silver (I) complexes of imidazolium based N-heterocyclic carbenes for antibacterial applications. *J. Mol. Liq.* **2017**, *231*, 396-403.
8. Aher, S.; Das, A.; Muskawar, P.; Osborne, J.; Bhagat, P., In vitro antimicrobial evaluation, effects of halide concentration and hemolysis study of silver-N-heterocyclic carbene complexes. *Res. Chem. Intermed.* **2018**, *44* (3), 2099-2110.
9. Asekunowo, P. O.; Haque, R. A., Counterion-induced modulation in biochemical properties of nitrile functionalized silver(I)-N-heterocyclic carbene complexes. *J. Coord. Chem.* **2014**, *67* (22), 3649-3663.
10. Asekunowo, P. O.; Haque, R. A.; Razali, M. R., Sterically modulated silver(I) complexes of N-benzyl-substituted N-heterocyclic carbenes: synthesis, crystal structures and bioactivity. *Transition Met. Chem.* **2015**, *40* (1), 79-88.
11. Gök, Y.; Akkoç, S.; Albayrak, S.; Akkurt, M.; Tahir, M. N., N-Phenyl-substituted carbene precursors and their silver complexes: synthesis, characterization and antimicrobial activities. *Appl. Organomet. Chem.* **2014**, *28* (4), 244-251.
12. Günal, S.; Kaloğlu, N.; Özdemir, İ.; Demir, S.; Özdemir, İ., Novel benzimidazolium salts and their silver complexes: Synthesis and antibacterial properties. *Inorg. Chem. Commun.* **2012**, *21*, 142-146.
13. Hackenberg, F.; Lally, G.; Müller-Bunz, H.; Paradisi, F.; Quaglia, D.; Streciwilk, W.; Tacke, M., Novel symmetrically p-benzyl-substituted 4,5-diaryl-imidazole N-heterocyclic carbene-silver(I) acetate complexes – Synthesis and biological evaluation. *J. Organomet. Chem.* **2012**, *717*, 123-134.
14. Haque, R. A.; Asekunowo, P. O.; Razali, M. R., Dinuclear silver(I)-N-heterocyclic carbene complexes of N-allyl substituted (benz)imidazol-2-ylidenes with pyridine spacers: synthesis, crystal structures, nuclease and antibacterial studies. *Transition Met. Chem.* **2014**, *39* (3), 281-290.
15. Haque, R. A.; Choo, S. Y.; Budagumpi, S.; Abdullah, A. A.-A.; Khadeer Ahamed, M. B.; Abdul Majid, A. M. S., Synthesis, crystal structures, characterization and biological studies of nitrile-functionalized silver(I) N-heterocyclic carbene complexes. *Inorg. Chim. Acta* **2015**, *433*, 35-44.
16. Johnson, N. A.; Southerland, M. R.; Youngs, W. J., Recent Developments in the Medicinal Applications of Silver-NHC Complexes and Imidazolium Salts. *Molecules* **2017**, *22* (8), 1263-1283.

17. Kaloğlu, M.; Kaloğlu, N.; Özdemir, İ.; Günal, S.; Özdemir, İ., Novel benzimidazol-2-ylidene carbene precursors and their silver(I) complexes: Potential antimicrobial agents. *Biorg. Med. Chem.* **2016**, *24* (16), 3649-3656.
18. Patil, S.; Claffey, J.; Deally, A.; Hogan, M.; Gleeson, B.; Méndez, L. M. M.; Müller-Bunz, H.; Paradisi, F.; Tacke, M., Synthesis, Cytotoxicity and Antibacterial Studies of p-Methoxybenzyl-Substituted and Benzyl-Substituted N-Heterocyclic Carbene–Silver Complexes. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2010**, *2010* (7), 1020-1031.
19. Patil, S.; Deally, A.; Gleeson, B.; Hackenberg, F.; Müller-Bunz, H.; Paradisi, F.; Tacke, M., Synthesis, Cytotoxicity and Antibacterial Studies of Novel Symmetrically and Non-Symmetrically p-Nitrobenzyl-Substituted N-Heterocyclic Carbene–Silver(I) Acetate Complexes. *Z. Anorg. Allg. Chem.* **2011**, *637* (3-4), 386-396.
20. Patil, S.; Dietrich, K.; Deally, A.; Gleeson, B.; Müller-Bunz, H.; Paradisi, F.; Tacke, M., Synthesis, Cytotoxicity and Antibacterial Studies of Novel Symmetrically and Nonsymmetrically 4-(Methoxycarbonyl)benzyl-Substituted N-Heterocyclic Carbene–Silver Acetate Complexes. *Helv. Chim. Acta* **2010**, *93* (12), 2347-2364.
21. Peana, M.; Medici, S.; Crisponi, G.; Nurchi, V.; Lachowicz, J.; Remelli, M.; Zoroddu, M., *Silver coordination compounds: A new horizon in medicine*. 2016.
22. Ray, S.; Mohan, R.; Singh, J. K.; Samantaray, M. K.; Shaikh, M. M.; Panda, D.; Ghosh, P., Anticancer and Antimicrobial Metallopharmaceutical Agents Based on Palladium, Gold, and Silver N-Heterocyclic Carbene Complexes. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (48), 15042-15053.
23. Sylvain, R.; Claude, J.; Thierry, C.; Laure, E.; Pascale, B.; Arnaud, H.; Virginie, M.; Corinne, V.; Jean-Marc, P., Investigation of a Series of Silver–N-Heterocyclic Carbenes as Antibacterial Agents: Activity, Synergistic Effects, and Cytotoxicity. *Chem. Eur. J.* **2011**, *17* (5), 1442-1446.
24. Karataş, M. O.; Olgundeniz, B.; Günal, S.; Özdemir, İ.; Alici, B.; Çetinkaya, E., Synthesis, characterization and antimicrobial activities of novel silver(I) complexes with coumarin substituted N-heterocyclic carbene ligands. *Biorg. Med. Chem.* **2016**, *24* (4), 643-650.
25. Haque, R. A.; Salman, A. W.; Budagumpi, S.; Abdullah, A. A.-A.; Majid, A. M. S. A., Sterically tuned Ag(i)- and Pd(ii)-N-heterocyclic carbene complexes of imidazol-2-ylidenes: synthesis, crystal structures, and in vitro antibacterial and anticancer studies. *Metallomics* **2013**, *5* (6), 760-769.
26. Vellé, A.; Maguire, R.; Kavanagh, K.; Sanz Miguel, P. J.; Montagner, D., Steroid–Au–NHC Complexes: Synthesis and Antibacterial Activity. *Chemmedchem* **2017**, *12* (11), 841-844.
27. Claudia, S.; Bianka, K.; Rainer, M.; Aram, P.; Raimo, F.; Mark, B.; Ingo, O., Gold(I) NHC Complexes: Antiproliferative Activity, Cellular Uptake, Inhibition of Mammalian and Bacterial Thioredoxin Reductases, and Gram-Positive Directed Antibacterial Effects. *Chem. Eur. J.* **2017**, *23* (8), 1869-1880.
28. Owings, J. P.; McNair, N. N.; Mui, Y. F.; Gustafsson, T. N.; Holmgren, A.; Contel, M.; Goldberg, J. B.; Mead, J. R., *Auranofin and N-heterocyclic carbene gold-analogs are potent inhibitors of the bacteria Helicobacter pylori*. 2016; Vol. 363.
29. Roymahapatra, G.; Mandal, S. M.; Porto, W. F.; Samanta, T.; Giri, S.; Dinda, J.; Franco, O. L.; Chattaraj, P. K., Pyrazine Functionalized Ag(I) and Au(I)-NHC Complexes are Potential Antibacterial Agents. *Curr. Med. Chem.* **2012**, *19* (24), 4184-4193.
30. Cetinkaya, B.; Cetinkaya, E.; Kucukbay, H.; Durmaz, R., *Antimicrobial activity of carbene complexes of Rhodium(I) and Ruthenium(II)*. 1996; Vol. 46, p 821-3.
31. Edwards, E. I.; Epton, R.; Marr, G., Organometallic derivatives of penicillins and cephalosporins a new class of semi-synthetic antibiotics. *J. Organomet. Chem.* **1975**, *85* (2), C23-C25.
32. Edwards, E. I.; Epton, R.; Marr, G., 1,1'-Ferrocenyldiacetic Acid Anhydride and its Use in the preparation of heteroannularly substituted ferrocenyl-penicillins and -cephalosporins. *J. Organomet. Chem.* **1976**, *122* (3), C49-C53.

33. Edwards, E. I.; Epton, R.; Marr, G., A new class of semi-synthetic antibiotics: ferrocenylpenicillins and -cephalosporins. *J. Organomet. Chem.* **1976**, *107* (3), 351-357.
34. Edwards, E. I.; Epton, R.; Marr, G., The synthesis and reactions of homonuclear ferrocene acid anhydrides and their use in the preparation of ferrocenylpenicillins and -cephalosporins. *J. Organomet. Chem.* **1979**, *168* (2), 259-272.
35. Long, B.; He, C.; Yang, Y.; Xiang, J., Synthesis, characterization and antibacterial activities of some new ferrocene-containing penems. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45* (3), 1181-1188.
36. Pillai, M. S.; Latha, S. P., Designing of some novel metallo antibiotics tuning biochemical behaviour towards therapeutics: Synthesis, characterisation and pharmacological studies of metal complexes of cefixime. *J. Saudi Chem. Soc.* **2016**, *20*, S60-S66.
37. Lewandowski, E. M.; Szczupak, Ł.; Wong, S.; Skiba, J.; Guśpiel, A.; Solecka, J.; Vrček, V.; Kowalski, K.; Chen, Y., Antibacterial Properties of Metallocenyl-7-ADCA Derivatives and Structure in Complex with CTX-M β -Lactamase. *Organometallics* **2017**, *36* (9), 1673-1676.
38. Ogunniran, K. O.; Ajanaku, K. O.; James, O. O.; Ajani, O. O.; Nwinyi, C. O.; Allensela, M. A., Fe(III) and Co(II) complexes of mixed antibiotics: synthesis, characterization, antimicrobial potential and their effect on alkaline phosphatase activities of selected rat tissues. *Int. J. Phys. Sci.* **2008**, *3* (8), 177-182.
39. Efthimiadou, E. K.; Sanakis, Y.; Katsaros, N.; Karaliota, A.; Psomas, G., Transition metal complexes with the quinolone antibacterial agent piperimidic acid: Synthesis, characterization and biological activity. *Polyhedron* **2007**, *26* (5), 1148-1158.
40. Efthimiadou, E. K.; Karaliota, A.; Psomas, G., Mononuclear metal complexes of the second-generation quinolone antibacterial agent enrofloxacin: Synthesis, structure, antibacterial activity and interaction with DNA. *Polyhedron* **2008**, *27* (6), 1729-1738.
41. Arayne, S.; Sultana, N.; Haroon, U.; Mesaik, M. A., Synthesis, Characterization, Antibacterial and Anti-Inflammatory Activities of Enoxacin Metal Complexes. *Bioinorg. Chem. Appl.* **2009**, *2009*, 1-6.
42. Sultana, N.; Naz, A.; Arayne, M. S.; Mesaik, M. A., Synthesis, characterization, antibacterial, antifungal and immunomodulating activities of gatifloxacin-metal complexes. *J. Mol. Struct.* **2010**, *969* (1), 17-24.
43. Patra, M.; Gasser, G.; Wenzel, M.; Merz, K.; Bandow, J. E.; Metzler-Nolte, N., Synthesis and Biological Evaluation of Ferrocene-Containing Bioorganometallics Inspired by the Antibiotic Platensimycin Lead Structure. *Organometallics* **2010**, *29* (19), 4312-4319.
44. El-Halim, H. F. A.; Mohamed, G. G.; El-Dessouky, M. M. I.; Mahmoud, W. H., Ligational behaviour of lomefloxacin drug towards Cr(III), Mn(II), Fe(III), Co(II), Ni(II), Cu(II), Zn(II), Th(IV) and UO₂(VI) ions: Synthesis, structural characterization and biological activity studies. *Spectrochim. Acta A.* **2011**, *82* (1), 8-19.
45. Patra, M.; Gasser, G.; Wenzel, M.; Merz, K.; Bandow, J. E.; Metzler-Nolte, N., Sandwich and Half-Sandwich Derivatives of Platensimycin: Synthesis and Biological Evaluation. *Organometallics* **2012**, *31* (16), 5760-5771.
46. Khan, S. A.; Shahid, S.; Kanwal, S.; Hussain, G., Synthesis characterization and antibacterial activity of Cr (III), Co (III), Fe (II), Cu (II), Ni (III) complexes of 4-(2-(((2-hydroxy-5-nitrophenyl) diazenyl) (phenyl) methylene) hydrazinyl) benzene sulfonic acid based formazan dyes and their applications on leather. *Dyes Pigm.* **2018**, *148*, 31-43.
47. Sevgi, F.; Bagkesici, U.; Kursunlu, A. N.; Guler, E., Fe (III), Co(II), Ni(II), Cu(II) and Zn(II) complexes of schiff bases based-on glycine and phenylalanine: Synthesis, magnetic/thermal properties and antimicrobial activity. *J. Mol. Struct.* **2018**, *1154*, 256-260.
48. Abdel-Rahman, L. H.; El-Khatib, R. M.; Nassr, L. A. E.; Abu-Dief, A. M., DNA binding ability mode, spectroscopic studies, hydrophobicity, and in vitro antibacterial evaluation of some new Fe(II) complexes bearing ONO donors amino acid Schiff bases. *Arab. J. Chem.* **2017**, *10*, S1835-S1846.

49. Amolegbe, S. A.; Adewuyi, S.; Akinremi, C. A.; Adediji, J. F.; Lawal, A.; Atayese, A. O.; Obaleye, J. A., Iron(III) and copper(II) complexes bearing 8-quinolinol with amino-acids mixed ligands: Synthesis, characterization and antibacterial investigation. *Arab. J. Chem.* **2015**, *8* (5), 742-747.
50. Bedier, R. A.; Yousef, T. A.; Abu El-Reash, G. M.; El-Gammal, O. A., Synthesis, structural, optical band gap and biological studies on iron (III), nickel (II), zinc (II) and mercury (II) complexes of benzyl α -monoxime pyridyl thiosemicarbazone. *J. Mol. Struct.* **2017**, *1139*, 436-446.
51. Shaker, A. M.; Nassr, L. A. E.; Adam, M. S. S.; Mohamed, I. M. A., Synthesis, Characterization and Spectrophotometric Studies of Seven Novel Antibacterial Hydrophilic Iron(II) Schiff Base Amino Acid Complexes. *J. Korean Chem. Soc.* **2013**, *57* (5), 560-567.
52. Mjos, K. D.; Cawthray, J. F.; Polishchuk, E.; Abrams, M. J.; Orvig, C., Gallium(III) and iron(III) complexes of quinolone antimicrobials. *Dalton Trans.* **2016**, *45* (33), 13146-13160.
53. Dhokale, N. T.; Karale, B. K.; Nagawade, A. V., Synthesis, Characterization and Antibacterial Studies on Mn(II) and Fe(II) Complexes of N, O Donor Salicyloylpyrazoleoxime Schiff Bases. *Orient. J. Chem.* **2017**, *33* (1), 165-172.
54. Pan, Z.-H.; Zhao, G.-Q.; Xue, L.-W.; Yang, W.-C., Synthesis, Crystal Structure, and Antimicrobial Activity of Manganese(III) and Iron(III) Complexes Derived from Similar bis-Schiff Bases. *Synth. React. Inorg., Met.-Org., Nano-Met. Chem.* **2016**, *46* (12), 1759-1764.
55. Surati, K. R.; Sathe, P. A., Schiff base pyrazolone complexes of iron (III): synthesis, characterization, antimicrobial and antioxidant activity. *Med. Chem. Res.* **2016**, *25* (12), 2742-2751.
56. Wei, F. Y.; Wen, P. H., Synthesis, structures, and antibacterial activities of two iron(III) complexes with Schiff bases. *Russ. J. Coord. Chem.* **2014**, *40* (5), 289-296.
57. Fayad, N. K.; Al-Noor, T. H.; Mahmood, A. A.; Malih, I. K., Synthesis, Characterization, and Antibacterial Studies of Mn (II), Fe (II), Co(II), Ni(II), Cu (II) and Cd(II) Mixed-Ligand Complexes Containing Amino Acid (L-Valine) And (1,10-phenanthroline). *Chemistry and Materials Research* **2013**, *3* (5), 66-73.
58. Lippert, R.; Shubina, T. E.; Vojnovic, S.; Pavic, A.; Veselinovic, J.; Nikodinovic-Runic, J.; Stankovic, N.; Ivanović-Burmazović, I., Redox behavior and biological properties of ferrocene bearing porphyrins. *J. Inorg. Biochem.* **2017**, *171*, 76-89.
59. Ikhile, M. I.; Barnard, T. G.; Ngila, J. C., Potential application of synthesized ferrocenylimines compounds for the elimination of bacteria in water. *Physics and Chemistry of the Earth, Parts A/B/C* **2017**, *100*, 121-125.
60. Parveen, H.; Alatawi, R. A. S.; El Sayed, N. H.; Hasan, S.; Mukhtar, S.; Khan, A. U., Synthesis, characterization and biological evaluation of some novel nitrogen and sulphur containing organometallic heterocycles. *Arab. J. Chem.* **2017**, *10* (8), 1098-1106.
61. Liu, Y.-T.; Sheng, J.; Yin, D.-W.; Xin, H.; Yang, X.-M.; Qiao, Q.-Y.; Yang, Z.-J., Ferrocenyl chalcone-based Schiff bases and their metal complexes: Highly efficient, solvent-free synthesis, characterization, biological research. *J. Organomet. Chem.* **2018**, *856*, 27-33.
62. Liu, Y.; Xin, H.; Yin, J.; Yin, D.; Yang, Z.; Li, J., Synthesis of novel ferrocenyl Mannich bases and their antibacterial activities. *J. Mol. Struct.* **2018**, *1157*, 482-485.
63. Chohan, Z. H., Antibacterial and antifungal ferrocene incorporated dithiothione and dithioketone compounds. *Appl. Organomet. Chem.* **2006**, *20* (2), 112-116.
64. Hafiz, A. A.; Badawi, A. M.; El-Deeb, F. I.; Soliman, E. A.; El-Awady, M. Y.; Mohamed, D. E., Ferrocene-Based Cationic Surfactants: Surface and Antimicrobial Properties. *J. Surfactants Deterg.* **2010**, *13* (2), 165-172.
65. Li, S.; Wang, Z.; Wei, Y.; Wu, C.; Gao, S.; Jiang, H.; Zhao, X.; Yan, H.; Wang, X., Antimicrobial activity of a ferrocene-substituted carborane derivative targeting multidrug-resistant infection. *Biomaterials* **2013**, *34* (4), 902-911.
66. Liu, Y.-T.; Lian, G.-D.; Yin, D.-W.; Su, B.-J., Synthesis and antimicrobial activity of some novel ferrocene-based Schiff bases containing a ferrocene unit. *Res. Chem. Intermed.* **2012**, *38* (3), 1043-1053.

67. Tiwari, K. N.; Monserrat, J.-P.; Hequet, A.; Ganem-Elbaz, C.; Cresteil, T.; Jaouen, G.; Vessieres, A.; Hillard, E. A.; Jolival, C., In vitro inhibitory properties of ferrocene-substituted chalcones and aurones on bacterial and human cell cultures. *Dalton Trans.* **2012**, 41 (21), 6451-6457.
68. Yavuz, S.; Yildirim, H., Ferrocene Derivatives Carrying Urea, Thiourea, and Sulfonamide Moieties: Synthesis and Evaluation of Antibacterial and Antifungal Activities. *J. Chem.* **2013**, 2013, 1-7.
69. Yin, D.; Sun, X.; Liu, Y., Ferrocene-Based with Thiadiazole Antibacterial Agents: Synthesis, Characterization, and Biological Evaluation. *Applied Mechanics and Materials* **2012**, 189, 181-184.
70. Sharaby, C. M.; Amine, M. F.; Hamed, A. A., Synthesis, structure characterization and biological activity of selected metal complexes of sulfonamide Schiff base as a primary ligand and some mixed ligand complexes with glycine as a secondary ligand. *J. Mol. Struct.* **2017**, 1134, 208-216.
71. Appelt, P.; da Silva, J. P.; Fuganti, O.; Aquino, L. E. N.; Sandrino, B.; Wohnrath, K.; Santos, V. A. Q.; Cunha, M. A. A.; Veiga, A.; Murakami, F. S.; Back, D. F.; de Araujo, M. P., New heterobimetallic ruthenium (II) complexes [Ru(N-S)(bipy)(dppf)]PF₆: Synthesis, molecular structure, electrochemistry, DFT, antioxidant and antibacterial potential. *J. Organomet. Chem.* **2017**, 846, 326-334.
72. Abd-Elzaher, M. M.; El-shiekh, S. M.; Eweis, M., Biological studies of newly synthesized ferrocenyl complexes containing triazinone moiety. *Appl. Organomet. Chem.* **2006**, 20 (10), 597-602.
73. Farooq, G.; Lokhande, M. V., Synthesis of Ferrocene Based Organometallic Compounds & Antimicrobial Activity. *IOSR JAC* **2014**, 7 (2), 27-32.
74. Elseman, A. M.; Shalan, A. E.; Rashad, M. M.; Hassan, A. M.; Ibrahim, N. M.; Nassar, A. M., Easily attainable new approach to mass yield ferrocenyl Schiff base and different metal complexes of ferrocenyl Schiff base through convenient ultrasonication-solvothermal method. *J. Phys. Org. Chem.* **2017**, 30 (6), e3639.
75. Shah, F. U.; Jamil, M.; Aslam, J.; Gul, A.; Akhter, Z.; Mirza, B., *Influence of ferrocene and transition metals on the biological activities of Schiff bases*. 2016; Vol. 38, p 1112-1120.
76. Li, S.; Wu, C.; Tang, X.; Gao, S.; Zhao, X.; Yan, H.; Wang, X., New strategy for reversing biofilm-associated antibiotic resistance through ferrocene-substituted carborane ruthenium(II)-arene complex. *Sci. China Chem.* **2013**, 56 (5), 595-603.
77. Liu, Y.; Sun, X.; Yin, D., Ferrocene-Based Antibacterial Agents: Synthesis, Characterization, and Biological Evaluation of Metal (II) Complexes with Glycine-Derived Compounds. *J. Adv. Mater. Res.* **2011**, 339, 317-320.
78. Liu, Y.-T.; Lian, G.-D.; Yin, D.-W.; Su, B.-J., Synthesis, characterization and biological activity of ferrocene-based Schiff base ligands and their metal (II) complexes. *Spectrochim. Acta A.* **2013**, 100, 131-137.
79. Mahmoud, W. H.; Mahmoud, N. F.; Mohamed, G. G., Mixed ligand complexes of the novel nanoferrocene based Schiff base ligand (HL): Synthesis, spectroscopic characterization, MOE studies and antimicrobial/anticancer activities. *J. Organomet. Chem.* **2017**, 848, 288-301.
80. Mahmoud, W. H.; Mahmoud, N. F.; Mohamed, G. G., Spectroscopic characterization and molecular docking studies of acetyl ferrocene-derived Schiff base ligand with phenanthroline and some transition metal ions. *J. Therm. Anal. Calorim.* **2018**, 131 (3), 2775-2793.
81. Mahmoud, W. H.; Mahmoud, N. F.; Mohamed, G. G., New nanobidentate Schiff base ligand of 2-aminophenol with 2-acetyl ferrocene with some lanthanide metal ions: synthesis, characterization and Hepatitis A, B, C and breast cancer docking studies. *J. Coord. Chem.* **2017**, 70 (20), 3552-3574.

82. Shabbir, M.; Akhter, Z.; Ahmad, I.; Ahmed, S.; Bolte, M.; Ismail, H.; Mirza, B., Ferrocene-based Schiff bases copper (II) complexes: Synthesis, characterization, biological and electrochemical analysis. *Inorg. Chim. Acta* **2017**, *463*, 102-111.
83. Wenzel, M.; Patra, M.; Senges, C. H. R.; Ott, I.; Stepanek, J. J.; Pinto, A.; Prochnow, P.; Vuong, C.; Langklotz, S.; Metzler-Nolte, N.; Bandow, J. E., Analysis of the Mechanism of Action of Potent Antibacterial Hetero-tri-organometallic Compounds: A Structurally New Class of Antibiotics. *ACS Chem. Biol.* **2013**, *8* (7), 1442-1450.
84. Lopes, R. Catalysis with bio-relevant metals: iron and nickel organometallic complexes in reduction reactions. Universidade Nova de Lisboa, 2018.
85. da Costa, A. P.; Viciano, M.; Sanaú, M.; Merino, S.; Tejada, J.; Peris, E.; Royo, B., First Cp*-Functionalized N-Heterocyclic Carbene and Its Coordination to Iridium. Study of the Catalytic Properties. *Organometallics* **2008**, *27* (6), 1305-1309.
86. Postigo, L.; Lopes, R.; Royo, B., Dehydrogenative coupling of aromatic thiols with Et₃SiH catalysed by N-heterocyclic carbene nickel complexes. *Dalton Trans.* **2014**, *43* (2), 853-858.
87. da Costa, A. P.; Lopes, R.; Cardoso, J. M. S.; Mata, J. A.; Peris, E.; Royo, B., Enantiomerically Pure Cyclopentadienyl- and Indenyl-Functionalized N-Heterocyclic Carbene Complexes of Iridium and Rhodium. *Organometallics* **2011**, *30* (16), 4437-4442.
88. Pereira, M. M.; Burrows, H. D., *Química - Síntese e Estrutura Uma abordagem prática*. Escolar Editora: 2006.
89. Cardoso, J. M. S.; Lopes, R.; Royo, B., Dehydrogenative silylation of alcohols catalysed by half-sandwich iron N-heterocyclic carbene complexes. *J. Organomet. Chem.* **2015**, *775* (Supplement C), 173-177.
90. Cardoso, J. M. S.; Royo, B., Unprecedented synthesis of iron-NHC complexes by C-H activation of imidazolium salts. Mild catalysts for reduction of sulfoxides. *Chem. Commun.* **2012**, *48* (41), 4944-4946.
91. Kandepi, V. V. K. M.; Cardoso, J. M. S.; Peris, E.; Royo, B., Iron(II) Complexes Bearing Chelating Cyclopentadienyl-N-Heterocyclic Carbene Ligands as Catalysts for Hydrosilylation and Hydrogen Transfer Reactions. *Organometallics* **2010**, *29* (12), 2777-2782.
92. World Health Organization, *Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics*; Geneva, 2017.
93. CLSI *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically, 10th Edition*; Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute: 2015.
94. Lemire, J. A.; Harrison, J. J.; Turner, R. J., Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications. *Nat. Rev. Microbiol.* **2013**, *11*, 371-384.
95. Regiel-Futyrá, A.; Dąbrowski, J. M.; Mazuryk, O.; Śpiewak, K.; Kyzioł, A.; Pucelik, B.; Brindell, M.; Stochel, G., Bioinorganic antimicrobial strategies in the resistance era. *Coord. Chem. Rev.* **2017**, *351*, 76-117.
96. Cardoso, J. M. S.; Fernandes, A.; Cardoso, B. d. P.; Carvalho, M. D.; Ferreira, L. P.; Calhorda, M. J.; Royo, B., Cationic Half-Sandwich Iron(II) and Iron(III) Complexes with N-Heterocyclic Carbene Ligands. *Organometallics* **2014**, *33* (20), 5670-5677.
97. Juven, B. J.; Pierson, M. D., Antibacterial Effects of Hydrogen Peroxide and Methods for Its Detection and Quantitation. *J. Food Prot.* **1996**, *59* (11), 1233-1241.

Capítulo 5

Síntese, caracterização e avaliação da atividade antiplasmódica de chalconas

As chalconas podem ser consideradas com uma das mais importantes classes de flavonóides naturais, devido à sua fácil síntese e modelação, o que lhes permite conter na sua estrutura uma grande variedade de substituintes, conferindo-lhes, deste modo, potencial para múltiplas aplicações. ¹⁻⁵ Destacando as suas aplicações a nível medicinal (Figura 5.1), ⁶⁻¹⁰ estas podem incluir a atuação das chalconas como agente anticancerígeno, ¹¹⁻¹⁶ antioxidante, ¹⁷ antifúngico, ¹⁸⁻²⁰ antileishmaniose, ²¹ antituberculose, ²² antiviral, ^{23, 24} anti-inflamatório, ²⁵ antibacteriano, ^{8, 26-28} hepatoprotetor ²⁹, regulador cardiovascular, ³⁰ ou antimalárico. ^{9,31}

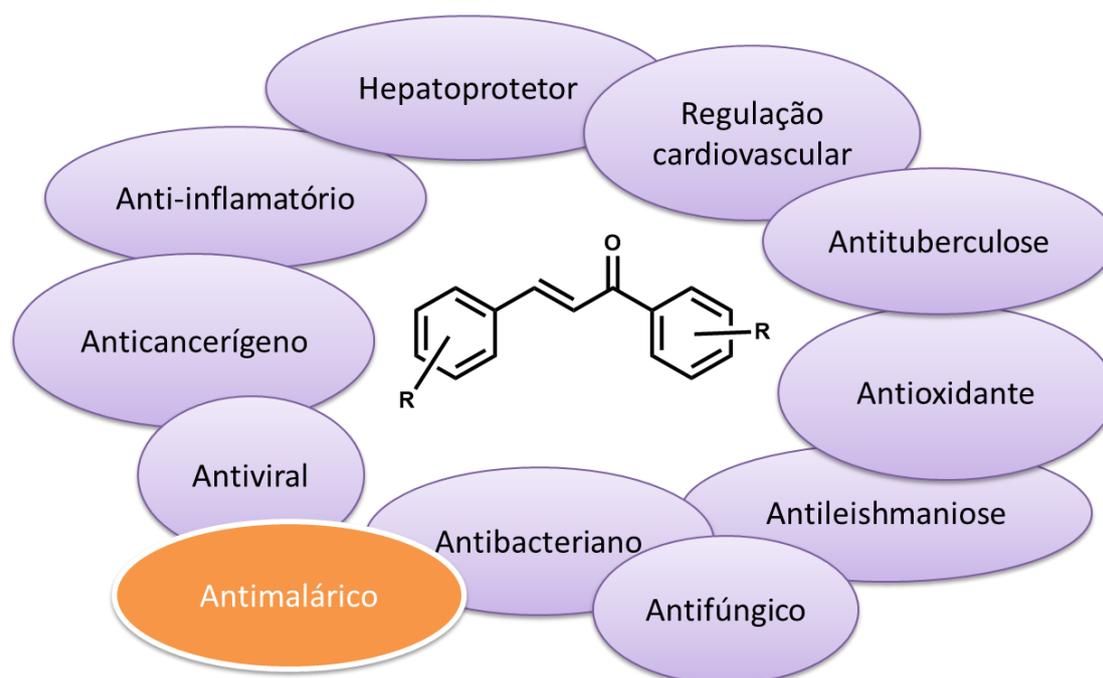


Figura 5.1- Atividades biológicas das chalconas

Estas múltiplas potencialidades são a justificação primordial para o interesse da comunidade científica no desenvolvimento de diferentes metodologias para a sua síntese. ³² Tal como descrito no capítulo 1 desta Tese, a atividade antimalárica das chalconas foi pela primeira vez observada num

produto natural denominado Licochalcona A.³³ A partir daí, inúmeros análogos foram sintetizados.³² No entanto, encontram-se na literatura poucos estudos estrutura/atividade. Dentro do nosso conhecimento, não existem estudos com chalconas relativamente à sua atividade na fase hepática da infecção por *Plasmodium*. Como primeira aproximação, decidiu-se analisar estudos estrutura/atividade na fase eritrocitária. Liu e os seus colaboradores^{33,34} descreveram um estudo onde foi avaliada a influência de grupos polares, apolares e halogénios no anel B da chalcona, mantendo grupos alcóxi ou hidroxilo no anel A (Figura 5.2). Deste estudo concluiu-se que as chalconas hidroxiladas foram menos ativas, sendo a 1-(2,3,4-trimetoxifenil)-3-(3-quinolinil)prop-2-en-1-ona o composto mais ativo.

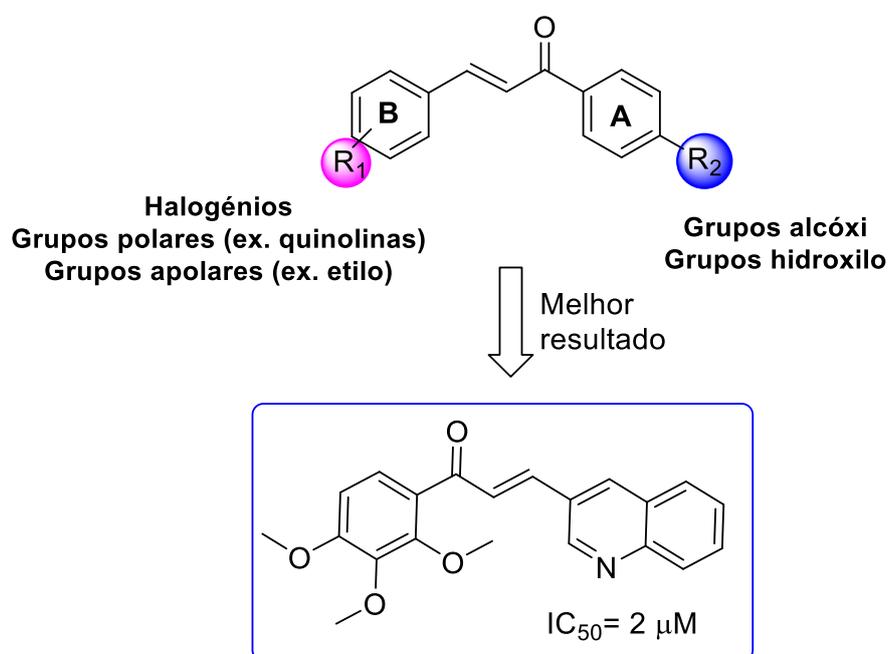


Figura 5.2- Estudos estrutura/atividade descritos por Liu e colaboradores³⁴

Por outro lado, Yadav *et al.*¹⁰ reportaram um estudo invertendo os substituintes entre os anéis, ou seja, modelando a estrutura com grupos alcóxi no anel B e grupos amina na posição 4 do anel A, tendo-se destacado a 1-(4-(benzimidazol-1-il)fenil)-3-(2,4-dimetoxifenil)prop-2-en-1-ona com um IC_{50} de 1,1 $\mu g/mL$ (Figura 5.3).

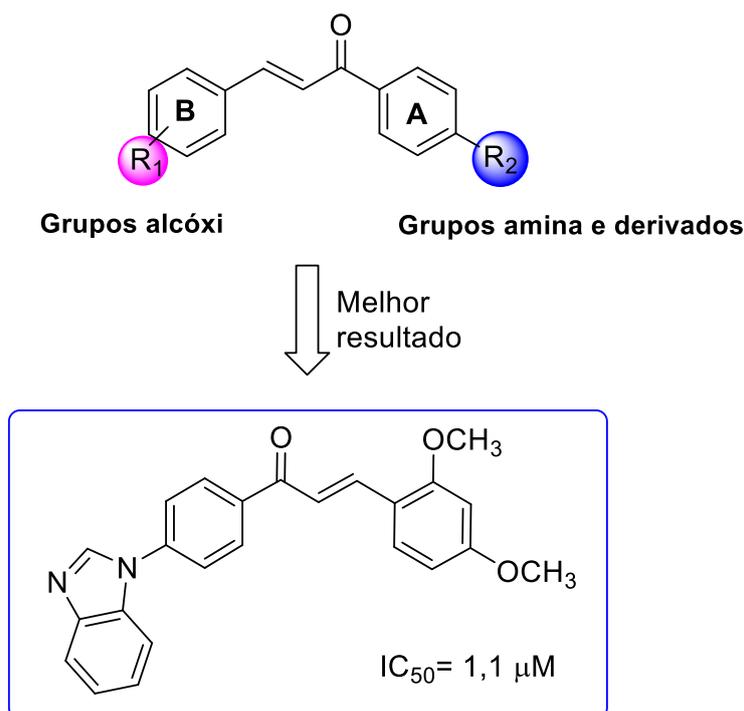


Figura 5.3- Estudos estrutura/atividade descritos por Yadav e colaboradores¹⁰

Baseados nos resultados obtidos nestes estudos, decidiu-se no trabalho descrito neste capítulo sintetizar-se uma série de chalconas contendo diferentes grupos amina no anel A e grupos alcóxi no anel B, de modo a avaliar a sua atividade antiplasmódica, centrando-se principalmente na fase hepática do ciclo de vida do parasita.

Os estudos pioneiros de síntese de chalconas foram realizados por Claisen³⁵ e Schmidt³⁶ em 1881, que descreveram a condensação de cetonas aromáticas com aldeídos, catalisada por ácidos ou bases fortes. A partir daí, inúmeros autores reportaram modificações e melhorias a esta metodologia, como foi recentemente compilado.² No entanto, a transposição destes métodos de síntese da escala laboratorial para a escala industrial tem sido altamente desafiante, uma vez que estes geralmente conduzem à produção de elevadas quantidades de resíduos, o que os torna caros e prejudiciais para o meio ambiente, sendo inapropriados para a produção destes compostos, especialmente tendo em conta as atuais regulamentações da Comissão Europeia (CE).³⁷

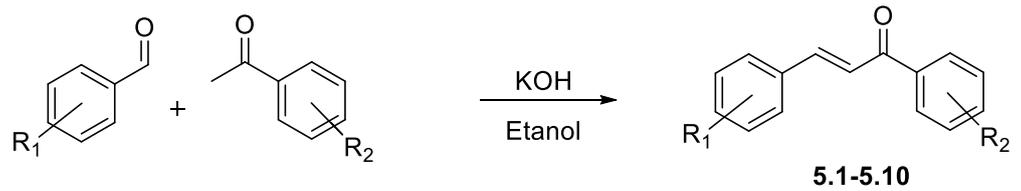
5.1- Desenvolvimento de um novo método de síntese de chalconas

Baseado no explicitado acima, é imperativo o desenvolvimento de processos sintéticos alternativos focados em reações com maior economia atômica, menor consumo de energia e uso de solventes renováveis. Com base neste conhecimento, a simbiose entre o nosso interesse na síntese de derivados de chalconas para aplicação em química medicinal com o desenvolvimento de processos de síntese sustentáveis de aplicabilidade industrial,³⁸⁻⁴⁴ levou-nos à idealização de uma nova otimização do conhecido método Claisen-Schmidt.

Numa experiência tipo, o benzaldeído e a acetofenona (1 mmol) foram dissolvidos na quantidade mínima de etanol absoluto (1 mL). De seguida, adicionou-se a quantidade mínima de catalisador necessária para o sucesso da reação, 10 mol% de KOH em pó. A mistura reacional foi agitada à temperatura ambiente, tendo-se observado a formação de precipitado após 2 minutos. O sólido foi filtrado e lavado com água, obtendo-se a (*E*)-1,3-difenilprop-2-en-1-ona, **5.1**, com um rendimento de 92% (Tabela 5.1, entrada 1).

O *scope* desta nova metodologia foi avaliado para diferentes aldeídos e cetonas, selecionados quer com base na avaliação da aplicabilidade da reação em grupos atratores e doadores de eletrões, quer nos estudos de estrutura-atividade abordados acima.^{10, 34, 39}

Deve ser enfatizado que o uso de quantidades mínimas de etanol, quando comparado com o previamente descrito na literatura,⁴⁰⁻⁵⁰ conduz, em todos os casos, a uma precipitação *in situ* dos compostos, o que representa uma grande vantagem no que diz respeito a uma transposição para escala industrial. Após filtração e lavagem com água, as chalconas foram obtidas com rendimentos elevados, entre 80-98% independentemente dos diferentes substituintes no benzaldeído (Tabela 5.1, entradas 2-4) ou na acetofenona (Tabela 5.1, entradas 4-10) utilizados. Deve realçar-se que, contrariamente ao descrito para outras metodologias,² neste trabalho, os rendimentos não foram significativamente afectados pela presença quer de doadores (ex. -OCH₃), quer de atratores de electrões (ex. 4-NO₂). Um rendimento ligeiramente inferior foi obtido para o 3,4,5-trimetoxibenzaldeído (80%, Tabela 5.1, entrada 3) .

Tabela 5.1- Scope de aldeídos e cetonas utilizados para a síntese de chalconas.


Entrada	Composto	R ₁	R ₂	Rendimento Isolado (%)
1	5.1	H	H	92
2	5.2	4-OCH ₃	H	94
3	5.3	3,4,5-OCH ₃	H	80
4	5.4	2-NO ₂	H	93
5	5.5	H	4-OCH ₃	95
6	5.6	4-OCH ₃	4-F	98
7	5.7	4-OCH ₃	4-NO ₂	93
8	5.8	3,4,5-OCH ₃	4-NH ₂	96
9	5.9	2-Cl	4-NH ₂	97
10	5.10	3,4,5-OCH ₃	4-piperazina	0

Adicionalmente, um resultado notável foi obtido quando se realizou a condensação da 4-aminoacetofenona com o 2-clorobenzaldeído ou com o 3,4,5-trimetoxibenzaldeído, originando as correspondentes chalconas em excelentes rendimentos (Tabela 5.1, entradas 8 e 9, 96 e 97%). Na literatura, a síntese de aminochalconas foi reportada apenas em rendimentos moderados.⁸ Por esta razão, alguns autores desenvolveram estratégias de síntese indireta para a sua preparação, através da redução de nitrochalconas.^{55, 56} Deste modo, a nossa estratégia sintética permite ultrapassar algumas limitações das metodologias previamente reportadas, possibilitando uma grande melhoria na síntese de chalconas aminadas, reconhecidas como *building blocks* para várias aplicações medicinais.⁶⁻¹⁰

Apesar disso, e mesmo após múltiplas tentativas, não foi possível obter a (*E*)-1-(4-(piperazin-1-il)fenil)-3-(3,4,5-trimetoxifenil)prop-2-en-1-ona, chalcona **5.10**, aplicando esta metodologia. Deste modo, procedeu-se à proteção da 1-(4-(piperazin-1-

il)fenil)etanona adaptando procedimentos típicos para a proteção de aminas com *tert*-butiloxicarbonilo, comumente conhecido por Boc (Figura 5.4).⁵¹ Assim, a uma solução desta acetofenona em acetonitrilo, foi adicionado DMAP e dicarbonato de di-*tert*-butilo. A mistura foi deixada em agitação vigorosa à temperatura de 30 °C durante 24h. Após o término da reação, evaporou-se o solvente a pressão reduzida, e redissolveu-se o produto em éter dietílico. A fase orgânica foi lavada com uma solução de 1M de bissulfato de sódio, com uma solução de 1M de bicarbonato de sódio e com uma solução saturada de hidróxido de sódio. Por último, secou-se com sulfato de sódio anidro, filtrou-se e evaporou-se o solvente, obtendo-se a acetofenona protegida **5.11** com um rendimento de 87%. Após este passo prévio de proteção, procedeu-se à síntese da chalcona pelo método descrito e desenvolvido nesta Tese usando KOH em etanol. Deste modo, a chalcona **5.12** foi obtida com um rendimento de 94%.

Por fim, procedeu-se à desproteção do grupo amina. Assim, num balão de fundo redondo contendo a chalcona **5.12**, adicionou-se 10 mol% de TFA e 2 mL de diclorometano. A reação foi deixada em agitação à temperatura ambiente durante 24 horas. Obteve-se o composto pretendido **5.10** com um rendimento de 96%.

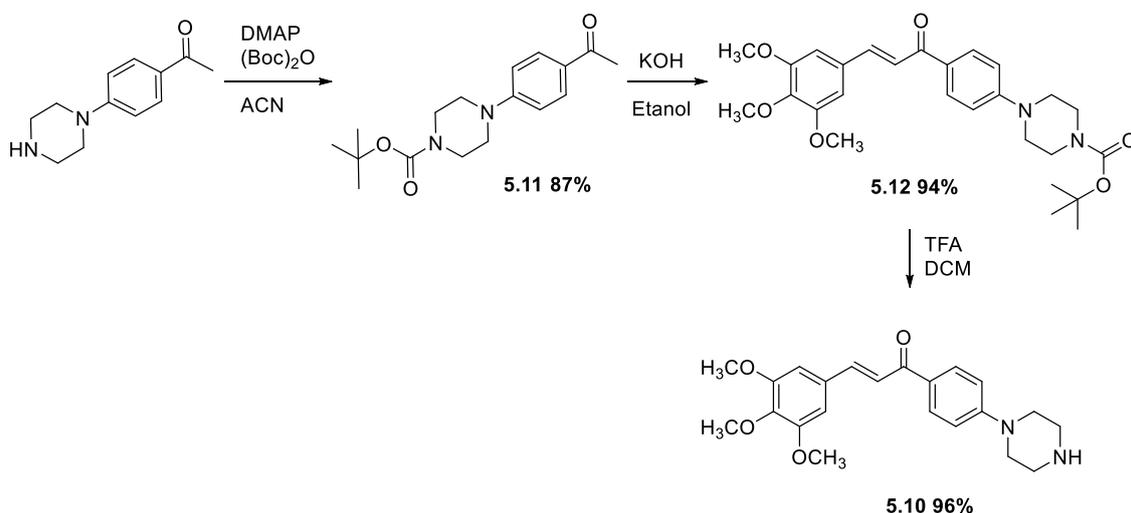


Figura 5.4- Esquema sintético da (*E*)-1-(4-(piperazin-1-il)fenil)-3-(3,4,5-trimetoxifenil)prop-2-en-1-ona **5.10**

Todas as chalconas anteriormente apresentadas foram caracterizadas por RMN de ^1H e ^{13}C . Nas figuras 5.5-5.7 encontra-se a título de exemplo a caracterização da

chalcona **5.12**. As restantes caracterizações encontram-se descritas na secção experimental, capítulo 6.

O RMN de ^1H apresenta 10 sinais característicos: quatro sinais em forma de duplete a 8,00; 7,70; 7,42 e 6,92 ppm; três sinais em forma de singuleto a 6,86; 3,92 e 3,90 ppm; dois sinais em forma de multiplete entre 3,63 – 3,57 e 3,39 – 3,33 ppm e por fim um sinal em forma de singuleto a 1,49 ppm. O singuleto a 1,49 ppm é atribuído aos nove prótons dos grupos metílicos do grupo protetor Boc (H10',11',12'). Por sua vez, os dois multipletos entre 3,92 – 3,59 e 3,37 – 3,35 ppm, correspondem aos oito prótons alquílicos da piperazina (H2',3',5',6') e os dois singuletos a 3,92 e 3,89 ppm aos nove prótons dos grupos metoxilo (H3'',4'',5''). A 7,70 e 7,42 ppm encontram-se os dois dupletos característicos dos prótons da ligação dupla da chalcona. Estes apresentam um acoplamento de $J = 15,5$ Hz, indicando que se encontram em posição *trans*. Pensando nas formas de ressonância típicas dos compostos carbonílicos α - β insaturados, podemos facilmente prever que o próton β (H7) relativamente ao grupo carbonilo terá uma menor densidade eletrónica e por isso se encontrará mais desviado para campo baixo (7,70 ppm). Por oposição, o próton α (H8) corresponderá ao sinal a 7,42 ppm. Por fim, os restantes sinais em campo baixo são atribuídos aos prótons dos anéis aromáticos, apresentando dubletos com acoplamentos típicos de $J = 7,5$ Hz no caso do anel A (H11,12,14,15) e em forma de singuleto (6,86 ppm) no caso do par de prótons do anel B (H2,6). Relativamente aos prótons aromáticos do anel A, sabemos que os prótons H11 e H15 possuem um grupo electroatratador em *orto* e um grupo doador em *meta*, contribuindo para uma maior desblindagem e conseqüente desvio para campo baixo (8,00 ppm). Assim, pelo efeito contrário, podemos atribuir os prótons H12 e H14 ao dublete a 6,92 ppm. Por RMN unidimensional não foi possível fazer a atribuição dos multipletos entre 3,63 – 3,57 e 3,39 – 3,33 ppm, correspondentes aos oito prótons alquílicos da piperazina (H2',3',5',6'). Deste modo, a sua atribuição foi realizada com recurso a HMBC, observando qual dos multipletos se correlacionava com o carbono do grupo Boc (C7') ou com o carbono sp^2 quaternário diretamente ligado à piperazina (C13).

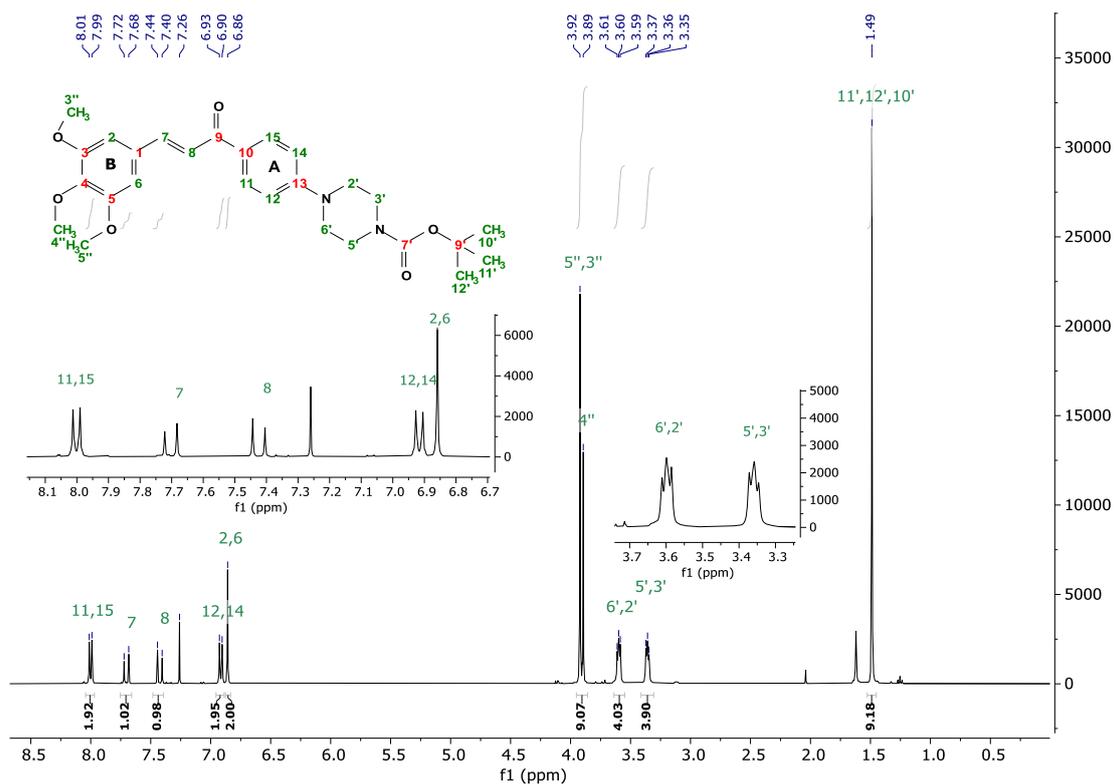


Figura 5.5- Espectro de RMN de ^1H para a chalcona **5.12** em CDCl_3

Com a atribuição dos sinais provenientes dos prótons efetuada, será feita uma análise semelhante para o espectro unidimensional de RMN de ^{13}C (Figura 5.6). No entanto, através deste não conseguimos realizar a atribuição inequívoca de todos os sinais, sendo necessário recorrer a espectros bidimensionais.

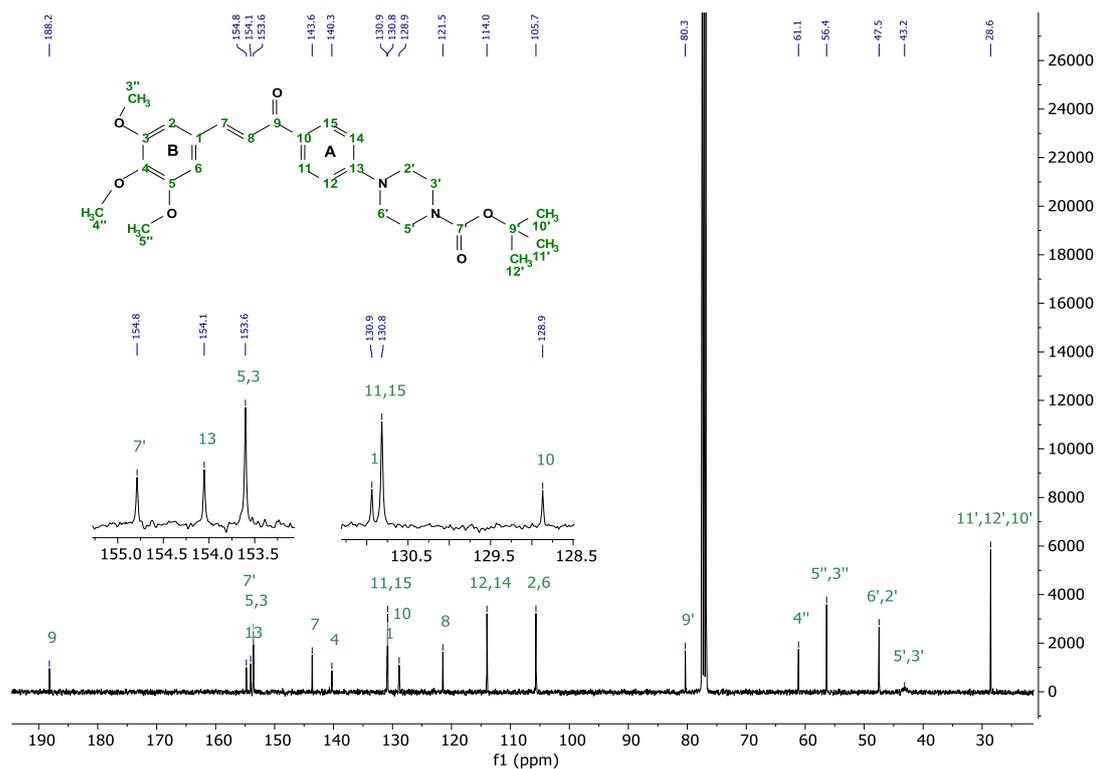


Figura 5.6- Espectro de RMN ^{13}C para a chalcona **5.12** em CDCl_3

Neste sentido, foram efetuados espectros de acoplamento ^1H - ^{13}C do tipo HSQC e HMBC (Figura 5.7). Após atribuição inequívoca dos prótons, foi relativamente fácil atribuir a maioria dos carbonos diretamente ligados a hidrogênios utilizando as correlações de HSQC, tendo a maior dificuldade sido a atribuição dos carbonos quaternários (Figura 5.8).

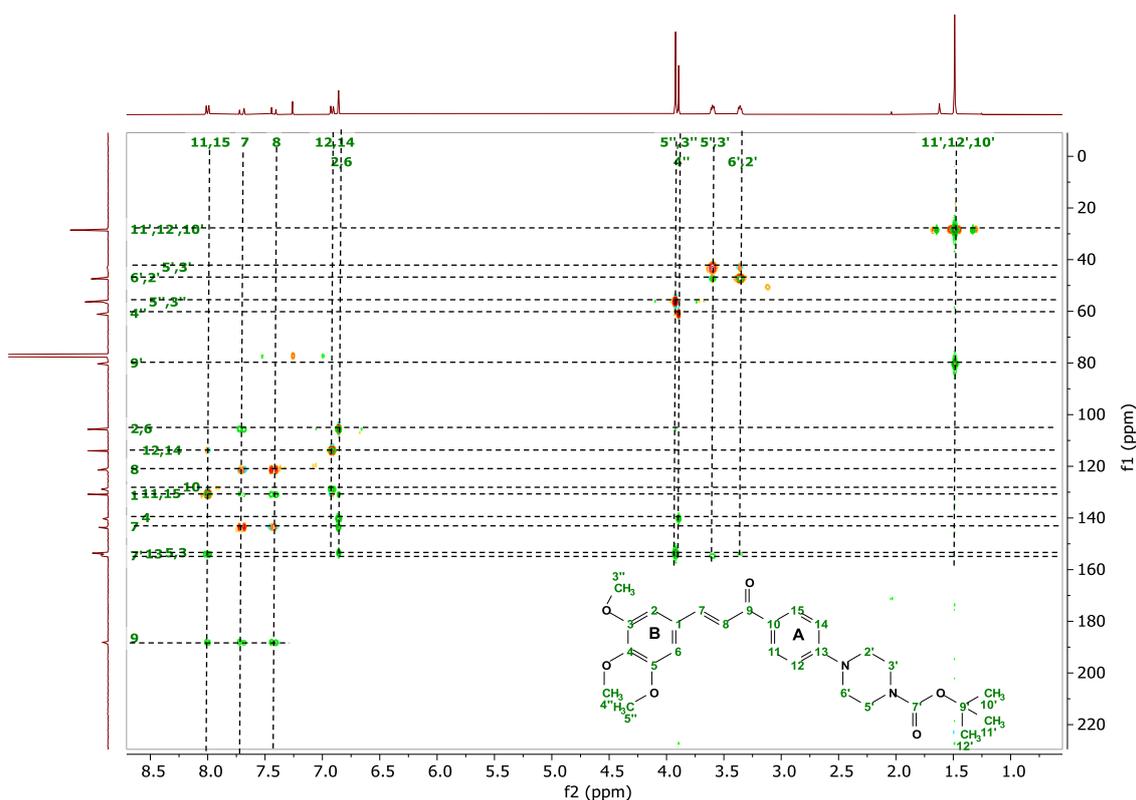


Figura 5.7- Sobreposição do espectro HSQC (laranja) com o espectro HMBC (verde) para a chalcona **5.12** em CDCl_3

O carbono quaternário mais simples de atribuir é o $\text{C}9'$, com desvio a 80,3 ppm, encontrando-se na zona típica dos carbonos alifáticos diretamente ligados a heteroátomos, e apresenta uma correlação com os grupos metilo do grupo Boc. Relativamente aos grupos carbonilo, estes encontram-se normalmente em frequências entre 200-150 ppm. O grupo cetona, ao possuir uma α - β insaturação, terá o seu sinal desviado para campo alto, a 188,2 ppm ($\text{C}9$). O carbono carbonílico do grupo Boc por se encontrar rodeado por dois grupos electrodoadores, encontrar-se-á ainda mais desviado para campo alto, pelo que a sua atribuição (154,8 ppm, $\text{C}7'$) foi efetuada através das correlações por HMBC (Figura 5.8). O $\text{C}13$ (154,0 ppm) foi atribuído por este apresentar correlação com sinais do seu anel aromático e com sinais alquílicos do grupo piperazina. O $\text{C}10$ (128,9 ppm) correlaciona-se apenas com os protões do seu respetivo anel aromático (H12 e H14). Deste modo, falta apenas atribuir os 4 carbonos quaternários do anel B. O carbono 1 é o único que se correlaciona com os protões da ligação dupla da chalcona, sendo por isso, facilmente atribuído. Relativamente aos carbonos 4 (140,3 ppm) e 3,5 (153,6 ppm), ambos se correlacionam com os protões

aromáticos (H2 e H6), mas apenas se correlacionam com os prótons do grupo metoxilo diretamente ligado a cada um. Ao contrário dos carbonos 3 e 5, o carbono 4 sofre um efeito eletrodoador por parte de ambos os grupos metoxilo em posição *orto* e, por essa razão, encontra-se mais desviado para campo alto.

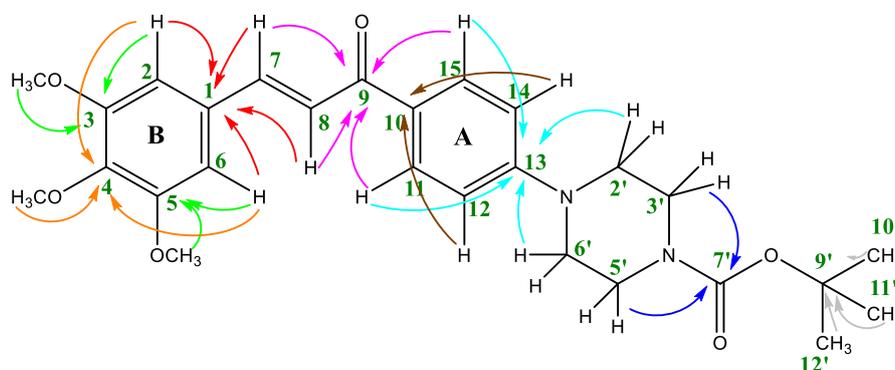


Figura 5.8- Esquema das correlações ^1H - ^{13}C do tipo J^2 e J^3 observadas em HMBC mais relevantes para a identificação dos carbonos quaternários da chalcona **5.12**

5.1.1- *Scale-up* reacional

Tal como referido no texto introdutório deste capítulo, um dos grandes desafios das metodologias de síntese de chalconas tem sido a sua transposição da escala laboratorial para a escala industrial. Neste sentido, foram realizados testes de *scale-up* da reação com 5 e 25 mmol usando o 4-metoxibenzaldeído e acetofenona como modelo. A chalcona foi obtida com um rendimento de 92% (1,10 g) e 97% (5,8 g), respetivamente. Na reação com maior quantidade, observou-se um ligeiro aumento do tempo necessário para que ocorra a precipitação de 5 para 15 minutos.

Estes resultados demonstraram a capacidade da nossa metodologia ser facilmente transposta para escala multi-grama, continuando a verificar-se a precipitação do produto pretendido, sem alterações significativas nos rendimentos obtidos.

5.1.2- Sustentabilidade da metodologia desenvolvida

Ao idealizar uma nova metodologia sintética sustentável, é importante verificar a melhoria de sustentabilidade introduzida no novo processo e não nos focarmos apenas na eficiência da reação. No sentido de tentar quantificar a sustentabilidade dos processos químicos e permitir a sua comparação têm surgido diversas métricas, de entre as quais se destaca o fator ambiental (fator-E)⁵² e o fator EcoScale.⁵³

O fator-E ambiental⁵² representa a relação entre o peso total de resíduos gerados e o peso do produto final, sendo uma ferramenta útil para avaliação rápida do processo implementado com base nos resíduos gerados. Nesta métrica o valor ideal é zero, correspondente a um processo onde não existe produção de qualquer resíduo. Assim, esta métrica centra-se na quantidade de resíduos gerados, não tendo em consideração o impacto ambiental dos produtos, dos resíduos ou dos solventes utilizados nos processos de purificação. Numa tentativa de colmatar esta lacuna, recentemente, surgiu o fator EcoScale⁵³ que pretende avaliar a sustentabilidade de um determinado processo em função do rendimento, do preço dos componentes da reação, da segurança, das condições reacionais, da temperatura, do tempo e facilidade de purificação e isolamento. O EcoScale define uma reação ideal com o valor de 100 e em seguida subtrai pontos de penalidade definidos para condições não ideais. Os valores de fator-E foram calculados usando sempre a síntese da (*E*)-1,3-difenilprop-2-en-1-ona, **5.1**, como referência para cada método, de modo a verificar a sustentabilidade do novo processo desenvolvido, usando KOH como base, e a compará-lo com os métodos previamente descritos na literatura.^{41-44, 46, 54, 55} Os valores apresentam-se na figura 5.9 e o seu cálculo encontra-se especificado no capítulo 6 (Secção experimental). Da análise dos valores obtidos, pode observar-se que a diminuição da quantidade de solvente e de catalisador utilizado, bem como o ligeiro aumento de rendimento conduz a uma melhoria significativa nos valores do E-fator para 4,2.

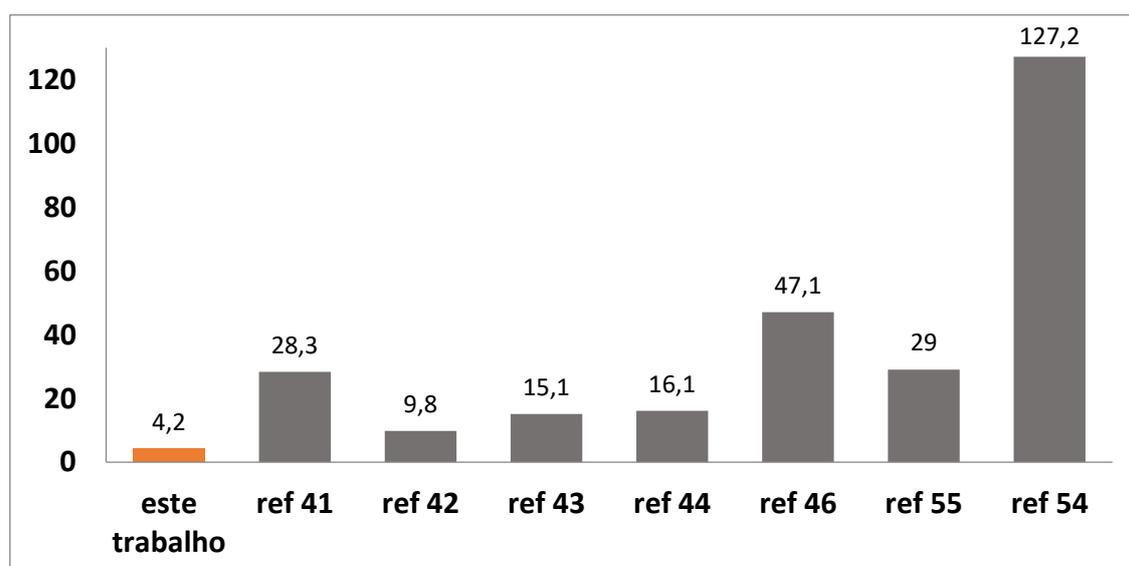


Figura 5.9- Valores de Fator-E para a metodologia descrita vs métodos descritos na literatura

Adicionalmente, o valor de Ecoscale para a metodologia desenvolvida neste trabalho foi também calculado de acordo com a tabela reportada por Van Aken⁵³. Deste modo, a nossa metodologia foi penalizada com 4 pontos devido ao rendimento obtido $[(100-\text{rendimento obtido})/2]$; 3 pontos relativamente ao preço dos componentes, tendo em conta que na Sigma-Aldrich 1 L de benzaldeído custam 35,60 €, 1 L de acetofenona 40,80 €, 1 kg de KOH 38 € e 1 L de etanol cerca de 16€; 1 ponto devido à purificação necessitar de filtração seguida de cristalização e por último 20 pontos pela perigosidade dos reagentes utilizados (benzaldeído- prejudicial, acetofenona- potencialmente perigoso, KOH- Corrosivo, etanol- Altamente inflamável). Foi obtido o elevado valor de 72/100.

Estas métricas evidenciam o aumento da sustentabilidade do método desenvolvido face aos previamente descritos, facto derivado da redução do tempo reacional e desta metodologia evitar processos de purificação laboriosos, nomeadamente os que envolvem vários passos desde neutralização com HCl, a extrações e lavagens sucessivas.

5.2- Avaliação da atividade antiplasmódica de chalconas

Tal como referido no capítulo 1 desta Tese, a maioria dos medicamentos utilizados atualmente no tratamento da malária atuam fortemente na fase eritrocitária. No entanto, para erradicação da malária, é necessário o desenvolvimento de medicamentos que atuem na fase hepática do desenvolvimento do parasita, devido às formas latentes do parasita que podem persistir no fígado, resultando em recidivas. Deste modo, esta fase do desenvolvimento do parasita tem um enorme potencial para intervenção de novas terapêuticas antimaláricas.⁵⁶⁻⁵⁸

Neste sentido, sete das chalconas sintetizadas foram selecionadas com base nos estudos estrutura/atividade apresentados acima para avaliar a sua atividade contra a fase hepática da infeção pelo parasita da malária. Os estudos foram realizados no deslocamento da Carolina S. Vinagreiro ao Prudêncio Lab, no Instituto de Medicina Molecular da Universidade de Lisboa. A capacidade destes compostos inibirem a infeção de linhas celulares Huh-7 por *P. berghei* foi avaliada usando um protocolo baseado na

medição de bioluminescência desenvolvido no Prudêncio Lab do Instituto de Medicina Molecular, Lisboa (Figura 5.10).⁵⁹ Neste ensaio, são utilizados parasitas geneticamente modificados para expressar luciferase (*PbLuc*), uma enzima que utiliza a luciferina como substrato para catalisar reações biológicas que transformam energia química em energia luminosa, de modo a poder quantificar a carga parasitária em células hepáticas infetadas.

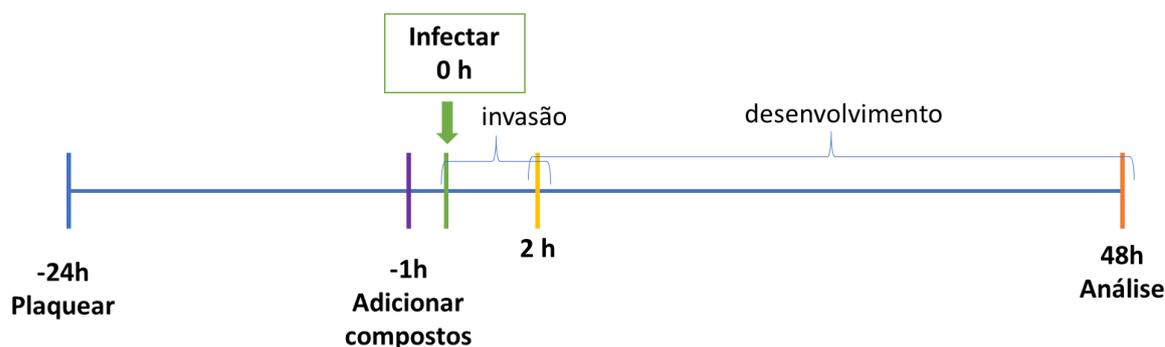


Figura 5.10- Protocolo experimental utilizado na avaliação da atividade antiplasmódica

Sucintamente, as células Huh-7 são plaqueadas em placas de 96 poços no dia anterior ao tratamento com os fármacos e à infeção. Soluções *stock* dos compostos são preparadas e diluídas com meio de acordo com as concentrações de teste desejadas. Para a realização do primeiro *screening*, testaram-se 3 concentrações de cada composto - 1, 5 e 10 μM - em triplicado. O meio de cultura é substituído por meio contendo os compostos nas concentrações desejadas, 1 hora antes da infeção. Como controlo, utilizou-se DMSO numa quantidade equivalente à presente na concentração mais elevada dos compostos testados.

De seguida, procedeu-se à disseção de mosquitos *Anopheles* fêmea infetados com parasitas *PbLuc*, de modo a retirar as suas glândulas salivares (Figura 5.11), de onde, após um processo de disrupção, são extraídos os esporozoítos. Uma hora após a adição dos compostos, acrescenta-se a cada poço 10.000 esporozoítos. Procede-se a uma centrifugação (1700 *g*, 5 minutos) de modo a promover o contacto e aumentar a infeção e, de seguida, incubam-se as células por 48 horas a 37 °C na presença de 5% de CO_2 . Após este tempo, realiza-se um processo de lise celular e por fim, através da medição da luminescência usando o protocolo para o ensaio da luciferase descrito no capítulo 6 desta Tese, foram quantificados os níveis de infeção. Adicionalmente, é também

avaliada a viabilidade celular usando o ensaio de Alamar Blue. Neste, o metabolismo das células vivas converte a resazurina (componente ativo do Alamar Blue) em resofurina, possuindo diferenças quantificáveis ao nível da absorvidade.

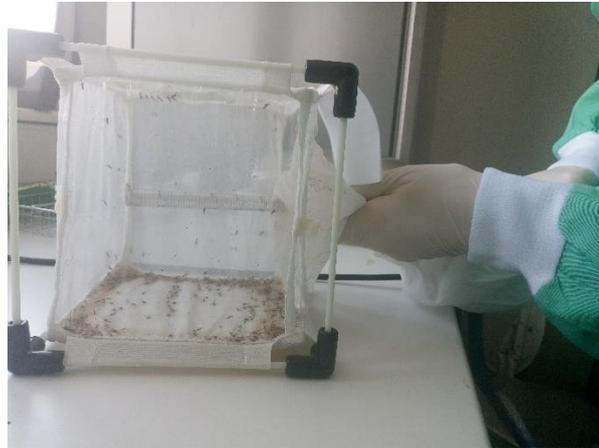


Figura 5.11- Processo de dissecação dos mosquitos realizado pela autora da Tese (Carolina S. Vinagreiro)

A análise dos resultados encontra-se em registo gráfico na figura 5.12, onde as barras representam a percentagem de infeção e os pontos a confluência celular. Note-se que uma confluência celular de 100% é obtida quando as células ocupam todo o poço da placa e a sua % diminui de forma diretamente proporcional ao aumento da toxicidade celular dos compostos. Os resultados são expressos como a média \pm desvio padrão, sendo que as flutuações apresentadas (barras de erro) se devem à variabilidade

característica deste tipo de ensaios. Observa-se que a chalcona **5.2** não tem qualquer atividade, enquanto as restantes apresentam atividades nas concentrações de 5 e 1 μM . Observa-se ainda toxicidade do composto **5.12** na maior concentração estudada (10 μM).

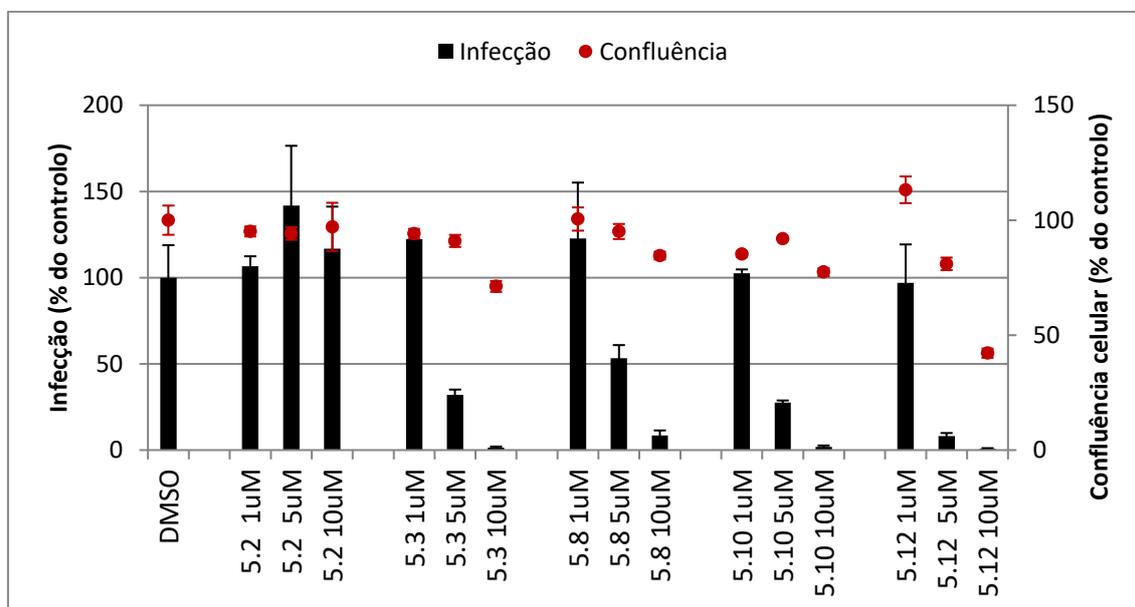


Figura 5.12- Primeiro *screening* de atividade dos compostos selecionados (**5.2**, **5.3**, **5.8**, **5.10**, **5.12**)

Os resultados deste primeiro *screening* permitiram excluir o composto **5.2** dos estudos subsequentes. O IC_{50} é uma medida quantitativa que indica a concentração necessária de uma substância inibidora específica para inibir, *in vitro*, um determinado processo biológico ou componente biológico em 50%, pelo que neste caso específico indica-nos a concentração de chalcona necessária para inibir 50% da infecção hepática por *P. berghei*. Para o cálculo destes valores, foi utilizado um procedimento semelhante ao anteriormente descrito, mas utilizando concentrações de cada composto selecionadas de acordo com os resultados de citotoxicidade observados no primeiro *screening*. Foram realizados três ensaios independentes, cada um com poços em triplicado, para cada concentração. As concentrações para cada composto foram selecionadas de acordo com as indicações dadas pelo primeiro *screening*, quer a nível de atividade quer de toxicidade. A título de exemplo, na figura 5.13 encontra-se o gráfico referente a uma das experiências realizadas para o cálculo do IC_{50} para a chalcona **5.12**.

Como se pode observar, nas concentrações selecionadas, o composto não apresenta qualquer hepatotoxicidade.

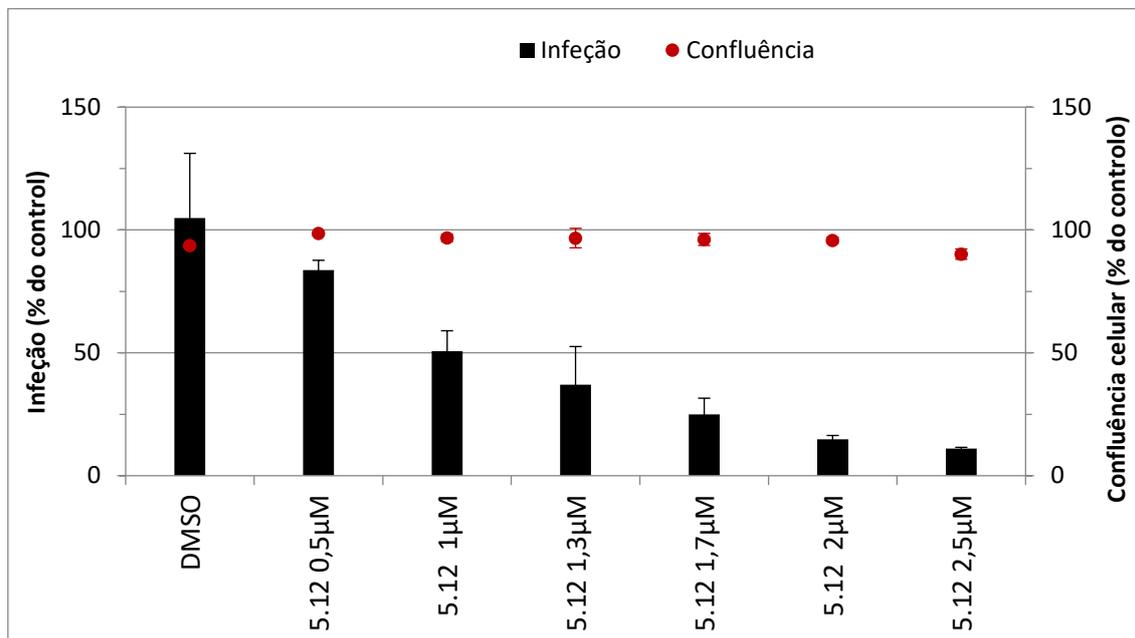


Figura 5.13- Efeito de diversas concentrações da chalcona 5.12 na porcentagem de infecção e confluência celular

Após se obter os resultados experimentais, procede-se à construção de um gráfico da porcentagem de infecção em função do logaritmo da concentração (Figura 5.14). O valor de IC_{50} é calculado através da equação de ajuste entre os pontos obtidos, quando o valor do eixo das ordenadas é 50%.

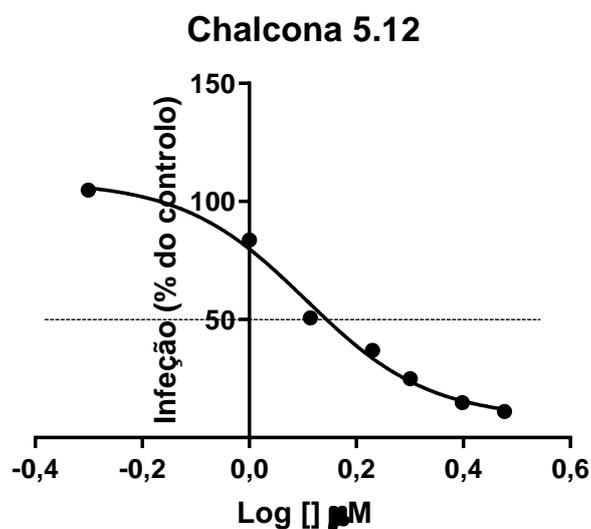


Figura 5.14- Ajuste para o efeito da dose da chalcona 5.12 em função da porcentagem de infecção

O mesmo procedimento foi realizado para os restantes compostos e os resultados encontram-se resumidos na tabela 5.2. Pela análise desta tabela pode concluir-se que a chalcona mais ativa na fase hepática da infeção *in vitro* por *P. berghei* é a chalcona **5.12**, com um IC₅₀ de 1,45 ± 0,04 µM (Tabela 5.2, entrada 4), o que corresponde a uma potência cerca de 7 vezes superior à da primaquina, também avaliada como controlo nesta experiência. É interessante a comparação entre as chalconas **5.10** e **5.12**, que apenas se distinguem na proteção do grupo amina com um grupo Boc. Como se observa, na chalcona com a amina livre **5.10** o valor de IC₅₀ aumenta consideravelmente para valores de 3,79 ± 1,13 µM (Tabela 5.2, entrada 3).

Tabela 5.2- IC₅₀ dos compostos avaliados contra a infeção hepática *in vitro* por *P. berghei*.

Entrada	Composto	IC ₅₀ /µM	Erro	LogP ^a
1	5.3	4,84	0,47	3,17
2	5.8	5,27	1,64	2,38
3	5.10	3,79	1,13	2,87
4	5.12	1,45	0,04	3,99
5	Primaquina	9,5	2,3	1,58

^a Estimado pelo MarvinSketch 15.10.19 usando a função de cálculo ChemAxon

Pensou-se que esta variação na atividade antiplasmodica pudesse estar relacionada com a alteração do coeficiente de partição, pelo que estes foram previstos utilizando o software MarvinSketch 15.10.19 usando a função de cálculo ChemAxon (Figura 5.15). Como se pode observar na figura 5.15, existe uma tendência em que se observa que os mais hidrofílicos são menos ativos e os mais hidrofóbicos mais ativos, podendo por isso esta propriedade ser importante, mas não exclusiva, para a sua atividade. Mazier e os seus colaboradores tentaram estabelecer esta correlação, mas usando moléculas com diferentes estruturas, pelo que não foi possível retirar conclusões concretas.⁶⁰

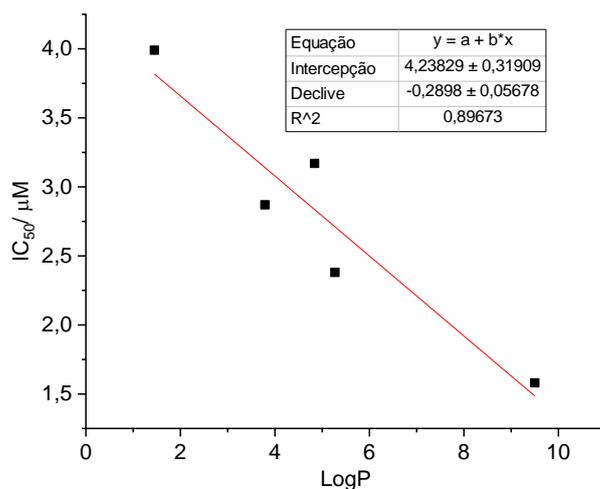


Figura 5.15- Correlação entre atividade antiplasmódica das chalconas e o seu LogP previsto

Adicionalmente, foram realizados pelo Prudêncio Lab estudos de atividade destes compostos na fase eritrocitária, mas estes não exibiram qualquer atividade.

5.3- Conclusão

Como referido, as chalconas são motivos estruturais essenciais numa variedade de aplicações medicinais. Neste sentido, o objetivo central deste capítulo consistiu no *design* de chalconas com grupos adequados para possuírem atividade antimalárica, de acordo com a análise de estudos estrutura-atividade previamente descritas. Além disso, e como um dos grandes focos desta Tese são os processos sintéticos, desenvolvemos um processo sintético sustentável alternativo para a síntese destes compostos, baseado em modificações do método clássico de Claisen-Schmidt. Neste, conseguimos reduzir a quantidade de etanol e catalisador a valores mínimos, assim como diminuir o número de passos no processo de purificação. Este método tolera uma ampla gama de grupos funcionais, fornecendo um protocolo eficaz para síntese e *scale-up* (testado até 5 g) eficientes de derivados de chalcona. Foram alcançados valores das métricas de sustentabilidade sem precedentes, obtendo-se um fator-E de apenas 4,2 e um Ecoscale de 72. Todas estas premissas se interligam, tornando esta metodologia promissora para

a preparação de chalconas com múltiplas funcionalizações, em condições de reação suaves e sustentáveis, tempos de reação curtos, processos de isolamento e purificação simples, abrindo certamente um caminho para a transposição futura para o desenvolvimento industrial de possíveis novos fármacos.

De seguida, sete das chalconas sintetizadas foram selecionadas com base em estudos estrutura/atividade para avaliar a sua atividade antimalárica na fase hepática. A capacidade destes compostos inibirem a infeção de linhas celulares de Huh-7 hepatócitos por *Plasmodium berghei* foi avaliada usando um protocolo baseado na medição de bioluminescência desenvolvido no Prudêncio Lab. Após a realização de um primeiro *screening*, foram calculados os valores de IC₅₀ para os mais promissores, tendo-se concluído que a chalcona mais ativa na fase hepática é a chalcona **5.12**, com um IC₅₀= 1,45 ± 0,04 µM. Esta chalcona apresenta uma potência cerca de 7 vezes superior à da primaquina, um dos fármacos utilizados no tratamento da fase hepática. Adicionalmente foram realizados pelo Prudêncio Lab estudos preliminares de atividade destes compostos na fase eritrocitária da infeção por *P. falciparum*, mas estes não exibiram qualquer atividade.

Estes estudos exploratórios de otimização da síntese de chalconas abre certamente excelentes perspectivas para no futuro se proceder a um “*fine-tuning*” estrutura/atividade e conseguir obter fármacos muito mais ativos para a fase hepática da doença.

5.4- Referências

1. Rosa, G. P.; Seca, A. M. L.; Barreto, M. C.; Pinto, D. C. G. A., Chalcone: A Valuable Scaffold Upgrading by Green Methods. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2017**, *5* (9), 7467-7480.
2. Zhuang, C.; Zhang, W.; Sheng, C.; Zhang, W.; Xing, C.; Miao, Z., Chalcone: A Privileged Structure in Medicinal Chemistry. *Chem. Rev.* **2017**, *117* (12), 7762-7810.
3. Berar, U., Chalcones: compounds possessing a diversity in applications. *Orbital Elec. J. Chem.* **2012**, *4* (3), 209-221.
4. Nair, D.; Pavashe, P.; Namboothiri, I. N. N., 1,3-Dipolar cycloaddition of chalcones and arylidene-1,3-dicarbonyls with diazosulfone for the regioselective synthesis of functionalized pyrazoles and pyrazolines. *Tetrahedron* **2018**, *74* (22), 2716-2724.
5. Zeraik, M. L.; Ximenes, V. F.; Regasini, L. O.; Dutra, L. A.; Silva, D. H. S.; Fonseca, L. M.; Coelho, D.; Machado, S. A. S.; Bolzani, V. S., 4'-Aminochalcones As Novel Inhibitors of the Chlorinating Activity of Myeloperoxidase. *Curr. Med. Chem.* **2012**, *19* (31), 5405-5413.
6. Daniela Ilieva, B.; Iva Todorova, T., Trends in Utilization of the Pharmacological Potential of Chalcones. *Curr. Clin. Pharmacol.* **2010**, *5* (1), 1-29.
7. Singh, P.; Anand, A.; Kumar, V., Recent developments in biological activities of chalcones: A mini review. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *85*, 758-777.
8. Prasad, Y. R.; Rao, A. S.; Rambabu, R., Synthesis of Some 4'-Amino Chalcones and their Antiinflammatory and Antimicrobial Activity. *Asian J. Chem.* **2009**, *21* (2), 907-914.
9. Sinha, S.; Medhi, B.; Sehgal, R., Chalcones as an Emerging Lead Molecule for Antimalarial Therapy: A Review. *J. Modern Med. Chem.* **2013**, *1* (2), 64-77.
10. Yadav, N.; Dixit, S. K.; Bhattacharya, A.; Mishra, L. C.; Sharma, M.; Awasthi, S. K.; Bhasin, V. K., Antimalarial Activity of Newly Synthesized Chalcone Derivatives In Vitro. *Chem. Biol. Drug Des.* **2012**, *80* (2), 340-347.
11. Mai, C. W.; Yaeghoobi, M.; Abd-Rahman, N.; Kang, Y. B.; Pichika, M. R., Chalcones with electron-withdrawing and electron-donating substituents: Anticancer activity against TRAIL resistant cancer cells, structure-activity relationship analysis and regulation of apoptotic proteins. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *77* (Supplement C), 378-387.
12. Brandão, P.; Loureiro, J. B.; Carvalho, S.; Hamadou, M. H.; Cravo, S.; Moreira, J.; Pereira, D.; Palmeira, A.; Pinto, M.; Saraiva, L.; Cidade, H., Targeting the MDM2-p53 protein-protein interaction with prenylchalcones: Synthesis of a small library and evaluation of potential antitumor activity. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *156*, 711-721.
13. Muhammad, Z.; Edrees, M.; Faty, R.; Gomha, S.; Alterary, S.; Mabkhot, Y., Synthesis, Antitumor Evaluation and Molecular Docking of New Morpholine Based Heterocycles. *Molecules* **2017**, *22* (7), 1211-1225.
14. Mahapatra, D. K.; Bharti, S. K.; Asati, V., Anti-cancer chalcones: Structural and molecular target perspectives. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *98*, 69-114.
15. Micheline, L. J.; Castro, M. R. C.; Custodio, J. M. F.; Naves, L. F. N.; Vaz, W. F.; Lobón, G. S.; Martins, F. T.; Perez, C. N.; Napolitano, H. B., A novel potential anticancer chalcone: Synthesis, crystal structure and cytotoxic assay. *J. Mol. Struct.* **2018**, *1168* (Supplement C), 309-315.
16. Wang, G.; Peng, Z.; Zhang, J.; Qiu, J.; Xie, Z.; Gong, Z., Synthesis, biological evaluation and molecular docking studies of amino-chalcone derivatives as potential anticancer agents by targeting tubulin colchicine binding site. *Bioorg. Chem.* **2018**, *78* (Supplement C), 332-340.
17. El Sayed Aly, M. R.; Abd El Razek Fodah, H. H.; Saleh, S. Y., Antiobesity, antioxidant and cytotoxicity activities of newly synthesized chalcone derivatives and their metal complexes. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *76* (Supplement C), 517-530.
18. Hassan, S., Synthesis, Antibacterial and Antifungal Activity of Some New Pyrazoline and Pyrazole Derivatives. *Molecules* **2013**, *18* (3), 2683-2711.

19. Ramírez, J.; Svetaz, L.; Quiroga, J.; Abonia, R.; Raimondi, M.; Zacchino, S.; Insuasty, B., Synthesis of novel thiazole-based 8,9-dihydro-7H-pyrimido[4,5-b][1,4]diazepines as potential antitumor and antifungal agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *92* (Supplement C), 866-875.
20. Zhang, K.-X.; Wang, W.; Zhao, F.; Meng, Q.-G.; Jin, Y.-S., Synthesis of Substituted Chalcones and Assessment of their Antifungal Activity Against *Trichophyton rubrum*. *Chem. Nat. Compd.* **2018**, *54* (1), 158-160.
21. de Mello, M. V. P.; Abraham-Vieira, B. d. A.; Domingos, T. F. S.; de Jesus, J. B.; de Sousa, A. C. C.; Rodrigues, C. R.; Souza, A. M. T. d., A comprehensive review of chalcone derivatives as antileishmanial agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *150* (Supplement C), 920-929.
22. Anandam, R.; Jadav, S. S.; Ala, V. B.; Ahsan, M. J.; Bollikolla, H. B., Synthesis of new C-dimethylated chalcones as potent antitubercular agents. *Med. Chem. Res.* **2018**, *27* (6), 1690-1704.
23. Wan, Z.; Hu, D.; Li, P.; Xie, D.; Gan, X., Synthesis, Antiviral Bioactivity of Novel 4-Thioquinazoline Derivatives Containing Chalcone Moiety. *Molecules* **2015**, *20* (7), 11861-11874.
24. Chintakrindi, A. S.; Gohil, D. J.; Kothari, S. T.; Chowdhary, A. S.; Kanyalkar, M. A., Design, synthesis and evaluation of chalcones as H1N1 Neuraminidase inhibitors. *Med. Chem. Res.* **2018**, *27* (4), 1013-1025.
25. Nowakowska, Z., A review of anti-infective and anti-inflammatory chalcones. *Eur. J. Med. Chem.* **2007**, *42* (2), 125-137.
26. Venkataramana Reddy, P. O.; Hridhay, M.; Nikhil, K.; Khan, S.; Jha, P. N.; Shah, K.; Kumar, D., Synthesis and investigations into the anticancer and antibacterial activity studies of β -carboline chalcones and their bromide salts. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2018**, *28* (8), 1278-1282.
27. Kar, S.; Mishra, R. K.; Pathak, A.; Dikshit, A.; Golakoti, N. R., In silico modeling and synthesis of phenyl and thienyl analogs of chalcones for potential leads as anti-bacterial agents. *J. Mol. Struct.* **2018**, *1156* (Supplement C), 433-440.
28. Singh, A.; Fong, G.; Liu, J.; Wu, Y.-H.; Chang, K.; Park, W.; Kim, J.; Tam, C.; Cheng, L. W.; Land, K. M.; Kumar, V., Synthesis and Preliminary Antimicrobial Analysis of Isatin–Ferrocene and Isatin–Ferrocenyl Chalcone Conjugates. *ACS Omega* **2018**, *3* (5), 5808-5813.
29. Karimi-Sales, E.; Mohaddes, G.; Alipour, M. R., Chalcones as putative hepatoprotective agents: Preclinical evidence and molecular mechanisms. *Pharmacol. Res.* **2018**, *129* (Supplement C), 177-187.
30. Mahapatra, D. K.; Bharti, S. K., Therapeutic potential of chalcones as cardiovascular agents. *Life Sci.* **2016**, *148* (Supplement C), 154-172.
31. Mahapatra, D. K.; Bharti, S. K.; Asati, V., Chalcone scaffolds as anti-infective agents: Structural and molecular target perspectives. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *101* (Supplement C), 496-524.
32. Rani, A.; Anand, A.; Kumar, K.; Kumar, V., Recent developments in biological aspects of chalcones: the odyssey continues. *Expert Opin. Drug Disc.* **2019**, *14* (3), 249-288.
33. Chen, M.; Theander, T. G.; Christensen, S. B.; Hviid, L.; Zhai, L.; Kharazmi, A., Licochalcone A, a new antimalarial agent, inhibits in vitro growth of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* and protects mice from *P. yoelii* infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1994**, *38* (7), 1470-1475.
34. Liu, M.; Wilairat, P.; Go, M.-L., Antimalarial Alkoxyated and Hydroxylated Chalcones: Structure–Activity Relationship Analysis. *J. Med. Chem.* **2001**, *44* (25), 4443-4452.
35. Claisen, L.; Claparède, A., Condensationen von Ketonen mit Aldehyden. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1881**, *14* (2), 2460-2468.
36. Schmidt, J. G., Ueber die Einwirkung von Aceton auf Furfurol und auf Bittermandelöl bei Gegenwart von Alkalilauge. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1881**, *14* (1), 1459-1461.
37. http://ec.europa.eu/environment/chemicals/reach/reach_en.htm (accedido a 22/09/2018).

38. Henriques, C. A.; Pinto, S. M. A.; Aquino, G. L. B.; Pineiro, M.; Calvete, M. J. F.; Pereira, M. M., Ecofriendly Porphyrin Synthesis by using Water under Microwave Irradiation. *ChemSusChem* **2014**, *7* (10), 2821-2824.
39. Liu, M.; Wilairat, P.; Croft, S. L.; Tan, A. L.-C.; Go, M.-L., Structure-activity relationships of antileishmanial and antimalarial chalcones. *Biorg. Med. Chem.* **2003**, *11* (13), 2729-2738.
40. Garg, S.; Raghav, N., Spectrophotometric analysis of bovine serum albumin in presence of some hydroxy- and nitro- substituted chalcones. *Int. J. Pharm, Pharm. Sci.* **2012**, *4* (4), 264-268.
41. Tee, J. T.; Chee, C. F.; Buckle, M. J. C.; Lee, V. S.; Chong, W. L.; Khaledi, H.; Rahman, N. A., Model studies on construction of the oxabicyclic [3.3.1] core of the mulberry Diels–Alder adducts morusalbanol A and 441772-64-1. *Tetrahedron Lett.* **2015**, *56* (36), 5082-5085.
42. Amin, A. N.; El-Khouly, M. E.; Subbaiyan, N. K.; Zandler, M. E.; Fukuzumi, S.; D'Souza, F., A novel BF₂-chelated azadipyrromethene–fullerene dyad: synthesis, electrochemistry and photodynamics. *Chem. Commun.* **2012**, *48* (2), 206-208.
43. Azouz, M.; Lammara, K.; Benallia, M.; Guenane, H., Synthesis of New Pyrazoline-Nucleoside Analogue Derivatives. *Nucleos. Nucleot. Nucl.* **2013**, *32* (6), 294-305.
44. Ganesan, P.; Ranganathan, R.; Chi, Y.; Liu, X.-K.; Lee, C.-S.; Liu, S.-H.; Lee, G.-H.; Lin, T.-C.; Chen, Y.-T.; Chou, P.-T., Functional Pyrimidine-Based Thermally Activated Delay Fluorescence Emitters: Photophysics, Mechanochromism, and Fabrication of Organic Light-Emitting Diodes. *Chem. Eur. J.* **2017**, *23* (12), 2858-2866.
45. Samshuddin, S.; Narayana, B.; Sarojini, B. K.; Khan, M. T. H.; Yathirajan, H. S.; Raj, C. G. D.; Raghavendra, R., Antimicrobial, analgesic, DPPH scavenging activities and molecular docking study of some 1,3,5-triaryl-2-pyrazolines. *Med. Chem. Res.* **2012**, *21* (8), 2012-2022.
46. Xie, Z.; Luo, X.; Zou, Z.; Zhang, X.; Huang, F.; Li, R.; Liao, S.; Liu, Y., Synthesis and evaluation of hydroxychalcones as multifunctional non-purine xanthine oxidase inhibitors for the treatment of hyperuricemia. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2017**, *27* (15), 3602-3606.
47. Parmar, K. A.; Vihol, J. R.; Sonara, H. C.; Dabhi, Y. M., Spectral analysis and Biological screening of some new derivatives of Piperazine-Pyrazoline merged Compounds. *Der Pharmacia Sinica* **2012**, *3* (2), 249-253.
48. Parmar, K. A.; Vihol, J. R.; Dabhi, Y. M.; Sutariya, S. D., Synthesis, spectral studies and antibacterial screening of some novel derivatives of pyrazoline based on chalcones. *J. Chem. Pharm. Res.* **2012**, *4* (3), 1584-1588.
49. Bu, X.; Li, Y., Synthesis of Exiguaflavanone K and (±)-Leachianone G. *J. Nat. Prod.* **1996**, *59* (10), 968-969.
50. Bu, X.; Zhao, L.; Li, Y., A Facile Synthesis of 6-C-Prenylflavanones. *Synthesis* **1997**, *1997* (11), 1246-1248.
51. Li, B.; Zhang, Y.; Ma, D.; Li, L.; Li, G.; Li, G.; Shi, Z.; Feng, S., A strategy toward constructing a bifunctionalized MOF catalyst: post-synthetic modification of MOFs on organic ligands and coordinatively unsaturated metal sites. *Chem. Commun.* **2012**, *48* (49), 6151-6153.
52. Sheldon, R. A., The E factor 25 years on: the rise of green chemistry and sustainability. *Green Chem.* **2017**, *19* (1), 18-43.
53. Van Aken, K.; Strekowski, L.; Patiny, L., EcoScale, a semi-quantitative tool to select an organic preparation based on economical and ecological parameters. *Beilstein J. Org. Chem.* **2006**, *2* (1), 3-10.
54. Harathi, P.; Rajendra Prasad, V. V. S.; Satyavati, D.; Subramanian, S.; Boya, V.; Gali, P., Synthesis, characterization and anti-inflammatory activity of novel pyrazole derivatives. *Asian J. Pharm. Clin. Res.* **2015**, *8* (5), 83-87.
55. Quazi, I.; Sastry, V. G.; Ansari, J. A., Synthesis and antimicrobial activity of indole derivative bearing the pyrazole moiety. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* **2017**, *8* (3), 1145-1152.
56. Rodrigues, T.; Prudêncio, M.; Moreira, R.; Mota, M. M.; Lopes, F., Targeting the Liver Stage of Malaria Parasites: A Yet Unmet Goal. *J. Med. Chem.* **2012**, *55* (3), 995-1012.

57. Prudêncio, M.; Mota, M. M.; Mendes, A. M., A toolbox to study liver stage malaria. *Trends Parasitol.* **2011**, *27* (12), 565-574.
58. Derbyshire, E. R.; Mota, M. M.; Clardy, J., The Next Opportunity in Anti-Malaria Drug Discovery: The Liver Stage. *PLoS Pathog.* **2011**, *7* (9), e1002178.
59. Azevedo, R.; Markovic, M.; Machado, M.; Franke-Fayard, B.; Mendes, A. M.; Prudêncio, M., Bioluminescence Method for In Vitro Screening of Plasmodium Transmission-Blocking Compounds. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2017**, *61* (6), 1-12.
60. Mahmoudi, N.; Garcia-Domenech, R.; Galvez, J.; Farhati, K.; Franetich, J.-F.; Sauerwein, R.; Hannoun, L.; Derouin, F.; Danis, M.; Mazier, D., New Active Drugs against Liver Stages of Plasmodium Predicted by Molecular Topology. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2008**, *52* (4), 1215-120.

Capítulo 6

Secção experimental

Este capítulo encontra-se dividido em cinco secções experimentais: a **6.1** onde se encontra descrita a instrumentação, os reagentes, solventes e respetiva purificação, utilizados ao longo do trabalho descrito nesta Tese; a **6.2** onde se encontra descrita a síntese e caracterização dos compostos descritos no capítulo 2; a **6.3** onde se encontram os procedimentos da caracterização fotofísica e fotoquímica dos fotossensibilizadores e dos estudos *in vitro*, quer em bactérias planctónicas e biofilmes, quer em células eucarióticas; a **6.4** que se refere aos compostos sintetizados e apresentados no capítulo 4 e aos procedimentos relativos à avaliação da sua atividade antibacteriana e, por fim, a **6.5** referente aos compostos sintetizados e apresentados no capítulo 5 e aos procedimentos relativos à avaliação da sua atividade antiplasmódica. De notar que a numeração de todos os compostos se encontra de acordo com o capítulo onde é discutida a respetiva síntese.

6.1- Métodos gerais

6.1.1- Solventes e Reagentes

Todos os reagentes e os solventes foram usados tal como fornecidos pela *Sigma-Aldrich-Merck*, *Acros* ou *Fluorochem*. Os reagentes sensíveis ao ar e humidade foram manuseados sob atmosfera de azoto, num sistema de vácuo, usando técnicas de *Schlenk*. Estes foram purificados ou secos, sempre que necessário, de acordo com os métodos descritos na literatura.¹ O clorofórmio deuterado, utilizado nos espectros de RMN foi neutralizado numa coluna de alumina básica de grau I antes da sua utilização.

6.1.2- Instrumentação

I-Equipamento Micro-Ondas

As reações assistidas por micro-ondas foram efetuadas num equipamento micro-ondas CEM Discover® SP com um *kit* de adição de gases (Discover® Gas Addition), ligado a uma

linha de gases do Departamento de Química da Universidade de Coimbra. Foram usados tubos de vidro apropriados para o efeito com capacidade de 10 mL.

II-Cromatografia de camada fina

O controlo das reações foi feito por cromatografia em camada fina (TLC) usando placas de sílica 60 (Fluka), com indicador de fluorescência UV₂₅₄. O eluente usado varia dependendo da reação em causa.

III-Cromatografia de adsorção em placa

As porfirinas sintetizadas, sempre que necessário, foram purificadas por cromatografia de adsorção, usando gel de sílica G (MN-Kieselgel G), contendo indicador de fluorescência UV₂₅₄ como fase estacionária e o eluente apropriado tal como descrito nas respetivas secções.

IV-Cromatografia de adsorção em coluna

Algumas das porfirinas sintetizadas foram purificadas por cromatografia de adsorção em coluna, usando gel de sílica 60 (Merck) como fase estacionária. O eluente usado é variável dependendo da reação em causa.

V-Cromatografia de exclusão molecular

Algumas das porfirinas sintetizadas foram purificadas por cromatografia de exclusão molecular usando uma coluna de Sephadex® G-10 (limite de exclusão molecular de 700 g/mol)

VI-Filtração por tamanho

Algumas das porfirinas sintetizadas foram purificadas com recurso a um dispositivo Amicon® equipado com uma membrana de 1KDa (retém compostos com peso molecular superior a 1000 daltons).

VII-Ultra-sons

Com o objetivo de facilitar a dissolução dos compostos, usou-se o *Bandelin Sonorex TK52*.

VIII-Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)

Os espectros de ressonância magnética nuclear de protão (^1H), de carbono (^{13}C) e de flúor (^{19}F) foram obtidos num espectrómetro *BrukerAvance 400* (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). Encontra-se descrito em cada experiência o solvente deuterado utilizado, dependendo da solubilidade dos compostos. Os dados obtidos encontram-se indicados pela seguinte ordem: Núcleo (frequência, solvente): desvio químico (δ , ppm) [multiplicidade do sinal (s – singuleto, sl – singuleto largo, d – duplete, t – tripleto, q – quarteto, dd – duplo duplete, m – multiplete), constante de acoplamento (J , em Hertz), intensidade relativa (nH, como número de protões).

IX-Espectrometria de massa

Os espectros de massa ESI-TOF foram realizados num espectrómetro *Bruker Microtof* e os de MALDI-TOF num espectrómetro *Bruker Autoflex*, na Unidade de Espectrometria de Massa da Universidade de Santiago de Compostela. Outros espectros ESI foram também obtidos pela unidade de espectroscopia de massa (UniMS) do ITQB/IBET, Oeiras, Portugal.

X-Espectroscopia de absorção Ultravioleta-Visível

Os espectros de UV-Visível foram obtidos num espectrofotómetro Hitachi U-2001 ou Shimadzu 2100, usando células de quartzo com percurso ótico de 1 cm. Os coeficientes de absorção molar foram determinados após a preparação de soluções com concentração entre 10^{-5} e 10^{-7} 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. Esta analogia é transmitida pela lei de Beer-Lambert, $A=\epsilon bc$, onde A é a absorvância, ϵ é o coeficiente de absorvidade molar, b é o caminho ótico percorrido pela luz e c é a concentração da solução.

XI-Espectroscopia de emissão de fluorescência

Os espectros de emissão de fluorescência foram obtidos num espectrofotómetro Horiba-Jobin-Ivon Spex Fluorog 3-22 corrigido para a resposta do comprimento de onda do sistema, utilizando células de quartzo de quatro faces com percurso ótico de 1 cm.

XII-Rendimento quântico de oxigénio singuleto

A determinação do rendimento quântico de oxigénio singuleto foi realizada com recurso a um espectrómetro de fotólise por relâmpago da Applied Photophysics LKS.60, constituído por um laser Nd-YAG Spectra-Physics Quanta Ray GCR-130 e um osciloscópio Hewlett Packard Infinium, com irradiação utilizando a terceira harmónica do laser (355 nm). O comprimento de onda de 1270 nm é detetado num fotomultiplicador *Hamamatsu R5509-42*, arrefecido a 193 K numa câmara de azoto líquido.

XIII-Cromatografia Gasosa (GC)

A cromatografia gasosa foi realizada num aparelho Agilent-7820A equipado com uma coluna capilar apolar HP-5 (5% difenil e 95% dimetilpolisiloxano), com 30 m de comprimento e 0,32 mm de diâmetro interno e com um detetor FID, do Departamento de Química da Universidade de Coimbra.

XIV-Cromatografia Gasosa acoplada com espectrometria de massa (GC-MS)

A análise por GC-MS foi realizada num cromatógrafo de gás Agilent 7820 GC System Technologies, equipado com uma coluna capilar HP-5 MS acoplada a um espectrómetro de massa Agilent 5905 MSD System Technologies, do Departamento de Química, da Universidade de Coimbra.

XV-Microscopia confocal

As imagens de microscopia confocal foram adquiridas usando um microscópio de fluorescência confocal Zeiss (LSM 780 modelo invertido) com laser de excitação (LASER Diodo 405 nm). O microscópio encontra-se equipado com um detetor altamente sensível GaAsP para imagens espectrais (400-700 nm).

XVI-Dispositivos de irradiação para ensaios de aPDT

Para a realização dos estudos planctônicos na Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra foi utilizado, como fonte de irradiação, um LED desenhado e construído no Departamento de Química da Universidade de Coimbra, com um máximo de emissão a 415 nm e com uma potência constante de 4 mW/cm². Nos estudos planctônicos realizados na Polónia, as células foram irradiadas com luz branca ou azul, caso se trate de porfirinas ou bacterioclorinas, respetivamente, usando uma fibra ótica de 150 W.

Para a avaliação da suscetibilidade de biofilmes à fotossensibilização, foi desenhada e construída pelo Laboratório de Suporte Técnico do Instituto de Física de São Carlos (Universidade de São Paulo) uma Biotable®. Esta é composta por 24 lâmpadas LED e emite luz em comprimentos de onda entre 400-700 nm, com uma potência constante de 30 mW/cm².

XVII-Infravermelho (IV)

Os espectros de infravermelho foram obtidos num espectrómetro Bruker IFS 66/S ATR-FTIR, usando pastilhas de KBr.

XVIII-EPR

Os espectros de EPR (banda -X; 0,34; 9,5 GHz) foram obtidos num espectrómetro Bruker EMX de onda contínua, equipado com um criostato de fluxo contínuo para medições a baixas temperaturas.

6.2- Experimental associada ao capítulo 2

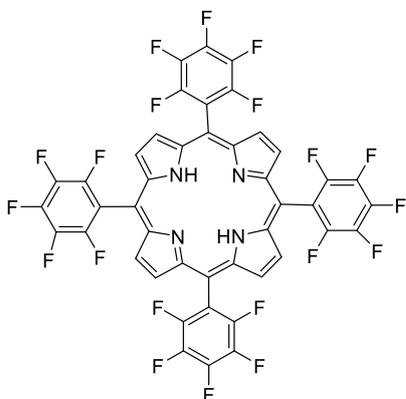
6.2.1- Família I

5,10,15,20-tetraquis(pentafluorofenil)porfirina 2.1

A porfirina foi sintetizada de acordo com o método do NaY.² Num balão de fundo redondo contendo 8,425 g (42,97 mmol) de pentafluorobenzaldeído adicionou-se 340 mL ácido acético, 190 mL de nitrobenzeno e 18,03 g de NaY. Aqueceu-se a mistura até 130 °C e posteriormente adicionou-se 3 mL de pirrole gota a gota. Colocou-se a solução

em refluxo durante duas horas, e deixou-se arrefecer até à temperatura ambiente. De seguida, procedeu-se à filtração da suspensão e lavagem do material sólido resultante, primeiramente com uma mistura de diclorometano/metanol (5:1) e de seguida com THF, até este não apresentar cor. Procedeu-se a uma destilação a pressão reduzida seguida de redissolução em diclorometano. Realizaram-se duas colunas cromatográficas em gel de sílica usando como eluente um gradiente crescente de hexano/diclorometano (20:1), (10:1), (5:1). O solvente foi evaporado, a porfirina foi redissolvida em diclorometano e foram feitas várias precipitações usando metanol e por fim recristalização, deixando repousar durante vários dias no frio com o mesmo solvente.

Rendimento: 9,11% (0,955 g).



RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ, ppm: 8,92 (s; 8H); - 2,91 (s; 2H).

RMN ¹⁹F (376 MHz, CDCl₃) δ, ppm: -135,35 a -135,43 (dd; *J* = 23,3; 7,7 Hz; 8F); -150,06 a -150,16 (t; *J* = 20,8 Hz; 4F); -160,14 a -160,28 (m; 8F).

UV-Vis (CH₂Cl₂): λ_{abs} (log ε), 416 (5,36); 508 (4,23); 538; 586 (3,73); 639 (2,91); 656 (2,77) nm.

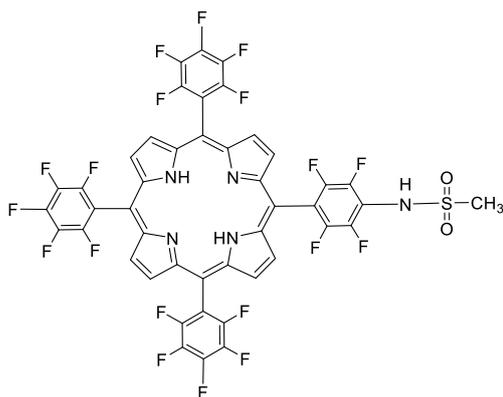
Os dados espectroscópicos encontram-se de acordo com o descrito na literatura.³

5-[2',3',5',6'-tetrafluoro-4'-metanosulfamoil)fenil]-10,15,20-*tris*(pentafluorofenil)

porfirina 2.2

Num balão de fundo redondo contendo 5,10,15,20-*tetraquis*(pentafluorofenil)porfirina (100 mg; 1,02x10⁻⁴ mol), a metanosulfonamida (58 mg; 6,12x10⁻⁴ mol) e carbonato de céσιο (200 mg, 6,12x10⁻⁴ mol) adicionou-se 20 mL de dioxano. De seguida, a mistura é aquecida até 100 °C e deixada em agitação até que a análise por cromatografia de camada fina indique o consumo total do material de partida (72-96 horas). O dioxano foi evaporado, o sólido redissolvido em diclorometano e lavado usando como fase aquosa sequencialmente uma solução saturada de bicarbonato de sódio (6 vezes) e de seguida com água (6 vezes). Secou-se a fase orgânica com sulfato de sódio anidro, filtrou-se e retirou-se o solvente no evaporador rotativo. De seguida foi realizada

purificação por cromatografia de adsorção em coluna de sílica gel utilizando como eluente acetato de etilo/hexano (1:2). Com o intuito de obter frações puras de porfirina, cada amostra foi subsequentemente sujeita a cromatografia de adsorção em placas preparativas revestidas de gel de sílica usando como eluente um gradiente crescente de hexano/acetato de etilo, permitindo o isolamento do composto puro.



Rendimento: 18,5% (0,020 g).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ , ppm: 8,93 (sl; 8H); 3,53 (s; 3H); -2,92 (s; 2H).

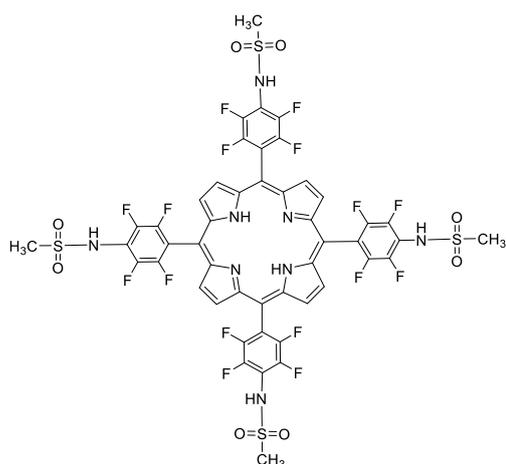
RMN ^{19}F (376 MHz, CDCl_3) δ , ppm: -136,47 (dd; $J = 15,3; 7,9$ Hz; 6F); -136,54 (m; 2F); -147,82 (m; 2F); -151,22 (td; $J = 20,9; 7,1$ Hz; 3F); -161,26 a -161,37 (m; 6F).

UV-Vis ($\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3$): λ_{abs} (log ϵ), 411 (5,38); 505 (4,15); 582 (3,65); 636 (3,82) nm.

MS (MALDI-TOF): m/z 1049,0549 [M] $^+$ calculado para $\text{C}_{45}\text{H}_{14}\text{F}_{19}\text{N}_5\text{O}_2\text{S}$ 1049,0559.

5,10,15,20-tetraquis-[2',3',5',6'-tetrafluoro-4'-metanosulfamoilfenil]porfirina 2.3

Num balão de fundo redondo contendo 5,10,15,20-tetraquis(pentafluorofenil)porfirina (30 mg; $3,07 \times 10^{-5}$ mol), a metanosulfonamida (53 mg; $5,55 \times 10^{-4}$ mol) e carbonato de céσιο (120 mg, $3,68 \times 10^{-4}$ mol) adicionou-se 2 mL de dioxano. De seguida, a mistura é aquecida até 100 °C e deixada em agitação até que a análise por cromatografia de camada fina indique o consumo total do material de partida (48 horas). O crude foi lavado com acetona recorrendo ao auxílio de ultra-sons para facilitar a dissolução e, de seguida, o sólido resultante foi dissolvido em água e purificado usando o dispositivo Amicon® (membrana de 1 kDa).



Rendimento: 70% (0,027 g).

RMN ¹H (400 MHz, (DMSO-d₆) δ, ppm: 9,11 (s; 8H); 3,28 (s; 12H); -3,04 (s; 2H).

RMN ¹⁹F (376 MHz, (DMSO-d₆) δ, ppm: -144,71 (d; *J* = 17,7 Hz; 8F); -152,19 (d; *J* = 19,1; 8F).

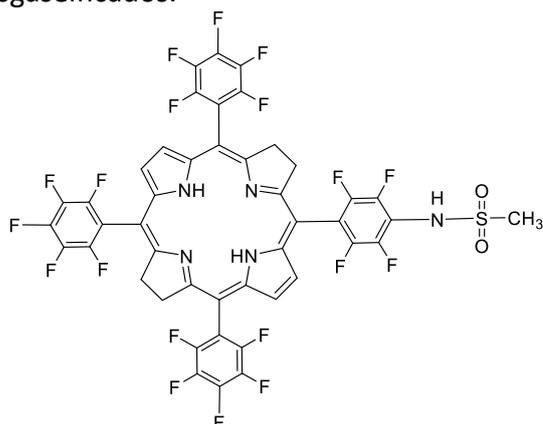
UV-Vis (DMSO): λ_{abs} (log ε), 413 (4,76); 509 (3,89); 585 (3,45); 638 (2,80) nm.

MS (MALDI-TOF): *m/z* 1274,04778 [M]⁺ calculado para C₄₈H₂₆F₁₆N₈O₈S₄ 1274,04955.

Síntese de Bacterioclorinas

5-[2',3',5',6'-tetrafluoro-4'-metanosulfamoil)fenil]-10,15,20-*tris*(pentafluorofenil) bacterioclorina 2.4

A 5-[2',3',5',6'-tetrafluoro-4'-metanosulfamoil)fenil]-10,15,20-*tris*(pentafluorofenil)porfirina (50 mg; 4,77x10⁻⁵ mol) e *p*-toluenosulfonilhidrazina (355 mg; 1,91x10⁻³ mol) foram misturadas num almofariz, tendo-se obtido um pó finamente dividido. O pó foi introduzido num tubo de *Schlenk*, que foi mantido sob vácuo (0,1 Torr), durante 20 minutos. O tubo foi aquecido até 140 °C e mantido com agitação durante 1 hora. Após arrefecimento até à temperatura ambiente, o sólido resultante foi redissolvido em diclorometano e de seguida purificado por coluna de cromatografia em gel de sílica usando-se como eluente diclorometano/acetato de etilo (3:1), previamente desgaseificados.



Rendimento: 89,5% (0,045 g).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ, ppm: 8,09-8,16 (m; 4H); 4,12 (s; 8H); 3,47 (s; 3H); -1,43 (s; 2H).

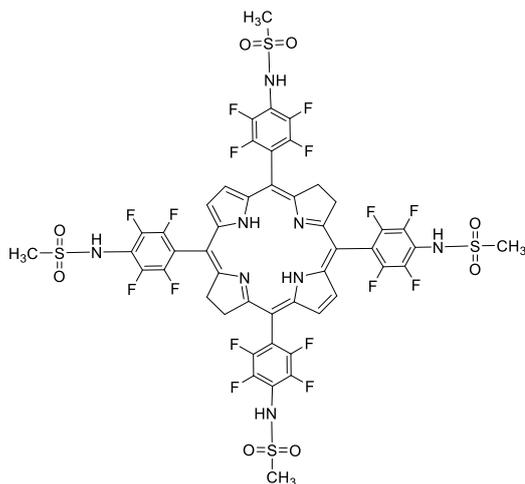
RMN ^{19}F (376 MHz, CDCl_3) δ , ppm: -138,13 (dd; $J = 23,9$; 10,6 Hz; 2F); -138,28 (dd; $J = 23,0$; 6,9 Hz; 6F); -147,32 (dd; $J = 23,9$; 10,6 Hz; 2F); -152,77 (td; $J = 20,8$; 10,0 Hz; 3F); -161,06 (td; $J = 22,9$; 7,8 Hz; 6F).

UV-Vis ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$): λ_{abs} (log ϵ), 342 (5,16); 372 (5,18); 502 (4,55); 743 (5,03) nm.

MS (ESI-TOF): m/z 1054,0941 $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculado para $\text{C}_{45}\text{H}_{19}\text{F}_{19}\text{N}_5\text{O}_2\text{S}$ 1054,0951.

5,10,15,20-tetraquis-[2',3',5',6'-tetrafluoro-4'-metanosulfamoil)fenil] bacterioclorina 2.5

A 5,10,15,20-tetraquis-[2',3',5',6'-tetrafluoro-4'-metanosulfamoil)fenil]porfirina (25 mg; $1,96 \times 10^{-5}$ mol) e *p*-toluenosulfonilhidrazina (146 mg; $7,85 \times 10^{-4}$ mol) foram misturadas num almofariz, tendo-se obtido um pó finamente dividido. O pó foi introduzido num tubo de *Schlenk*, que foi mantido sob vácuo (0,1 Torr), durante 20 minutos. O tubo foi aquecido até 140 °C e mantido com agitação durante 20 minutos. Após arrefecimento até à temperatura ambiente, o sólido resultante foi redissolvido em diclorometano e de seguida purificado por coluna de cromatografia em gel de sílica usando-se como eluente diclorometano/acetato de etilo (3:1), previamente desgasificados.



Rendimento: 70% (0,018 g).

RMN ^1H (400 MHz, DMSO-d_6) δ , ppm: 8,45 (s; 4H); 4,12 (s; 8H); 2,91 (s; 12H); -1,41 (s; 2H).

RMN ^{19}F (376 MHz, DMSO-d_6) δ , ppm: -145,36 a -145,45 (m; 8F); -140,54 a -140,64 (m; 8F).

UV-Vis ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$): λ_{abs} (log ϵ), 345 (5,19); 373 (5,20); 503 (4,79); 745 (5,12) nm.

MS (ESI-TOF): m/z 1279,0870 $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculado para $\text{C}_{48}\text{H}_{31}\text{F}_{16}\text{N}_8\text{O}_8\text{S}_4$ 1279,0887.

6.2.2- Família II

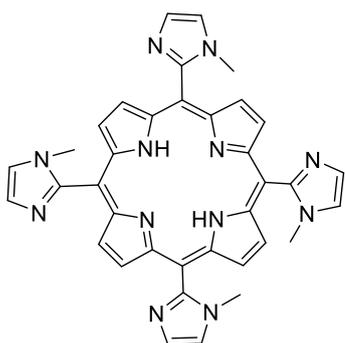
5,10,15,20-tetraquis(1-metil-1H-imidazol-2-il)porfirina 2.6

Método do Nitrobenzeno: Num balão de fundo redondo contendo 4,73 g (43 mmol) de 1-metilimidazol-2-carboxaldeído adicionou-se 140 mL de ácido acético e 70 mL de nitrobenzeno. Aqueceu-se a mistura até 150 °C, posteriormente adicionou-se 3 mL de pirrole (43 mmol) gota a gota e colocou-se a solução em refluxo durante uma hora e meia. Desligou-se o aquecimento e deixou-se arrefecer até à temperatura ambiente. Procedeu-se a uma destilação a pressão reduzida seguida de redissolução em diclorometano. Realizou-se coluna cromatográfica em sílica gel usando como eluente primeiramente hexano e de seguida diclorometano/metanol (10:1). Obteve-se o composto com um rendimento de 15% (1,04 g).

Método do NaY: Num balão de fundo redondo contendo 275 mg (2,5 mmol) de 1-metilimidazol-2-carboxaldeído adicionou-se 7 mL ácido acético, 5 mL de nitrobenzeno e 1 g de NaY. Aqueceu-se a mistura até 130 °C e posteriormente adicionou-se 0,17 mL de pirrole (2,5 mmol) gota a gota. Colocou-se a solução em refluxo durante duas horas, desligou-se o aquecimento e deixou-se arrefecer até à temperatura ambiente. De seguida, procedeu-se à filtração da suspensão e lavagem do material sólido resultante, primeiramente com uma mistura de diclorometano/metanol (5:1) e de seguida com THF, até este não apresentar cor. Procedeu-se a uma destilação a pressão reduzida seguida de lavagens usando como fase orgânica diclorometano e como fase aquosa uma solução saturada de bicarbonato de sódio e água sucessivamente (6 vezes). De seguida, os passos de purificação foram semelhantes aos supracitados. Obteve-se o composto com um rendimento de 8% (0,032 g).

Método recorrendo a água e Mw: A um copo reacional de 10 mL foi adicionado o 1-metilimidazol-2-carboxaldeído (1,08 g; 9,8 mmol), o pirrole (0,68 mL; 9,8 mmol) e a água (0,2 mL). A mistura foi sujeita a radiação micro-ondas com potência máxima de 300 W durante 10 min, a uma temperatura de 200 °C. Após arrefecimento, os passos de purificação foram semelhantes aos supracitados. Obteve-se o composto com um rendimento de 12% (0,185 g).

Método de Lindsey modificado: Num tubo de *Schlenk* em atmosfera inerte adicionou-se o 1-metilimidazol-2-carboxaldeído (1,08 g; 9,8 mmol), pirrole (0,68 mL; 9,8 mmol) e diclorometano (300 mL). A mistura foi borbulhada com árgon durante 20 minutos e de seguida adicionou-se ácido trifluoroacético (TFA, 9 μ L; 0,12 mmol) e colocou-se em agitação, à temperatura ambiente, durante uma hora. Após este tempo, adicionou-se uma quantidade equimolar de trietilamina (16,4 μ L; 0,12 mmol) e evaporou-se o solvente sob vácuo. O sólido foi transferido para um tubo de micro-ondas, ao qual se adicionou água (0,2 mL). A mistura foi sujeita a radiação micro-ondas por 10 minutos, usando um programa dinâmico com temperatura de 200 °C e potência máxima de 300 W. Observou-se a formação de um sólido escuro, que foi redissolvido em diclorometano, confirmando-se por TLC e por UV-Vis a formação de porfirina. As etapas de purificação foram semelhantes ao supracitado, tendo-se obtido a porfirina **2.6** com um rendimento de 13% (0,201 g).



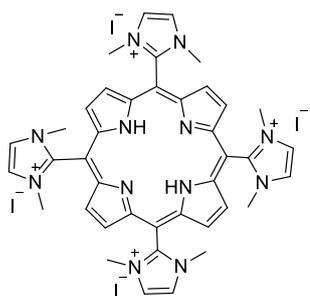
RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ , ppm: mistura de atropoisómeros 8,91-8,86 (sl; 8H); 7,69 (dd; $J = 5,7; 1,3$ Hz; 4H); 7,49 (dd; $J = 3,2; 1,4$ Hz; 4H); 3,55-3,38 (sl; 12H); -2,84 a -2,95 (sl; 2H).

UV-Vis (CH_2Cl_2): λ_{abs} (log ϵ), 420 (5,31); 513 (4,14); 552, 587(3,67); 658 (3,59) nm.

Os dados espectroscópicos encontram-se de acordo com o descrito na literatura.⁴

Tetra-iodeto de 5,10,15,20-tetraquis(1,3-dimetil-1H-imidazol-3-io-2-il)porfirina 2.7

Num balão de fundo redondo contendo a 5,10,15,20-tetraquis(1-metil-1H-imidazol-2-il)porfirina (50 mg; 0,0793 mmol) dissolvido em DMF (0,2 mL), adicionaram-se faseadamente 100 equivalentes de iodeto de metilo (0,494 mL). A mistura reacional foi mantida em agitação durante 24 horas a 30 °C. Terminado este período, precipitou-se o produto com éter dietílico. O sólido foi filtrado, lavado com éter dietílico e seco sob vácuo.



Rendimento: 92% (0,050 g).

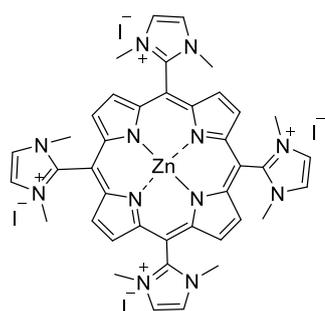
RMN ¹H (400 MHz, (DMSO-d₆) δ, ppm: 9,32 (s; 8H); 8,54 (s; 8H); 3,76 (s; 24H); -3,21 (sl; 2H).

UV-Vis (H₂O): λ_{abs} (log ε), 407 (5,22); 507 (4,17); 541 (3,73); 579 (3,79); 630 (3,78) nm.

Os dados espectroscópicos encontram-se de acordo com o descrito na literatura.⁵

Tetra-iodeto de 5,10,15,20-tetraquis(1,3-dimetil-1H-imidazol-3-io-2-il)porfirinato de zinco (II) 2.8

A tetra-iodeto de 5,10,15,20-tetraquis(1,3-dimetil-1H-imidazol-3-io-2-il)porfirina (20 mg; 0,0167 mmol) foi dissolvida em 5 mL de DMF. A mistura é aquecida até 100 °C e o acetato de zinco di-hidratado (36,7 mg; 0,167 mmol) foi adicionado. A reação foi monitorada por UV-Vis até que o pico da banda Soret se altere de 407 para 417 nm, e as 4 bandas Q características desapareçam e se formem 2 bandas Q, típicas do complexo metálico. Após terminada a reação, deixou-se arrefecer até à temperatura ambiente e a porfirina foi precipitada com uma mistura de diclorometano e éter dietílico, redissolvida em água e o excesso de acetato de zinco removido numa coluna cromatográfica de Sephadex® G10.



Rendimento: 92% (0,019 g).

RMN ¹H (400 MHz, (DMSO-d₆) δ, ppm: 9,23 (s; 8H); 8,52 (s; 8H); 3,70 (s; 24H).

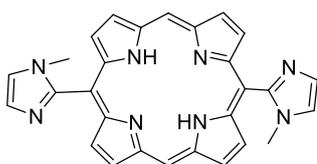
UV-Vis (H₂O): λ_{abs} (log ε), 417 (5,43); 556 (4,23); 586 (4,03) nm.

Os dados espectroscópicos encontram-se de acordo com o descrito na literatura.⁶

5,15-bis(1-metil-1H-imidazol-2-il)porfirina 2.9

Dipirrometano (438 mg, 3 mmol) e 1-metilimidazol-2-carboxaldeído (330 mg, 3 mmol) foram dissolvidos em diclorometano (300 mL). A mistura foi borbulhada com árgon

durante 15 minutos e de seguida adicionou-se ácido trifluoroacético (TFA, 153 μ L, 2 mmol) e deixou-se em agitação em atmosfera inerte a 30 °C. Ao fim de 8 horas, adicionou-se DDQ e aumentou-se a temperatura para 50 °C durante 1 hora. De seguida, o solvente é evaporado e a mistura lavada por diversas vezes com uma solução saturada de bicarbonato de sódio. Após este processo, realiza-se coluna cromatográfica em sílica gel usando como eluente diclorometano/metanol (10:1).



Rendimento: 19% (0,134 g).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ , ppm: mistura de atropoisómeros 10,35 (s; 2H); 9,43 (d; $J = 4,3$ Hz; 4H); 9,03 (d; $J = 4,3$ Hz; 4H); 7,73 (d; $J = 10,7$ Hz; 2H); 7,54 (s; 2H); 3,52 (s; 6H); -3,31 (s; 2H).

UV-Vis (CH_2Cl_2): λ_{abs} (log ϵ), 406 (4,83); 500 (3,75); 535 (3,54); 573 (3,37); 627 (3,12) nm.

ESI-MS m/z 471,20405 $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculado para $[\text{C}_{28}\text{H}_{23}\text{N}_8]^+$ 471,20402.

5,15-*bis*(1-metil-1H-imidazol-2-il)porfirinato de zinco (II) 2.10

A 5,15-*bis*(1-metil-1H-imidazol-2-il)porfirina (86 mg; 0,183 mmol) foi dissolvida em 10 mL de clorofórmio. A mistura é aquecida até 50 °C e o acetato de zinco di-hidratado (401 mg; 1,83 mmol), previamente dissolvido em 3 mL de metanol, foi adicionado. A reação foi controlada por UV-Vis até as 4 bandas Q características se transformaram em 2 bandas Q, típicas do complexo metálico. Após terminada a reação, deixou-se arrefecer até à temperatura ambiente. De seguida, o solvente foi removido sob vácuo e o sólido obtido redissolvido em diclorometano. A fase orgânica foi lavada com uma solução saturada de bicarbonato de sódio e água destilada, sucessivamente. Por fim, foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e o solvente posteriormente eliminado no evaporador rotativo.



Rendimento: 81% (0,070 g).

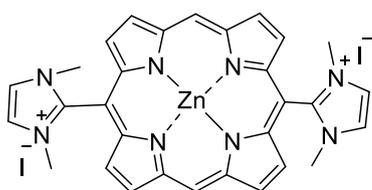
RMN ^1H (400 MHz, DMSO-d_6) δ , ppm: mistura de atropoisómeros 10,38 (d; $J = 3,8$ Hz; 2H); 9,66 (d; $J = 4,1$ Hz; 4H); 9,04 (d; $J = 4,3$ Hz; 2H); 8,94 (d; $J = 4,6$ Hz; 2H); 8,02 (s; 2H); 7,62 (s; 2H).

UV-Vis (DMSO): λ_{abs} ($\log \epsilon$), 415 (4,29); 545 (3,14); 581 (2,94) nm.

Nota 1: não é possível visualizar o sinal dos CH₃ por se encontrar na zona do pico da água no DMSO-d₆.

Di-iodeto de 5,15-bis(1,3-dimetil-1H-imidazol-3-ilo-2-il)porfirinato de zinco (II) 2.11

Num balão de fundo redondo contendo o 5,15-bis(1-metil-1H-imidazol-2-il)porfirinato de zinco (II) (20 mg; 0,0375 mmol) dissolvido em DMF (0,15 mL), adicionaram-se faseadamente 100 equivalentes de iodeto de metilo (0,233 mL). A mistura reacional foi mantida em agitação durante 24 horas a 30 °C. Terminado este período, precipitou-se o produto com éter dietílico. O sólido foi filtrado, lavado com éter dietílico e seco sob vácuo.



Rendimento: 94% (0,020 g).

RMN ¹H (400 MHz, (DMSO-d₆) δ , ppm: 10,73 (s; 2H); 9,81 (d; $J = 4,5$ Hz; 4H); 9,07 (d; $J = 4,5$ Hz; 4H); 8,50 (s; 4H); 3,70 (s; 12H).

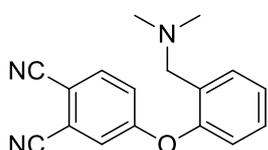
UV-Vis (H₂O): λ_{abs} ($\log \epsilon$), 406 (4,37); 540 (3,09); 573 (3,34) nm.

ESI-MS m/z 689,06134 [M-I]⁺ calculado para [C₃₀H₂₆IN₈Zn]⁺ 689,06111.

6.2.3- Família III

4-(2-((dimetilamino)metil)fenoxi)ftalonitrilo 2.12

Num balão de fundo redondo contendo 4-nitroftalonitrilo (500 mg; 2,89 mmol), 2-((dimetilamino)metil)fenol (1 eq; 437 mg; 2,89x10⁻³ mol) e carbonato de potássio (5 eq; 2 g; 1,44x10⁻² mol), adicionou-se 20 mL de DMF. A mistura foi deixada em agitação à temperatura ambiente durante 72 horas. A base foi filtrada e a mistura vertida lentamente sob água gelada. O sólido resultante foi filtrado, obtendo-se o produto pretendido.



Rendimento: 66% (0,529 g).

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ , ppm: 8,05 (d; $J = 8,8$ Hz; 1H); 7,66 (d; $J = 2,6$ Hz; 1H); 7,53 (dd; $J = 7,6; 1,9$ Hz; 1H); 7,40 (td; $J = 7,7;$

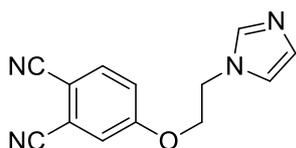
1,9 Hz; 1H); 7,33 (td; $J = 7,4$; 1,4 Hz; 1H); 7,25 (dd; $J = 8,8$; 2,6 Hz; 1H); 7,13 (dd; $J = 8,0$; 1,3 Hz; 1H); 3,30 (s; 2H); 2,06 (s, 6H).

RMN ^{13}C (101 MHz, DMSO- d_6) δ 161,56; 151,62; 136,12; 131,51; 131,06; 129,18; 126,13; 121,77; 121,22; 120,98; 116,46; 115,92; 115,40; 107,55; 56,95; 44,86.

MS (ESI-TOF): m/z 278,1288 $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculado para $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{N}_3\text{O}$ 278,1289.

4-(2-(1H-imidazol-1-il)etoxi)ftalonitrilo 2.13

Num balão de fundo redondo contendo 4-nitroftalonitrilo (1 g; $5,78 \times 10^{-3}$ mol), 1-(2-hidroxi)imidazole (1,2 eq; 778 mg; $6,93 \times 10^{-3}$ mol) e carbonato de potássio (5 eq; 3,99g; $2,89 \times 10^{-2}$ mol), adicionou-se 20 mL de DMF. A mistura foi deixada em agitação à temperatura ambiente durante 72 horas. A base foi filtrada e a mistura vertida lentamente sob água gelada. O sólido resultante foi filtrado, obtendo-se o produto pretendido.



Rendimento: 55% (0,756 g).

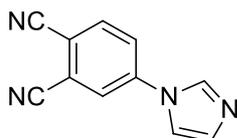
RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ , ppm: 7,72 (d; $J = 8,7$ Hz; 1H); 7,59 (sl; 1H); 7,26 (d; $J = 8,8$; 2,6 Hz; 1H); 7,17 (dd; $J = 8,8$; 2,6 Hz; 1H); 7,09 (t; $J = 1,1$; 1H); 7,02 (t; $J = 1,2$; 1H); 4,46-4,36 (m; 2H); 4,36-4,25 (m, 2H).

RMN ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) δ , ppm: 161,0; 137,6; 135,5; 130,2; 119,5; 119,5; 119,3; 117,8; 115,5; 115,1; 108,5; 68,4; 46,0.

MS (ESI-TOF): m/z 239,0933 $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculado para $\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{N}_4\text{O}$ 239,0927.

4-(1H-imidazol-1-il)ftalonitrilo 2.14

Num balão de fundo redondo contendo 4-nitroftalonitrilo (2 g; $1,16 \times 10^{-2}$ mol), imidazole (1,2 eq; 0,983 g; $1,44 \times 10^{-2}$ mol) e carbonato de potássio (5 eq; 7,98 g; $5,78 \times 10^{-2}$ mol), adicionou-se 40 mL de DMF. A mistura foi deixada em agitação à temperatura ambiente durante 72 horas. A base foi filtrada e a mistura vertida lentamente sob água gelada. O sólido resultante foi filtrado e lavado com metanol quente, obtendo-se o produto pretendido.



Rendimento: 61% (1,37 g).

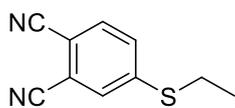
RMN ¹H (400 MHz, (DMSO-d₆) δ, ppm: 8,56 (d; *J* = 1,8 Hz; 1H); 8,50 (s; 1H); 8,32-8,19 (m; 2H); 7,95 (s, 1H); 7,15 (s, 1H).

RMN ¹³C (101 MHz, (DMSO-d₆) δ, ppm: 140,3; 136,1; 135,8; 131,0; 124,5; 124,1; 117,7; 116,5; 115,7; 115,5; 111,7

Os dados espectroscópicos encontram-se de acordo com o descrito na literatura.⁷

4-(etiltio)ftalonitrilo 2.15

Num balão de fundo redondo contendo 4-nitroftalonitrilo (1 g; 5,78x10⁻³ mol), etanotiol (1,2 eq; 431 mg; 6,94x10⁻³ mol) e carbonato de potássio (5 eq; 3,99 g; 2,89x10⁻² mol), adicionou-se 20 mL de DMF. A mistura foi deixada em agitação a 35°C durante 20 horas. A base foi filtrada e a mistura vertida lentamente sob água gelada. Realizou-se uma coluna cromatográfica em sílica gel usando como eluente diclorometano.



Rendimento: 78% (0,853 g).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ, ppm: 7,64 (d; *J* = 8,4 Hz; 1H); 7,55 (d; *J* = 1,9 Hz; 1H); 7,49 (dd; *J* = 8,4; 1,9 Hz; 1H); 3,05 (q; *J* = 7,4 Hz; 2H); 1,40 (t; *J* = 7,4 Hz; 3H).

RMN ¹³C (101 MHz, CDCl₃) δ, ppm: 147,7; 133,6; 130,4; 130,3; 116,7; 116,0; 115,6; 111,1; 26,4; 13,8.

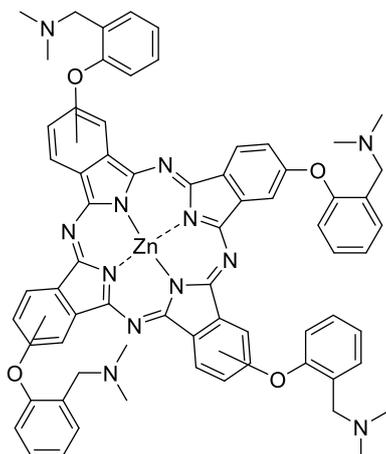
MS (ESI-TOF): *m/z* 189,0481 [M+H]⁺ calculado para C₁₀H₈N₂S 189,0408.

Síntese de Ftalocianinas

Ao ftalonitrilo (2,58 mmol) e 1/3 de Zn(OAc)₂·2H₂O (0,86 mmol) foi adicionado DMAE (4 mL). A mistura foi aquecida a 130 °C e agitada até se observar por TLC o consumo total do material de partida.

2(3),9(10),16(17),23(24)-tetraquis(2-((dimetilamino)metil)fenoxi)ftalocianinato de zinco (II) 2.16

Ao fim de 24 horas desligou-se a reação. Precipitou-se o composto com água e filtrou-se. Realizou-se coluna cromatográfica em sílica gel usando como eluente primeiramente diclorometano, de seguida acetato de etilo, terminando em etanol/trietilamina (10:2).



Rendimento: 60% (0,440 g).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃ + 5% piridina-d₅)
 δ , ppm: 9,13 (m; 4H); 8,74-8,65 (m; 4H);
 7,65-7,53 (m; 8H); 7,32-7,21 (m; 12H);
 3,64 (m; 8H); 2,42-2,18 (m; 24H).

UV-Vis (DMSO): λ_{abs} (log ϵ), 356 (4,77); 613 (4,44); 681 (5,15) nm.

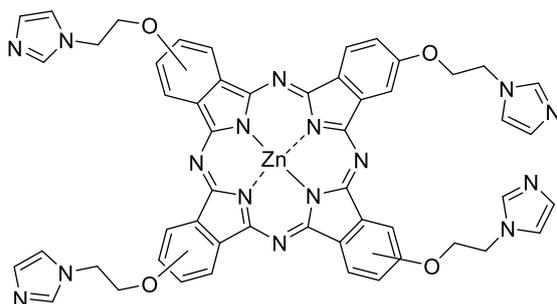
MS

(ESI-TOF): m/z 1173,4215 [M+H]⁺ calculado para

C₆₈H₆₁N₁₂O₄Zn 1173,4225.

2(3),9(10),16(17),23(24)-tetraquis(2-(1H-imidazol-1-il)etoxi)ftalocianinato de zinco (II) 2.17

Ao fim de 24 horas desligou-se a reação. Precipitou-se o composto com água e filtrou-se o sólido resultante. O precipitado foi lavado com água, acetato de etilo e éter dietílico.



Rendimento: 67% (0,426 g).

RMN ¹H (400 MHz, (DMSO-d₆ + 5% TFA) δ ,
 ppm: 9,47 (sl; 4H); 9,20 (sl; 4H); 8,10 (sl;
 4H); 7,84 (sl; 4H); 7,76-7,53 (m; 4H); 7,33
 (m; 4H); 4,98 (sl; 8H); 4,74-4,48 (m; 8H).

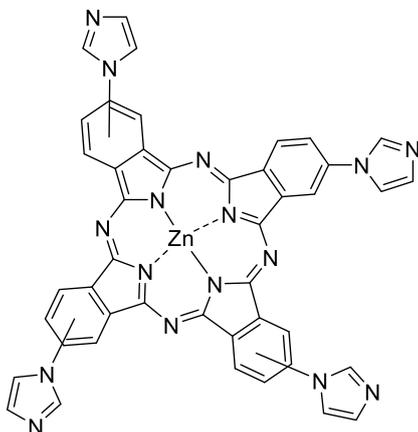
UV-Vis (DMSO): λ_{abs} 354; 613; 681 nm.

MS (ESI-TOF): m/z 1017,2746 [M+H]⁺ calculado para C₅₂H₄₁N₁₆O₄Zn 1017,2783.

Nota 2: Devido a questões de agregação não foi possível calcular o épsilon

2(3),9(10),16(17),23(24)-tetraquis(1H-imidazol-1-il)ftalocianinato de zinco (II) 2.18

Ao fim de 12 horas desligou-se a reação. Deixou-se arrefecer até à temperatura ambiente e precipitou-se com água/metanol. O sólido resultante foi filtrado. Lavou-se o sólido com acetato de etilo quente e filtrou-se novamente.



Rendimento: 71% (0,385 g).

RMN ¹H (400 MHz, piridina-d₅, 80 °C): δ, ppm: 9,24-9,41 (m; 8H); 8,83-8,91 (m; 4H); 8,06-8,31 (m; 8H); 7,76 (d; *J* = 10,3 Hz; 4H)

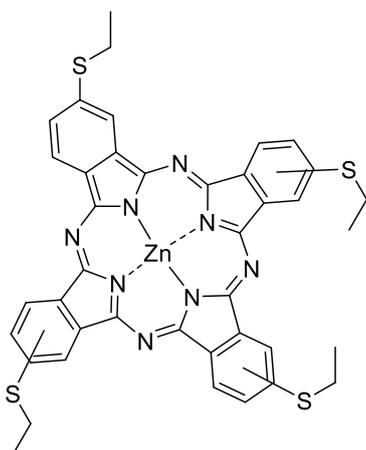
UV-Vis (DMSO): λ_{abs} (log ε), 358 (4,40); 616 (4,11); 682 (4,85) nm.

MS (ESI-TOF): *m/z* 841,1735 [M+H]⁺ calculado para C₄₄H₂₅N₁₆Zn 841,1740.

Os dados espectroscópicos encontram-se de acordo com o descrito na literatura.⁷

2(3),9(10),16(17),23(24)-tetraquis(etiltio)ftalocianinato de zinco (II) 2.19

Ao fim de 17 horas terminou-se a reação. Deixou-se arrefecer até à temperatura ambiente e filtrou-se.



Rendimento: 76% (0,389 g).

RMN ¹H (400 MHz, (DMSO-d₆) δ ppm: 8,70-8,63 (m; 8H); 8,07-7,88 (m; 4H); 3,66-3,49 (m; 8H); 1,75-1,65 (m; 12H).

UV-Vis (DMSO): λ_{abs} (log ε), 363 (4,87); 624 (4,58); 693 (5,34) nm.

MS (ESI-TOF): *m/z* 816,0917 [M+H]⁺ calculado para C₄₀H₃₂N₈S₄Zn 816,0919.

Síntese de Subftalocianinas

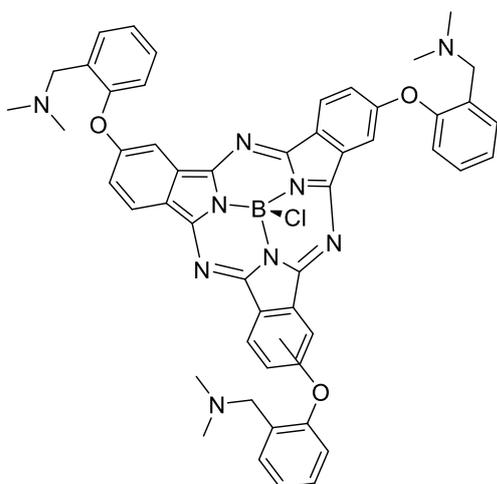
A um tubo de *Schlenk* em atmosfera inerte contendo o ftalonitrilo pretendido (1 mmol) foi adicionada uma solução de BCl₃ em *p*-xileno de concentração 1 M (1 mL). A mistura foi aquecida à temperatura de refluxo (aproximadamente a 140 °C) e agitada até se

verificar o consumo total do ftalonitrilo de partida. Após o arrefecimento, a mistura reacional foi submetida a uma corrente de árgon e o solvente foi evaporado a pressão reduzida. A seguinte purificação é descrita para cada caso específico.

Cloro[2,9,16(17)-tris(2-((dimetilamino)metil)fenoxi)]subftalocianinato de boro (III)

2.20

A reação terminou ao fim de 60 minutos. De seguida, o composto foi purificado por coluna cromatográfica em gel de sílica usando-se como eluente diclorometano.



Rendimento: 65% (0,190 g).

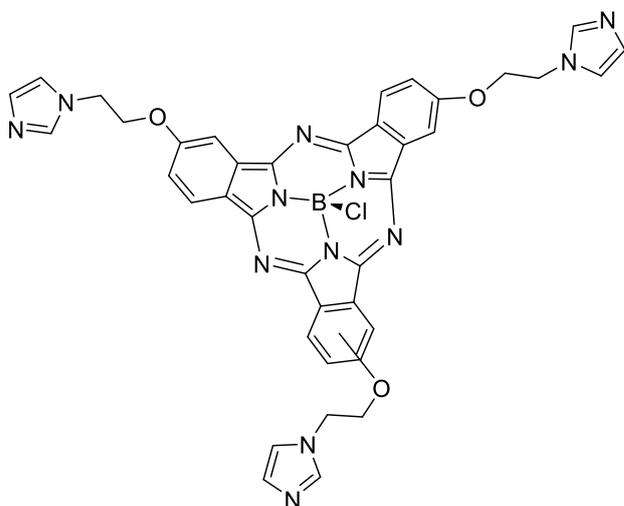
RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ , ppm: 7,77 (d; $J = 8,6$ Hz; 3H); 7,59 (dd; $J = 7,4$; 1,2 Hz; 3H); 7,43 (td; $J = 7,6$; 1,7 Hz; 3H); 7,38 (td; $J = 7,4$; 1,2 Hz; 3H); 7,29-7,22 (m; 6H); 7,06 (dd; $J = 8,0$; 1,5 Hz; 3H); 3,38 (s; 6H); 2,22 (s; 18H).

UV-Vis (CH_2Cl_2): λ_{abs} (log ϵ), 572 (3,43) nm.

Método por Mw: Adicionalmente, realizou-se uma otimização do processo sintético através de síntese assistida por micro-ondas. Num tubo de micro-ondas de 10 mL contendo o ftalonitrilo (1 mmol), colocou-se um fluxo de árgon com uma pipeta e, de seguida adicionou-se BCl_3 em *p*-xileno de concentração 1 M (1 mL) e fechou-se. A mistura foi colocada sob irradiação a 200 °C, P=300 W, por 6 minutos. Evaporou-se o xileno e realizou-se a mesma purificação descrita acima. O produto foi obtido com um rendimento de 69%.

Cloro[2,9,16(17)-tris(2-(1H-imidazol-1-il)etoxi)]subftalocianinato de boro (III) 2.21

A reação terminou ao final de 2 horas.



Rendimento: n.d

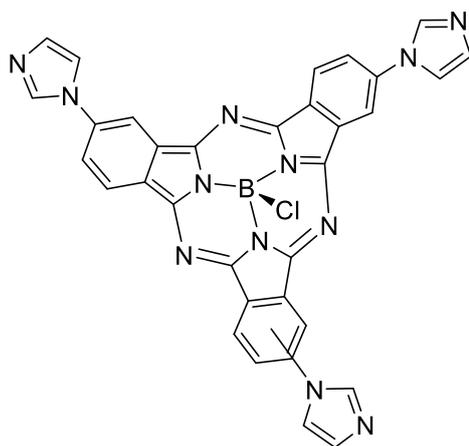
RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD) δ, ppm:
 9,16-9,09 (m; 3H); 7,91-7,85 (m; 3H);
 7,80-7,70 (m; 3H); 7,62-7,58 (m; 3H);
 7,57-7,51 (m; 3H); 7,48-7,35 (m; 3H);
 4,80-4,67 (m; 6H); 4,60-4,51 (m; 6H).

UV-Vis (CH₂Cl₂): λ_{abs}, 572 nm.

Nota 3: Não foi possível obter o composto sem contaminação com sais pelo que não se determinou o rendimento

Cloro[2,9,16(17)-tris(1H-imidazol-1-il)]subftalocianinato de boro (III) 2.22

A reação terminou ao final de 3 horas.



Rendimento: n.d.

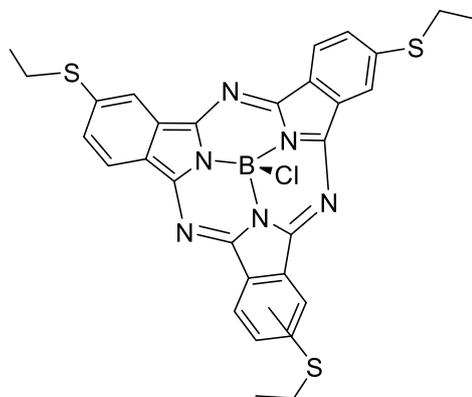
RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD) δ, ppm:
 9,82-9,64 (m; 3H); 8,64-8,48 (m; 3H);
 8,45-8,20 (m; 9H); 8,11-7,83 (m; 3H).

UV-Vis (CH₂Cl₂): λ_{abs}, 566 nm.

Nota 4: Não foi possível obter o composto sem contaminação com sais pelo que não se determinou o rendimento

Cloro[2,9,16(17)-tris(etiltio)]subftalocianinato de boro (III) 2.23

A reação terminou ao final de 1 hora. De seguida, o composto foi purificado por coluna cromatográfica em gel de sílica usando-se como eluente diclorometano.



Rendimento: 31% (0,063 g)

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm:
8,77-8,22 (m; 3H); 7,84-7,44 (m; 6H);
3,51-2,94 (m; 6H); 1,58-1,31 (m; 9H).

UV-Vis (CH₂Cl₂): λ_{abs} (log ε), 586
(4,84); 364 (4,34) nm.

MS (ESI-TOF): m/z 611,1094 [M+H]⁺ calculado para C₃₀H₂₅BClN₆S₃ 611,1084.

6.3- Experimental associada ao capítulo 3**6.3.1- Caracterização fotofísica e fotoquímica****Rendimentos quânticos de fluorescência**

Para o cálculo do rendimento quântico de fluorescência seguiu-se a metodologia proposta por Parker *et al.*⁸ A referência utilizada foi a TPP em tolueno ($\phi_f=0,11^9$) no caso das porfirinas e o iodeto de 1,1',3,3',3',3'-Hexametilindotricarbocianina (HITCI) como referência ($\phi_f=0,283^{10}$ em etanol) para a bacterioclorina. Foram preparadas soluções das referências e dos compostos cujo rendimento se quer determinar em tolueno ou em etanol, consoante a solubilidade dos compostos, de forma a apresentarem no espectro de absorção UV-Visível uma absorvância de aproximadamente 0,1 para a banda Soret. Diluíram-se estas soluções num fator de 1/10, procedeu-se ao seu desarejamento, borbulhando azoto, durante cerca de 15 minutos e de seguida, registaram-se os respetivos espectros de emissão excitando a 418 nm no caso das porfirinas e 510 nm no caso da bacterioclorina. Por fim, os rendimentos quânticos de fluorescência foram então calculados com recurso à equação:

$$\phi F (\text{amostra}) = \frac{\text{Área} (\text{amostra})}{1 - 10^{-\text{Abs}(\text{amostra})}} * \frac{1 - 10^{-\text{Abs}(\text{ref})}}{\text{Área} (\text{ref})} * \frac{\eta^2 (\text{amostra})}{\eta^2 (\text{ref})} * \phi F (\text{ref})$$

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.

Rendimento quântico de formação de oxigênio singuleto

Foi detetada a fosforescência emitida pelo oxigênio a 1270 nm à temperatura ambiente, após excitação das soluções contendo os compostos pretendidos na concentração necessária para produzir uma absorvância de 0,2 a 355 nm. A excitação das amostras foi realizada neste comprimento de onda, correspondente à terceira harmónica do laser (Nd-YAG). O comprimento de onda de 1270 nm foi selecionado para deteção no fotomultiplicador arrefecido a 193 K com azoto líquido. Como padrão utilizou-se a fenalenona, que possui um $\phi\Delta = 1,08^{11}$ em tolueno. Foram obtidos múltiplos gráficos do decaimento da emissão de fosforescência a 1270 nm ao longo do tempo, com diferentes intensidades relativas do pulso de laser. Para os dados referentes a cada energia do laser é ajustada uma exponencial, utilizando, mais uma vez, o programa *OriginLab*. De cada uma destas, é retirado o valor referente ao pré-exponencial (A) e construído um novo gráfico deste em função da energia do laser. Por fim, ajusta-se uma função linear a estes dados e retira-se o valor do declive. Calcula-se assim o rendimento quântico de oxigênio singuleto com recurso à equação:

$$\phi\Delta (\text{amostra}) = \frac{\text{Declive} (\text{amostra})}{1 - 10^{-Abs(\text{amostra})}} * \frac{1 - 10^{-Abs(\text{ref})}}{\text{Declive} (\text{ref})} * \phi\Delta (\text{ref})$$

4.3.6- Determinação de coeficientes de partição

Volumes iguais de *n*-octanol e PBS são misturados e deixados a repousar. No dia seguinte, dissolve-se o composto em 5 mL de *n*-octanol saturado com PBS e em seguida, adicionam-se a este 5 mL de PBS saturado com *n*-octanol. Agita-se a mistura vigorosamente e centrifuga-se a 3700 rpm. A um volume de 2 mL da parte do PBS adiciona-se 0,5 mL de *n*-octanol puro e procede-se à evaporação do primeiro a pressão reduzida (cerca de 50 °C). Após evaporação, adicionam-se 2,5 mL de *n*-octanol puro a este. Por outro lado, a um volume de 2 mL da parte do *n*-octanol adiciona-se 1 mL de *n*-octanol puro de modo a manter diluições iguais na fase orgânica e aquosa. Por fim,

efetuam-se espectros UV-Vis de cada uma das fases, dos quais se regista a absorvância para o cálculo do coeficiente de partição a partir da equação:

$$\log P_{OW} = \log(Abs_{n-oct}/Abs_{PBS})$$

Deteção de espécies reativas de oxigénio em solução

3'-*p*-(aminofenil)fluoresceína (APF) e 3'-*p*-(hidroxifenil)fluoresceína (HPF) são sondas seletivas para radicais hidroxilo. *Singlet oxygen Sensor Green*[®] (SOSG) é uma sonda específica para o oxigénio singuleto. Estas sondas foram utilizadas para detetar espécies reativas de oxigénio (ROS) após irradiação do fotossensibilizador. Soluções de fotossensibilizador foram diluídas para uma concentração final de aproximadamente 10 µM por poço. De seguida, cada sonda de fluorescência foi adicionada aos poços numa concentração final de 15 µM por poço. A placa foi então irradiada com luz branca usando com fonte de luz uma fibra óptica de 150 W (OSH150) por diversos intervalos de tempo. Um leitor de placas (Tecan Infinite M200 Reader) foi usado para adquirir o sinal de fluorescência imediatamente antes e após irradiação. Quando se utilizou APF e HPF, excitou-se a 488 nm e mediu-se a emissão de fluorescência a 515 nm. Por outro lado, com o SOSG, excitou-se a 505 nm e mediu-se a 525 nm.

6.3.2- Estudos *in vitro*

Estudos em bactérias

As experiências foram realizadas em estirpes bacterianas padrão da *American Type Culture Collection* (ATCC) usualmente usadas como controlos em antibiogramas. As estirpes bacterianas utilizadas foram: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. De seguida, outros ensaios foram realizados com estirpes clínicas resistentes do Centro Hospitalar da Universidade de Coimbra, nomeadamente: duas estirpes *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA), Sa1CHUC e Sa2CHUC, resistentes a todos os antibióticos beta-lactâmicos e a última resistente também a quinolonas; *Acinetobacter baumannii* 141HUC altamente resistente a todos os beta-lactâmicos, carbapenemos, quinolonas, gentamicina e netilmicina; *Escherichia coli* 189 resistentes a todos os antibióticos beta-lactâmicos e à colistina; e *Klebsiella pneumoniae* resistentes a todos os antibióticos beta-

lactâmicos, aminoglicosídeos e quinolonas.¹² Para os estudos em biofilmes foi usado *Staphylococcus aureus* ATCC 25925.

Estudos de internalização

Suspensões de *E. coli* e *S. aureus* foram incubadas por 1 hora com o fotossensibilizador pretendido (5 μ M) no escuro à temperatura ambiente. Após o tempo de incubação, o fotossensibilizador não ligado foi retirado por lavagem e centrifugação dessas suspensões por 10 min a 1550 *g* e as células lavadas foram ressuspensas em PBS sem Ca^{2+} e Mg^{2+} . Este procedimento foi repetido duas vezes e, em seguida, a parte sólida foi dissolvida em 10% SDS por pelo menos 24 horas. Os lisados foram utilizados para determinação do *uptake* celular de PS usando medições de fluorescência. A fluorescência foi medida usando um leitor automático de microplacas (Tecan Infinite M200 Reader) com excitação a 412 nm para porfirinas e 510 nm para bacterioclorinas e emissão entre 600-750 nm e 700-800 nm, respectivamente. Para quantificação do PS, as curvas de calibração foram preparadas com base em soluções de PS em 10% SDS e utilizadas para determinação da concentração de PS. Os valores de internalização foram obtidos dividindo a concentração de PS em lisados de células pelo número de unidades formadoras de colônias (UFC). O número de moléculas por célula foi calculado usando o número de Avogadro.

Fotoinativação de bactérias planctónicas

As células bacterianas planctónicas foram cultivadas em meio *Mueller Hinton* (MH) agar a 37 °C durante cerca de 12-24 horas. A densidade celular foi ajustada de forma a obter uma turbidez da suspensão bacteriana em água destilada correspondente ao padrão de 0,5 na escala de McFarland, o que equivale a aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. Para experiências de aPDT, suspensões bacterianas em placas de 96 poços foram incubadas no escuro por 60 minutos, à temperatura ambiente, com as várias concentrações dos fotossensibilizadores. Os poços usados como controlos foram incubados apenas com PBS. O tempo de incubação foi selecionado através de ensaios preliminares. De seguida, algumas placas foram iluminadas com a fonte de luz adequada para cada fotossensibilizador (descritas acima na instrumentação). Para os controlos de PS sem

irradiação, células com os fotossensibilizadores no escuro foram incubadas cobertas de papel de alumínio durante o mesmo tempo dos grupos de aPDT (60 minutos). Após irradiação ou incubação no escuro, as amostras são diluídas em PBS e agitadas. Alíquotas são retiradas, adicionadas a placas de Petri e incubadas a 37 °C por 18-24 horas no escuro. Após este tempo, as colônias são contadas. Foram realizados 3 ensaios independentes, utilizando poços em duplicados. A análise estatística foi realizada no GraphPad Prism 8.

Crescimento de biofilmes

Para o crescimento de biofilmes, foram usadas culturas de *S. aureus* incubadas durante 12 horas e diluídas 9:1 em infusão de cérebro-coração (do inglês, *Brain Heart Infusion* BHI). Os micro-organismos foram centrifugados (1500 rpm, 10 min) e lavados duas vezes com PBS. Alíquotas das suspensões bacterianas diluídas foram inoculadas em placas de 24 poços com fundo de poliestireno e incubadas por 24 h a 37 °C.

Fotoinativação de biofilmes bacterianos

Para as experiências de aPDT, as placas previamente preparadas com biofilme foram incubadas com diferentes concentrações dos fotossensibilizadores (0,0052-1 µM) por 30-60 minutos no escuro à temperatura ambiente. Os poços usados como controles foram incubados apenas com PBS. Após este período, as placas são iluminadas com a Biotable®, que emite luz em comprimentos de onda entre 400-700 nm, com uma potência constante de 30 mW/cm². Células com os fotossensibilizadores no escuro foram incubadas cobertas de papel de alumínio durante o mesmo tempo dos grupos de aPDT (60 minutos). Após irradiação ou incubação no escuro, os fotossensibilizadores são cuidadosamente removidos dos poços e os biofilmes lavados com PBS. Os biofilmes são raspados, sonicados e de seguida levados ao vórtex para homogeneizar as amostras. Estas são diluídas, adicionadas a placas de Petri com agar MH e incubadas por 24 h a 37 °C no escuro de modo a permitir a formação de colônias. Após este tempo, as colônias são contadas. Foram realizadas três experiências independentes, tendo sido efetuada cada uma com ensaios em triplicado.

Microscopia confocal dos biofilmes

Primeiramente, os biofilmes foram colocados a crescer em placas apropriadas à observação em microscopia. Após 24 horas, estas foram visualizadas ao microscópio confocal, observando-se a presença de biofilmes com espessura de cerca de 20 μm . De seguida, soluções de 1 μM das porfirinas **2.8** e **2.11** foram adicionadas a placas independentes e a intensidade de fluorescência no interior do biofilme foi seguida durante o tempo de incubação para cada PS (30 min e 1 h, respetivamente).

Citotoxicidade no escuro e fototoxicidade em células eucarióticas

Cultura de células

Fibroblastos dérmicos humanos neonatais (HDFn) e linhas celulares de queratinócitos humanos imortalizados (HaCaT) foram utilizadas para avaliar a citotoxicidade no escuro e a fototoxicidade dos fotossensibilizadores utilizados neste trabalho. Ambos os tipos de células foram cultivados em DMEM (do inglês, *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) com adição de 10% de soro fetal bovino. Antes das experiências, as células foram removidas por tripsinização, lavadas com PBS e mantidas em atmosfera humidificada a 37 °C na presença de 5% de CO₂.

Citotoxicidade no escuro

Primeiramente as células foram plaqueadas e, após atingirem uma confluência de cerca de 80%, soluções dos fotossensibilizadores em PBS (DMSO < 0,5%) com concentrações entre 0 a 100 μM , foram adicionadas. As placas foram incubadas por 1 h a 37 °C no escuro. Células controlo, sem adição de PS, foram incubadas nas mesmas condições. De seguida, a solução de PS em cada poço foi removida, lavando as células com PBS e adicionou-se meio de cultura fresco a cada poço. MTT foi dissolvido a 5 mg/mL em PBS. Uma solução de MTT foi adicionada a cada poço (concentração final de 0,5 mg/mL) e as placas foram incubadas por 3-4 h. O meio foi então descartado e 100 μL de metanol, foram adicionados às culturas e misturados cuidadosamente para dissolver os cristais azuis escuros de formazan. A quantificação do formazan foi realizada utilizando um leitor automático de microplacas (Tecan Infinite M200 Reader) por medições de absorvância

com o comprimento de onda de 565 nm. Cada experiência foi repetida três vezes e realizada em triplicado. Os dados foram expressos como valor médio da absorvância.

Fototoxicidade

O procedimento utilizado para a determinação da fototoxicidade foi semelhante ao anterior, exceto que após a adição dos compostos e respectivo período de incubação, as células são irradiadas com a fonte de luz adequada a cada fotossensibilizador.

6.4-Experimental associada ao capítulo 4

6.4.1- Síntese de precursores

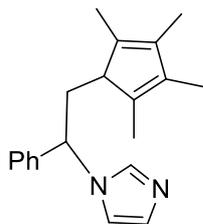
1,2,3,4-tetrametilfulveno 4.1

Método A: Uma solução 1,60 M de *n*-BuLi em hexano (5,5 mL; 8,70 mmol) foi adicionada gota a gota a uma solução de pentametilciclopentadieno (1,36 g; 10,0 mmol) em THF (30 mL) a -60 °C. A mistura foi agitada durante 20 minutos no escuro. De seguida, permitiu-se o aquecimento até à temperatura ambiente e agitou-se durante 1 hora. O cloreto de tritilo (2,34 g; 8,70 mmol) foi adicionado a 0 °C e a solução deixada em agitação durante a noite a 4 °C.

Método B: Similar ao método A mas substituindo a base por uma solução 1 M de LDA em THF/hexano (8,70 mL; 8,70 mmol).

PhCp*-NHC 4.2

Uma solução 1,60 M de *n*-BuLi em hexano (5,5 mL; 8,70 mmol) foi adicionada gota a gota uma solução de benzilimidazole (1,15 g; 7,25 mmol) em THF seco (15 mL) previamente arrefecida a -60 °C. Após agitar durante 20 minutos, o tetrametilfulveno previamente preparado (método A) foi adicionado. De seguida, permitiu-se o aquecimento até à temperatura ambiente e agitou-se durante 1 hora. Metanol (10 mL) foi adicionado e o solvente removido sob vácuo. O crude foi purificado por cromatografia (hexano/acetato de etilo, 1:4) obtendo-se o composto como um óleo amarelado.



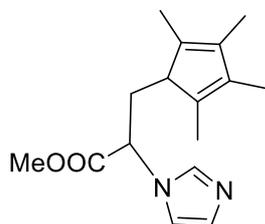
Rendimento: 71% (1,51 g).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ, ppm: 7,64-6,76 (m; 8H); 5,31-4,70 (m; 1H); 3,37-2,08 (m; 3H); 2,06-0,68 (m; 12H).

Os dados espectroscópicos encontram-se de acordo com o descrito na literatura.¹³

COOMeCp*-NHC 4.4

Uma solução 1 M de LDA em THF/hexano (8,70 mL; 8,70 mmol) foi adicionada gota a gota uma solução de 2-(1*H*-imidazol-1-il)acetoneitrilo (0,777 g; 7,25 mmol) em THF seco (15 mL) previamente arrefecida a -60 °C. Após agitar durante 20 minutos, o tetrametilfulveno previamente preparado (método B) foi adicionado. De seguida permitiu-se o aquecimento até à temperatura ambiente e agitou-se durante 1 hora. Metanol seco (10 mL) foi adicionado e o solvente removido sob vácuo. O crude foi purificado por cromatografia (hexano/acetato de etilo, 1:4).



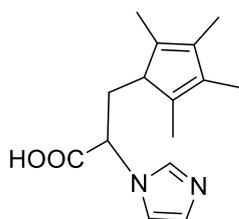
Rendimento: 12% (0,293 g).

MS (ESI-TOF) *m/z* 275,1 [M]⁺, calculado para C₁₆H₂₂N₂O₂ 275,1.

IV selecionado (KBr, ν (cm⁻¹)): 1746,82 (CO).

COOHCp*-NHC 4.5

Uma solução 1 M de LDA em THF/hexano (8,70 mL; 8,70 mmol) foi adicionada gota a gota uma solução de 2-(1*H*-imidazol-1-il)acetato de metilo (1,02 g; 7,25 mmol) em THF seco (15 mL) previamente arrefecida a -60 °C. Após agitar durante 20 minutos, o tetrametilfulveno previamente preparado (método B) foi adicionado. De seguida permitiu-se o aquecimento até à temperatura ambiente e agitou-se durante 1 hora. Metanol seco (10 mL) foi adicionado e o solvente removido sob vácuo. O crude foi lavado com diclorometano e hexano. De seguida, realizou-se uma cromatografia de fase reversa usando como eluente primeiramente água e de seguida água/metanol (1:1).



Rendimento: 37% (0,700 g).

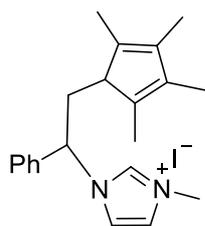
MS (ESI-TOF) m/z 261,1 $[M]^+$ calculado para $C_{15}H_{20}N_2O_2$ 261,1.

IV selecionado (KBr, ν (cm^{-1})): 3381,05 (OH); 1620,74 (CO).

6.4.2- Síntese de pró-ligandos

Cp*-NHC^{Me}I 4.3a

Num balão de fundo redondo contendo uma solução de PhCp*NHC (506,2 mg; $1,73 \times 10^{-3}$ mol) em acetona (5 mL), adicionou-se iodometano (5 eq; 0,54 mL; $8,67 \times 10^{-3}$ mol). A mistura foi deixada sob agitação à temperatura ambiente durante a noite. Os componentes voláteis foram evaporados sob vácuo, obtendo-se o composto pretendido.



Rendimento: 88,5% (0,665 g).

RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ , ppm: mistura de isômeros 10,2-9,2 (s; 1H); 7,75-6,76 (m; 7H); 5,75-4,9 (m; 1H); 4,0-3,8 (s; 3H); 3,44-2,4 (m; 3H); 1,74-1,35 (s; 9H); 1,00-0,80 (s; 3H).

Os dados espectroscópicos encontram-se de acordo com o descrito na literatura.¹³

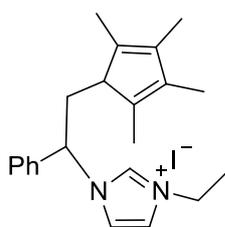
Cp*-NHC^{Et}I 4.3b

Método A: Num balão de fundo redondo contendo uma solução de PhCp*NHC (529 mg; 1,8 mmol) em THF (10 mL), adicionou-se o iodoetano (0,71 mL, 9,1 mmol). A mistura foi agitada a 50 °C por 72 horas. O solvente foi evaporado sob vácuo e o sólido resultante lavado sucessivamente com éter dietílico e hexano. O composto foi obtido com um rendimento de 68% (0,549 g).

Método B: Similar ao método A mas sem solvente e com um excesso de 150 equivalentes de iodoetano ($2,70 \times 10^{-2}$ mol). O composto foi obtido com um rendimento de 67% (0,541 g), após 36 horas.

Método C: Similar ao método A, mas a mistura foi exposta a ultrassons. O composto foi obtido com um rendimento de 77% (0,621 g), após 6 horas.

Método D: Similar ao método A, mas a mistura foi exposta a irradiação micro-ondas a 80 °C, com uma potência de 100 W por 0,25 horas. O composto foi obtido com um rendimento de 81% (0,654 g).



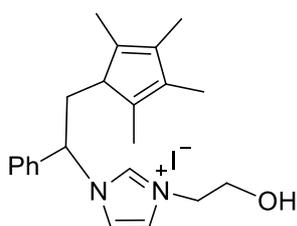
RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ, ppm: mistura de isómeros 10,47-9,43 (s; 1H); 7,75-7,01 (m; 7H); 5,83-5,53 (m; 1H); 4,43-4,10 (m; 2H); 3,47-2,29 (m; 3H); 1,81-0,83 (m; 15H).

RMN ¹³C (101 MHz, CDCl₃) δ, ppm: 140,0; 131,3-119,5; 69,4-64,0; 57,2-49,1; 45,6-45,4; 32,6-31,4; 15,7-11,5.

Os dados espectroscópicos encontram-se de acordo com o descrito na literatura.¹⁴

Cp*-NHC^{Etanol}I 4.3c

Num balão de fundo redondo contendo uma solução de PhCp*NHC (529 mg; 1,8x10⁻³ mol) em acetona (10 mL), adicionou-se 2-iodoetanol (5 eq; 0,71 mL; 9,1x10⁻³ mol). A mistura foi deixada sob agitação à temperatura ambiente durante 4 dias. O solvente foi evaporado sob vácuo e o sólido resultante lavado sucessivamente com éter dietílico e hexano.



Rendimento: 63% (0,532 g).

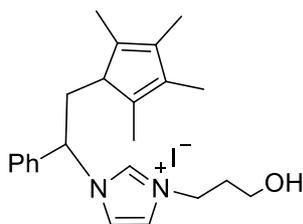
RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ, ppm: mistura de isómeros 9,64-9,41 (s; 1H); 7,69-6,81 (m; 7H); 5,77-5,37 (m; 1H); 4,65-4,36 (m; 2H); 4,10-3,67 (m; 2H); 3,48-2,98 (m; 2H); 2,87-2,03 (m; 1H); 1,92-0,80 (m; 12H).

RMN ¹³C (101 MHz, CDCl₃) δ, ppm: 141,3; 136,4-120,2; 70,5-62,4; 59,5; 53,8-49,3; 32,2-31,7; 15,4-12,0.

MS (ESI-TOF) m/z 337 [M-I]⁺ calculado para C₂₂H₂₉N₂O 337.

Cp*-NHC^{Propanol} 4.3d

Num balão de fundo redondo contendo uma solução de PhCp*NHC (464 mg; $1,59 \times 10^{-3}$ mol) em acetona (10 mL), adicionou-se 3-iodopropanol (5 eq; 0,76 mL; $7,95 \times 10^{-3}$ mol). A mistura foi deixada sob agitação à temperatura ambiente durante 4 dias. O solvente foi evaporado sob vácuo e o sólido resultante lavado sucessivamente com éter dietílico e hexano.



Rendimento: 61% (0,467 g).

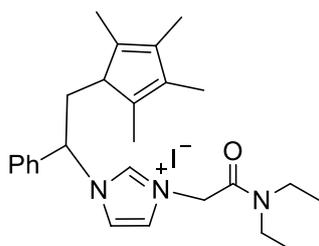
RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ, ppm: mistura de isómeros 10,22-9,67 (s; 1H); 7,73-6,77 (m; 7H); 5,95-5,30 (m; 1H); 4,69-4,22 (m; 2H); 3,90-3,52 (m; 2H); 3,38-2,70 (m; 2H); 2,17-2,03 (m; 3H); 1,98-0,56 (m; 12H).

RMN ¹³C (101 MHz, CDCl₃) δ, ppm: 144,0; 133,6-120,2; 65,0-62,5; 56,9; 56,9-49,6; 47,8; 32,5-31,7; 14,2-10,8.

MS (ESI-TOF) m/z 351 [M-I]⁺ calculado para C₂₃H₃₁N₂OI 351.

Cp*-NHC^{Acetamida} 4.3f

A 2-iodo-*N,N*-dietilacetamida exige um passo prévio de preparação, em que o 2-cloro-*N,N*-dietilacetamida é colocada em agitação com KI (1 eq) em acetona, à temperatura ambiente durante 24 horas, de modo a que ocorra a troca do halogênio de cloro para iodo. A suspensão formada é filtrada e o solvente evaporado. Num balão de fundo redondo contendo uma solução de PhCp*NHC (640 mg; 2,2 mmol) em acetona (10 mL), adicionou-se 2-iodo-*N,N*-dietilacetamida previamente preparada (5 eq; 11 mmol). A mistura foi deixada sob agitação à temperatura ambiente durante 4 dias. O solvente foi evaporado sob vácuo e o sólido resultante lavado sucessivamente com éter dietílico e hexano.



Rendimento: 69% (0,659 g).

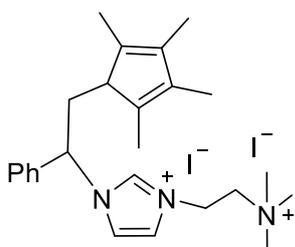
RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ, ppm: mistura de isómeros 10,11-9,75 (s; 1H); 7,48-6,85 (m; 7H); 5,80-4,72 (m; 3H); 3,55-3,18 (m; 4H); 2,85-2,73 (m; 2H); 2,58-2,28 (m; 1H); 1,81-0,80 (m; 18H).

RMN ¹³C (101 MHz, CDCl₃) δ, ppm: 163,3; 143,7; 140,1-120,2; 64,9-62,6; 53,5; 50,5; 41,7; 32,9-32,7; 14,0-11,4.

MS (ESI-TOF) m/z 406 [M-I]⁺ calculado para C₂₆H₃₆N₃O 406.

Cp*-NHC^{Etiltrimetilamônio} I 4.3g

Num tubo de *Schlenk* sob atmosfera inerte contendo Cp*^{NHC} (523,2 mg; 1,79x10⁻³ mol), cloreto de (2-cloroetil)trimetilamônio (5 eq; 1,42 g; 8,96x10⁻³ mol) e iodeto de potássio (5 eq; 1,49 g; 8,96x10⁻³ mol) adicionou-se 5 mL de DMF seco. A mistura foi deixada em agitação durante 72 horas a 80 °C. Precipitou-se o composto com uma mistura de diclorometano/hexano. O produto pretendido foi extraído do sólido obtido com acetona.



Rendimento: 54% (0,613 g).

RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD) δ, ppm: 9,74-9,59 (s; 1H); 8,22 (s; 1H); 8,04 (s; 1H); 7,95-7,21 (m; 5H); 5,74-5,54 (m; 1H); 4,12 (t; *J* = 6,6 Hz; 2H); 3,88 (t; *J* = 6,6 Hz; 2H); 3,43-3,39 (m; 3H); 3,31 (s; 9H) 1,92-0,90 (m; 12H).

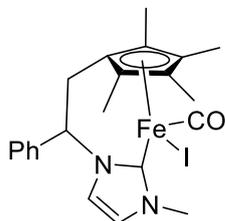
MS (ESI-TOF) m/z 364,2719 [M-2I-1CH₃]⁺ calculado para C₂₄H₃₃N₃ 364,2669.

6.4.3- Síntese de complexos de ferro

Procedimento geral: A mistura do respetivo pro-ligando (1,38 mmol) com 1/3 Fe₃(CO)₁₂ (0,46 mmol) foi refluxada em tolueno seco (15 mL) durante a noite. Deixou-se arrefecer à temperatura ambiente e filtrou-se o solvente por cânula. O tolueno foi evaporado a

pressão reduzida. O sólido resultante foi lavado com hexano e este novamente filtrado por cânula, obtendo-se o complexo pretendido.

(Cp*-NHC^{Me})Fe(CO)I 4.6a

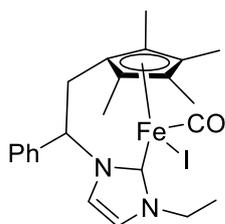


Rendimento: 90% (0,661 g).

RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD) δ, ppm: 7,62-7,51 (m; 5H); 7,13 (s; 1H); 6,44 (s; 1H); 6,00-5,97 (dd; *J* = 11,8; 2,6 Hz; 1H); 3,79 (s; 3H); 2,98-2,96 (m; 2H); 2,36 (s; 3H); 1,81 (s; 3H); 1,74 (s; 3H); 0,96 (s; 3H).

Os dados espectroscópicos encontram-se de acordo com o descrito na literatura.¹⁵

(Cp*-NHC^{Et})Fe(CO)I 4.6b



Rendimento: 68% (0,512 g).

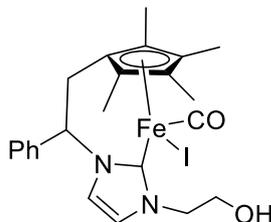
RMN ¹H (400 MHz, acetona-d₆) δ, ppm: 7,63-7,53 (m; 5H); 7,13 (s; 1H); 6,48 (s; 1H); 6,06 (d; *J* = 12 Hz; 1H); 4,35-4,23 (m; 2H); 3,05-2,92 (m; 2H); 2,40 (s; 3H); 1,81 (s; 3H); 1,76 (s; 3H); 1,35 (t; *J* = 8 Hz; 3H);

0,96 (s; 3H).

RMN ¹³C (101 MHz, acetona-d₆) δ, ppm: 226,8; 194,8; 138,8; 130,1; 130,0; 129,9; 122,3; 121,3; 104,7; 91,7; 90,4; 84,1; 81,3; 67,1; 46,1; 28,9; 16,9; 13,4; 10,4; 9,7; 9,5.

Os dados espectroscópicos encontram-se de acordo com o descrito na literatura.¹⁴

(Cp*-NHC^{Etanol})Fe(CO)I 4.6c



Rendimento: 74% (0,574 g).

RMN ¹H (400 MHz, acetona-d₆) δ, ppm: 7,59-7,53 (m; 5H); 7,07 (s; 1H); 6,46 (s; 1H); 6,06 (d; *J* = 12 Hz; 1H); 4,50-4,40 (m; 2H); 3,88-3,86 (m; 2H); 3,0-2,92 (m; 2H); 2,39 (s; 3H); 1,82 (s; 3H); 1,7

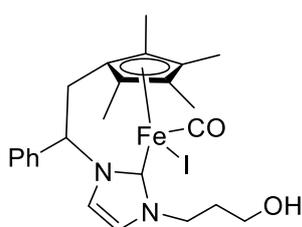
(s; 3H); 0,94 (s; 3H).

RMN ^{13}C (101 MHz, acetona- d_6) δ , ppm: 226,8; 194,9; 138,8; 129,0; 124,0; 120,0; 104,0; 91,6; 90,4; 84,3; 81,2; 69,0; 67,1; 61,0; 52,0; 21,0; 13,0; 11,0; 10,0; 9,5.

IV seleccionado (KBr, ν (cm^{-1})): 1901 (CO).

MS (ESI-TOF+) m/z 419 $[\text{M-I}]^+$ calculado para $\text{C}_{23}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_2\text{Fe}$ 419.

(Cp*-NHC^{Propanol}) Fe(CO)I 4.6d



Rendimiento: 76% (0,604 g).

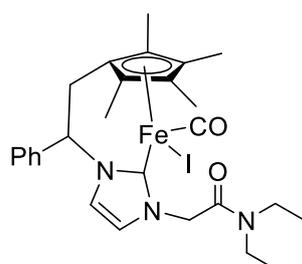
RMN ^1H (400 MHz, (acetona- d_6) δ , ppm: 7,62-7,42 (m; 5H); 7,26-7,04 (m; 2H); 6,48 (d; $J = 1,9$ Hz; 1H); 6,07 (dt; $J = 21,5$; 10,7 Hz, 1H); 4,32 (d; $J = 5,9$ Hz; 1H); 3,59 (s; 1H); 3,05-2,93 (m; 1H); 2,40 (s; 3H); 2,00-1,87 (m; 2H); 1,81 (s; 3H); 1,75 (s; 3H); 0,95 (s; 3H).

RMN ^{13}C (101 MHz, acetona- d_6) δ , ppm: 226,9; 195,2; 138,9; 130,2; 130,1; 130,0; 129,8; 129,1; 123,4; 121,1; 104,8; 91,8; 90,5; 84,3; 81,2; 67,2; 58,9; 48,0; 34,8; 29,2; 13,4; 10,5; 9,7; 9,6.

IV seleccionado (KBr, ν (cm^{-1})): 1907 (CO).

MS (ESI-TOF) m/z 433 $[\text{M-I}]^+$ calculado para $\text{C}_{24}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{O}_2\text{Fe}$ 433.

(Cp*-NHC^{Acetamida}) Fe(CO)I 4.6e



Rendimiento: 76% (0,662 g).

RMN ^1H (400 MHz, C_6D_6) δ , ppm: 7,22-7,16 (m; 5H); 6,28 (s; 1H); 6,23 (s; 1H); 6,05 (m, 1H); 5,43 (d; $J = 2,16$ Hz; 1H); 3,87 (d; $J = 1,64$ Hz; 1H); 3,46 (m; 2H); 2,92 (m; 2H); 2,77 (m; 2H); 2,40 (s; 3H); 1,81 (s; 3H); 1,72 (s; 3H); 1,15 (s; 3H); 1,02 (t; $J =$

0,41 Hz; 3H); 0,77 (t; $J = 0,30$ Hz; 3H).

RMN ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) δ , ppm: 227,3; 198,3; 165,7; 138,5; 129,0; 123,0; 120,0; 102,7; 92,7; 90,6; 83,3; 82,2; 66,0; 52,0; 41,0; 40,0; 29,1; 13,0; 10,0; 9,9; 1,6.

IV seleccionado (KBr, ν (cm^{-1})): 1924 (CO).

MS (ESI-TOF) m/z 488 $[\text{M-I}]^+$ calculado para $\text{C}_{27}\text{H}_{34}\text{N}_3\text{O}_2\text{Fe}$ 488.

6.4.4- Avaliação da capacidade oxidativa do ferro

Uv-Vis: Uma solução de $(\text{Cp}^*\text{-NHC}^{\text{Me}})\text{Fe}(\text{CO})\text{I}$ em acetonitrilo (0,465 mM) foi titulada com uma solução de peróxido de hidrogénio 33% em água. O espectro de absorção UV/Vis de cada adição foi adquirido.

EPR: O espectro de EPR da solução do complexo de Fe (II) em acetonitrilo (1 mM) e de uma solução similar com 200 μL de H_2O_2 foram adquiridos a 20 °C.

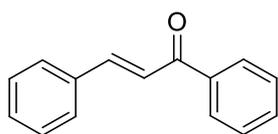
Deteção de radicais hidroxilo: A uma solução do complexo $(\text{Cp}^*\text{-NHC}^{\text{Me}})\text{Fe}(\text{CO})\text{I}$ (0,465 mM) foram adicionados 12,5 μM de uma solução contendo *p*-aminofenil fluoresceína (APF) em tampão sódio fosfato (0,1 M, pH 7,4). De seguida, H_2O_2 foi progressivamente adicionado e a fluorescência foi medida em cada ponto, usando excitação/emissão de 490/515 nm. A formação de ROS foi observada através do aparecimento de fluorescência. Duas experiências controlo foram também realizadas: uma sem APF e outra sem o complexo de ferro.

6.5-Experimental associada ao capítulo 5

6.5.1- Síntese de chalconas

A uma mistura de acetofenona (1 mmol) com um aldeído aromático (1 mmol) na mínima quantidade de etanol (≈ 1 mL), adicionou-se KOH em pó (10 mol %). A mistura reacional foi agitada à temperatura ambiente até se observar a formação de um precipitado (poucos minutos). O sólido foi separado por filtração e lavado com água, de modo a obter a respetiva chalcona.

(*E*)-1,3-difenilprop-2-en-1-ona 5.1



Rendimento: 92% (0,208 g).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ , ppm: 8,07-7,99 (m; 2H); 7,82 (d; $J = 15,7$ Hz; 1H); 7,65 (dd; $J = 6,7; 2,8$ Hz; 2H); 7,62-7,47 (m; 4H);

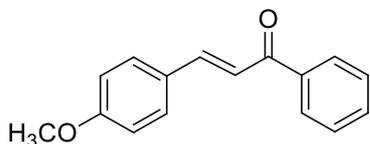
7,45-7,39 (m; 3H).

RMN ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) δ , ppm: 190,7; 145,0; 138,3; 135,0; 132,9; 130,7; 129,1; 128,8; 128,6; 128,6; 122,2.

GC-MS (IE): m/z (tR, min) = 7,365 (208,1) [M]⁺.

Os dados espectroscópicos encontram-se de acordo com o descrito na literatura.¹⁶

(E)-1-fenil-3-(4-metoxifenil)prop-2-en-1-ona 5.2



Rendimento: 94% (0,238 g).

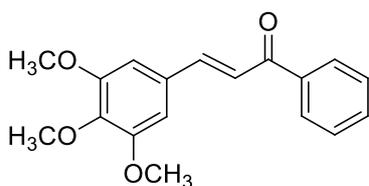
RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ , ppm: 8,03 (d; J = 8,9 Hz; 2H); 7,73 (d; J = 15,6 Hz; 1H); 7,53 (m; 6H); 6,99 (d; J = 8,9 Hz; 2H); 3,89 (s; 3H).

RMN ¹³C (101 MHz, CDCl₃) δ , ppm: 188,5; 163,7; 142,7; 134,2; 132,3; 131,1; 131,0; 129,9; 124,7; 122,5; 114,1; 55,7.

GC-MS (IE): m/z (tR, min) = 238,1 (8,145) [M]⁺.

Os dados espectroscópicos encontram-se de acordo com o descrito na literatura.¹⁷

(E)-1-fenil-3-(3,4,5-trimetoxifenil)prop-2-en-1-ona 5.3



Rendimento: 80% (0,298 g).

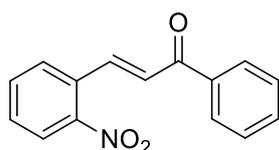
RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ , ppm: 8,06-7,96 (m; 2H); 7,71 (d; J = 15,6 Hz; 1H); 7,58 (t; J = 7,3 Hz; 1H); 7,50 (t; J = 7,5 Hz; 2H); 7,40 (d; J = 15,6 Hz; 1H); 6,88 (s; 2H); 3,94 (s; 6H); 3,92 (s; 3H).

RMN ¹³C (101 MHz, CDCl₃) δ , ppm: 190,7; 153,6; 145,2; 140,6; 138,4; 132,9; 130,5; 128,7; 128,6; 121,6; 105,8; 61,1; 56,4.

GC-MS (IE): m/z (tR, min) = 298,1 (9,127) [M]⁺.

Os dados espectroscópicos encontram-se de acordo com o descrito na literatura.¹⁸

(E)-3-(2-nitrofenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona 5.4



Rendimento: 93% (0,253 g).

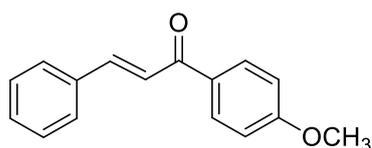
RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ , ppm: 8,13 (d; J = 15,7 Hz; 1H); 8,10-8,05 (m; 1H); 8,04-7,98 (m; 2H); 7,78-7,48 (m; 6H); 7,32 (d; J = 15,7 Hz, 1H).

RMN ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) δ , ppm: 190,7; 149,0; 140,4; 137,6; 133,7; 133,3; 131,5; 130,5; 129,4; 128,9; 128,9; 127,6; 125,1.

GC-MS (IE): m/z (tR, min) = 8,374 (253,9) $[\text{M}]^+$.

Os dados espectroscópicos encontram-se de acordo com o descrito na literatura.¹⁹

(E)-1-(4-metoxifenil)-3-fenilprop-2-en-1-ona 5.5



Rendimento: 95% (0,238 g).

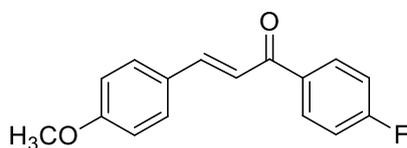
RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ , ppm: 8,05 (d; $J = 7,5$ Hz; 2H); 7,81 (d; $J = 15,7$ Hz; 1H); 7,67-7,62 (m; 2H); 7,55 (d; $J = 15,7$ Hz; 1H); 7,45-7,35 (m; 3H); 6,99 (d; $J = 7,5$; 2H); 3,89 (s; 3H).

RMN ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) δ , ppm: 188,9; 163,6; 144,1; 135,2; 131,2; 131,0; 130,5; 129,1; 128,5; 122,0; 114,0; 55,6.

GC-MS (IE): m/z (tR, min) = 238,1 (8,172) $[\text{M}]^+$.

Os dados espectroscópicos encontram-se de acordo com o descrito na literatura.¹⁶

(E)-1-(4-fluorofenil)-3-(4-metoxifenil)prop-2-en-1-ona 5.6



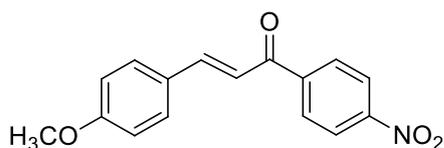
Rendimento: 98% (0,256 g).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ , ppm: 8,14-7,98 (m; 2H); 7,79 (d; $J = 15,6$ Hz; 1H); 7,60 (d; $J = 8,7$ Hz; 2H); 7,38 (d; $J = 15,6$ Hz; 1H); 7,21-7,08 (m; 2H); 6,94 (d; $J = 8,8$ Hz; 2H); 3,86 (s; 3H).

RMN ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) δ , ppm: 189,0; 165,6 (d; $J^{13\text{C}-^{19}\text{F}} = 254,5$ Hz); 161,9; 145,1; 135,0 (d, $J^{13\text{C}-^{19}\text{F}} = 3,0$ Hz); 131,1 (d, $J^{13\text{C}-^{19}\text{F}} = 9,1$ Hz); 130,4; 127,6; 119,4; 115,8 (d; $J^{13\text{C}-^{19}\text{F}} = 21,2$ Hz); 114,6; 55,6.

GC-MS (IE): m/z (tR, min) = 256,1 (8,071) $[\text{M}]^+$.

Os dados espectroscópicos encontram-se de acordo com o descrito na literatura.¹⁶

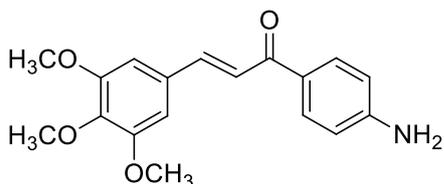
(E)-3-(4-metoxifenil)-1-(4-nitrofenil)prop-2-en-1-ona 5.7**Rendimento:** 93% (0,283 g).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ, ppm: 8,37-8,28 (m; *J* = 2H); 8,14-8,08 (m; 2H); 7,82 (d; *J* = 15,6 Hz; 1H); 7,62 (d; *J* = 8,7 Hz; 2H); 7,35 (d; *J* = 15,6 Hz; 1H); 6,96 (d; *J* = 8,7 Hz; 2H); 3,87 (s; 3H).

RMN ¹³C (101 MHz, CDCl₃) δ, ppm: 189,2; 162,4; 150,1; 146,9; 143,6; 130,8; 129,5; 127,2; 124,0; 119,1; 114,8; 55,6.

GC-MS (IE): *m/z* (tR, min) = 253,9 (8,374) [M]⁺.

Os dados espectroscópicos encontram-se de acordo com o descrito na literatura.²⁰

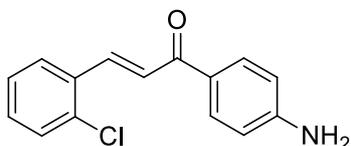
(E)-1-(4-aminofenil)-3-(3,4,5-trimetoxifenil)prop-2-en-1-ona 5.8**Rendimento:** 96% (0,313 g).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ, ppm: 7,90 (d; *J* = 8,2 Hz; 2H); 7,66 (d; *J* = 15,5 Hz; 1H); 7,41 (d; *J* = 15,5 Hz; 1H); 6,82 (s; 2H); 6,67 (d; *J* = 8,2 Hz; 2H); 3,88 (s; 9H).

RMN ¹³C (101 MHz, CDCl₃) δ, ppm: 188,0; 153,4; 151,4; 143,3; 140,0; 131,1; 130,9; 128,3; 121,4; 113,8; 105,5; 61,0; 56,2.

GC-MS (IE): *m/z* (tR, min) = 313,1 (11,834) [M]⁺.

Os dados espectroscópicos encontram-se de acordo com o descrito na literatura.²¹

(E)-1-(4-aminofenil)-3-(2-clorofenil)prop-2-en-1-ona 5.9**Rendimento:** 97% (0,257 g).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ, ppm: 8,13 (d; *J* = 15,7 Hz; 1H); 7,98-7,86 (m; 2H); 7,80-7,70 (m; 1H); 7,49 (d; *J* = 15,7 Hz; 1H); 7,46-7,39 (m; 1H); 7,33-7,27 (m; 2H); 6,75-6,64 (m; 2H); 4,21 (sl, 2H).

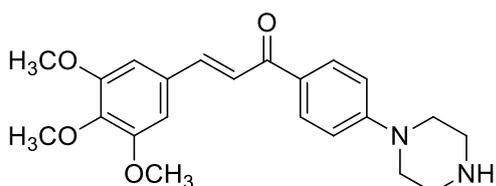
RMN ¹³C (101 MHz, CDCl₃) δ, ppm: 188,1; 151,4; 139,1; 135,4; 133,8; 131,4; 130,9; 130,4; 128,4; 127,9; 127,1; 125,1; 114,1.

GC-MS (IE): *m/z* (tR, min) = 257,0 (9,347) [M]⁺.

Os dados espectroscópicos encontram-se de acordo com o descrito na literatura.¹⁶

(E)-1-(4-(piperazin-1-il)fenil)-3-(3,4,5-trimetoxifenil)prop-2-en-1-ona 5.10

Num balão de fundo redondo contendo (E)-4-(4-(3-(3,4,5-trimetoxifenil)acrilóil)fenil)piperazina-1-carboxilato de *terc*-butilo (0,1 g; 20,7 mmol), adicionou-se 10 mol% de TFA e 2 mL de diclorometano. A reação foi deixada em agitação à temperatura ambiente durante 24 horas. O solvente foi removido sob vácuo e o TFA retirado realizando misturas azeotrópicas com tolueno.



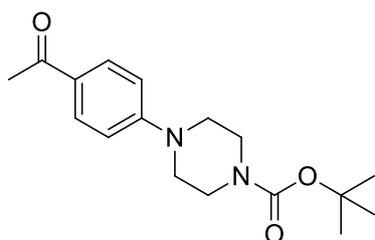
Rendimento: 96% (0,076 g).

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm: 9,06 (s; 1H); 8,11 (d; *J* = 9,0 Hz; 2H); 7,87 (d; *J* = 15,4 Hz; 1H); 7,63 (d; *J* = 15,4 Hz; 1H); 7,20 (s; 2H); 7,09 (d; *J* = 9,0 Hz; 2H); 3,86 (s; 6H); 3,71 (s; 3H); 3,59 (t; *J* = 5,4 Hz; 4H); 3,24 (t; *J* = 5,4 Hz; 4H).

RMN ¹³C (101 MHz, DMSO-d₆) δ ppm: 186,7; 153,1; 153,0; 143,0; 139,5; 130,6; 130,5; 128,3; 121,4; 113,9; 106,4; 60,1; 56,2; 44,0; 42,5.

4-(4-acetilfenil)piperazina-1-carboxilato de *terc*-butilo 5.11

A um balão de fundo redondo contendo a 4'-(piperazin-1-il)acetofenona (2 g, 9,8 mmol), DMAP (0,238 g, 1,96 mmol) e dicarbonato de di-*terc*-butilo (6,42 g, 29,4 mmol), adicionou-se acetonitrilo (10 mL). A mistura foi deixada em agitação vigorosa à temperatura de 30 °C durante 24h. Após o término da reação, evaporou-se o solvente a pressão reduzida, e redissolveu-se o produto em éter etílico. A fase orgânica foi lavada com uma solução de 1 M de bissulfato de sódio (3x100 mL), com uma solução de 1 M de bicarbonato de sódio (3x100 mL) e com uma solução saturada de hidróxido de sódio (1x100 mL). Por último secou-se com sulfato de sódio anidro, filtrou-se e evaporou-se o solvente.

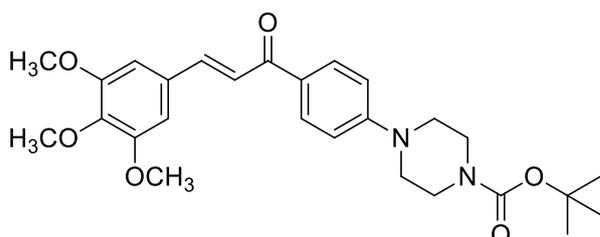


Rendimento: 83% (2,49 g).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm: 7,86 (d; *J* = 8,9 Hz; 2H); 6,85 (d; *J* = 9,0 Hz; 2H); 3,69-3,49 (m; 4H); 3,39-3,18 (m; 4H); 2,50 (s; 3H); 1,49 (s; 9H).

RMN ¹³C (101 MHz, CDCl₃) δ ppm: 196,0; 154,3; 153,1; 130,1; 127,7; 113,5; 79,8; 47,0; 42,9; 28,2; 25,9.

(E)-4-(4-(3-(3,4,5-trimetoxifenil)acrilóil)fenil)piperazina-1-carboxilato de *terc*-butilo
5.12



Rendimento: 93,6% (0,452 g).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 8,00 (d; *J* = 8,9 Hz; 2H); 7,70 (d; *J* = 15,5 Hz; 1H); 7,42 (d; *J* = 15,5 Hz; 1H); 6,92 (d; *J* = 9,0 Hz; 2H); 6,86 (s; 2H); 3,92 (s; 6H); 3,89 (s; 3H); 3,61-3,59 (m; 4H); 3,37-3,35 (m; 4H); 1,49 (s; 9H).

RMN ¹³C (101 MHz, CDCl₃) δ ppm: 188,2; 154,8; 154,1; 153,6; 143,6; 140,3; 130,9; 130,8; 128,9; 121,5; 114,0; 105,7; 80,3; 61,1; 56,4; 47,5; 43,2; 28,6.

6.5.2- Cálculos de métricas relacionadas com a sustentabilidade

A) Factor-E

Factor-E = (0,12 (acetofenona) + 0,11 (benzaldeído) + 0,006 (KOH) + 0,786 (etanol)) – 0,19 (chalcona))/ 0,19 (chalcona) = 4,2

Dados para o cálculo do factor-E

Ref	Acetofenona	Benzaldeído	KOH	Etanol	Água	Chalcona	Factor-E
22	0,12	0,11	0,5	3,9	1	0,19	28,3
23	5,89	5,20	0,1	67,1	15	8,67	9,8
24	3,60	3,20	2,0	59,2	10	4,83	15,1
25	5,66	5,00	7,0	39,4	50	6,27	16,1
26	0,12	0,11	0,2	7,9	1	0,19	47,1
27	1,20	1,06	4,0	27,7	10	1,33	29,0
28	1,20	1,06	1 gota	157,8	--	1,24	127,2

B) EcoScale

Considerando:

Benzaldeído (1 L, 35,60 €); Acetofenona (1 L, 40,80 €), KOH (1 Kg, 38 €) e Etanol (1 L, 16 €), adquiridos na Sigma-Aldrich

Benzaldeído: Prejudicial; Acetofenona: potencialmente perigoso; KOH: Corrosivo; Etanol: Altamente inflamável

Tabela 6.1- Pontos de penalização do cálculo do EcoScale para o método desenvolvido

Parâmetro	Pontos de Penalização
1 Rendimento (100 – rendimento %)/2	4
2 Preço dos componentes da reação (para obter 10 mmol de produto final)	3
3 Segurança	20
4 Configuração técnica	0
5 Temperatura/tempo	0
6 Etapas de purificação	1
Total (100 - pontos de penalização)	72

6.5.3- Atividade *in vitro* na fase hepática do *Plasmodium berghei*

Cultura de células

As células Huh-7, uma linha celular de hepatócitos humanos, foram cultivadas em RPMI 1640 (do inglês, *Roswell Park Memorial Institute*), suplementado com 10% v/v de soro fetal bovino, 1% v/v de aminoácidos não essenciais, 1% v/v de penicilina/estreptomicina, 1% v/v de glutamina e 10 mM de tampão HEPES (ácido *N*-(2-hidroxietil)piperazina-*N'*-2-etanossulfônico), a pH 7 e mantidas em atmosfera humidificada a 37 °C na presença de 5% de CO₂.

Inibição da infecção de *Plasmodium berghei* na fase hepática

A inibição da infecção na fase hepática foi avaliada usando um protocolo baseado na medição da bioluminescência de lisados de células Huh-7 48 horas após infecção com linhas de *P. berghei* geneticamente modificadas para expressar luciferase (*PbLuc*), desenvolvido no Prudêncio Lab.²⁹ Primeiramente, as células foram plaqueadas (placas de 96 poços) com uma concentração de 12x10³ células por poço, no dia antes do tratamento com os fármacos e da infecção. Soluções *stock* dos compostos em DMSO são preparadas e diluídas com meio de acordo com as concentrações de teste. O meio de cultura é substituído por meio contendo os compostos nas concentrações desejadas, 1 hora antes da infecção. Como controlo, utilizou-se DMSO numa quantidade equivalente à presente na concentração mais elevada dos compostos testados. Esporozoítos (10,000

spz por poço), obtidos no momento através da disrupção das glândulas salivares de mosquitos *Anopheles* fêmea infetados, foram acrescentados aos poços 1 hora após a adição dos compostos, seguido de centrifugação (1700 g, 5 min) e incubação por 48 horas a 37 °C na presença de 5% de CO₂. Após este tempo, os níveis de infecção são medidos usando um *kit* de ensaio da luciferase e o efeito dos compostos na viabilidade das células Huh-7 usando o ensaio de Alamar Blue, seguindo os protocolos disponibilizados pelos fornecedores (explicitados abaixo). O tratamento dos dados referentes às curvas de dose-resposta foi efetuado usando o GraphPad Prism 8, e os valores de IC₅₀ determinados mediante a análise da regressão não linear obtida.

Protocolos disponibilizados pelos fornecedores

A) Verificação da confluência- Alamar Blue

1. Descongelar as alíquotas de Alamar-blue
2. Fazer uma diluição de 1:20 em RPMI
3. Adicionar 80 µl/poço da solução e incubar a 37 °C por 1h 30 minutos
4. Ler a fluorescência usando o leitor de placas. Software: *tecan i control*.

(comprimento de onda de excitação: 530 nm e de emissão 590 nm)

B) Verificação da infecção- ensaio da luciferase

1. Descongelar o FLAB (guardado a -80 °C)
2. Diluir o regente de lise celular 5 x em água milliQ, de modo, a preparar o tampão de lise
3. Lavar as células com PBS (100 µl/poço), remover este cuidadosamente
4. Adicionar 70 µL do tampão de lise/poço (com multicanal automática para garantir precisão)
5. Agitar durante 15 minutos a 600 rpm
6. Centrifugar por 5 minutos a 3000 rpm para permitir o depósito de todos os detritos
7. Pipetar 30 µL do sobrenadante para uma placa de 96 poços
8. Preparar a solução de luciferina (diluir 1:50 em FLAB)
9. Ir para o leitor de placas. Software: *tecan i control*. (tempo de integração 100 ms)

10. Preparar a placa e adicionar rapidamente 50 μL /poço da solução de luciferina
(com multicanal automática para garantir precisão)
11. Ler a luminescência.

6.6- Referências

1. Burrows, H. D.; Pereira, M. M., *Química: Síntese e Estrutura - uma abordagem prática*. Escolar Editora: 2006.
2. Silva, M.; Fernandes, A.; Bebian, S. S.; Calvete, M. J. F.; Ribeiro, M. F.; Burrows, H. D.; Pereira, M. M., Size and ability do matter! Influence of acidity and pore size on the synthesis of hindered halogenated meso-phenyl porphyrins catalysed by porous solid oxides. *Chem. Commun.* **2014**, 50 (50), 6571-6573.
3. Grancho, J. C. P.; Pereira, M. M.; Miguel, M. d. G.; Gonsalves, A. M. R.; Burrows, H. D., Synthesis, Spectra and Photophysics of some Free Base Tetrafluoroalkyl and Tetrafluoroaryl Porphyrins with Potential Applications in Imaging. *Photochem. Photobiol.* **2002**, 75 (3), 249-256.
4. Tjahjono, D. H.; Akutsu, T.; Yoshioka, N.; Inoue, H., Cationic porphyrins bearing diazolium rings: synthesis and their interaction with calf thymus DNA. *BBA- Gen Subjects* **1999**, 1472 (1), 333-343.
5. Maximiano, R. V.; Piovesan, E.; Zílio, S. C.; Machado, A. E. H.; de Paula, R.; Cavaleiro, J. A. S.; Borissevitch, I. E.; Ito, A. S.; Gonçalves, P. J.; Barbosa Neto, N. M., Excited-state absorption investigation of a cationic porphyrin derivative. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **2010**, 214 (2), 115-120.
6. Machado, A. E. H.; Gomes, W. R.; Araújo, D. M. S.; Miglio, H. S.; Ueno, L. T.; Paula, R. D.; Cavaleiro, J. A. S.; Neto, N. M. B., Synthesis and Spectroscopic Characterization of Two Tetrasubstituted Cationic Porphyrin Derivatives. *Molecules* **2011**, 16 (7), 5807-5821.
7. Aroso, R. T.; Calvete, M. J. F.; Pucelik, B.; Dubin, G.; Arnaut, L. G.; Pereira, M. M.; Dąbrowski, J. M., Photoinactivation of microorganisms with sub-micromolar concentrations of imidazolium metallophthalocyanine salts. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, 184, 111740.
8. Parker, C. A.; Rees, W. T., Correction of fluorescence spectra and measurement of fluorescence quantum efficiency. *Analyst* **1960**, 85 (1013), 587-600.
9. Pineiro, M.; Carvalho, A. L.; Pereira, M. M.; Gonsalves, A. M. d. A. R.; Arnaut, L. G.; Formosinho, S. J., Photoacoustic measurements of porphyrin triplet-state quantum yields and singlet-oxygen efficiencies. *Chem. Eur. J.* **1998**, 4, 2299-2307.
10. Rurack, K.; Spieles, M., Fluorescence Quantum Yields of a Series of Red and Near-Infrared Dyes Emitting at 600–1000 nm. *Anal. Chem.* **2011**, 83 (4), 1232-1242.
11. Schmidt, R.; Tanielian, C.; Dunsbach, R.; Wolff, C., Phenalenone, a universal reference compounds for the determination of quantum yields of singlet oxygen. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **1994**, 79, 11-17.
12. Da Silva, G. J.; Quinteira, S.; Bértolo, E.; Sousa, J. C.; Gallego, L. D., A.; Peixe, L., Long-term dissemination of an OXA-40 carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* clone in the Iberian Peninsula. *J. Antimicrob. Chemother.* **2004**, 54, 255-258.
13. da Costa, A. P.; Viciano, M.; Sanaú, M.; Merino, S.; Tejeda, J.; Peris, E.; Royo, B., First Cp*-Functionalized N-Heterocyclic Carbene and Its Coordination to Iridium. Study of the Catalytic Properties. *Organometallics* **2008**, 27 (6), 1305-1309.
14. Cardoso, J. M. S.; Lopes, R.; Royo, B., Dehydrogenative silylation of alcohols catalysed by half-sandwich iron N-heterocyclic carbene complexes. *J. Organomet. Chem.* **2015**, 775 (Supplement C), 173-177.
15. Kandepi, V. V. K. M.; Cardoso, J. M. S.; Peris, E.; Royo, B., Iron(II) Complexes Bearing Chelating Cyclopentadienyl-N-Heterocyclic Carbene Ligands as Catalysts for Hydrosilylation and Hydrogen Transfer Reactions. *Organometallics* **2010**, 29 (12), 2777-2782.
16. Montes-Avila, J.; Díaz-Camacho, S. P.; Sicairos-Félix, J.; Delgado-Vargas, F.; Rivero, I. A., Solution-phase parallel synthesis of substituted chalcones and their antiparasitary activity against *Giardia lamblia*. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, 17 (18), 6780-6785.

17. Romanelli, G.; Pasquale, G.; Sathicq, Á.; Thomas, H.; Autino, J.; Vázquez, P., Synthesis of chalcones catalyzed by aminopropylated silica sol–gel under solvent-free conditions. *J. Mol. Catal. A-Chem.* **2011**, *340* (1), 24-32.
18. Bhatia, R.; Kadyan, K.; Duhan, M.; Devi, M.; Singh, R.; Kamboj, R. C.; Kumar, P., A Serendipitous Synthesis: SiO₂-HNO₃ Mediated Oxidative Aromatization and Regioselective Nitration of 1,3,5-Trisubstituted-4,5-Dihydro-1H-Pyrazoles. *ChemistrySelect* **2019**, *4* (35), 10417-10424.
19. Gómez-Rivera, A.; Aguilar-Mariscal, H.; Romero-Ceronio, N.; Roa-de la Fuente, L. F.; Lobato-García, C. E., Synthesis and anti-inflammatory activity of three nitro chalcones. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23* (20), 5519-5522.
20. Arulkumaran, R.; Sundararajan, R.; Vijayakumar, S.; Sakthinathan, S. P.; Suresh, R.; Kamalakkannan, D.; Ranganathan, K.; Vanangamudi, G.; Thirunarayanan, G., Solvent free synthesis, spectral correlation and antimicrobial activities of some 2E 4'-nitrochalcones. *J. Saudi Chem. Soc.* **2016**, *20*, S122-S131.
21. Rambabu, R.; Prasad, Y.; Atlas, S., Synthesis of New 4'-amino chalcones and their anti-inflammatory and antimicrobial activity. *Asian J. Chem.* **2009**, *21* (2), 907-914.
22. Tee, J. T.; Chee, C. F.; Buckle, M. J. C.; Lee, V. S.; Chong, W. L.; Khaledi, H.; Rahman, N. A., Model studies on construction of the oxabicyclic [3.3.1] core of the mulberry Diels–Alder adducts morusalbanol A and 441772-64-1. *Tetrahedron Lett.* **2015**, *56* (36), 5082-5085.
23. Amin, A. N.; El-Khouly, M. E.; Subbaiyan, N. K.; Zandler, M. E.; Fukuzumi, S.; D'Souza, F., A novel BF₂-chelated azadipyrrromethene–fullerene dyad: synthesis, electrochemistry and photodynamics. *Chem. Commun.* **2012**, *48* (2), 206-208.
24. Azouz, M.; Lammara, K.; Benallia, M.; Guenane, H., Synthesis of New Pyrazoline-Nucleoside Analogue Derivatives. *Nucleos. Nucleot. Nucl.* **2013**, *32* (6), 294-305.
25. Ganesan, P.; Ranganathan, R.; Chi, Y.; Liu, X.-K.; Lee, C.-S.; Liu, S.-H.; Lee, G.-H.; Lin, T.-C.; Chen, Y.-T.; Chou, P.-T., Functional Pyrimidine-Based Thermally Activated Delay Fluorescence Emitters: Photophysics, Mechanochromism, and Fabrication of Organic Light-Emitting Diodes. *Chem. Eur. J.* **2017**, *23* (12), 2858-2866.
26. Xie, Z.; Luo, X.; Zou, Z.; Zhang, X.; Huang, F.; Li, R.; Liao, S.; Liu, Y., Synthesis and evaluation of hydroxychalcones as multifunctional non-purine xanthine oxidase inhibitors for the treatment of hyperuricemia. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2017**, *27* (15), 3602-3606.
27. Quazi, I.; Sastry, V. G.; Ansari, J. A., Synthesis and antimicrobial activity of indole derivative bearing the pyrazole moiety. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* **2017**, *8* (3), 1145-1152.
28. Harathi, P.; Rajendra Prasad, V. V. S.; Satyavati, D.; Subramanian, S.; Boya, V.; Gali, P., Synthesis, characterization and anti-inflammatory activity of novel pyrazole derivatives. *Asian J. Pharm. Clin. Res.* **2015**, *8* (5), 83-87.
29. Azevedo, R.; Markovic, M.; Machado, M.; Franke-Fayard, B.; Mendes, A. M.; Prudêncio, M., Bioluminescence Method for In Vitro Screening of Plasmodium Transmission-Blocking Compounds. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2017**, *61* (6), 1-12.