

Arona Figueroa Pires

**Porfirinas Artificiais como  
Modelos da Hemoglobina para  
Estudos em Análises Forenses**

Mestrado em Química Forense

Departamento de Química

FCTUC

Julho de 2013



UNIVERSIDADE DE COIMBRA



Arona Figueroa Pires

# **Porfirinas Artificiais como Modelos da Hemoglobina para estudos em análises forenses**

**Dissertação apresentada para provas de Mestrado em Química Forense**

**Orientação : Prof. Dr. Abílio J. F. N. Sobral**

Julho de 2013

Universidade de Coimbra



# Agradecimentos

O percurso por mim efetuado ao longo deste ano não seria possível se não fosse a presença de determinadas pessoas que, de uma maneira ou de outra me apoiaram, deram força e acima de tudo confiança para seguir em frente e lutar pelos meus objetivos.

Em primeiro lugar gostaria de agradecer ao meu orientador Prof. Doutor Abílio J. F. N. Sobral pela disponibilidade, apoio incondicional e científico e acima de tudo confiança que me transmitiu e que me ajudou de forma decisiva a ultrapassar todos os obstáculos que ao longo da minha carreira científica foram surgindo.

Gostaria também de agradecer as minhas colegas de laboratório, Joana Silva, Cláudia Arranja, Letícia Costa e a Mariana Marcos, pela ajuda, dedicação, amizade e sobretudo por tudo que me ensinaram durante este ano letivo.

Aos meus colegas de laboratório, Mariana, Bruno, Daniel, Heitor, Avula, e Carlos pela boa disposição e companheirismo.

Agradeço à FCT/QREN/COMPETE o apoio financeiro através dos Projetos PTDC/AAC-CLI/098308/2008 e PTDC/AAC-CLI/118092/2010.

Gostaria de agradecer em especial, aos meus grandes amigos, Bruno Maneca, Ângela Neves, pois com a ajuda deles e a grande amizade a minha vida foi mais fácil.

Aos meus outros amigos, Tiago Maricoto, Sónia, Nuno Samelo, Jaime Samelo, Ruizinho, Rita Figueiredo, Miguel Conceição, e Jorge, por todos os bons momentos que passamos e continuaremos a passar bem como a amizade.

E, acima de tudo, quero agradecer à minha Mãe, e ao meu Pai que apesar de não estar presente, infelizmente, a quem dedico esta tese, pelo apoio incondicional durante todas as etapas da minha vida, amizade e nunca duvidaram de mim. A minha irmã que sempre me apoiou e pelos bons momentos que passamos juntas.

Ao Cláudio, por ser a pessoa especial e única que é, por me chamar à razão quando necessário, pelo carinho, por estar sempre ao meu lado em todos os momentos e me ajudar a ultrapassar todos os obstáculos que ao longo destes anos foram surgindo.



# Índice

Resumo	iii
Abstract	v
Abreviaturas	vi
Nomenclatura das porfirinas	ix

## Capítulo 1- Introdução

1.1) Ciências forenses	5
1.2) O sangue	5
1.3) Sangue artificial	6
1.4) A hemoglobina	6
1.5) Porphirinas	7
1.6) Porphirinas de ferro	12
1.7) Dímeros de porfirinas	12
1.8) Aplicações das porfirinas	13
1.9) Técnicas para análise de porfirinas	14
1.9.1) Espectroscopia de ultravioleta/visível	14
1.9.2) Cromatografia Líquida de alta Eficiência	16
1.9.3) Espectrometria de massa	19
1.10) Bibliometria	22

## Capítulo 2- Materiais e Métodos

2.1) Descrição dos reagentes, solventes e instrumentação	27
--	----

2.2) Síntese da 5,10,15,20- <i>meso</i> - tetra – fenil-21 <i>H</i> , 22 <i>H</i> –porfirina (TPP)	28
2.3) Síntese da 5,10,15,20- <i>meso</i> -tetra (4-carboxi-fenil)-21 <i>H</i> , 22 <i>H</i> - porfirina (TcPP)	29
2.4) Síntese da 5-(4-carboxi-fenil)-10,15,20- <i>meso</i> -trifenil-21 <i>H</i> , 22 <i>H</i> -porfirina (MF)	30
2.5) Síntese da 5-(4-clorocarbonil-fenil)- 10,15,20- <i>meso</i> - trifenil-21 <i>H</i> , 22 <i>H</i> - porfirina, (MF-COCl)	32
2.6) Síntese da bis ( <i>meso</i> -tetraquis-5,10,15-trifenil-20-( <i>p</i> -carboxifenil)-porfirinil) -1,6- hexanodiamida,	33
2.7) Síntese da 5,10,15,20- <i>meso</i> -tetra-fenil-ferro(II)-porfirina (TPP-Fe(II))	34

## Capítulo 3 – Resultados e discussão

3.1) Discussão da síntese da 5,10,15,20- <i>meso</i> -tetra –fenil-21 <i>H</i> , 22 <i>H</i> -porfirina(TPP)	38
3.2) Discussão da síntese da 5,10,15,20- <i>meso</i> -tetra (4-carboxi-fenil)-21 <i>H</i> , 22 <i>H</i> - porfirina (TcPP)	43
3.3) Discussão da síntese da 5-(4-carboxi-fenil)-10,15,20- <i>meso</i> -trifenil- 21 <i>H</i> , 22 <i>H</i> - porfirina (MF)	47
3.4) Discussão da síntese da 5-(4-clorocarbonil-fenil)-10,15,20- <i>meso</i> -trifenil-21 <i>H</i> , 22 <i>H</i> -porfirina (MF-COCl)	54
3.5) Discussão da síntese da bis ( <i>meso</i> -tetraquis-5,10,15-trifenil-20-( <i>p</i> -carboxifenil)- porfirinil) -1,6-hexanodiamida,	57
3.6) Discussão da síntese da 5,10,15,20- <i>meso</i> -tetra-fenil-ferro(II)- porfirina (TPP- Fe(II))	62
3.7) Modelação computacional da bis ( <i>meso</i> -tetraquis-5,10,15-trifenil-20-( <i>p</i> - carboxifenil)-porfirinil) -1,6-hexanodiamida, coordenado com ferro (II)	65

## Capítulo 4- Conclusão

Conclusão	71
-----------	----

<b>Referências</b>	<b>73</b>
--------------------	-----------



# Resumo

A Ciência Forense é uma ciência que é composta por um conjunto de componentes ou áreas diversas como, por exemplo, Antropologia, Criminologia, Entomologia, Odontologia, Patologia e Psicologia que, em conjunto, atuam de modo a resolver casos de carácter legal. É utilizada na análise de vestígios biológicos e não biológicos, principalmente em crimes violentos, na análise da balística, na análise de falsificações tanto de documentos como de obras de arte, na análise de testes genéticos, papiloscopia, toxicologia e entomologia.

A descoberta de novos métodos ou moléculas, através da química, permitem ajudar na análise desses vestígios biológicos ou não biológicos.

Em Química Forense o sangue é um dos principais fluidos biológicos para obtenção de provas, o que mostra a sua grande importância nos dias de hoje. Devido à escassez do sangue em tratamentos médicos foi necessário desenvolver novas estruturas, nomeadamente perfluorocarbonos (PFCs) e os derivados de hemoglobina (hemes artificiais), que desempenham as funções do sangue natural. O aparecimento deste sangue artificial traduz-se em mais um desafio para os químicos forenses no que respeita à sua deteção e análise.

Estas novas estruturas levantam sérios problemas, uma vez que podem vir contaminadas, pois são extraídas de hemoglobinas de animais, e também por serem insolúveis em água.

Assim é necessário prosseguir com o estudo e desenvolvimento de estruturas para substituir o sangue natural e criar materiais fluidos para o transporte de oxigénio.

Sendo a hemoglobina uma proteína com quatro grupos prostéticos que possui complexos de ferro de hemoporfirinas, o estudo da complexação do ferro nas porfirinas é sem dúvida um tema importante em Química Forense e foi por isso escolhido para este trabalho.

A monofuncionalização da *meso*-tetra-fenil-porfirina por meio de introdução de um grupo carboxílico na posição *meso* confere a possibilidade de se ancorar uma amida que permite a ligação a suportes funcionalizados.

Por outro lado, a estrutura dimérica flexível, bis (*meso*-tetraquis-5,10,15-trifenil-20-(*p*-carboxifenil)-porfirinil) -1,6-hexanodiamida, faz com que seja possível incorporar iões de ferro no centro para mimetizar funções da hemoglobina natural, sendo então um bom candidato para o sangue artificial, no sentido em que a hemoglobina natural também tem vários grupos com iões ferro ligados e a cooperar entre si. Isto é, o dímero é um modelo simples da hemoglobina natural.

Neste trabalho, descreve-se a síntese, e caracterização da porfirina dimérica flexível, bis (*meso*-tetraquis-5,10,15-trifenil-20-(*p*-carboxifenil)-porfirinil)- 1,6 hexanodiamida e dos seus precursores. Para além disso, fizemos estudos computacionais da incorporação do ferro, devido à importância que os modelos de dímeros ou outras estruturas supramoleculares de porfirinas podem vir a ter na área do sangue artificial, e consequentemente em Química Forense.

# Abstract

The Forensic Science is a science that comprises a series of components or different areas, *e.g.*, Anthropology, Criminology, Entomology, Dentistry, Pathology and Psychology, which together act in order to solve cases of legal nature. It is used in the analysis of biological and non-biological traces, especially in violent crimes, in the analysis of ballistics, forgeries of documents and works of art, in the analysis of genetic testing, papiloscopia, toxicology and entomology.

The blood in forensic, is a major biological fluid used in the search for evidences. The availability of blood for medical treatments has always been a problem for science. Artificial blood today is based on solutions of perfluorocarbons (PFCs) or hemoglobin derivatives (artificial hemes). These structures are based in fluorinated molecules and carbon (PFC) and also sterilized natural hemoglobin. But these structures pose serious problems, the most notable being the insolubility in water, and contamination due to the use of natural hemoglobin from animal sources. Thus it, is necessary to proceed with the study and development of structures to replace the natural blood, and create fluid biomaterials for efficient oxygen transport.

Monofunctionalisation of *meso*-tetra-phenil-porphyrin through the introduction of a carboxylic group in one *meso* position, confers the possibility to anchor a stable amide to functionalized support molecules. With this flexible dimeric structure, bis-(*meso*-tetrakis-5,10,15-triphenyl-20-(*p*-carboxyphenyl)-porphyrinyl)-1,6-hexanediamide, it is possible to embed iron in the center and thereby mimic the functions of natural hemoglobin making this structure a good candidate for artificial blood.

In this work we describe the synthesis, and characterization of a functionalized flexible dimeric porphyrin, bis-(*meso*-tetrakis-5,10,15-triphenyl-20-(*p*-carboxyphenyl)-porphyrinyl)-1,6 hexanediamide. Moreover, computer simulations were made to evaluate the effect of the introduction of Fe (II) in the porphyrin dimer synthesized by us, due the importance that the models of dimers or other supramolecular porphyrins may have on the area of artificial blood, and consequently in Forensic Chemistry.

# Abreviaturas

**IUPAC**- Internacional Union of Pure and Applied Chemistry

**HPLC**- Cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês *High Performance Liquid Chromatography*)

**MS**- Espectrometria de massa

**HPLC-MS**- Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massa

**THF**-Tetrahidrofurano

**TLC**-Cromatografia de Camada Fina (do inglês *thin layer chromatography*)

**HPLC-DAD** - Cromatografia líquida de alta resolução com detecção por fotodíodos (do inglês *High Performance Liquid Chromatography with diode array detection*)

**RMN** - Ressonância magnética nuclear

**RMN <sup>1</sup>H**- Ressonância magnética nuclear do próton

**UV** - Ultravioleta

**UV/VIS** - Ultravioleta/visível (UV/Vis)

**TFA** - Ácido trifluoroacético

**HOMO**- Orbital molecular ocupada de maior energia (do inglês “*Highest Occupied Molecular Orbital*”)

**LUMO**-Orbital molecular desocupada de menor energia (do inglês “*Lowest Unoccupied Molecular Orbital*”)

**m/z** – Relação massa/ carga

**δ**- Desvio químico em relação ao tetrametilsilano (em ppm)

**ESI**- ionização por eletrospray (do inglês *Electrospray Ionization*)

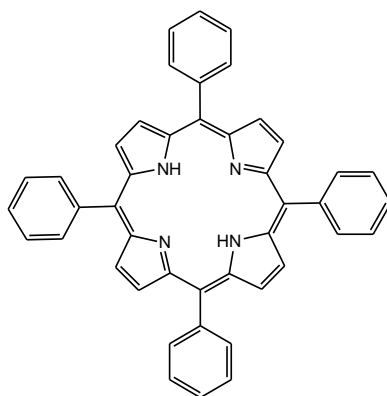
**TMS** – Tetrametilsilano

**[M<sup>+</sup>]** -Ião molecular

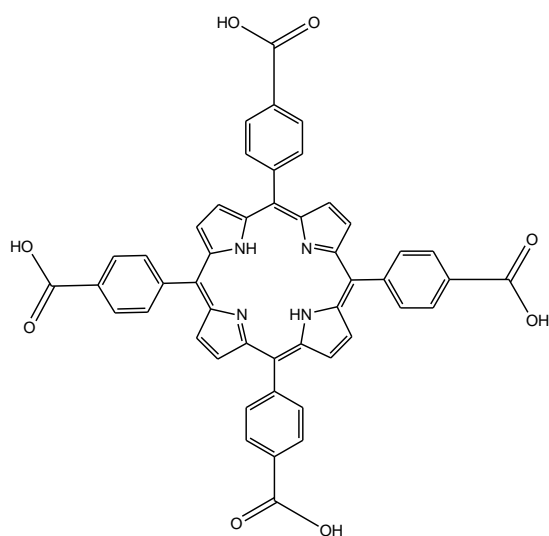
**ppm** -Partes por milhão

**DFT**-Teoria dos Funcionais de Densidade (do inglês “*Density Functional Theory*”)

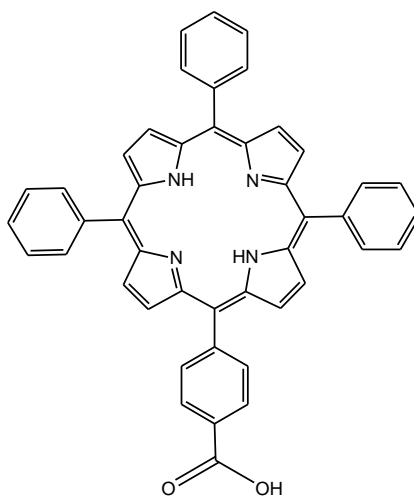
**TPP-** 5,10,15,20-*meso*-tetra-fenil-21*H*, 22*H*-porfirina



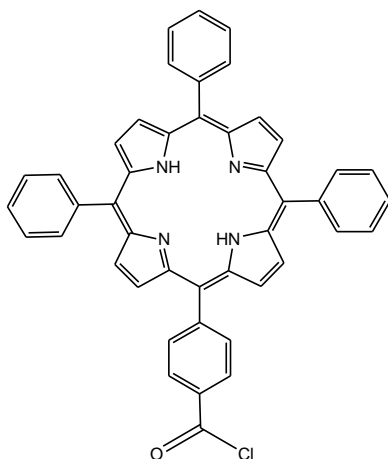
**TcPP-** 5,10,15,20-*meso*-tetra-(4-carboxi-fenil)-21*H*, 22*H*-porfirina



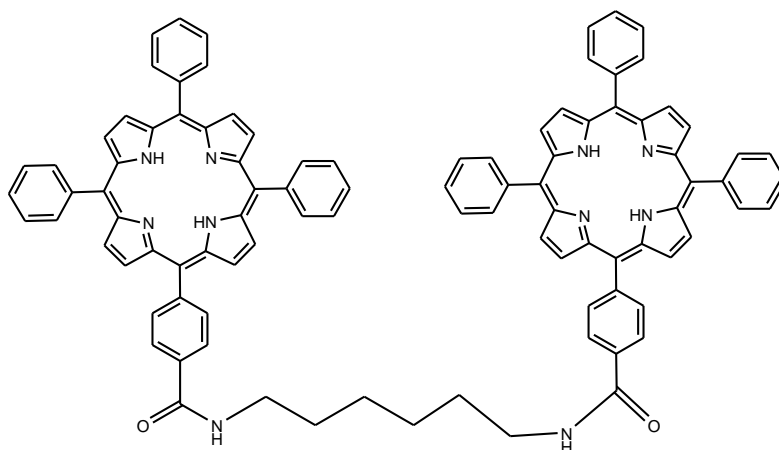
**MF-** Porfirina monofuncionalizada, 5-(4-carboxi-fenil)-10,15,20- *meso*-trifenil-21*H*, 22*H*-porfirina



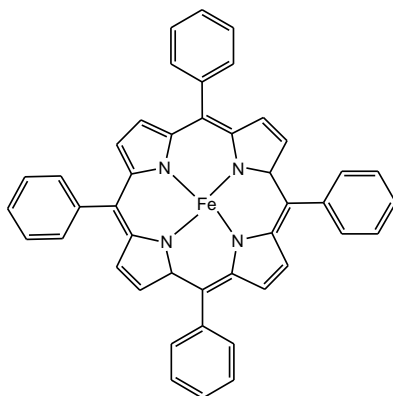
**MF-COCl**- 5-(4-clorocarbonil-fenil)-10,15,20-*meso*- trifenil-21*H*, 22*H*-porfirina



**Dímero-bis(meso-tetraquis-5,10,15-trifenil-20-(p-carboxifenil)-porfirinil)-1,6-hexanodiamida,**

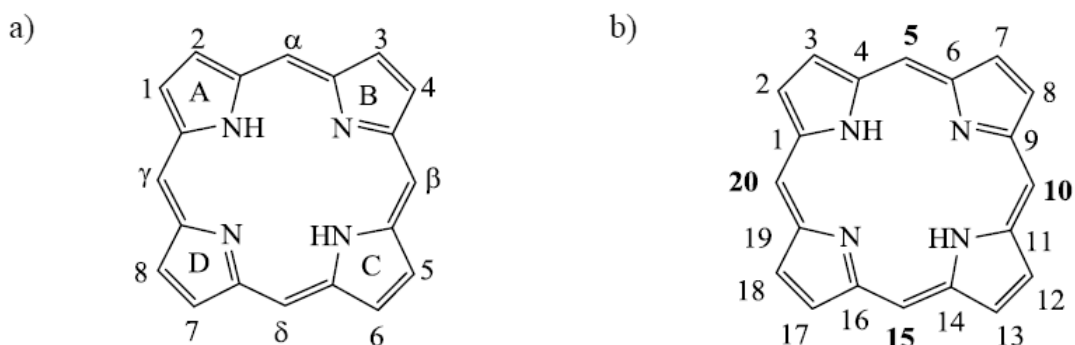


**TPP Fe (II)**- 5,10,15,20 -*meso*- tetra-fenil-ferro(II)-porfirina (TPP-Fe(II))



# Nomenclatura das porfirinas

Atualmente existem dois sistemas de nomenclatura que podem ser utilizados para classificação dos macrociclos tetrapirrólicos: a nomenclatura de Fischer e a nomenclatura IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*). Fischer atribuiu ao macrociclo tetrapirrólico conjugado com a estrutura a) o nome de porfirina e designou as posições periféricas por posições  $\beta$  e as pontes metileno interpirrólicas por posições *meso*.



De acordo com este autor, as posições  $\beta$  pirrólicas são numeradas de 1 a 8, as posições *meso* designadas pelas letras gregas  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  e os anéis pirrólicos denominados de A, B, C e D. Por outro lado, de acordo com as recomendações da IUPAC [i] para macrociclos tetrapirrólicos, todos os carbonos são numerados de 1 a 20 e os azotos pirrólicos de 21 a 24, cujas recomendações foram aqui seguidas.

[i] Tomé A., *Introdução a Nomenclatura de Compostos Orgânicos*, 2010, Escolar Editora, Portugal





# Capítulo 1



# 1) Introdução

## 1.1) Ciências forenses

A palavra, *forense*, vem do latim (significa "antes do fórum") e refere-se a algo "relativo a, ou utilizado num tribunal de direito." Nos dias de hoje, refere-se quase sempre a um método de obtenção de provas criminais para fins de utilização de um juiz de direito [1].

A Ciência Forense é uma ciência que é composta por um conjunto de componentes ou áreas diversas como, por exemplo, Antropologia [2], Criminologia [3], Patologia [4] e Psicologia [5] que em conjunto, atuam de modo a resolver casos de carácter legal.

É utilizada na análise de vestígios biológicos e não biológicos, principalmente em crimes violentos, na análise da balística, na análise de falsificações tanto de documentos como de obras de arte, na análise de testes de genéticos, papiloscopia, toxicologia e entomologia [1,6].

Foi no início do século XX, que Landsteiner, descobriu os primeiros grupos sanguíneos ABO. Só na década de 20, foi estabelecida a Lei de *Locard* cujo princípio referia que "todo o contato deixa um rasto", sendo a partir deste momento essencial a averiguação de todas as provas no local do crime, mesmo que aparentemente insignificantes. Até à década de 20, o exame forense de amostras biológicas, como o sangue, para identificação pessoal, passou a ser consensual e baseava-se essencialmente na determinação dos grupos sanguíneos.

## 1.2) O sangue

No século XVII, os anatomistas, com a ajuda do microscópio, conseguiram demonstrar que o sangue é um tecido, constituído por uma parte fluida, o plasma, e por várias partículas extremamente pequenas, os corpúsculos.

A partir dessa descoberta, tornou-se tarefa de químicos e fisiologistas identificar e caracterizar esses componentes e a suas funções nos processos vitais [7].

O sangue constitui por cerca de 8% da massa corporal humana, sendo este descrito como uma mistura de vários componentes, dentre eles destacam-se as células, proteínas, substâncias inorgânicas (sais) e água.

Cerca de 55% (em volume) do sangue é o que denominamos plasma, sendo este constituído por água (aproximadamente 92%), sais dissolvidos e algumas proteínas como a albumina. Os restantes 45% são compostos por células sanguíneas, como os glóbulos vermelhos, brancos, plaquetas, etc [8].

O sangue tem inúmeras funções. Entre elas podemos destacar o transporte dos gases oxigénio e dióxido de carbono pelo nosso organismo e resposta imune [8, 9].

Na Ciência Forense, o sangue é uma das amostras biológicas mais usadas para a identificação pessoal, uma vez que deste se retira o DNA, e se pode então fazer a análise e identificação do indivíduo.

### **1.3) Sangue artificial**

A disponibilidade de sangue para tratamentos médicos sempre foi um problema. Várias situações médicas e acidentes resultam em perda aguda de sangue e então há uma grande necessidade de restaurar o transporte de oxigénio para os tecidos. As transfusões de sangue têm problemas inerentes, tais como a escassez de sangue, risco de transmissão de doenças, custo e tempo exigido no rastreamento de grupos sanguíneos, juntamente com a vida curta útil quando em condições de armazenamento [10].

A busca de estruturas artificiais, estáveis, e compatíveis com todos os grupos sanguíneos requerem muito interesse a nível da Química.

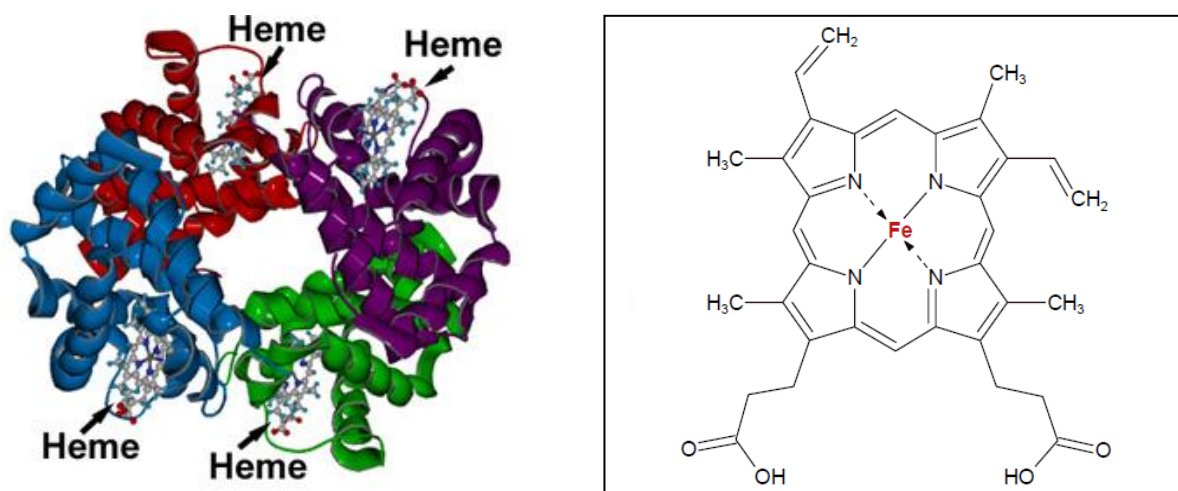
Essas estruturas artificiais, hoje em dia baseiam-se em soluções de Perfluorocarbonos, (PFCs), onde o oxigénio se dissolve, ou em derivados da hemoglobina (hemes artificiais transportadores de oxigénio em que o oxigénio está ligado).

Os PFCs são criados à base de moléculas de flúor e carbono e os hemes artificiais são criados a base de hemoglobinas naturais esterilizadas.

Mas apesar de serem considerados substitutos do sangue, ainda não se criou uma estrutura para substituir o sangue por completo, que seja estável e compatível com todos os tipos de sangue [10].

### **1.4) A Hemoglobina**

A molécula de hemoglobina (figura 1) está presente nos eritrócitos (glóbulos vermelhos). É uma molécula esférica com um diâmetro de aproximadamente 5,5 nm [11].



**Figura 1:** Representação da Hemoglobina e do seu grupo Heme.

Ao contrário da mioglobina, que também exerce um papel de transporte de oxigênio e possui apenas um grupo 'heme', a hemoglobina possui quatro grupos heme cada um associado a uma cadeia polipeptídica.

A estrutura quaternária da hemoglobina tem como características as fortes interações entre as suas subunidades diferentes. A interface  $\alpha 1\beta 1$  (a sua equivalente  $\alpha 2\beta 2$ ) envolve mais de 30 resíduos e é suficientemente forte para mantê-las ligadas. A interface  $\alpha 1\beta 2$  e a sua equivalente  $\alpha 2\beta 1$  envolvem 19 resíduos apenas. Este complexo é responsável pela fixação e transporte do oxigênio pelo sistema circulatório animal.

A ligação do complexo com o oxigênio é fraca e instável, dependendo de uma série de fatores, como pH, temperatura e pressão parcial dos gases dissolvidos no sangue [11].

### 1.5) Porfirinas

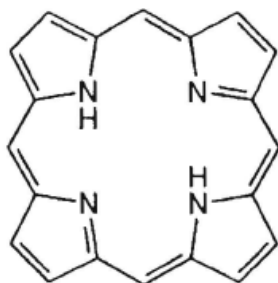
As propriedades fotoquímicas e fotofísicas únicas das porfirinas fazem com que estas sejam extremamente versáteis, uma vez que podem ser usadas em várias aplicações tanto na área da medicina, na catálise, na conversão de energia solar e também na nanotecnologia [11]. Atualmente, as porfirinas são uma classe de compostos muito estudada para a construção de estruturas supramoleculares. A presença de um sistema altamente conjugado facilita a ocorrência de interações  $\pi$ - $\pi$ . Além disso, as porfirinas possuem uma estrutura bastante versátil para efetuar reações de substituição eletrofílica, permitindo a introdução de grupos de forma a modular as respectivas propriedades físicas e químicas [12].

A palavra Porfirina teve origem na Grécia antiga, e designa pigmentos de cor intensa. Este termo por sua vez, deriva da palavra grega *porphura*, usada para descrever a cor púrpura.

Deste modo, uma das características mais importantes das porfirinas é a sua intensa cor púrpura [3].

As porfirinas são moléculas que estão presentes na natureza, como, por exemplo na clorofila e na hemoglobina. Podem também ser sintetizadas em laboratório.

Apresentam cores intensas, como descrito anteriormente, são pigmentos cristalinos e fluorescentes, tendo em comum um anel macrocíclico aromático, formado por 20 átomos de carbono e 4 átomos de nitrogénio - anel porfirínico. Este anel é constituído por 4 anéis pirrólicos ligados entre si por pontes metínicas (Figura 2).



**Figura 2:** Exemplo de um macrociclo porfirínico.

Os anéis pirrólicos, têm uma forma pentagonal, são formados por quatro átomos de carbono e um átomo de nitrogénio, e duas ligações duplas carbono-carbono. Os pirróis puros são sólidos brancos, ou então líquidos incolores. Mas apesar de serem brancos ou incolores, a conjugação entre eles é que confere a cor púrpura da porfirina [13].

Historicamente, o estudo das porfirinas teve início no Séc. XX quando Kuster em 1912, propôs a estrutura do macrociclo da porfirina. No entanto apesar de ser ele o primeiro a falar nas porfirinas, ninguém acreditou que pudessem existir estruturas com dimensões tão grandes e serem estáveis. A primeira porfirina a ser sintetizada a partir do pirrol, foi sintetizada por Hans Fischer em 1929, sendo então considerado o “pai” da química das porfirinas [13].

As porfirinas concetualmente derivam da porfina (a porfirina mais simples) por substituição nas pontes metínicas (posições *meso*) e/ou nas diversas posições livres dos anéis pirrólicos. A porfina, tem sido pouco utilizada em estudos químicos e espectroscópicos dos sistemas porfirínicos, devido ao facto de apresentar fraca solubilidade, na maior parte dos solventes e também pelo baixo rendimento da sua síntese [13]. A síntese de porfirinas meso-

substituídas a partir da reação de condensação entre pirróis e aldeídos, foi realizada por Rothemund em 1935.

O centro do macrociclo porfirínico é altamente conjugado podendo ser escritas várias estruturas de ressonância. Há 22 elétrons, mas apenas 18 podem ser incluídos na conjugação. Assim as porfirinas obedecem à lei da aromaticidade, regra de Huckel ( $4n+2$ ) onde  $n=4$ .

A intensidade, posição e número de bandas do espectro de UV/Vis é influenciada tanto pelos substituintes do anel como pelo íon metálico que possuem. Desta forma, a complexação do anel geralmente aumenta a intensidade da banda Soret e reduz o número de bandas Q para duas. Os substituintes aceitadores de elétrons também influenciam a posição das bandas, deslocando-as para maiores comprimentos de onda [14].

As porfirinas são moléculas cujo o ponto de fusão se situa entre os 200°C e 300°C, embora algumas fundam a temperaturas inferiores a 200°C [14].

Através de cristalografia de raios-x, vê-se a estrutura da porfirina como sendo então um macrociclo de grande dimensão, mas também é possível ver a sua planaridade. Contudo, a complexação com metais faz com que estas sofram distorção na sua planaridade. Estas distorções também podem acontecer quando há protonação de dois nitrogénios centrais [13].

A presença de um metal no centro porfirínico, afeta as suas características, devido ao facto de haver um rearranjo de orbitais moleculares, o que provoca uma mudança de simetria do anel da porfirina [13].

Os espectros de absorção de porfirinas são relativamente complexos e têm sido alvo de diversas interpretações levadas a cabo por diferentes autores [15, 16]. No entanto o modelo teórico proposto por *Gouterman* [17] em 1961, tem prevalecido até hoje, uma vez que interpreta de forma relativamente simples as propriedades espectroscópicas dos macrociclos tetrapirrólicos. Genericamente, o espectro de UV/vis de uma porfirina de base livre é caracterizado pela existência de uma banda com um coeficiente de extinção molar elevado, entre os 400-500 nm, e quatro bandas localizadas entre os 500-750nm. De acordo com *Platt* [18], as bandas de menor intensidade são designadas por bandas Q e a de maior intensidade denominada por banda B ou Soret.

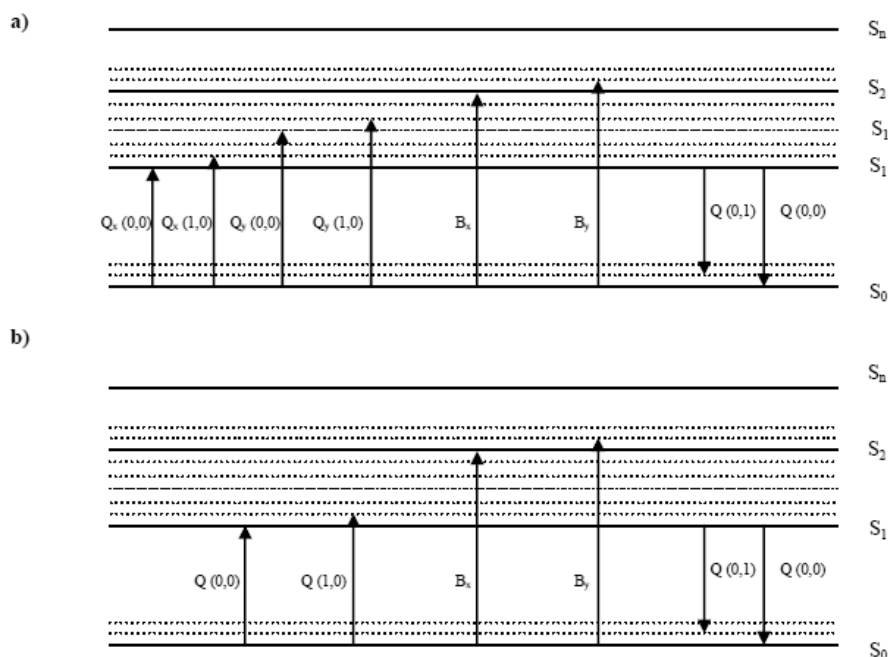
O modelo teórico de *Gouterman* faz a interpretação dos espectros de absorção de porfirinas recorrendo a quatro orbitais, duas HOMO (do inglês *highest occupied molecular orbital*) designadas por  $b_1$  e  $b_2$ , de simetria  $a_{2u}$  e  $a_{1u}$ , e duas LUMO (do inglês *lowest unoccupied molecular orbital*) denominadas por  $c_1$  e  $c_2$  de simetria  $e_g$ . De acordo com este autor, pode arbitrar-se um sistema de eixos x e y no plano do anel porfirínico e considerar-se que as transições  $B_x$ ,  $B_y$ ,  $Q_x$  e  $Q_y$ , ocorrem sobre esses eixos. As bandas correspondentes a  $B_x$

e  $B_y$  têm origem nas transições  $b_2 \rightarrow (c_1, c_2)$  enquanto que as  $Q_x$  e  $Q_y$  nas transições  $b_1 \rightarrow (c_1, c_2)$ . De referir que as bandas referidas podem ainda ser representadas por  $B_x(0,0)$ ,  $B_y(0,0)$ ,  $Q_x(0,0)$  e  $Q_y(0,0)$ , uma vez que as transições se efetuam entre o nível vibracional zero do estado fundamental e o nível vibracional zero do estado excitado, contudo poderá ainda aparecer um *overtone* vibrónico nas bandas Q surgindo as transições  $Q_x(0,1)$  e  $Q_y(0,1)$ .

A previsão teórica do espectro de absorção de uma porfirina de base livre, indica que deveriam aparecer duas bandas B. Contudo experimentalmente verifica-se que o espectro apenas apresenta uma banda deste tipo, uma vez que a diferença energética entre  $B_x$  e  $B_y$  é pequena, aparecendo estas duas bandas na forma de apenas uma banda ligeiramente alargada [16]. Recentemente, têm sido efetuados alguns estudos teóricos utilizando a teoria dos funcionais de densidade (DTF), que acrescentam à teoria das quatro orbitais a confirmação de que as transições  $b_1 \rightarrow c_1$  e  $b_1 \rightarrow c_2$  são iso-energéticas [19, 20].

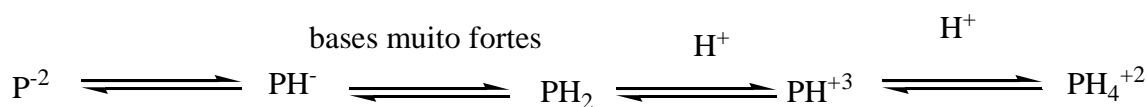
Contrariamente, ao que acontece com as porfirinas de base livre, as metaloporfirinas apresentam apenas uma banda B e duas Q, uma vez que a introdução do metal na porfirina aumenta a simetria do anel, passando de  $D_{2h}$  para  $D_{4h}$  [21, 22]. Esta mudança de simetria tem implicações diretas na degeneração das orbitais HOMO e LUMO envolvidas nas transições eletrónicas que originam as bandas do espectro de absorção destes compostos [23]. Na figura 3, apresenta-se uma proposta de diagrama energético representando as transições que ocorrem para as porfirinas e para as metaloporfirinas.





**Figura 3:** Proposta de diagrama energético representando as transições que dão origem às bandas Q e B:  
a) Porphirinas; b) Metaloporphirinas.

As porfirinas, na sua forma livre, podem comportar-se como bases fortes ou como ácidos fracos, (figura 4). As propriedades ácido-base das porfirinas resultam dos nitrogénios pirrólicos, dois dos quais podem ganhar protões e outros dois que apresentam a capacidade de os perderem [24].



**Figura 4:** Características ácido-base das porfirinas.

As porfirinas estão presentes numa grande gama de sistemas biológicos. Este grupo de compostos formam parte dos grupos prostéticos de vários produtos naturais, logo mostram grande interesse a nível da ciência.

A função principal das porfirinas na natureza é ligarem-se a átomos metálicos, formando complexos. Os sistemas porfirínicos podem complexar com átomos metálicos e assim originar cromóforos, que constituem um grande número de compostos coloridos na natureza.

## **1.6) Porfirinas de Ferro**

As porfirinas de ferro são muito importantes pois através delas é possível estudar hemeproteínas devido à sua semelhança.

A síntese de porfirinas de ferro e seus derivados, são então muito importantes pois permitem criar estruturas parecidas às hemeproteínas [25, 26].

Através da espectroscopia de Mossbauer é possível fazer a análise a vários tipos de parâmetros como a configuração eletrônica, tipos de ligação, simetria e ligação do átomo de ferro em compostos porfirínicos [27].

Uma característica muito importante, já referida anteriormente, é que as porfirinas apresentem uma banda Soret e quatro bandas Q em espectroscopia de UV/vis. No entanto, quando metaladas, as porfirinas apresentam uma banda Soret, que sofre um deslocamento para maiores comprimentos de onda, e apenas apresenta duas bandas Q [28]. Como já foi referido, isto deve-se ao facto de que quando ocorre a metalação há uma mudança significativa na simetria do anel porfirínico e na conformação do anel, assim como na estabilidade da metaloporfirina [28].

Os próprios potenciais redox da molécula vão sofrer alterações nos seus níveis tornando a interação com moléculas envolventes mais ou menos provável nomeadamente no que se refere à transferência de energia/eletrões [29].

De acordo com a literatura [30], é possível obter porfirinas metaladas através da metalação, em meio básico ou em meio ácido, com cloreto ou acetato metálico [31] ou seguindo a metodologia proposta por Adler [33] utilizando cloreto ou acetato metálico, em dimetilformamida, sendo este um dos métodos de complexação mais utilizados.

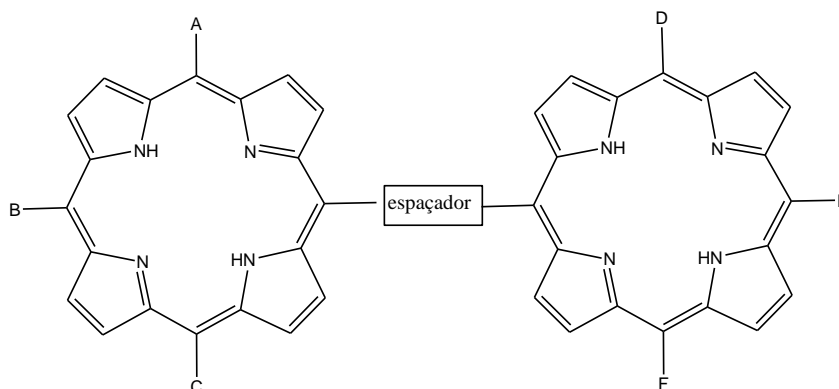
## **1.7) Dímeros de porfirinas**

As propriedades fotofísicas e fotoquímicas das porfirinas e dos macrociclos de porfirinas fazem com que estas sejam extremamente versáteis para aplicação em várias áreas diferentes como por exemplo na medicina, catálise e nanotecnologias [11].

Matrizes diméricas de porfirinas, também chamadas de bis-porfirinas, são importantes para o reconhecimento em sistemas de eletrões dadores-aceitadores [11].

Os dímeros de porfirinas ou bis-porfirinas são os mais simples elementos baseados em nanoestruturas e conseqüentemente são elementos desenvolvidos que permitem obter uma

síntese controlada e eficiente de sistemas compostos por duas porfirinas e um espaçador no meio das porfirinas [11].



**Figura 5:** Exemplo geral de um dímero da porfirina.

Um fator importante é a natureza do agente de ligação uma vez que este tem forte influencia sobre as propriedades gerais do dímero de porfirina, pois afeta tanto a parte física, (solubilidade e comportamento de agregação), como a parte química, (reatividade e estabilidade térmica) [11].

## 1.8) Aplicações das porfirinas

O grande impulso na química dos compostos tetrapirrólicos surgiu pela mão de Hans Fischer e da sua escola quando, após intensos anos de pesquisa, caracterizaram estruturalmente o grupo heme via síntese total, e relacionaram a sua estrutura com a estrutura da clorofila.

Estavam assim estabelecidas as estruturas dos compostos responsáveis pelo desenvolvimento de funções vitais essenciais à vida como a respiração e fotossíntese, justificando o facto destes compostos serem normalmente designados como “pigmentos da vida”.

Desde então, inúmeros investigadores dedicaram o seu trabalho à síntese e ao estudo das propriedades e reatividade dos macrociclos tetrapirrólicos, referindo-os como compostos com enormes potencialidades em diversas áreas, tais como catálise [33, 34], modelos de sistemas fotossintéticos [35], sensores químicos [36], agentes biocidas [37], novos materiais eletrónicos [38], semicondutores [39], terapia fotodinâmica (PDT) [40, 41] e inativação fotodinâmica de microrganismos patogénicos [42, 43].

## 1.9) Técnicas de análise de porfirinas

### 1.9.1) Espectroscopia de ultravioleta / visível

A espectroscopia molecular ultravioleta/visível (UV/vis) permite a determinação quantitativa de uma grande variedade de espécies orgânicas e inorgânicas.

A simplicidade e rapidez com que se obtêm resultados precisos e exatos, bem como o baixo custo do equipamento, são outras das vantagens que fazem desta técnica uma ferramenta poderosa na quantificação de espécies químicas [44].

A espectroscopia molecular, baseia-se na medida da transmitância,  $T$ , ou absorvância  $A$ , de soluções contidas em células transparentes, com um determinado caminho ótico. De modo geral, a concentração  $c$  de um analito, está diretamente relacionada com a absorvância, segundo a lei de Beer-Lambert:

$$A = \text{Log} (I_0/ I) = \varepsilon cl \quad (\text{eq 1})$$

onde  $\varepsilon$  é o coeficiente de extinção molar,  $l$  é a espessura da amostra percorrida pela luz e  $I$  e  $I_0$  são a intensidade de luz transmitida e incidente, respetivamente [44].

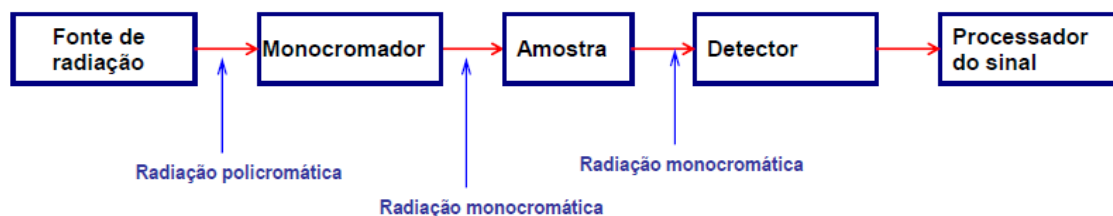
São frequentemente encontrados desvios à proporcionalidade entre a absorvância medida e a concentração (eq. 1). Alguns destes desvios representam limitações reais à lei de Beer-Lambert, outros são consequência da forma como as medidas das absorvâncias são feitas ou como mudanças químicas que resultam na variação das concentrações. Desta forma resultam dois tipos de desvios: instrumentais e químicos [44].

A (eq. 1) só é válida para concentrações inferiores a 0,1 M. Para concentrações superiores, as interações entre as moléculas afetam a distribuição da carga, alterando o coeficiente de extinção molar.

Os desvios químicos ocorrem quando um analito se dissocia, associa ou reage com um solvente, de tal modo que se forma um produto que tem um espectro de absorção diferente do analito.

A lei de Beer-Lambert só é válida para radiação monocromática, ou seja, para um comprimento de onda ( $\lambda$ ) específico. No entanto não é fácil gerar radiação com apenas um comprimento de onda. A variação da resposta do detetor e problemas de flutuação da fonte, são outros fatores que podem levar a desvios instrumentais [44].

Os espectrofotômetros contêm cinco componentes principais (figura 6), fontes de radiação, monocromador, recipientes para as amostras, detectores e processadores de sinal. Na figura 6 está representado um esquema básico de um espectrofotômetro [44].



**Figura 6:** Diagrama esquemático dos componentes básicos de um espectrofotômetro.

Os espectrofotômetros variam na sua complexidade e desempenho e podem ser de dois tipos:

- Espectrofotômetros de feixe simples: neste tipo de aparelhos existe apenas um feixe de radiação. Assim a determinação da absorvância para uma amostra é efetuada em duas etapas. Numa primeira etapa mede-se a intensidade de radiação que chega ao detector, após passar pela solução de referência. Em seguida, substitui-se a referência pela amostra e faz-se a determinação da absorvância.

- Espectrofotômetros de duplo feixe: dois feixes de radiação são formados, por um espelho que divide o feixe proveniente do monocromador. Um feixe passa pela solução de referência (branco) até ao transdutor e o segundo feixe, passa ao mesmo tempo através da amostra até ao segundo transdutor. Seguidamente é calculada a diferença de transmitância entre os dois feixes, que nos dá a absorvância [44].

Os monocromadores têm como função selecionar os comprimentos de onda pretendidos para a análise. É constituído por uma fenda de entrada, de um elemento de dispersão de radiação e uma fenda de saída. O elemento de dispersão pode ser um prisma ou uma rede de difração.

Nos monocromadores prismáticos, a radiação policromática, proveniente da fonte de radiação, passa pela fenda de entrada e incide sobre a face de um prisma, onde é dispersa. Nos monocromadores de rede de difração, uma placa transparente com inúmeras ranhuras paralelas, equidistantes, dispersam a radiação policromática através do fenómeno de interferência, e a dispersão resultante é linear. As redes de difração têm melhor resolução que os prismas e podem ser utilizadas em todas as regiões espectrais [45].

O detector mais usado em espectroscopia de absorção é o tubo fotomultiplicador. Este dispositivo é constituído por um tubo de vidro ou quartzo, sob vácuo, e placas metálicas

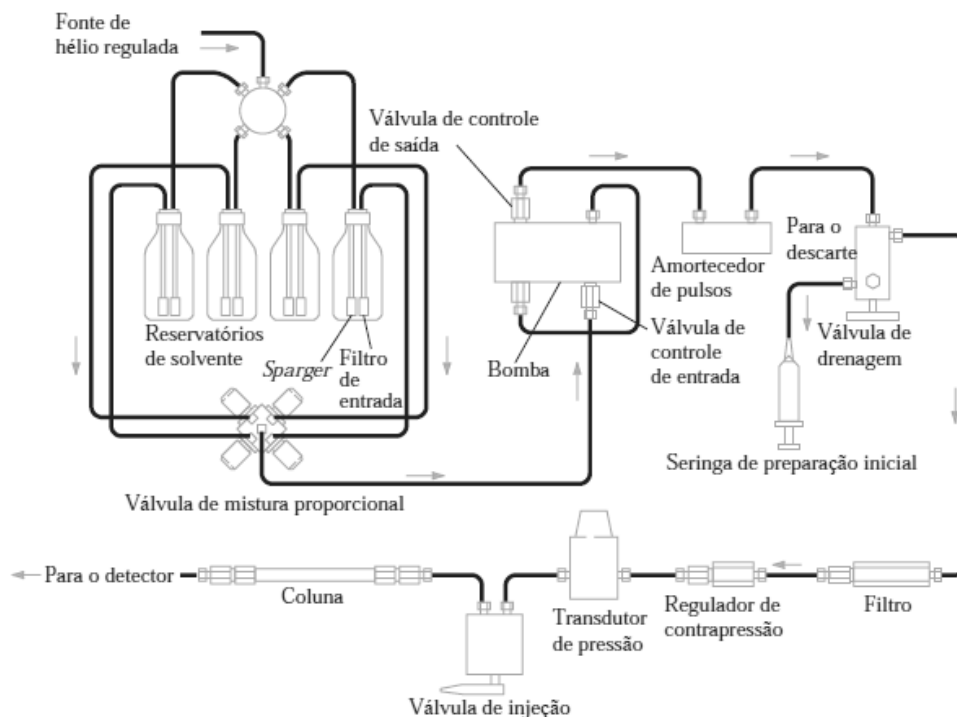
convertendo radiação em corrente elétrica. A radiação ao incidir nas placas vai induzir uma corrente elétrica. Como as placas estão sujeitas a uma diferença de potencial, o sinal é amplificado, de modo que se consegue detetar e registar sinais muito baixos de corrente elétrica [44].

A análise qualitativa, através da espectroscopia de UV/vis é feita a partir da observação do espectro de absorção. É possível detetar contaminações ou processos de decomposição de matérias-primas pela comparação dos espectros de absorção da matéria e do padrão da mesma [44].

### 1.9.2) Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

A cromatografia Líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês *High-performance Liquid Chromatography*) é uma das técnicas mais usadas na separação de analitos. Permite análises rápidas, utiliza pequenas quantidades de amostra, é possível analisar misturas, pode ser utilizado em amostras voláteis e em amostras não voláteis e tem uma elevada sensibilidade quando comparada com outras técnicas, como por exemplo GC (cromatografia gasosa) [45].

A cromatografia líquida de alta eficiência, iniciou-se na década de 1960. É uma extensão da cromatografia líquida clássica e está caracterizada pelo uso de colunas em aço inox muito mais estreitas, com diâmetro interno de 2-5 mm, empacotadas com partículas de tamanho muito pequeno, 3-10  $\mu\text{m}$ , que constituem a fase estacionária. A fase móvel circula sob alta pressão ao longo da coluna com um fluxo controlado. A alta pressão permite análises mais rápidas e o uso de fases estacionárias constituídas por micro partículas permite uma elevada eficiência na separação [46].



**Figura 7:** Esquema representativo da instrumentação da cromatografia líquida de alta eficiência.

A técnica de HPLC revelou-se um dos mais eficientes métodos cromatográficos, em virtude do desenvolvimento de instrumentação automatizada. Permitiu a injeção de volumes de amostra cada vez mais pequenos e reprodutíveis e a detecção de quantidades de analito cada vez menores em sistemas de detecção em fluxo que indicam quando os componentes sofrem eluição da coluna.

Esta técnica veio complementar a cromatografia de gases (GC) no tipo de compostos que podem ser separados. Apresentou também a vantagem de tempos de retenção mais curtos e maior número de análises por unidade de tempo. A introdução de colunas capilares, como em GC, oferece um maior número de pratos teóricos e uma melhor resolução do que as colunas padrão. Outra vantagem que esta técnica apresenta é a de menor quantidade de fase móvel, o que permite utilizar solventes tóxicos, raros, ou caros bem como o uso de fases estacionárias dispendiosas [46].

Assim, um sistema de HPLC (figura 7) consiste em quatro componentes principais: uma bomba, um sistema de injeção, uma coluna de separação e um detetor, todos ligados numa instalação resistente a altas pressões, que podem ir até 300 atmosferas.

Em geral, a técnica de HPLC é um processo dinâmico onde as moléculas dos analitos se movem através de um enchimento poroso, por ação da fase móvel bombeada continuamente, e interagem com diferentes afinidades com o material da fase estacionária.

A cromatografia líquida de alta eficiência pode ser dividida em dois grupos principais: em fase normal (HPLC-NP) e em fase reversa (HPLC-RP). Na cromatografia em fase normal, uma fase estacionária polar (normalmente sílica) é usada para a retenção dos analitos polares. As separações em fase reversa estão baseadas em forças atrativas entre solutos não polares e grupos funcionais não polares ligados a um suporte de sílica.

A maioria das separações são levadas a cabo por HPLC de fase reversa devido ao seu maior campo de aplicação, pois existem muito poucos compostos que sejam retidos permanentemente na coluna. As colunas também tendem a ser mais robustas [47]. Para um soluto ser retido por um sistema cromatográfico deve ser transferido da fase móvel para a fase estacionária. A associação do soluto com a fase estacionária pode envolver processos de partição, adsorção ou uma combinação de ambas.

Num processo por partição, o soluto está praticamente todo embebido na fase estacionária, enquanto num processo por adsorção o soluto está apenas em contacto superficial com a fase estacionária e não totalmente embebido nela. Esses dois processos foram usados para desenvolver as duas teorias principais que descrevem o mecanismo de retenção molecular em HPLC-RP [48].

Na fase reversa existe uma relação exponencial entre o fator de retenção  $k$  e a fração do volume do solvente orgânico na fase móvel. Um erro de 1% na quantidade de solvente orgânico pode fazer variar o fator de retenção entre 5% e 15% [49].

Quando a composição da fase móvel é alterada gradualmente ao longo da eluição cromatográfica, por aumento e posterior diminuição da percentagem de um solvente fala-se de uma eluição em gradiente. Nos casos em que a composição da fase móvel se mantém constante durante toda a análise o tipo de eluição é conhecido como isocrático. Pode dizer-se que, nas cromatografias em fase reversa, os compostos apolares ou fracamente polares são mais fortemente retidos na fase estacionária do que na fase móvel. A retenção de um composto na fase estacionária é tanto maior quanto menor é a sua solubilidade na fase móvel.

Um detetor de HPLC deve seguir os seguintes requisitos [50]: suficiente sensibilidade, limite de deteção suficientemente baixo, amplo intervalo dinâmico linear, suficiente estabilidade e reprodutibilidade do sinal, resposta do sensor rápida, ligação entre a coluna e o detetor curta e direta e um detetor com volume morto tão pequeno quanto possível.

Esta técnica permite caracterizar porfirinas pois tem uma grande sensibilidade e quando acoplada a um detetor específico, por exemplo espectrometria de massa (MS), torna-se um poderoso método de caracterização de amostras [51].



O HPLC acoplado ao MS é uma ferramenta poderosa para análise de amostras forenses.

### 1.9.3) Espectrometria de Massa

O fundamento da espectrometria de massa (MS, do inglês *mass spectrometry*) é a separação em fase gasosa das moléculas de acordo com a sua razão massa-carga ( $m/z$ ). Os analitos são ionizados e separados por alterações do campo magnético e/ou eletrostático em alto vácuo. O sinal captado pelo detetor é convertido na abundância relativa em função da razão  $m/z$ , resultando num espectro de massa [52].

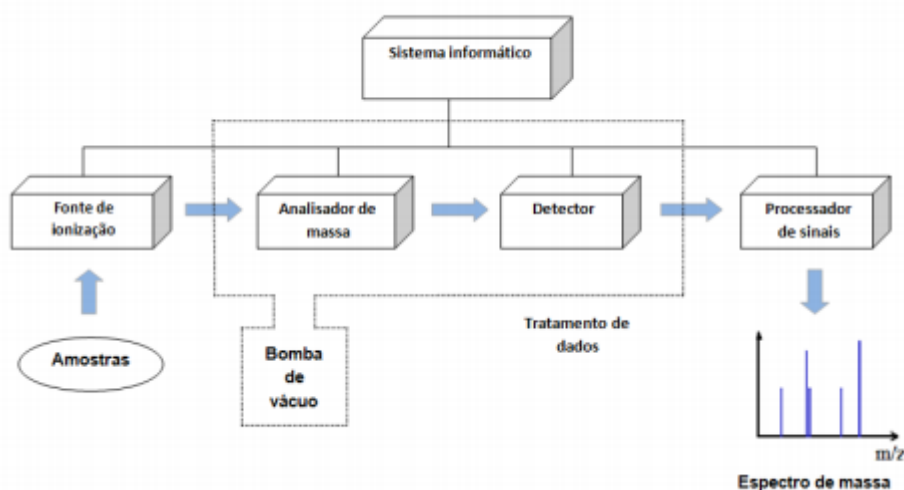
A MS fornece mais informação sobre analitos em amostras de menor quantidade do que outras técnicas, do ponto de vista quantitativo e qualitativo. É também a técnica mais confiável para a medição de massa exata [52].

As medições exatas de massa podem ser utilizadas para auxiliar na identificação de compostos e os padrões de fragmentação molecular e podem ser utilizados para identificar os analitos.

Todos os espectrômetros de massa partilham características comuns, com algumas diferenças entre si. Em alguns destes instrumentos a introdução da amostra no espectrômetro de massa é realizada através de cromatografia, noutros é realizada por inserção direta da amostra na câmara de ionização. Uma vez separados, os iões são detetados e quantificados.

Esta técnica é constituída por três componentes principais: uma fonte de ionização; o analisador de massa e o detetor. Na fonte de ionização, os componentes de uma amostra são convertidos em iões pela ação de um agente ionizante e os iões positivos ou negativos são imediatamente acelerados em direção ao analisador de massa. A função do analisador de massa é separar os iões de acordo com a sua razão  $m/z$  e dependendo da natureza do analisador o espectrômetro de massa pode ser classificado em várias categorias [53].

Finalmente, o detetor recebe os iões que foram separados pelo analisador, transformando a corrente de iões em sinais que são posteriormente processados (figura 8).



**Figura 8:** Exemplo dos componentes básicos de um espectrômetro de massa. A amostra é introduzida na fonte de ionização onde os analitos são ionizados no modo positivo ou negativo, no sentido de carregar as moléculas na fase gasosa. Os íões ionizados entram no espectrômetro de massa, e são separados no analisador de massa no sentido de alcançar o detector, para se obter o espectro de massa [52].

Existem vários métodos de ionização, tendo cada um deles as suas vantagens e desvantagens associadas. O método de ionização a utilizar depende do tipo de amostra, e do tipo de espectrômetro de massa que se vai utilizar. O método de ionização utilizado para efetuar a análise de uma determinada substância influencia substancialmente o aspeto final do respetivo espectro de massa. Existem uma série de métodos de ionização, tais como ionização por impacto eletrónico (EI), ionização química (CI), bombardeamento por átomos rápidos (FAB), termospray (TSP), ionização por eletrospray (ESI), ionização química à pressão atmosférica (APCI) e ionização por desorção por laser assistida por matriz (MALDI) [54].

As três principais características de um analisador são: o limite de massa, a transmissão iónica e o poder de resolução em massa. O limite de massa significa o valor mais elevado de massa que pode ser medido. A transmissão é a razão entre o número de íões que chegam ao detetor e os íões produzidos na fonte. O poder de resolução é a capacidade de produzir dois sinais distintos entre dois íões com uma diferença de massa pequena. Existem diversos dispositivos para a separação de íões com diferentes valores de  $m/z$  e o analisador deve permitir a passagem de um número de íões suficiente para fornecer uma corrente de íões facilmente mensurável. O analisador de massa contido no espectrômetro de massa pode ser de diferentes tipos: quadrupolo, quadrupolo ion trap, ion trap linear, orbitrap, tempo de voo (TOF) e sector magnético (menos utilizado em aplicações atuais). Os analisadores podem ser divididos em duas grandes classes com bases em várias propriedades, os analisadores digitais

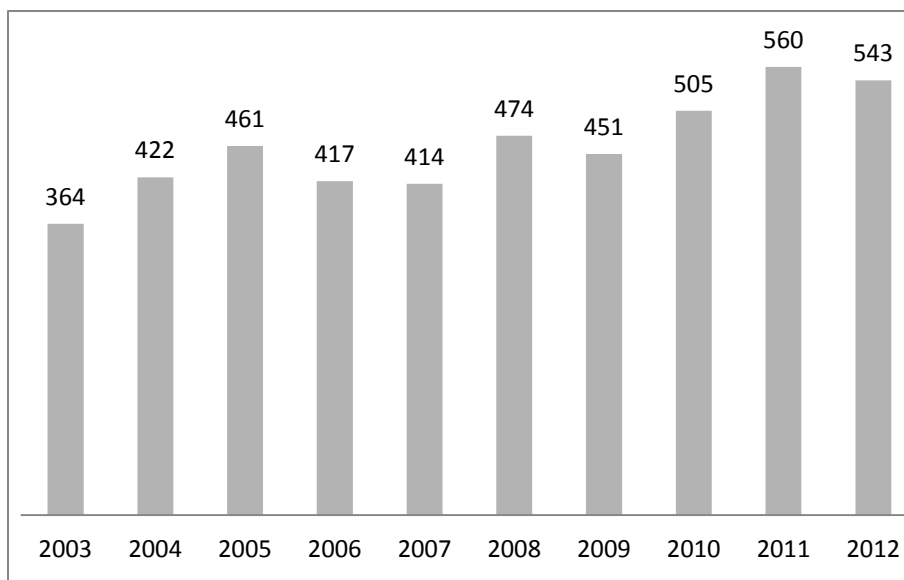
que transmitem os iões com diferentes massas sucessivamente ao longo do tempo, como por exemplo, o analisador de quadrupolos e os analisadores ao qual é efetuada a transmissão de todos os iões simultaneamente, como, por exemplo, o analisador TOF (do inglês time of flight) [48]. Outra característica dos analisadores de massa é a capacidade de se poder combinar diferentes analisadores em sequência a fim de aumentar a versatilidade [52].

O método de ionização “electrospray” (ESI), consiste num processo de ionização suave, permitindo a formação de iões em fase gasosa através de um processo delicado que torna possível a análise de compostos não voláteis e termolábeis.

Em contraste com outras técnicas de ionização, o electrospray funciona à pressão atmosférica. Os espectros são produzidos por passagem de um feixe líquido por um capilar metálico mantido a voltagens elevadas (3 – 4 kV). É esta voltagem que faz dispersar o feixe líquido, formando uma névoa de gotas de iões carregados que sofrem desolvatação durante a sua passagem pela fonte. À medida que vai diminuindo o tamanho das gotas atinge-se um ponto em que as forças repulsivas entre as cargas à sua superfície é suficientemente grande para ultrapassar a tensão superficial destas. Este processo vai dar origem a gotas cada vez mais pequenas. Este processamento é repetido até se obter iões dos analito de interesse, os quais são depois transferidos através de uma série de lentes até ao espectrómetro de massa [55].

## 1.10) Bibliometria

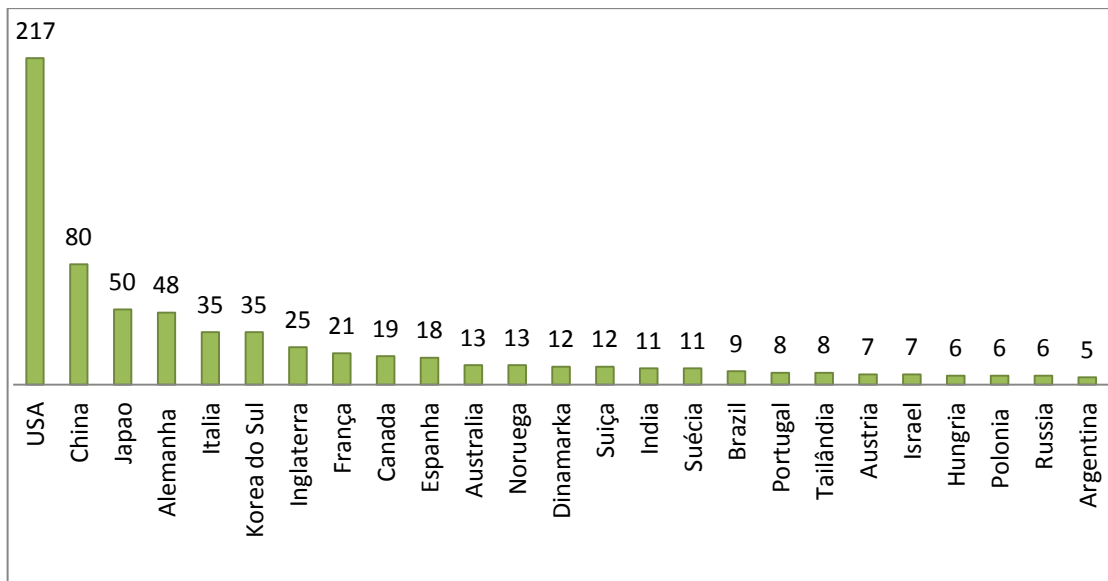
Sendo este um tema muito importante no futuro em várias áreas, é possível verificar a progressão do estudo de modelos do heme nos últimos anos (figura 9).



**Figura 9 :** Artigos de modelos heme lançados nos últimos 10 anos.

Pela análise feita na base de dados ISI, vê-se que nos últimos dez anos houve um aumento de artigos lançados sobre modelos heme em vários países diferentes. Assim se mostra o interesse mundial de criar novas de modelos do heme para várias áreas diferentes.

Também é importante verificar o estudo que foi feito no último ano de modelos do heme em outros países, incluindo Portugal (figura10).



**Figura 10:** Representação de artigos lançados sobre modelos heme no ano de 2012.

Observa-se um panorama dominado pelos Estados Unidos da América, mas onde ainda assim se destaca Portugal de entre os primeiros 20 países na investigação de modelos do heme. [59]



# Capítulo 2





## 2) Materiais e métodos

Este capítulo encontra-se dividido em duas secções: a 2.1 onde se encontra descrita a instrumentação, os reagentes e solventes; e a partir da secção 2.2 encontra-se descrita a síntese e caracterização dos compostos durante este trabalho.

### 2.1) Descrição dos reagentes, solventes e instrumentação

Os reagentes e solventes utilizados foram fornecidos por diferentes empresas. O ácido propanóico, cloreto de tionilo, o 4-carboxi-benzaldeído, a hexa-metileno-diamida, o diclorometano com 99,9%, e tetrahidrofurano (THF) com 99,9% *Chromasolv Plus* para HPLC, são da Sigma-Aldrich, o anidrido acético, o pirrol, o ácido benzóico e o n-hexano são da Panreac, o benzaldeído, o cloreto de ferro (II), o etanol e o tolueno são da Merck, a dimetilformamida (DMF) é da Fisher Scientific, a acetona com 99,5%, o hidrogenocarbonato de potássio são de José Manuel Gomes dos Santos, Lda e o sulfato de sódio anidro é de José M. Vaz Pereira.

Todos os reagentes e solventes utilizados foram de grau analítico.

Os compostos foram purificados em placas de sílica gel H de 5-40 $\mu$ m fornecida pela Fluka.

As reações foram identificadas por cromatografia de camada fina (TLC), usando placas de alumínio revestidas com sílica gel 60 da Merck com indicador de fluorescência para UV  $_{254/365}$  nm.

Os espectros de absorção de UV/Vis foram obtidos num espectrofotómetro Ocean Optics USB-4000-UV-Vis.

#### **HPLC:**

A análise por HPLC foi realizada usando um sistema de *Dionex Ultimate 3000*, equipado com um auto injetor e uma coluna *Hichrom 5 C18*, (dimensões 15cmx5mmx4,6 $\mu$ m). As corridas foram feitas a uma temperatura de 30°C com o acetonitrilo como eluente isocrático, com injeções de  $20 \times 10^{-3}$  cm<sup>-3</sup> e uma taxa de fluxo de 1,0mL min<sup>-1</sup>.

### MS:

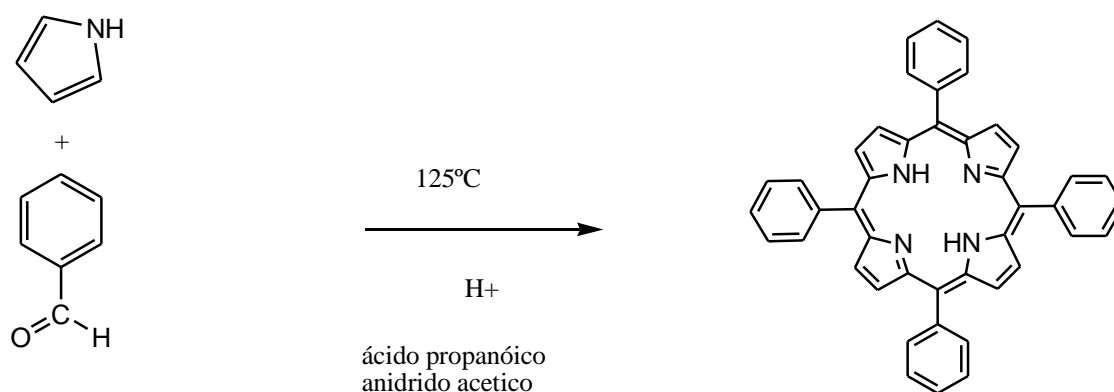
Os espectros de massa foram obtidos por *ion trap* MS: espectrômetro *Amazon SL, Bruker daltonics*, usando ionização por ESI (electrospray ionization).

No capítulo 3 na discussão dos resultados vão aparecer picos nos espectros de massa com valores de 453 e 475, aproximadamente. Estes picos correspondem a contaminantes dos solventes utilizados.

### RMN <sup>1</sup>H:

O espectro de ressonância magnética nuclear próton (RMN <sup>1</sup>H) foi obtido num espectrômetro *Bruker Avance* 400 MHz do Departamento de Química da Faculdade de Ciências da Universidade de Coimbra, usando o tetrametilsilano como padrão interno ( $\delta=0.00$  ppm). O solvente utilizado para o composto estudado por esta técnica foi o clorofórmio deuterado.

## 2.2) Síntese da 5,10,15,20-*meso*- tetra -fenil- 21H, 22H- porfirina (TPP)



**Figura 11:** Esquema da reação da porfirina TPP.

Na síntese da TPP, utilizaram-se 50 mL de anidrido acético, 200 mL de ácido propanóico, e 8mL de benzaldeído, num balão de fundo redondo de 500 mL, sendo este colocado em refluxo durante 15 minutos a uma temperatura de 100°C.

Decorrido este tempo adicionou-se o pirrol, 5,0 mL, gota a gota, e verificou-se que a solução ficou com uma tonalidade castanha, aumentou-se a temperatura para 110°C e deixou-

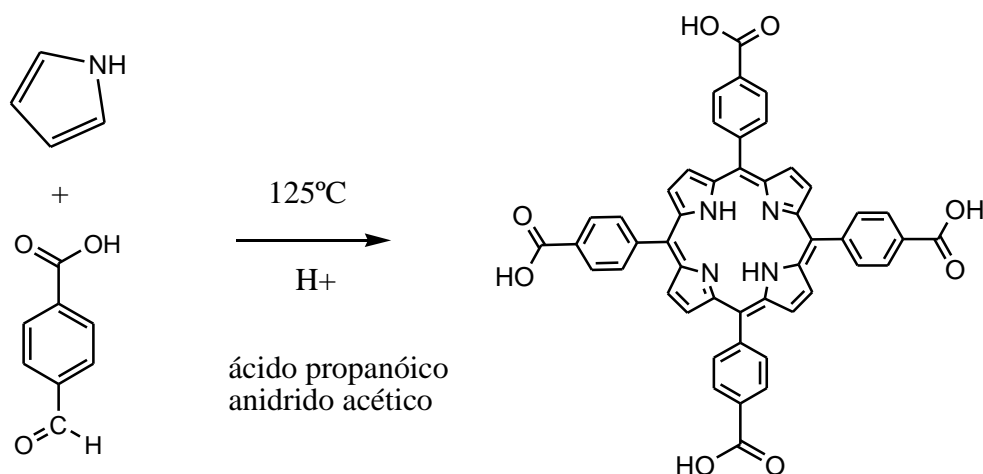
se em refluxo durante duas horas. Fez-se o controlo da reação por TLCs e por espectroscopia de UV/vis.

Ao fim desse tempo, a solução ficou a arrefecer, num local escuro e à temperatura ambiente. Ao fim de 5 horas a solução foi filtrada a pressão reduzida, lavada com etanol e seca à temperatura ambiente.

Fez-se a análise da amostra por espectroscopia de UV/vis e por HPLC-MS.

A TPP tem como formula química  $C_{44}H_{30}N_4$ , com a massa molecular de 614,25 g/mol e obteve-se com um rendimento de aproximadamente 15%.

### 2.3) Síntese da 5,10,15,20-*meso*- tetra (4-carboxi-fenil)-21H, 22H-porfirina (TcPP)



**Figura 12:** Esquema da reação da porfirina TcPP.

Na síntese da TcPP, utilizaram-se 30 mL de anidrido acético, 120 mL de ácido propanóico, num balão de fundo redondo de 250 mL, sendo este colocado em refluxo durante 15 minutos a uma temperatura de 100 °C. Seguidamente foi colocado 5,0 g de 4-carboxi-benzaldeído e deixado a refluxar mais meia hora. Por fim colocou-se 4,0 mL de pirrol, gota a gota, e verificou-se que a solução ficou com uma tonalidade castanha escura, deixou-se em refluxo durante duas horas a uma temperatura de 125 °C, aproximadamente. A reação foi seguida por TLC.

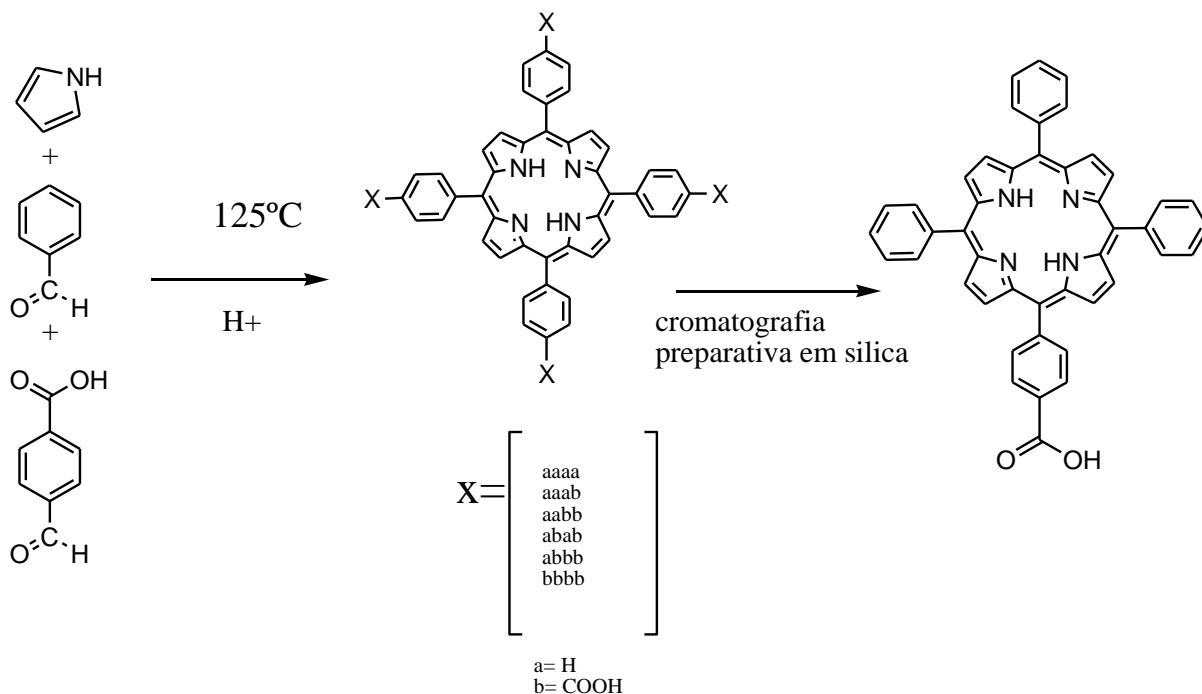
Ao fim desse tempo, a solução ficou a arrefecer, num local escuro e à temperatura ambiente. A porfirina cristalizou no seu meio de reação numa forma de grande pureza, assim não necessita de purificação adicional.

Por fim esta solução foi filtrada a pressão reduzida e os cristais lavados com água destilada. Efetuou-se outro refluxo de uma hora desses cristais em água destilada para melhorar a qualidade do produto final. Tornou-se a filtrar a pressão reduzida, e secou-se os cristais à temperatura ambiente.

Fez-se a análise por espectroscopia de UV/vis e por HPLC-MS.

A TcPP tem como fórmula química  $C_{48}H_{30}N_4O_8$ , com a massa molecular de 790,21 g/mol e obteve-se com um rendimento de aproximadamente 27%.

## 2.4) Síntese e isolamento da 5-(4-carboxi-fenil)-10,15,20-*meso*-trifenil-21H,22H-porfirina (MF)



**Figura 13:** Esquema da reação da porfirina MF.

Na síntese da MF, utilizaram-se 10 mL de anidrido acético, 40 mL de ácido propanóico, 0,75 mL de benzaldeído, e 1,050 g de 4-carboxi-benzaldeído, num balão de fundo redondo de 250 mL, sendo este colocado em refluxo durante 15 minutos a uma temperatura de 110 °C. Decorrido este tempo adicionou-se 1,0 mL de pirrol, gota a gota, ficando a solução com uma tonalidade castanha, e deixou-se em refluxo durante duas horas, aproximadamente, a uma temperatura de 120 °C.

Tiraram-se espectros de UV/vis ao fim da primeira hora, e ao fim da segunda hora. No fim desse tempo deixou-se arrefecer a solução à temperatura ambiente e num ambiente escuro. Após o arrefecimento de uma noite, a solução foi filtrada num funil de placa porosa, a pressão reduzida e lavado com água destilada.

Esse produto obtido foi seco na estufa durante 40 minutos a 90 °C. A secagem é necessária para poder retirar toda a água que tenha ficado, pois no passo seguinte, os cristais são colocados num balão de fundo redondo de 250 ml, em refluxo com diclorometano, e a presença de água é indesejada. Após 30 minutos de refluxo a solução foi deixada arrefecer, e então fez-se uma filtração em pressão reduzida, lenta, para separar todas as porfirinas que não se dissolvessem em diclorometano como é o caso da porfirina TcPP, por exemplo.

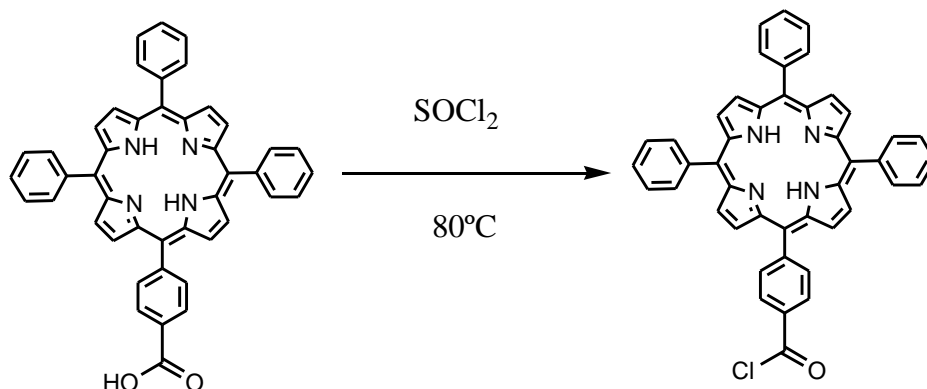
Depois de terminar a filtração, o filtrado foi evaporado até um volume mínimo de homogeneidade no evaporador rotativo.

Após a evaporação foi efetuada a cromatografia preparativa em sílica onde o eluente foi diclorometano/etanol (20:3), e então prosseguiu-se à separação das três manchas que aparecem na placa de sílica. Estas foram extraídas individualmente com THF como solvente, uma vez que este mostrou ser um solvente mais eficaz do que o diclorometano. No caso da amostra C foi necessário usar etanol como solvente. A sílica foi eliminada das soluções de porfirina por filtração simples.

NOTA: Para dissolver totalmente as porfirinas do balão, foi colocado também, THF quando já se tinha acabado toda a solução das porfirinas e do diclorometano. Pois o balão ainda tinha muita porfirina que já não saia com o diclorometano. Para essas placas preparativas de sílica usou-se um eluente de diclorometano/THF (20:3). A porfirina MF foi isolada como sendo a segunda banda.

A MF tem como formula química  $C_{45}H_{30}N_4O_2$ , com a massa molecular de 658,24 g/mol e obteve-se com um rendimento de aproximadamente 5%.

## 2.5 Síntese da 5-(4-clorocarbonil-fenil)-10,15,20-*meso*- trifenil-21*H*, 22*H*-porfirina (MF-COCl)



**Figura 14:** Esquema da reação da porfirina MF-COCl.

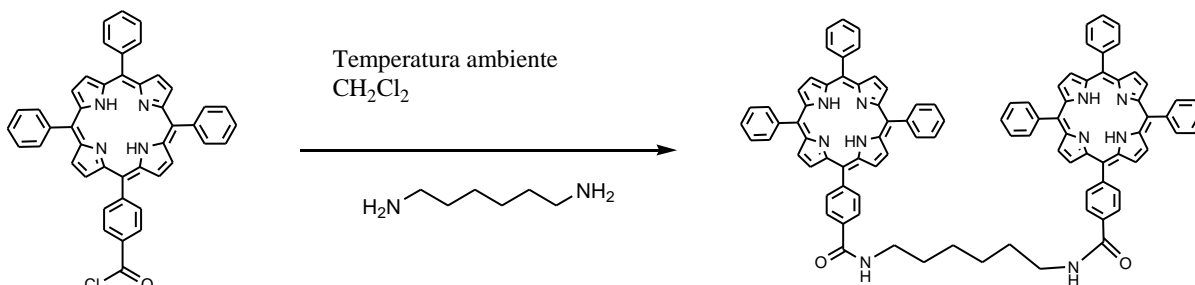
Num balão de fundo redondo de 100 mL, juntou-se 1 mL de cloreto de tionilo destilado (SOCl<sub>2</sub>), e 0,043 g de MF sintetizada na secção 2.4. A mistura entra em refluxo durante duas horas, com agitação e a uma temperatura de 80 °C. O topo do condensador é ligado a uma torre de secagem. A reação foi controlada por TLC.

O excesso de cloreto de tionilo no fim do refluxo foi evaporado no evaporador rotativo após a adição de tolueno, cerca de 40 mL em adições graduais de 20 mL, (passado por uma coluna com alumina), de modo a permitir o arrastamento completo do SOCl<sub>2</sub>.

Fez-se a análise da amostra por espectroscopia de UV/vis para controlar a reação, sendo que a MF-COCl não foi isolada, seguindo de imediato para a síntese do dímero.

A MF-COCl tem como fórmula química C<sub>45</sub>H<sub>29</sub>ClN<sub>4</sub>O, com a massa molecular de 676,20 g/mol.

## 2.6) Síntese da bis (*meso*-tetraquis-5,10,15-trifenil-20-(*p*-carboxifenil)-porfirinil) -1,6-hexanodiamida (dímero)



**Figura 15:** Esquema de reação da porfirina dimérica.

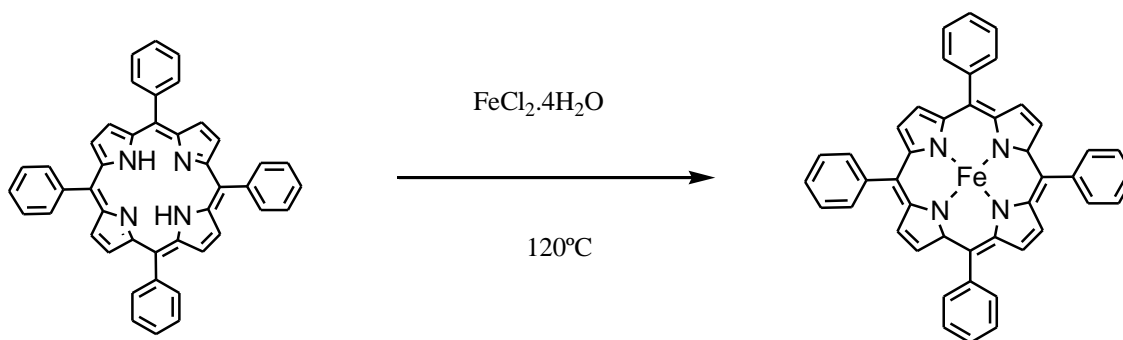
À porfirina MF-COCl preparada anteriormente, juntou-se 20 mL de diclorometano destilado, (passado numa coluna de alumina para retirar alguma água), e juntou-se uma solução preparada de 0,124 g (0,0011 mol) de hexa-metileno-diamida em 10 mL de diclorometano destilado, gota a gota, à temperatura ambiente e com agitação. Ao juntar essa solução preparada, ficou com uma cor castanha- avermelhada. Deixou-se repousar durante toda a noite.

No dia seguinte lavou-se a solução obtida com água ácida ( $\text{H}_2\text{O}$  e HCl diluído), para remover o excesso da diamina, e separou-se a fase orgânica da fase aquosa. Na fase orgânica colocou-se sulfato e sódio anidro como agente secante, e filtrou-se. Procedeu-se à separação da amostra da fase orgânica através da cromatografia preparativa em sílica. Obteve-se o dímero com 1% de rendimento.

O dímero tem como formula química  $\text{C}_{96}\text{H}_{72}\text{N}_{10}\text{O}_2$ , com massa molecular de 1396,58 g/mol e obteve-se um rendimento de aproximadamente 1%.

## 2.7) Síntese da 5,10,15,20 –*meso*- tetra-fenil-ferro(II)-porfirina (TPP-Fe(II))

Dos vários métodos de síntese de complexos metálicos de porfirinas descritos na literatura [32], selecionou-se o método de *Adler* [58] para a síntese dos complexos metálicos, uma vez a utilização de dimetilformamida como solvente permite a dissolução tanto do sal metálico como da porfirina e além disso pode atingir temperaturas de 150°C.



**Figura 16:** Esquema da reação da porfirina TPP-Fe(II).

Na síntese da TPP-Fe(II), utilizaram-se 50 mL de dimetilformamida, 102 mg de TPP sintetizada anteriormente, e 5,6 g de cloreto de ferro (II) polihidratado ( $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ), num balão de fundo redondo de 100 mL, sendo este colocado em refluxo durante 5 horas a uma temperatura de  $120^\circ\text{C}$ . No fim desse tempo deixou-se arrefecer a solução a temperatura ambiente, durante um dia. Esta reação foi seguida por TLC. Seguidamente foi colocado n-hexano para ajudar a formação de cristais, e deixou-se em repouso durante quatro dias.

Ao fim deste tempo formaram-se cristais e então foi feita uma filtração com um funil de prego, com o aumento progressivo e muito lento da pressão reduzida. Esses cristais foram colocados na estufa para secarem a  $40^\circ\text{C}$  durante 18 horas.

A TPP-Fe (II) tem como formula química  $\text{C}_{44}\text{H}_{30}\text{N}_4\text{Fe(II)}$ , com uma massa molecular: 670,18g/mol e obteve-se com um rendimento de aproximadamente 56%.



# Capítulo 3



### 3) Discussão de resultados

No presente trabalho o principal objetivo foi estudo da porfirina 5-(4-carboxi-fenil)-10,15,20-*meso*-trifenil-21*H*, 22*H*-porfirina (MF), e a preparação de uma estrutura dimérica bis (*meso*-tetraquis-5,10,15-trifenil-20-(*p*-carboxifenil)-porfirinil) -1,6-hexanodiamida, (MF-CONHC<sub>6</sub>H<sub>12</sub>NHCO-MF), para estudos futuros de transporte de oxigênio.

Para concretizar este objetivo, foram realizadas várias sínteses de várias porfirinas para se poder discutir e comparar resultados.

Quando se pretende efetuar o desenvolvimento de uma estrutura porfirínica deve-se ter em conta alguns fatores como a facilidade de efetuar a síntese, com recurso a matérias-primas acessíveis e com possibilidade de repetição de síntese em laboratórios industriais. A modulação da sua estrutura deverá permitir verificar se se trata de uma estrutura viável ou não, a sua estabilidade. Deve ser também ponderada a existência dos meios corretos e acessíveis para a caracterizar.

As porfirinas e os seus derivados são compostos com elevadas potencialidades, apresentam excelentes propriedades óticas, e estruturalmente são bastante versáteis porque permitem uma fácil modulação estrutural, com conseqüente alteração das respetivas propriedades físicas e químicas.

A primeira síntese realizada foi do composto 5,10,15,20 -*meso*- tetra-fenil-21*H*, 22*H*-porfirina (TPP), sendo então discutidos os resultados e comparados com resultados de outras sínteses. Seguidamente foi realizada a síntese da 5,10,15,20 -*meso*- tetra (4-carboxi-fenil)-21*H*, 22*H*-porfirina (TcPP) e analisados os resultados.

Na síntese da 5-(4-carboxi-fenil)-10,15,20-*meso*- trifenil-21*H*, 22*H*-porfirina (MF) foram analisados e estudados os resultados para se poder prosseguir com esta estrutura para a formação do dímero pretendido. Para isso foi convertida na MF-COCl pois esta conversão era necessária para funcionalizar e facilitar os passos seguintes de amidação para formação do dímero.

Foram também feitos estudos da metalação da porfirina TPP com ferro (II), para verificar a eficiência desta metalação.

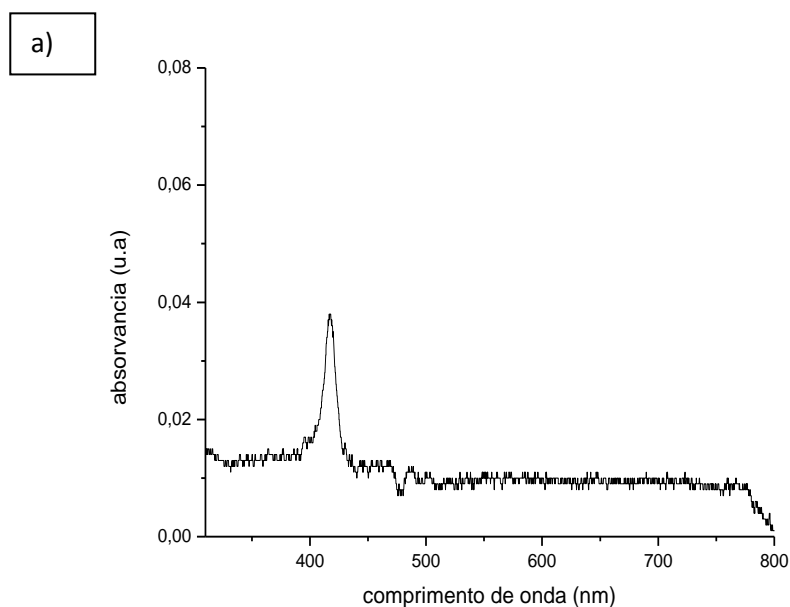
Por fim, foi estudado o modelo computacional do dímero obtido e feito o estudo desse dímero metalado com o ferro (II) afim de ver se vai perturbar ou não a sua estabilidade.

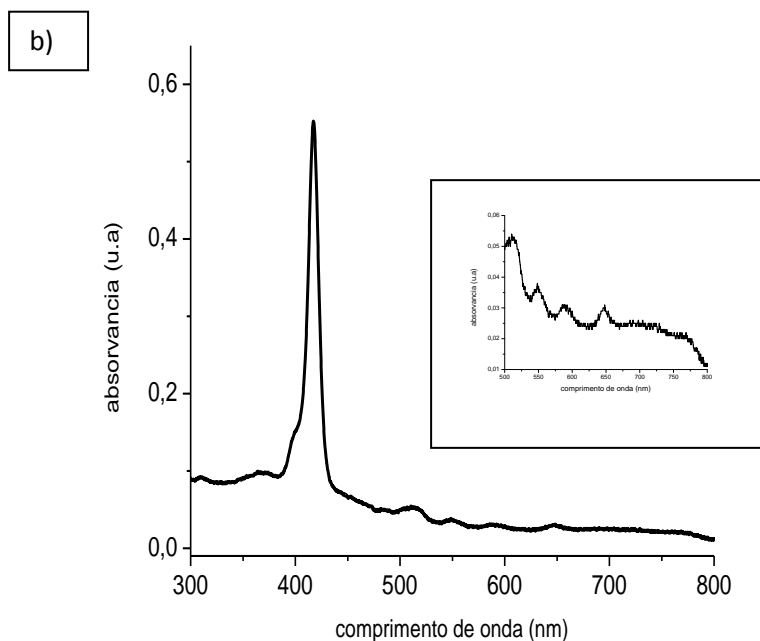
### 3.1) Discussão sobre a síntese da 5,10,15,20- *meso*- tetra-fenil-21*H*, 22*H*-porfirina (TPP)

Os nossos estudos começaram pela síntese da TPP. Embora não seja fundamental para a síntese do dímero, é um padrão necessário para o isolamento correto da MF, esta sim, fundamental para os nossos estudos.

Além disso e era necessária para os estudos da metalação, como se verá adiante.

Na síntese da TPP descrita na secção 2.2, fez-se o controlo da reacção por espectroscopia de UV/vis. A figura 17 apresenta os espectros obtidos ao fim da primeira hora de reacção e ao fim da segunda hora de reacção.





**Figura 17:** Espectros de UV/vis da reação da TPP, a) 1<sup>o</sup> hora de reação, b) 2<sup>o</sup> hora de reação.

Através dos dois espectros apresentado na figura 17, verifica-se o aparecimento da banda Soret característica das porfirinas ao longo do tempo, e assim é possível controlar a reação. Na figura 17 b) já é possível ver as quatro bandas Q da porfirina a caracterizar.

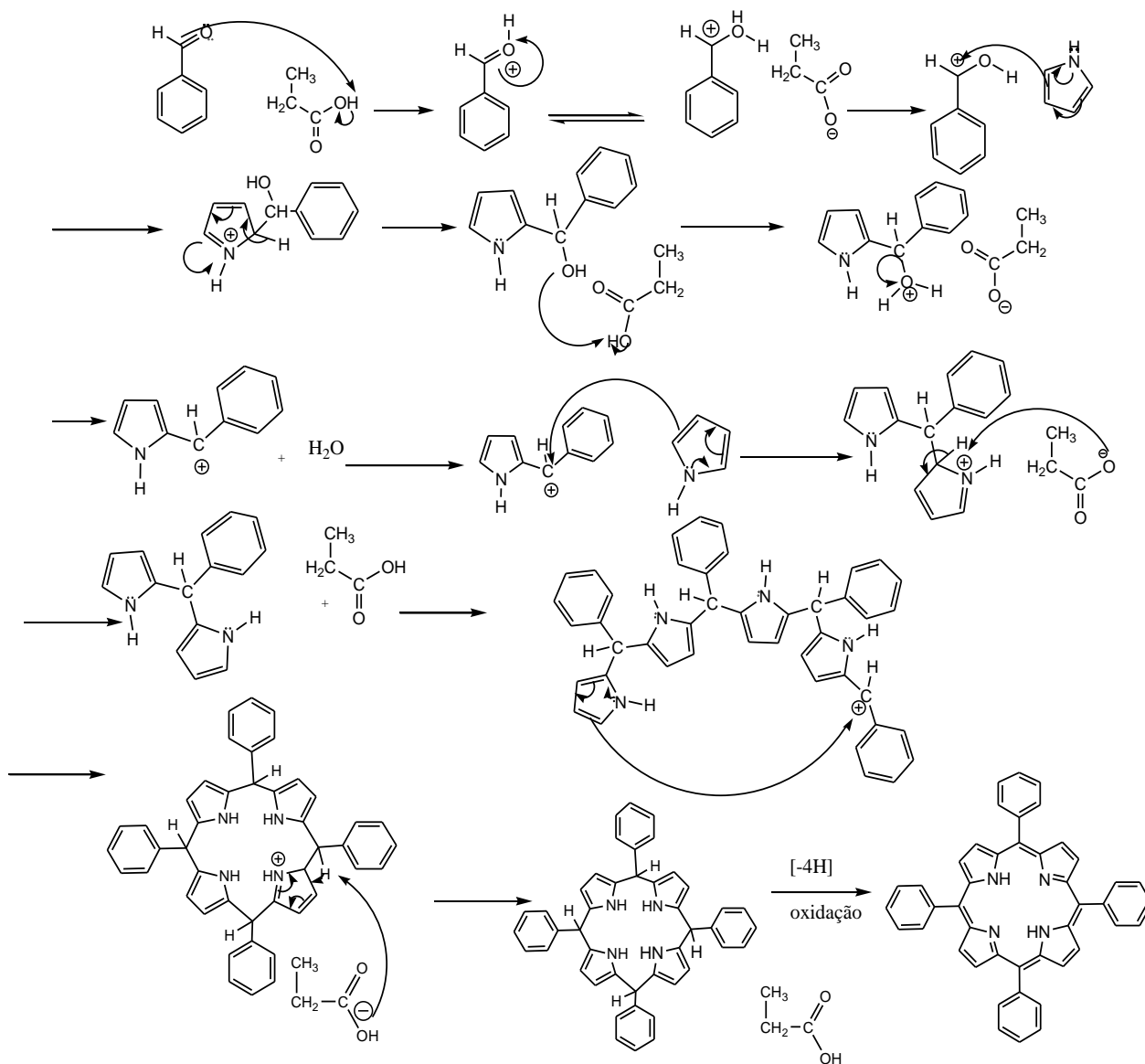
Esta reação descrita também foi seguida por TLC, onde se pode observar a presença de subprodutos no meio reacional.



**Figura 18:** TLC da reação da síntese da TPP, no fim do refluxo de duas horas.

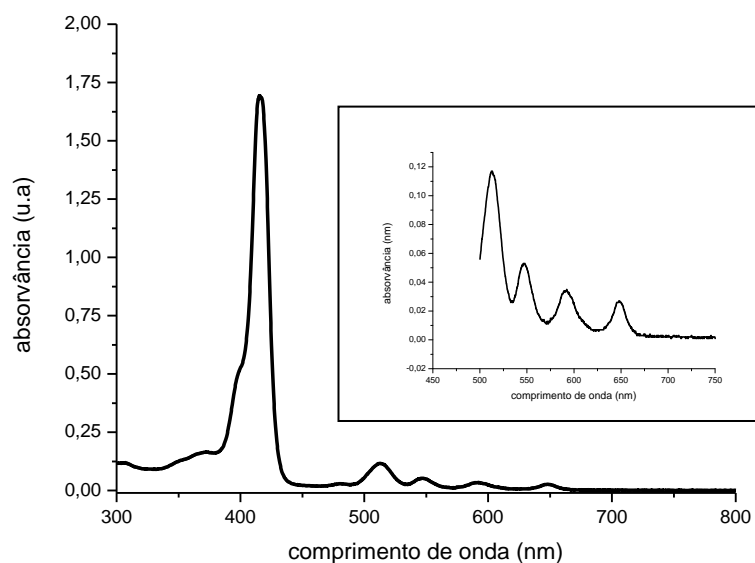
Para além deste subproduto, a presença de uma mancha que exibe fluorescência quando irradiada a 365nm, é indicativo da formação de uma porfirina. A figura 19 apresenta uma proposta de mecanismo para a síntese da TPP.

Independentemente da existência de alguns subprodutos a TPP cristaliza do meio de reação num forma de grande pureza e não necessita de purificações adicionais.

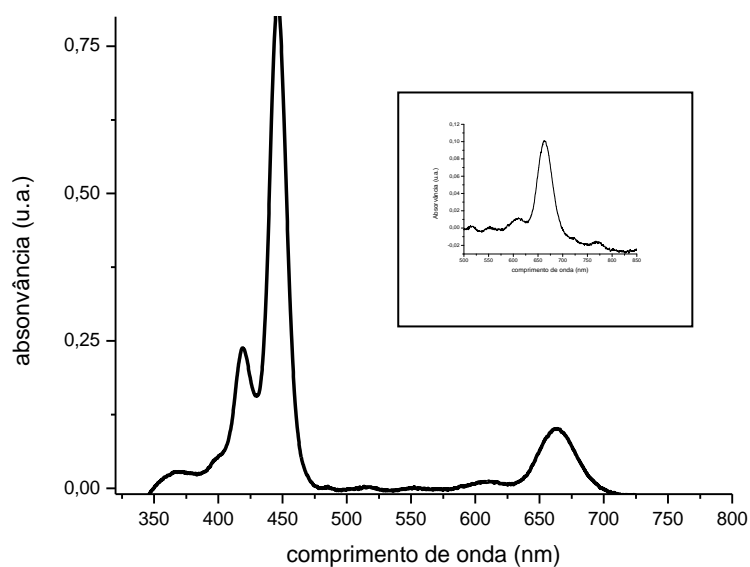


**Figura 19:** Mecanismo proposto para a síntese da TPP.

Depois de a amostra obtida estar já cristalizada e seca foram feitos os espectros UV/vis da porfirina em diclorometano, e em diclorometano + TFA para o dicatão. Obtiveram-se os seguintes espectros UV/vis (figura 20 e 21).



**Figura 20:** Espectro UV/vis da porfirina TPP.

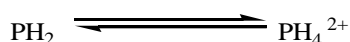


**Figura 21:** Espectro UV/vis do dicatão da TPP.

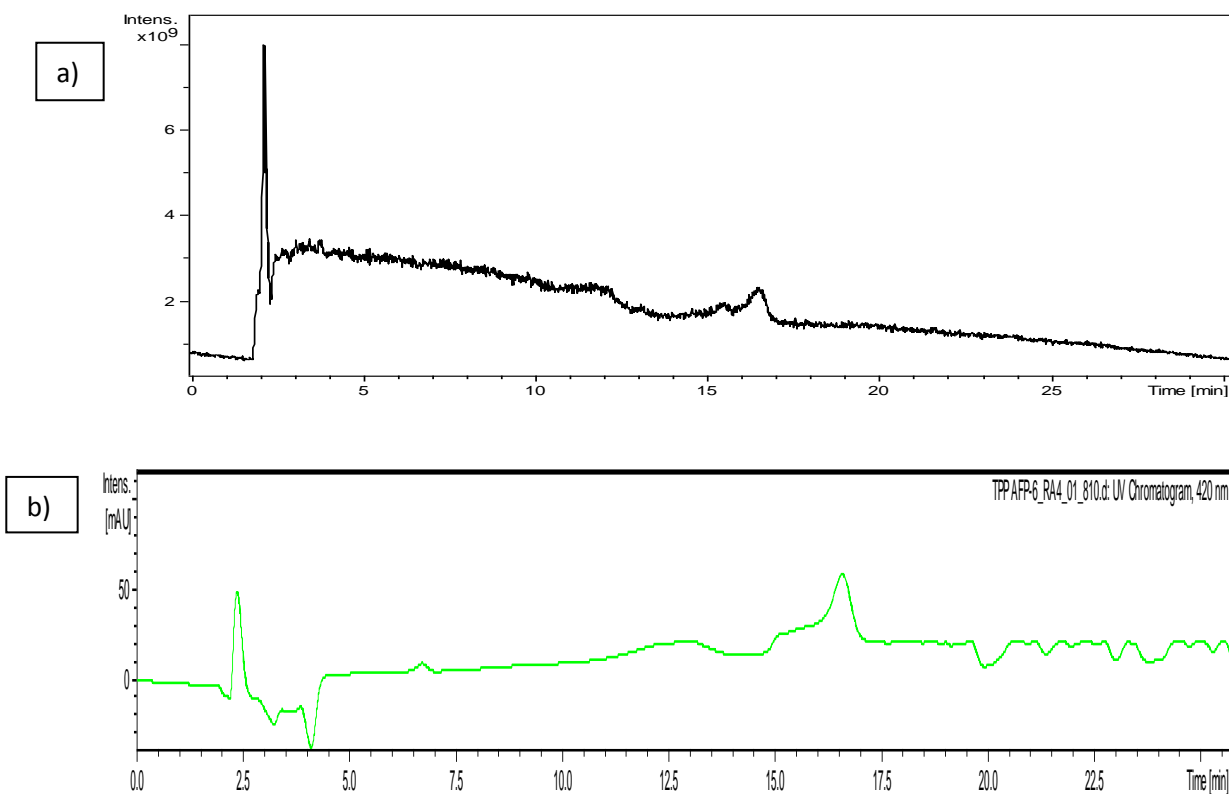
No espectro UV/vis da figura 20, vê-se uma banda com o máximo no comprimento de onda de 415 nm, que é característica das porfirinas, banda Soret, e observam-se as quatro bandas Q, nos comprimentos de onda de 512 nm, 547 nm, 592 nm e 649 nm, respetivamente.

Na figura 21, apresenta-se no espectro UV/vis do dicatão da porfirina TPP após colocar uma gota de TFA na solução a analisar no espectrofotómetro de UV/vis. Neste espectro (figura 21), observa-se uma banda Soret deslocada para o comprimento de onda de 447 nm, e observam-se duas bandas Q aos 610 nm e 664 nm, sendo estas bandas características

do dicatão da porfirina, uma vez que esta porfirina encontra-se na forma ácida. Mas também se observam uma banda com um comprimento de onda de 418 nm e outras bandas de intensidades mais baixas que apresentam comprimentos de onda de 514 nm, 553 nm, 722 nm e 770 nm. Estas bandas são bandas da porfirina TPP, são correspondentes à porfirina na forma de base fraca, e isto deve-se ao facto de ao colocar o TFA na solução para formar o dicatão da porfirina foi colocada pouca quantidade, mas o objetivo era observar o equilíbrio entre a porfirina e o seu dicatão.

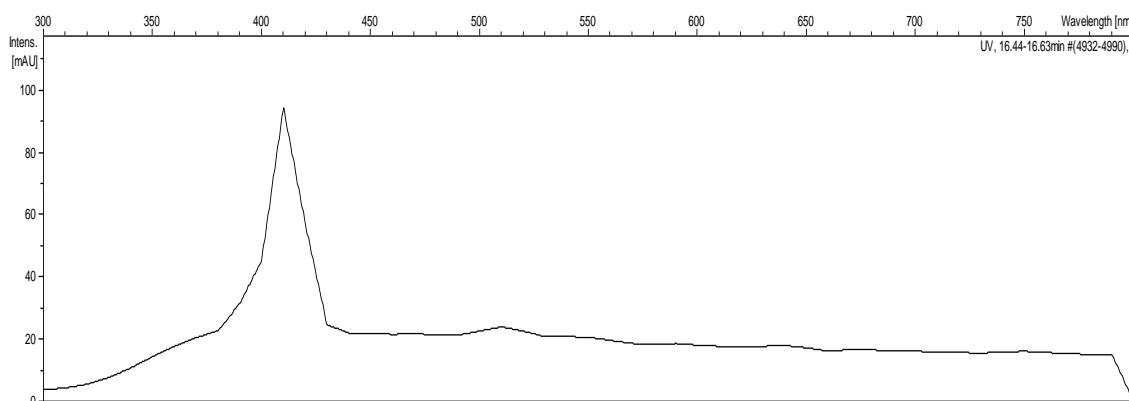


Destas observações concluímos que houve formação de uma porfirina na realização desta síntese.

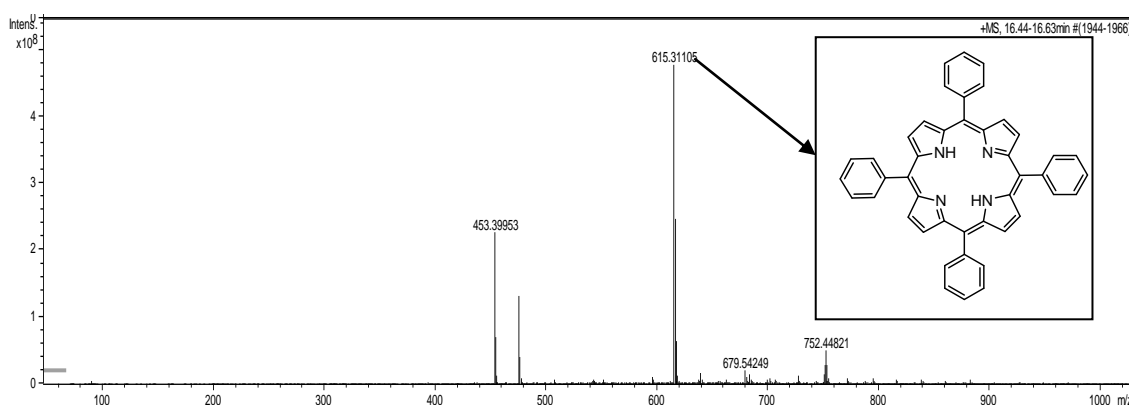


**Figura 22** a) TIC ( total ion current) da espectrometria de massa para a mesma análise, b) Perfil do cromatograma com deteção por UV/vis a 420 nm.





**Figura 23:** Espectro UV/vis do analito de massa 615,25 a 16,44 minutos.



**Figura 24:** Espectro de massa da TPP.

Para caracterizar melhor o composto obtido, a amostra também foi analisada por HPLC- DAD e MS (figura 22, 23 e 24).

Pela análise do cromatograma da figura 22 vê-se um único pico com um tempo de retenção de aproximadamente de 16,44 min, que corresponde ao composto sintetizado. O espectro de massa da figura 24, mostra um pico  $[M+H]^+$  com  $m/z= 615,3$  sendo este o pico que tem a massa do ião molecular esperada para a TPP, uma vez que o valor teórico calculado é de 615,25 e pelo espectro UV/vis verifica-se uma banda de grande intensidade que é a banda Soret desta porfirina TPP (figura 23).

### 3.2) Discussão sobre a síntese 3da 5,10,15,20- *meso*- tetra (4-carboxifenil)-21*H*, 22*H* -porfirina (TcPP)

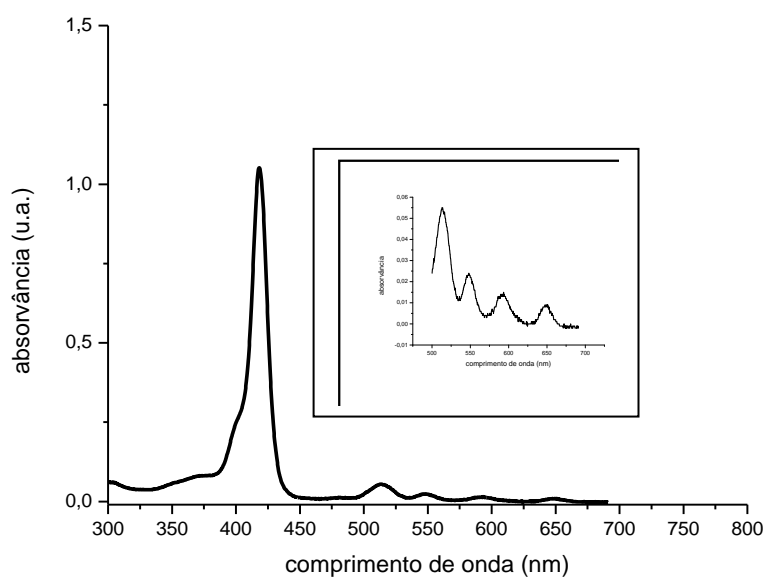
Os nosso estudos prosseguiram com a síntese da porfirina TcPP, porque embora não seja fundamental para a síntese do dímero, é um padrão necessário para o estudo da MF.

Como uma molécula relevante para o processo foi sintetizada de seguida a TcPP.

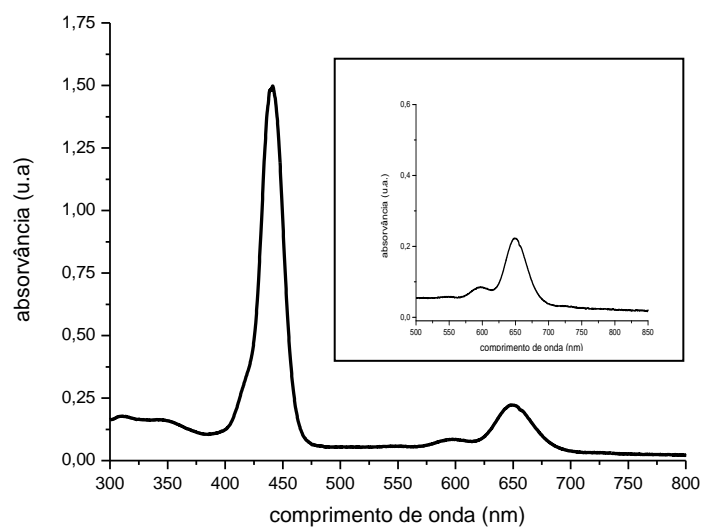
A síntese da TcPP foi descrita na secção 2.3. A reação foi seguida por TLC, (figura 25) e espectroscopia de absorção UV/Vis. Obtiveram-se os seguintes espectros de UV/vis (figura 26 e 27) do produto formado.



**Figura 25:** TLC da reação da TcPP ao fim do refluxo de 2 horas.



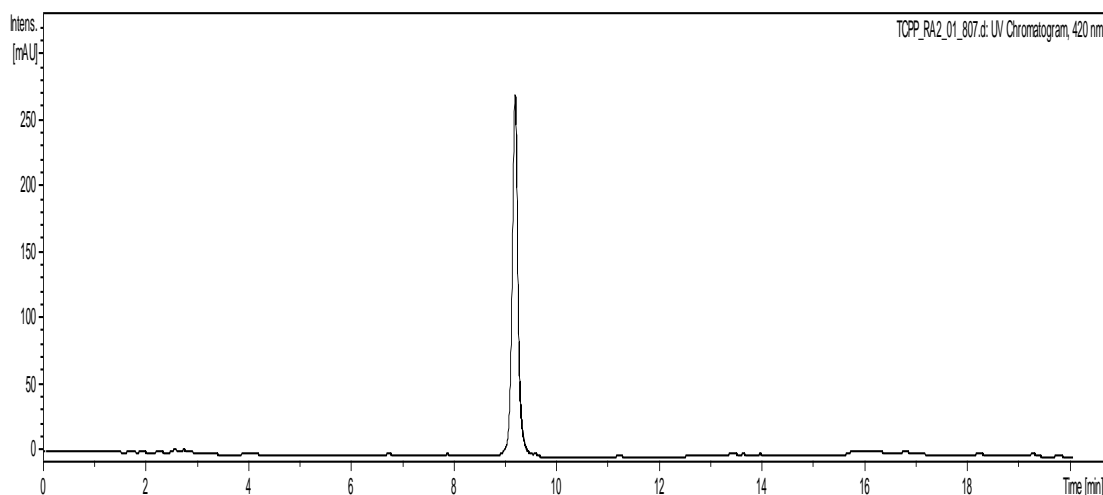
**Figura 26:** Espectro UV/vis da porfirina final.



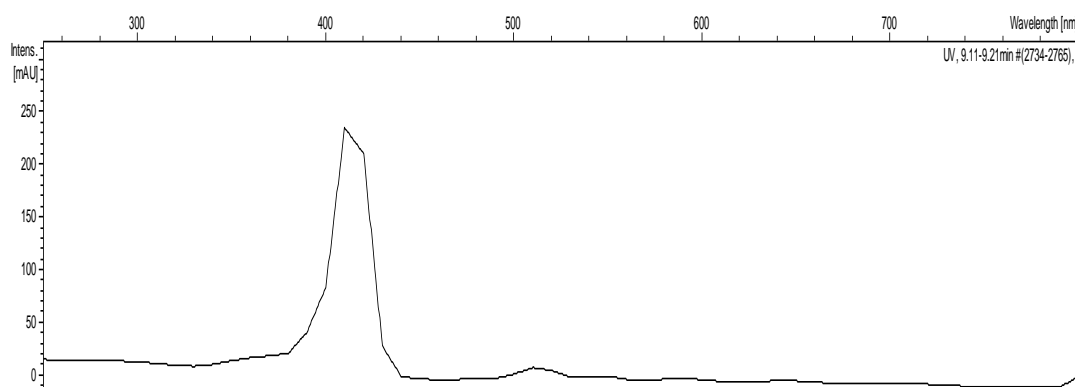
**Figura 27:** Espectro UV/vis da TcPP do dicatão.

Neste espectro, (figura 26), observa-se uma banda com um máximo no comprimento de onda de 418 nm, que é característica das porfirinas, banda Soret, e observam-se as quatro bandas Q de intensidade muito mais reduzidas a 513 nm, 546 nm, 593 nm e 649 nm. Na figura seguinte, (figura 27), observa-se novamente uma banda de grande intensidade, banda Soret, neste caso deslocada para o comprimento de onda de 441 nm, e duas bandas de menor intensidade de comprimento de onda de 594 nm e 650,1 nm, que também são denominadas de bandas Q. Verifica-se apenas a presença dessas bandas Q devido à porfirina se encontrar na forma ácida, pela adição de TFA, e este ser o espectro do seu dicatão.

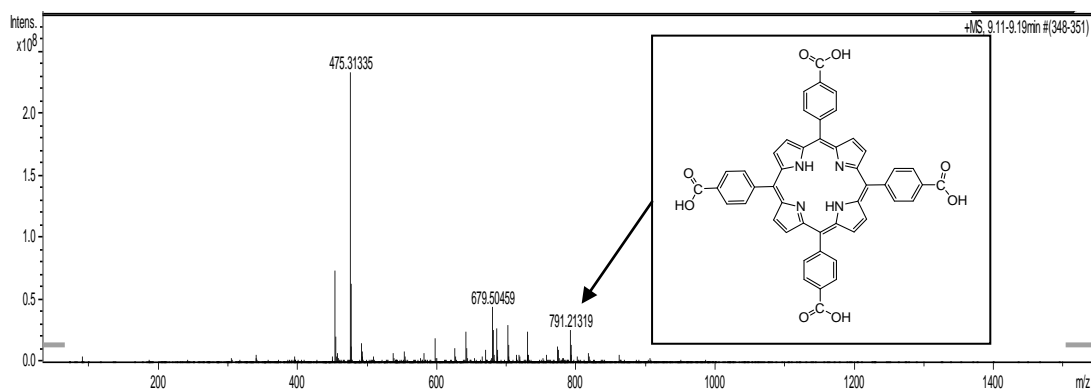
Uma vez a amostra final estar cristalizada e seca fez-se o estudo por HPLC DAD e MS para confirmar a presença do produto desejado (figura 28, 29, e 30).



**Figura 28:** Perfil do cromatograma com detecção por UV/vis a 420nm.



**Figura 29 :** Espectro UV/vis do analito a 9,11 minutos.



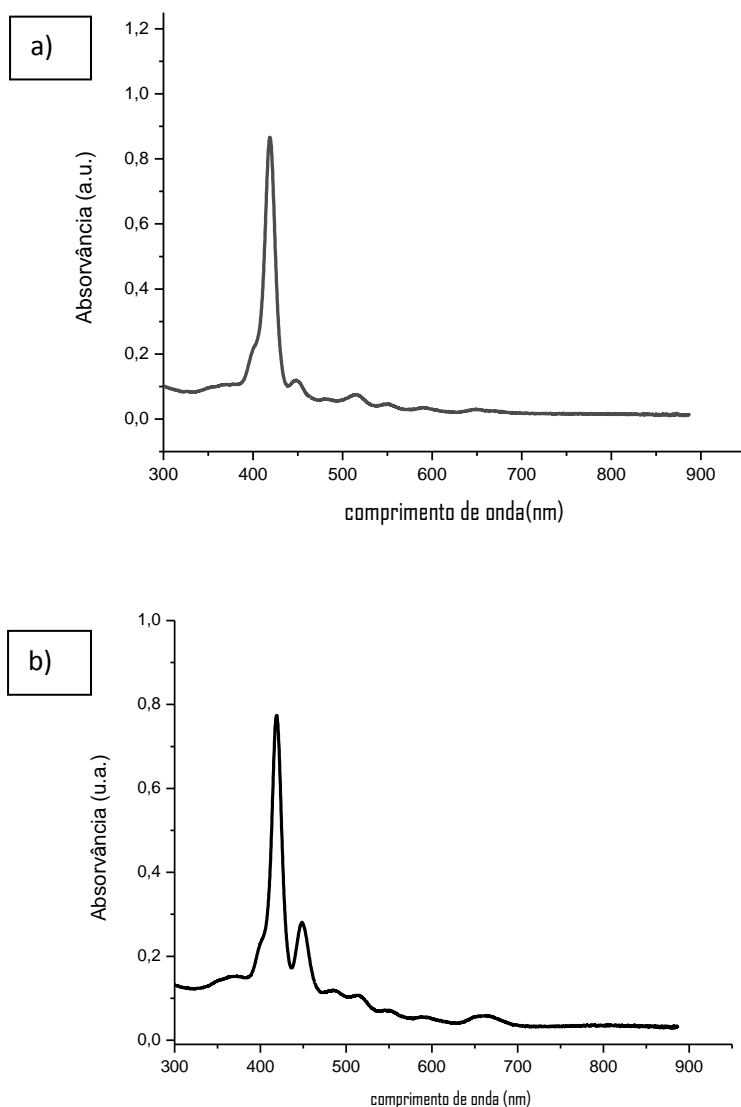
**Figura 30:** Espectro de massa da TcPP.

Pela análise do cromatograma da figura 28 vê-se um único pico com um tempo de retenção de aproximadamente de 9,11 minutos. O espectro de massa (figura 30) mostra um pico  $[M+H]^+$  com  $m/z=791,2$ , sendo este o pico experimental esperado para a TcPP, uma vez que o pico do ião molecular teórico é de 790,2. O espectro UV/vis mostra uma banda de grande intensidade, sendo esta a Banda Soret desta porfirina (figura 29).

### 3.3) Discussão sobre a síntese da 5-(4-carboxi-fenil)-10,15,20-meso-trifenil- 21H, 22H -porfirina (MF)

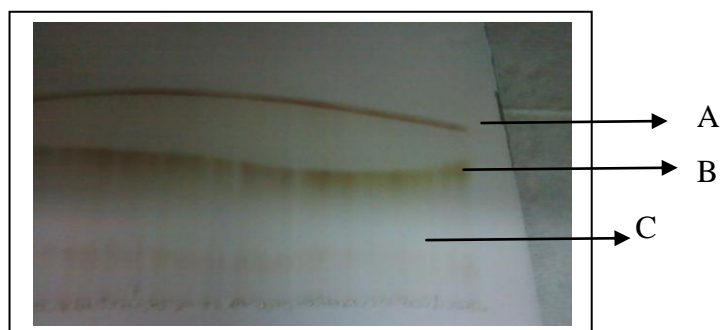
Depois de feito o estudo de duas porfirinas diferentes para nos auxiliar neste estudo, foi feito o estudo da MF, sendo esta fundamental para a síntese do dímero.

Na síntese da MF, descrita na secção 2.4, a reação foi seguida por espectroscopia de UV/vis ao fim da primeira hora, (figura 31 a)), e ao fim da segunda hora (figura 31 b)). Através desse controlo da reação é possível verificar a formação da banda Soret e a formação das quatro bandas Q, apesar de não ser possível dizer de que porfirina em específico se trata.



**Figura 31:** Espectros de UV/vis ao fim da primeira hora, a) e ao fim da segunda hora de refluxo de duas horas, b).

No fim desse tempo, e depois da sua separação por cromatografia preparativa em sílica onde se obtiveram três amostras diferentes, (A, B, C) (figura 32) foi feito o seu estudo por espectroscopia de UV/vis e HPLC -MS para ver se se tratavam de porfirinas com bandas Soret e bandas Q diferentes. A amostra B (MF) foi também analisada por RMN  $^1\text{H}$ , uma vez que é esta a porfirina que nos interessa.



**Figura 32:** Ilustração das e bandas separadas na placa de sílica preparativa usando com eluente diclorometano/etanol.

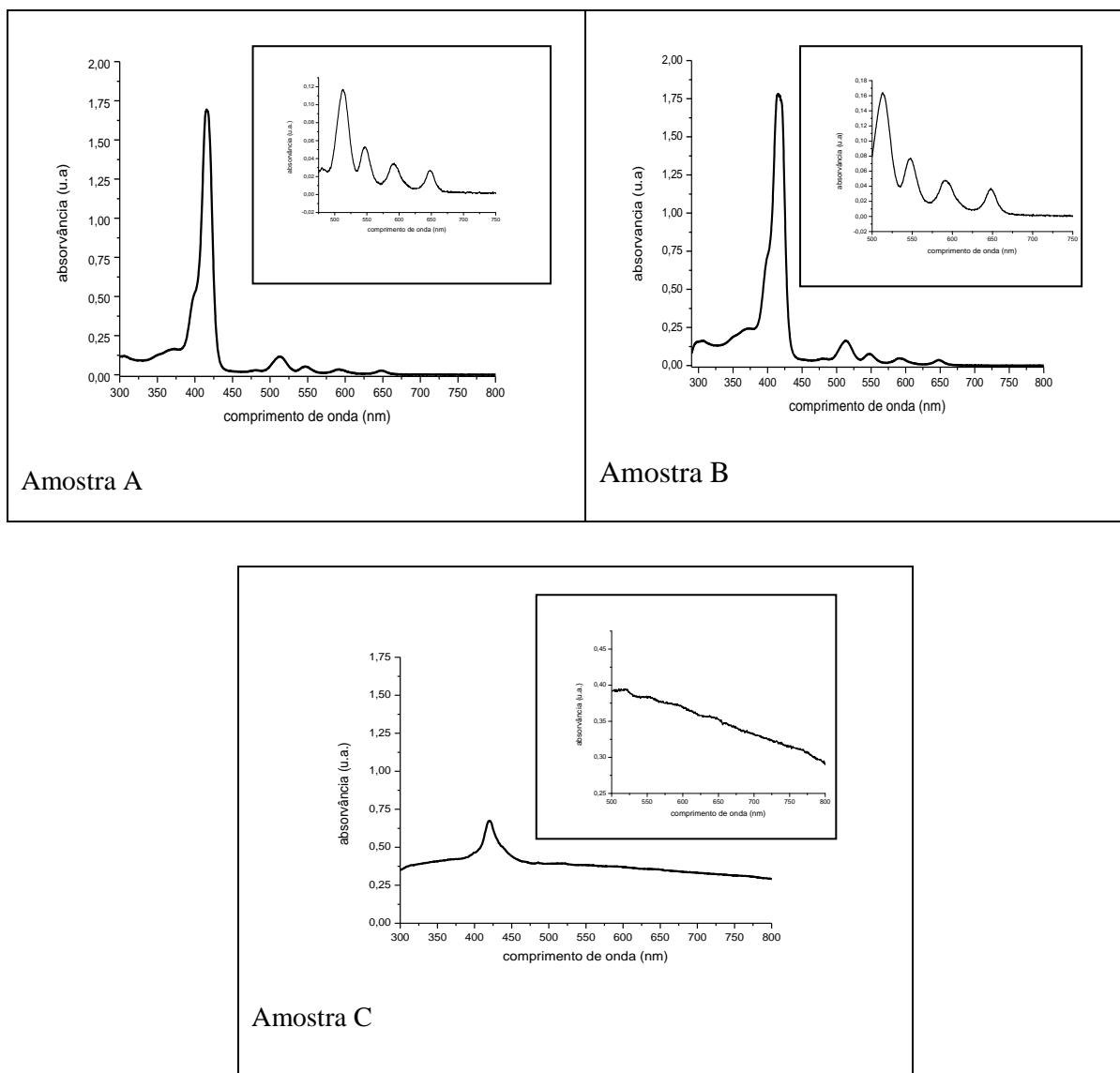
Através do analito dos espectros de UV/vis, da figura 33, pode-se verificar, nas amostra A e B a presença da banda Soret, sendo que na amostra C pode ser uma banda Soret mascarada com os restantes sub-produtos ou degradada pela presença do ácido propanóico, ou mesmo não se trataram da banda Soret característica das porfirinas.

A presença das quatro bandas Q características das porfirinas só se verificam com nitidez nas amostras A e B. Na amostra C poderão estar presentes as bandas Q, mas pelo mesmo motivo descrito para a banda Soret, estas não são evidentes.

Na amostra A (TPP) (figura 33) a banda Soret tem um comprimento de onda de 416 nm, e as respetivas bandas Q tem comprimentos de onda de 513 nm, 546 nm, 592 nm e 648 nm.

Na amostra B (MF) (figura 33) a banda Soret tem um comprimento de onda de 415 nm, e as respetivas bandas Q tem comprimentos de onda de 512 nm, 547 nm, 592 nm e 648 nm.

Na amostra C (figura 33) há uma banda de baixa intensidade por volta dos 420 nm, mas não se observam as bandas Q. É possível que se trate de restos das porfirinas com dois grupos ácidos mas a sua concentração é baixa demais para justificar o seu isolamento.

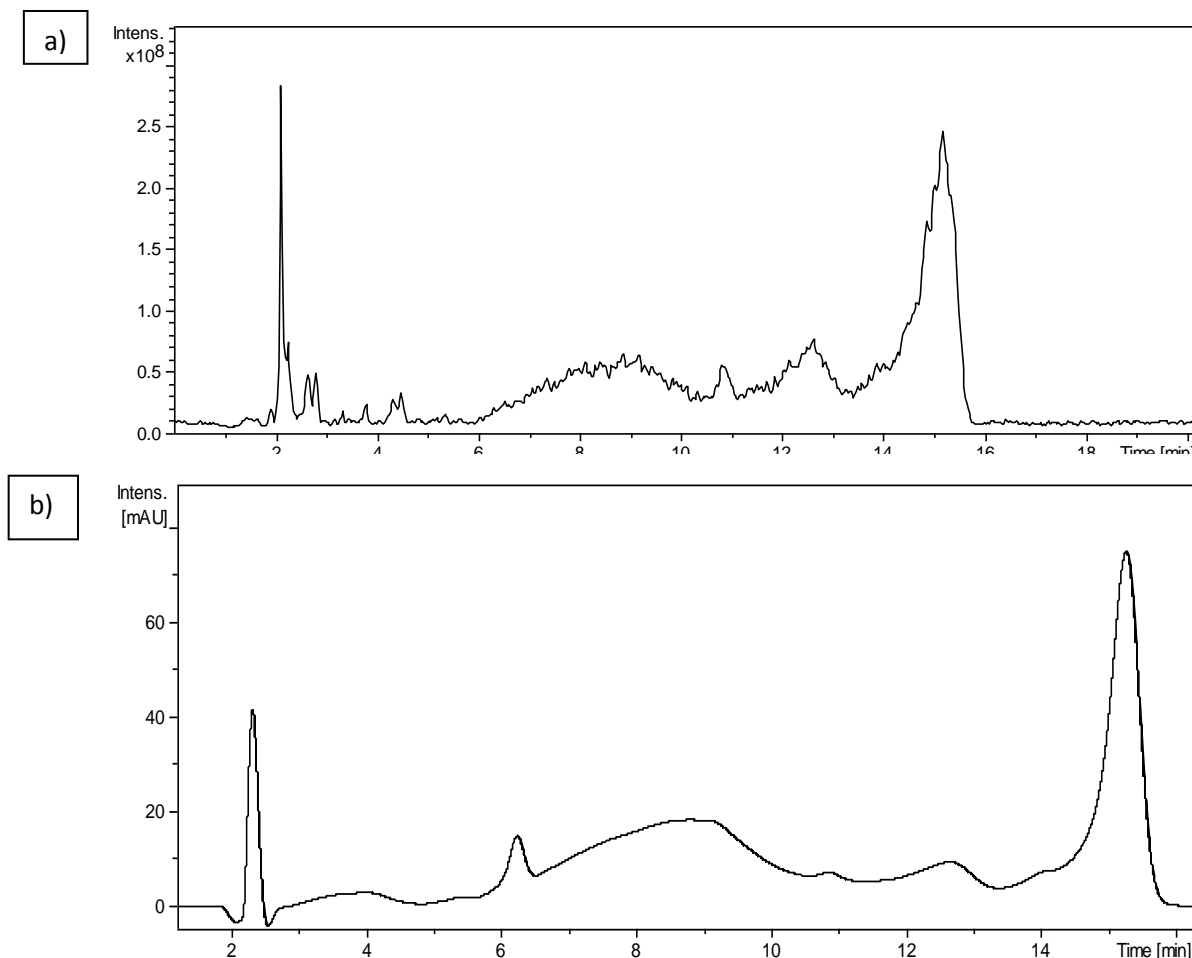


**Figura 33:** Representação dos espectros UV/vis das três amostras, A, B, e C.

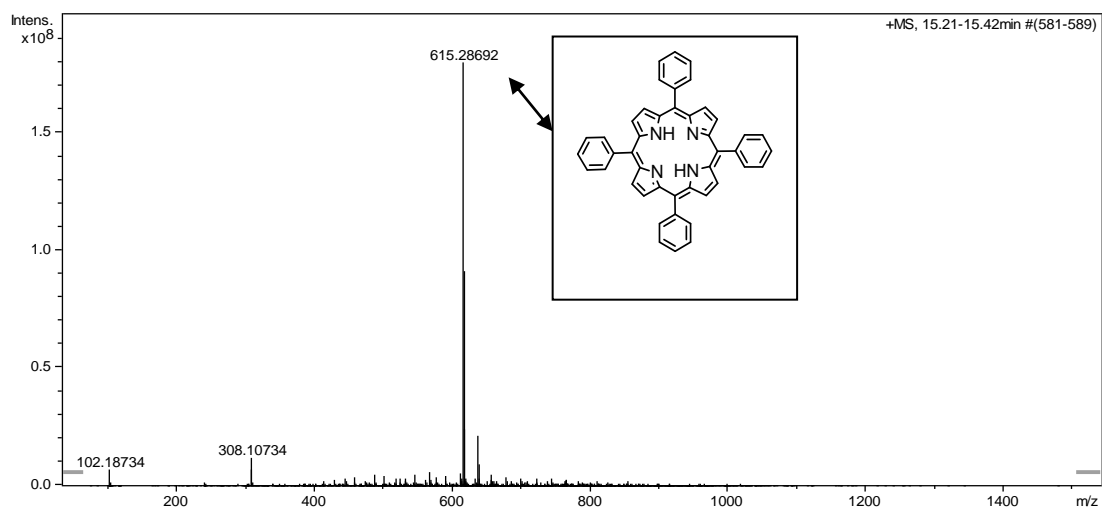
Logo nas duas primeiras amostras foi visto que se tratam de porfirinas, uma vez que todas apresentam a banda Soret, e as quatro bandas Q características das porfirinas.

Seguidamente, foi feita a análise das três amostras por HPLC-MS, onde se verificou que estruturas porfirínicas estão presentes nas amostras A e B, mas não na amostra C, logo esta amostra foi desprezada.

### Amostra A (TPP)



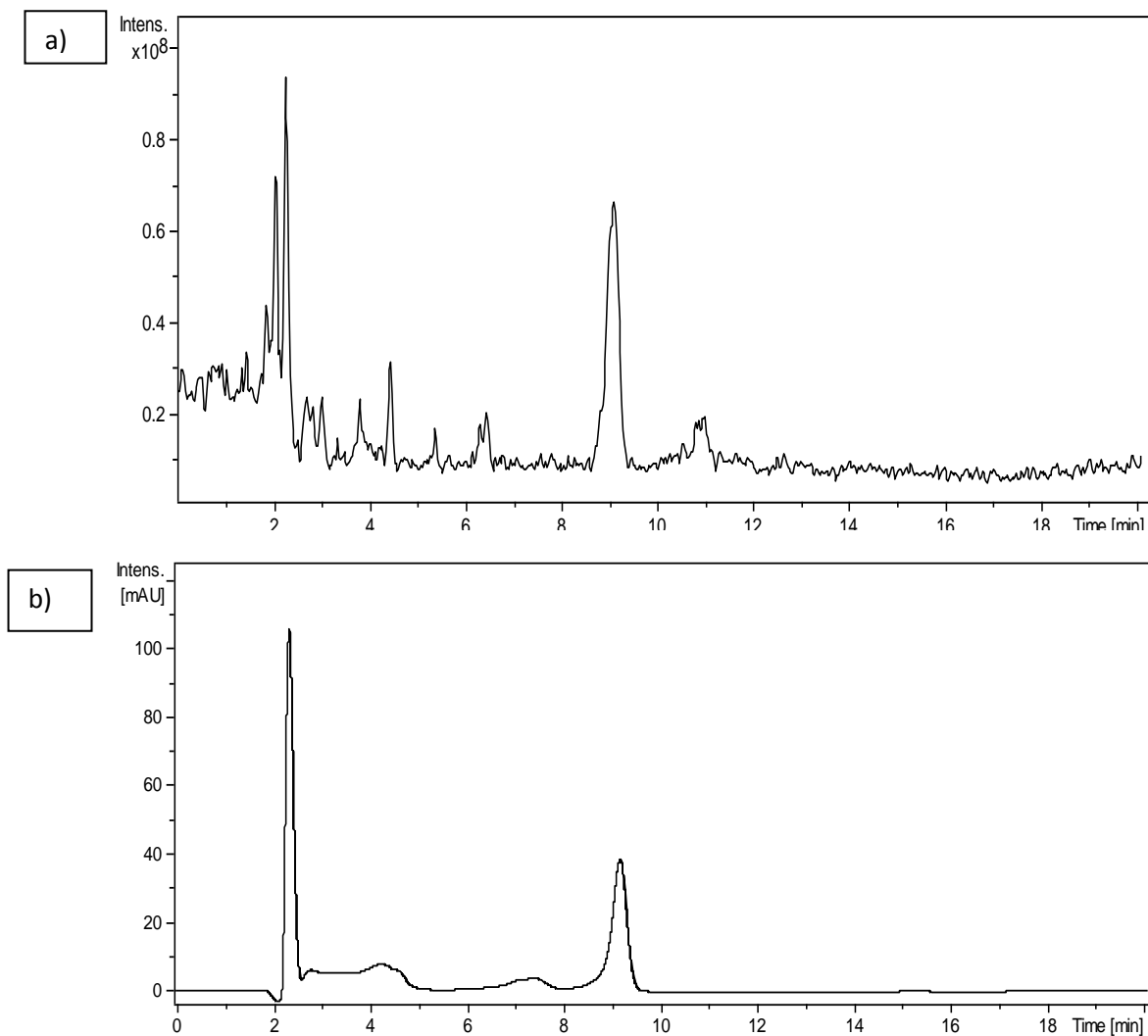
**Figura 34:** a) TIC ( Total ion Current) da espectrometria de massa para a mesma análise, b) Perfil do cromatograma com detecção por UV/vis a 420nm.



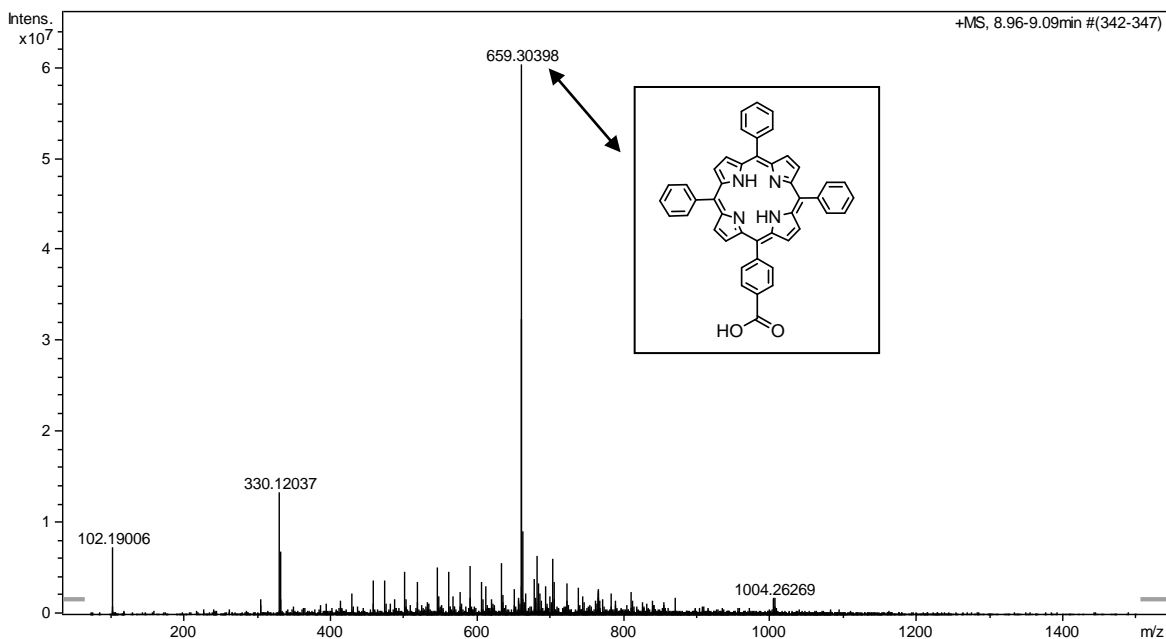
**Figura 35:** Espectro de massa da amostra A (TPP).



**Amostra B (MF)**



**Figura 36:** a) TIC ( total ion current) da espectrometria de massa para a mesma análise, b) Perfil do cromatograma com detecção por UV/vis a 420 nm.

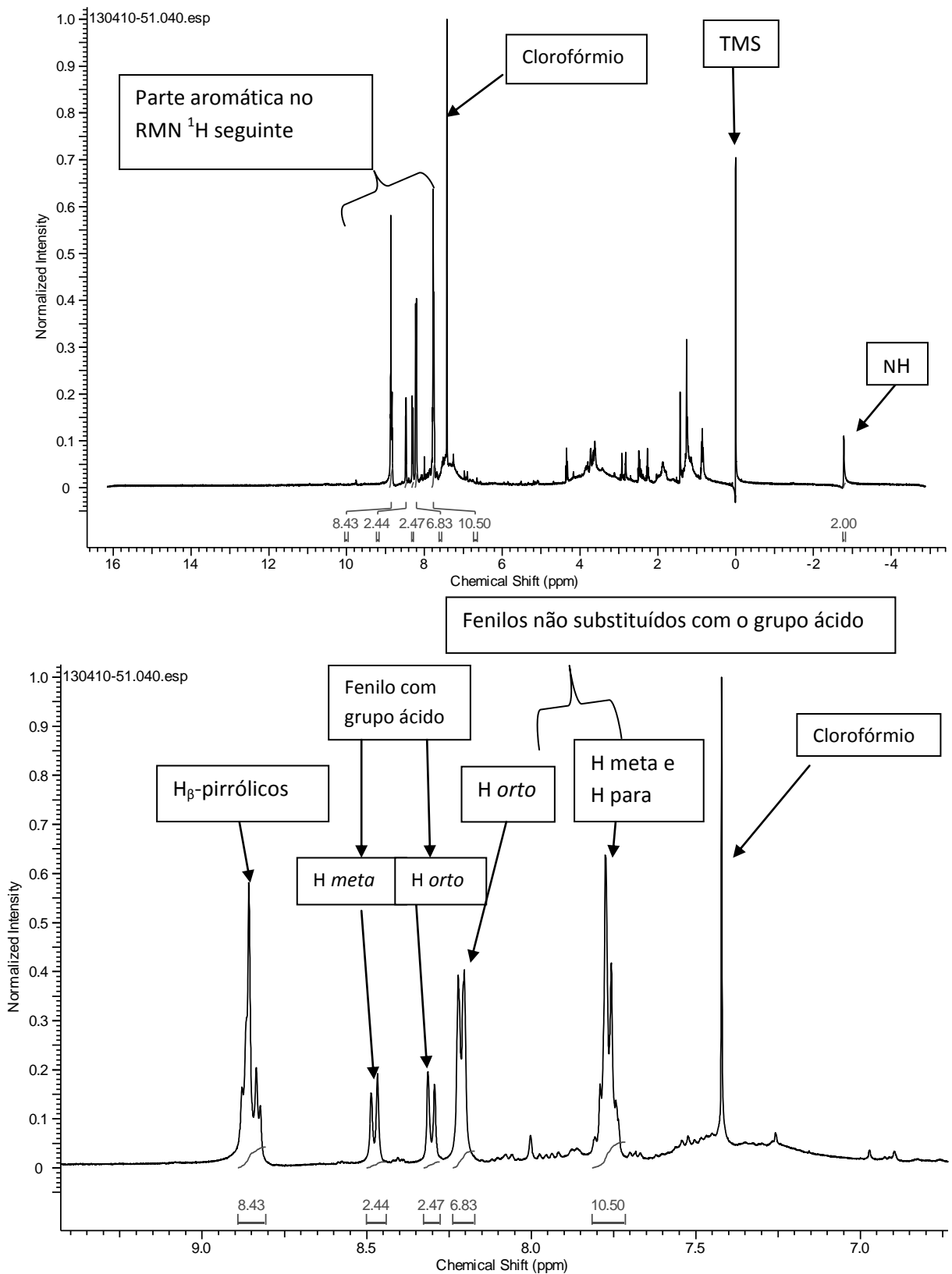


**Figura 37:** Espectro de massa da amostra B (MF), pico 1.

Na amostra A (TPP) foi detetada a TPP com um tempo de retenção de 15,21 minutos, (figura 34). Pela espectrometria de massa (figura 35) foi visto o ião molecular  $[M+H]^+$  com  $m/z=615,3$  que corresponde a TPP, sendo que a massa teórica do ião molecular é de 615,2.

Na amostra B (MF) (figura 36), foi detetada a porfirina MF com um tempo de retenção de 8,96 minutos, e pela espectrometria de massa (figura 37) foi visto o ião molecular  $[M+H]^+$  com  $m/z=659,3$  que corresponde a MF uma vez que a massa do ião molecular teórica é de 658,2.

Pelo resultado dos cromatogramas obtidos e pela análise dos respetivos espectros de massa foram detetadas porfirinas diferentes consoante a risca que foi analisada, nas amostra A (TPP) e B (MF).



**Figura 38:** RMN  $^1\text{H}$  da porfirina MF em clorofórmio.

Os estudos de RMN  $^1\text{H}$  de porfirinas revelam a natureza aromática do seu macrociclo [56]. No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (figura 38) é possível verificar o elevado efeito de anisotropia magnética resultante do fluxo da corrente à volta do anel, através da grande diferença nos valores dos desvios químicos resultantes da ressonância dos prótons internos amínicos, -NH, a campos mais elevados ( $\delta$  entre -2 e -3 ppm). Logo no interior do anel sofrem uma grande blindagem porque o campo magnético gerado pelas correntes do anel tem sentido oposto ao do campo externo e conseqüentemente apresentam valores negativos para os desvios químicos [57].

Pelo contrário no exterior do anel, o campo magnético externo é fortemente reforçado por essas correntes e a ressonância destes prótons surge a valores de  $\delta$  entre 8 a 9 ppm) [15, 57].

Os sinais com desvios químicos de 8,3 a 8,5 ppm, aproximadamente, são característicos do benzeno substituído com o grupo carbonilo. Estes apresentam-se na forma de dupletos (figura 38). Os prótons que apresentam maiores desvios químicos são os H *meta*, uma vez que devido a presença do grupo substituinte na posição *para* vai haver maior desblindamento, e assim maiores desvios químicos. Os prótons com menor desvio químico são os H *orto*, devido à explicação anterior.

Os prótons com desvios químicos entre 8,2 a 8,1, são os prótons da posição H *orto* dos anéis aromáticos não substituídos, estes aparecem na forma de dupletos, e como sofrem desblindagem do anel porfirínico aparecem com maiores desvios químicos que os H *meta* e que os H *para*, enquanto que os prótons com desvios químicos de 7,7 a 7,8 correspondem a uma sobreposição dos sinais dos prótons do anel aromático não substituído na posição H *meta* e na posição H *para*, pelo que se apresentam na forma de multipletos.

Pelo RMN  $^1\text{H}$  da porfirina MF, vemos que este apresenta todos os desvios químicos característicos da MF, pois trata-se de uma porfirina monofuncionalizada.

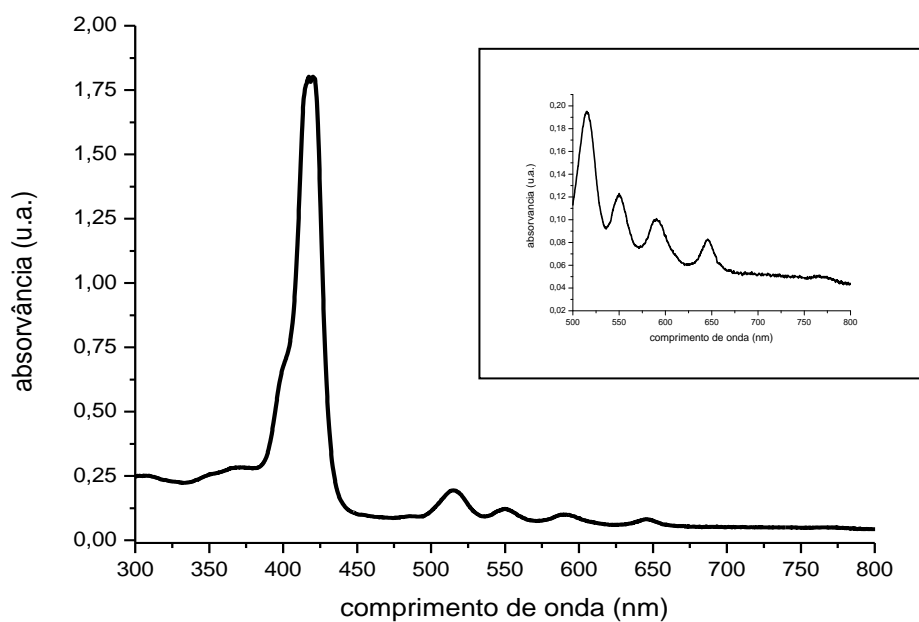
### **3.4) Discussão sobre a síntese da 5-(4-clorocarbonil-fenil)-10,15,20-meso-trifenil-21H, 22H-porfirina, (MF-COCl)**

Para a ativação do carbono do grupo carbonilo da MF obtida na secção 2.4, foi então feita a síntese descrita na secção 2.5. Esta ativação é necessária para se poder depois ligar a diamina (hexa-metileno-diamida). A reação descrita foi seguida por TLC (figura 39).

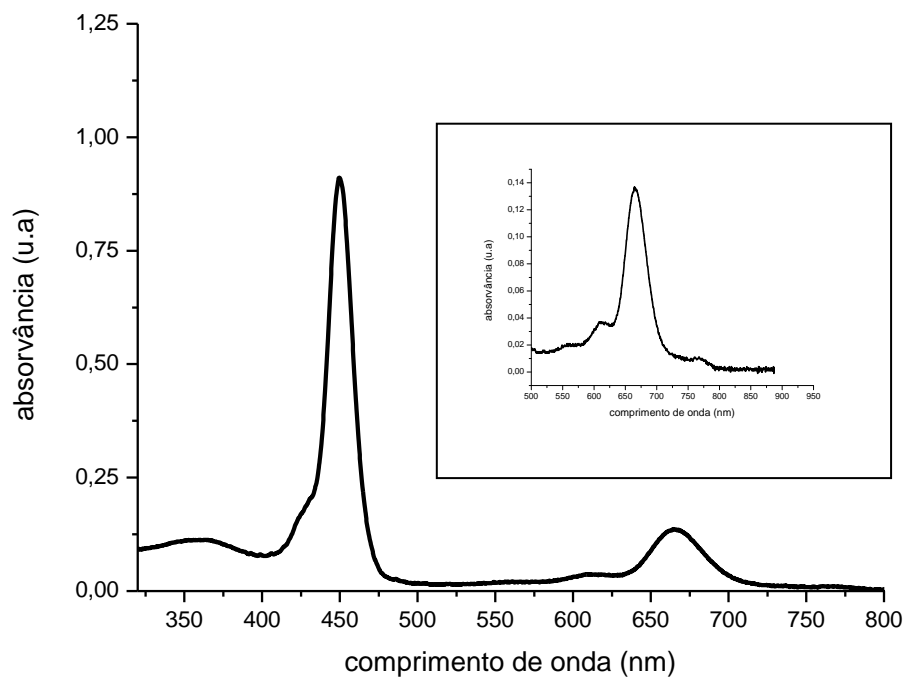


**Figura 39:** TLC da reação de síntese da MF-COCl.

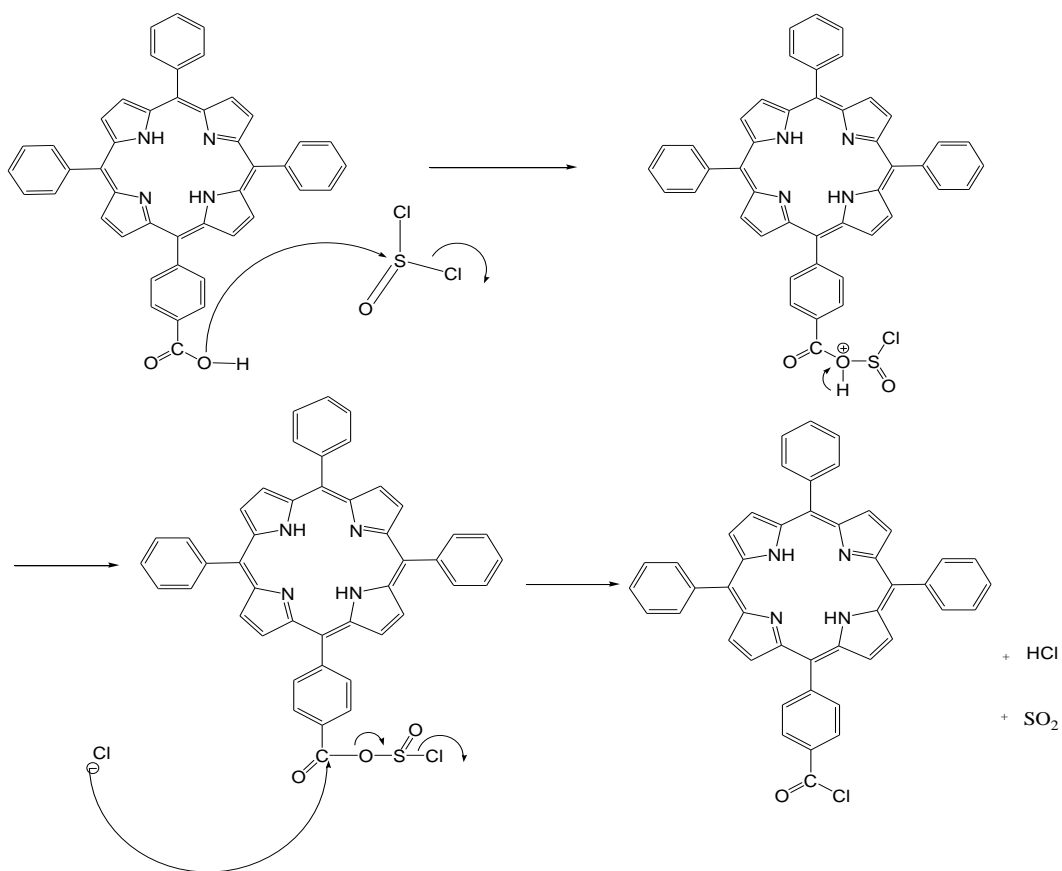
As figuras 40 e 41 mostram os espectros obtidos para o produto da reação. O mecanismo proposto para esta reação apresenta-se na figura 42.



**Figura 40:** Espectro UV/vis da MF-COCl.



**Figura 41:** Espectro UV/vis do dicatão da MF-COCl.



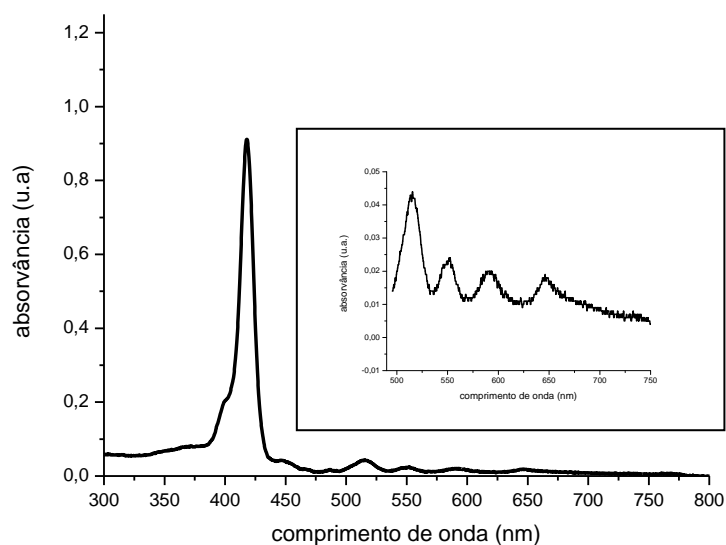
**Figura 42:** Mecanismo proposto para a reação da MF com cloreto de tionilo.

O espectro de UV/Vis da figura 40 , apresenta uma banda Soret com um máximo de comprimento de onda de 420 nm, e as suas respectivas bandas Q tem um comprimentos de onda de 515 nm, 550 nm, 590 nm e 644 nm. Para a realização deste espectro foi necessário neutralizar a porfirina por meio de adição de uma pequena quantidade de  $K_2CO_3(s)$  uma vez que esta se encontrava na sua forma ácida devido ao cloreto de tionilo.

O espectro de UV/vis do dicatão da figura 41, apresenta a banda Soret com o máximo no comprimento de onda de 450 nm, e aa bandas Q apresentam comprimentos de onda de 611 nm e 665,7nm.

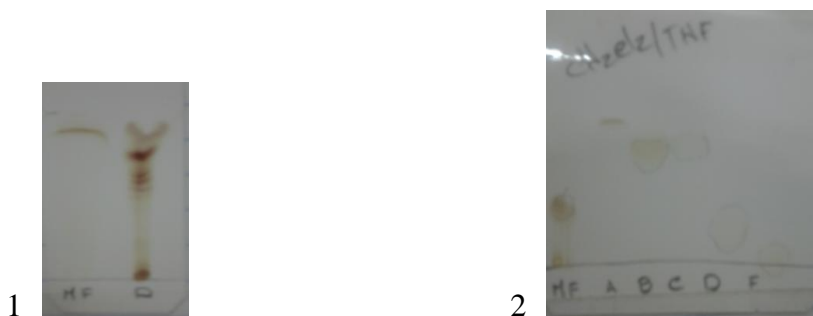
### 3.5) Discussão sobre a síntese da bis (*meso*-tetraquis-5,10,15-trifenil-20-(*p*-carboxifenil)-porfirinil) -1,6-hexanodiamida, (MF-CONHC<sub>6</sub>H<sub>12</sub>NHCO-MF)

A síntese da da bis (*meso*-tetraquis-5,10,15-trifenil-20-(*p*-carboxifenil)-porfirinil) -1,6-hexanodiamida,(MF-CONHC<sub>6</sub>H<sub>12</sub>NHCO-MF) ,(dímero) está descrita na secção 2.6, no fim da síntese e antes da separação da amostra por cromatografia preparativa em sílica foi feito um espectro de UV/vis ( figura 43). A reação foi também seguida por TLC para se poder verificar quantas riscas de compostos diferentes obtivemos (figura 44).

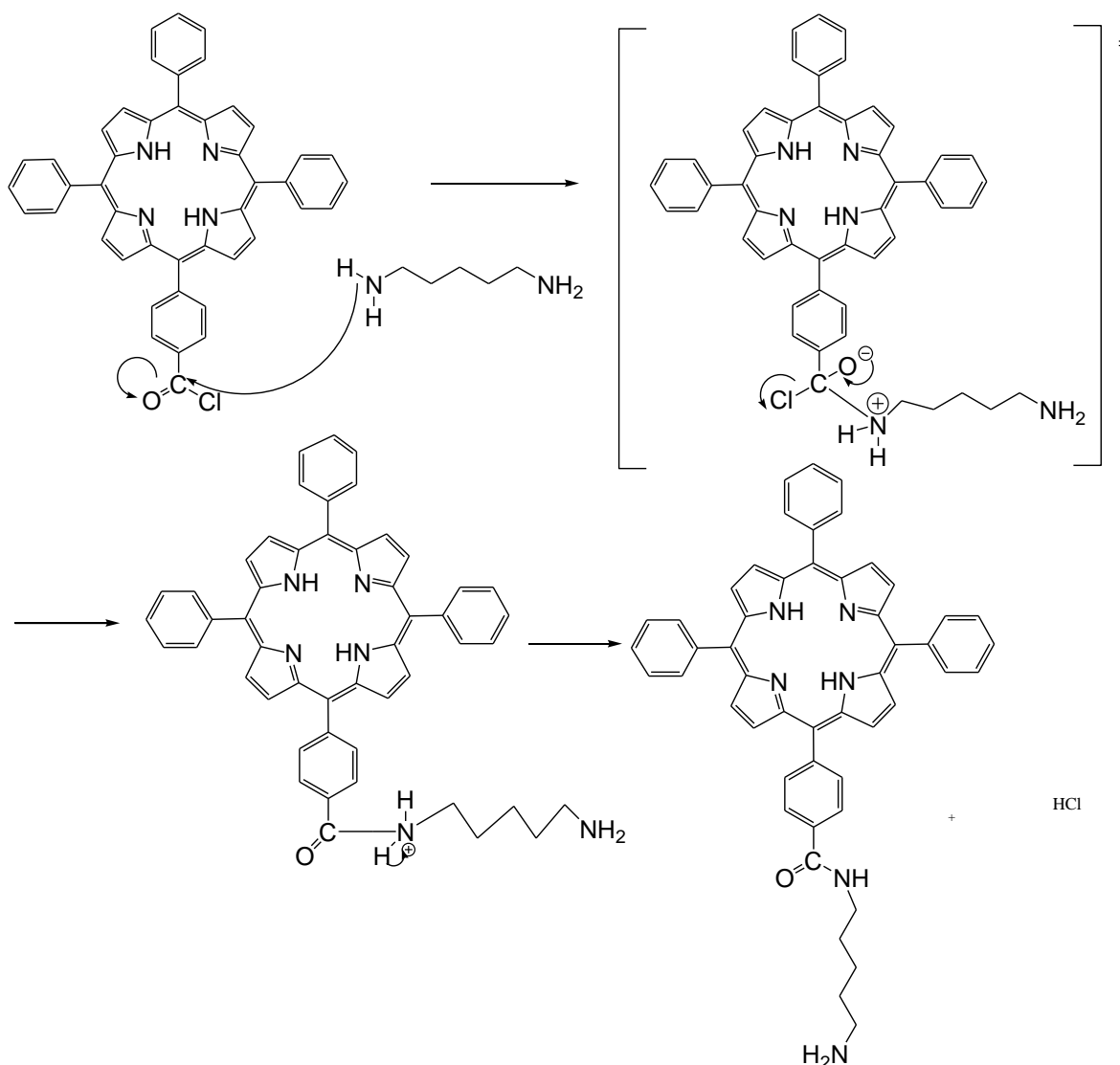


**Figura 43:** Espectro UV/ Vis antes da separação por placas de sílica onde mostra que existe porfirina na mistura de reação.

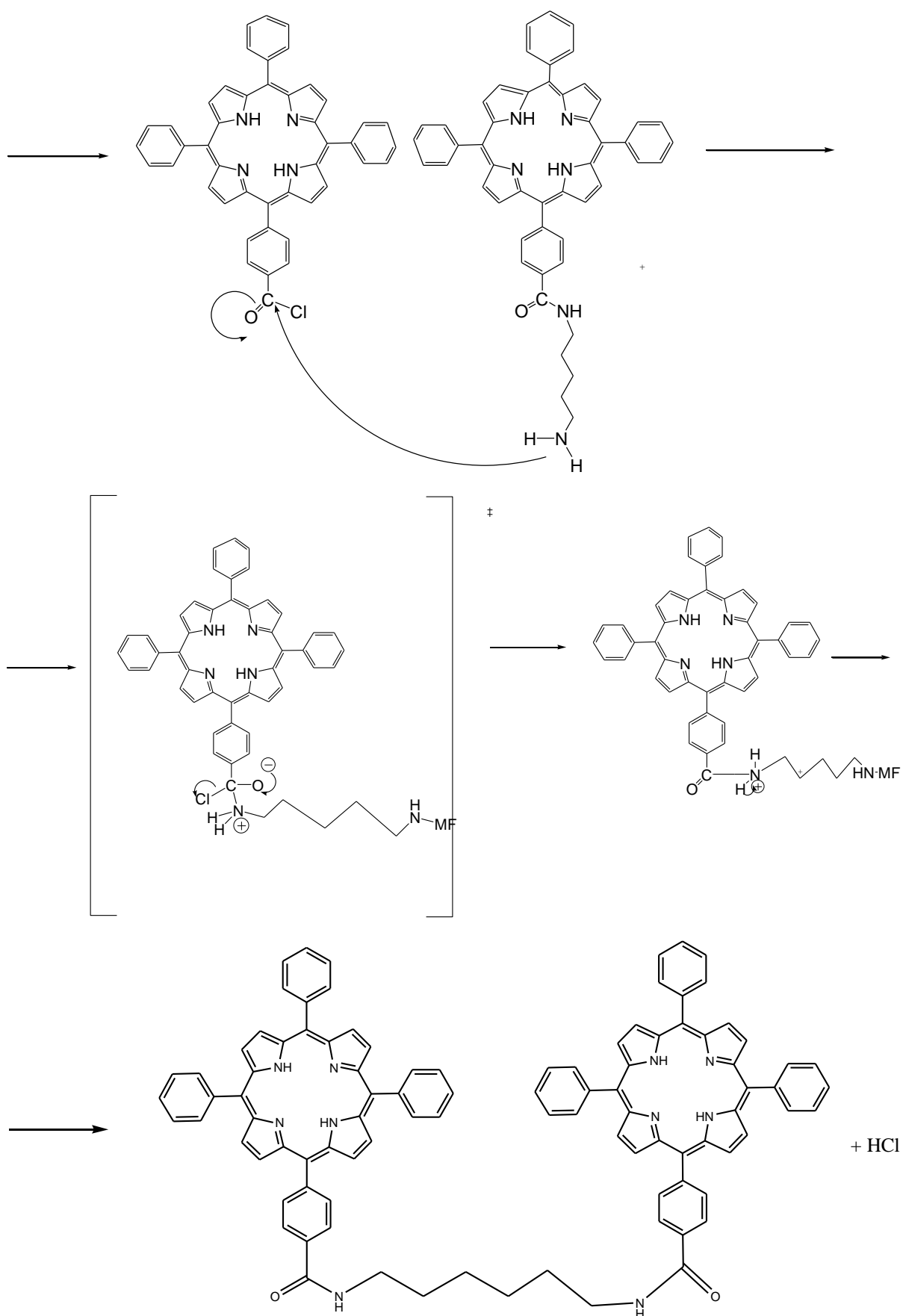
O espectro de UV/vis da figura 43, mostra a banda Soret com um máximo no comprimento de onda de 417 nm, e as respectivas bandas Q nos comprimentos de onda de 515 nm, 550 nm, 589 nm e 650 nm, mas apesar de ter bandas características de uma porfirina, não se pode dizer qual é a porfirina que apresenta estes valores. Logo foi necessário fazer HPLC-DAD ( figura 46) para tentar caracterizar as porfirinas presentes na amostra.



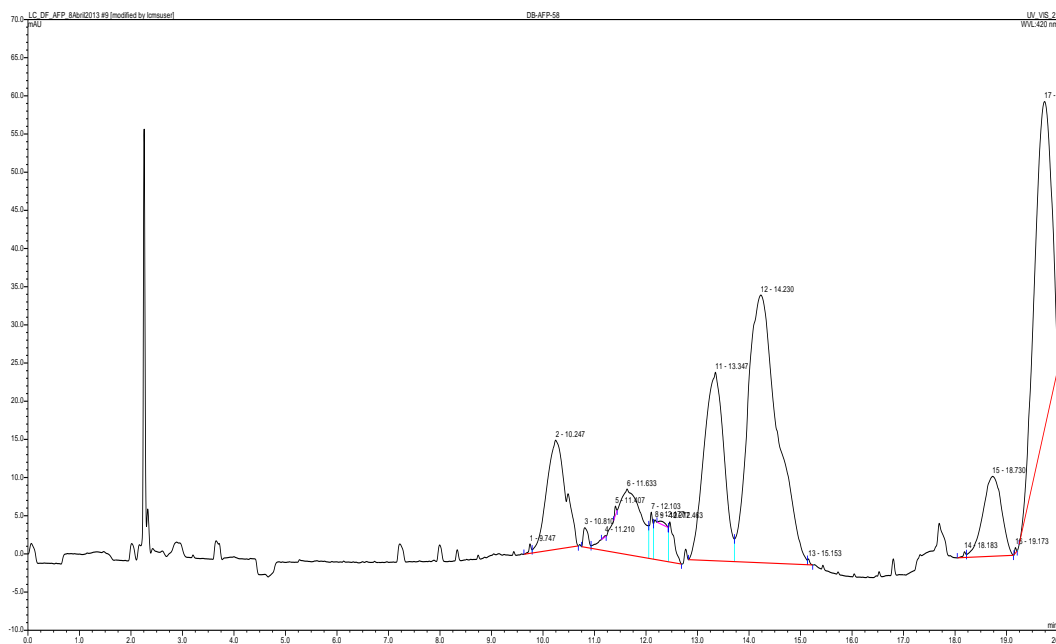
**Figura 44:** TLC 1, da solução orgânica obtida antes de fazer separação por placas de sílica, TLC 2 das várias bandas obtidas depois de separadas por placas de sílica.







**Figura 45:** Mecanismo proposto para a síntese da porfirina dimérica.



**Figura 46:** Resultado do cromatograma, antes de fazer a separação da amostra por cromatografia preparativa em sílica, onde se verificou serem todas porfirinas.

Depois desta análise, sem efetuar nenhuma separação por cromatografia preparativa em sílica, (figura 46), verificou-se a presença de vários picos com tempos de retenção diferentes.

Assim por esta pequena análise pode-se dizer que tratam-se de várias amostras que podem ser porfirinas, uma vez que apresentam tempos de retenção diferentes entre elas.

No fim desta análise feita por cromatografia líquida de alta eficiência foi necessário separar a amostra para ver quantas porfirinas diferentes esta amostra possui (TLC1 da figura 43). Assim por cromatografia preparativa em sílica vimos várias riscas (A,B,C,D e F), como descrito na secção 2.6, e foi feito outro TLC para comprovar se eram todas as riscas diferentes ou não. Foi considerado que a risca pertencente a amostra C trata-se da mesma que a amostra B, pois o TLC2 das 5 amostras da figura 43 mostra que a amostra B e a amostra C tem o mesmo RF, logo não foi analisada por MS direto. Também se verificou esta igualdade nas placas de sílica preparativa uma vez que só apareceram 4 riscas em vez das 5 riscas esperadas na grande maioria das placas separadas.

Foi necessário fazer a caracterização mais específica para poder verificar qual era a amostra correspondente ao dímero de porfirina que nos interessa.

Para caracterizá-las foi feito o estudo destas amostras obtidas (A, B, D e F) por espectrometria de massa direta (figura 47 e 48) sendo que as amostras D e F não deram porfirinas, logo foram excluídos.

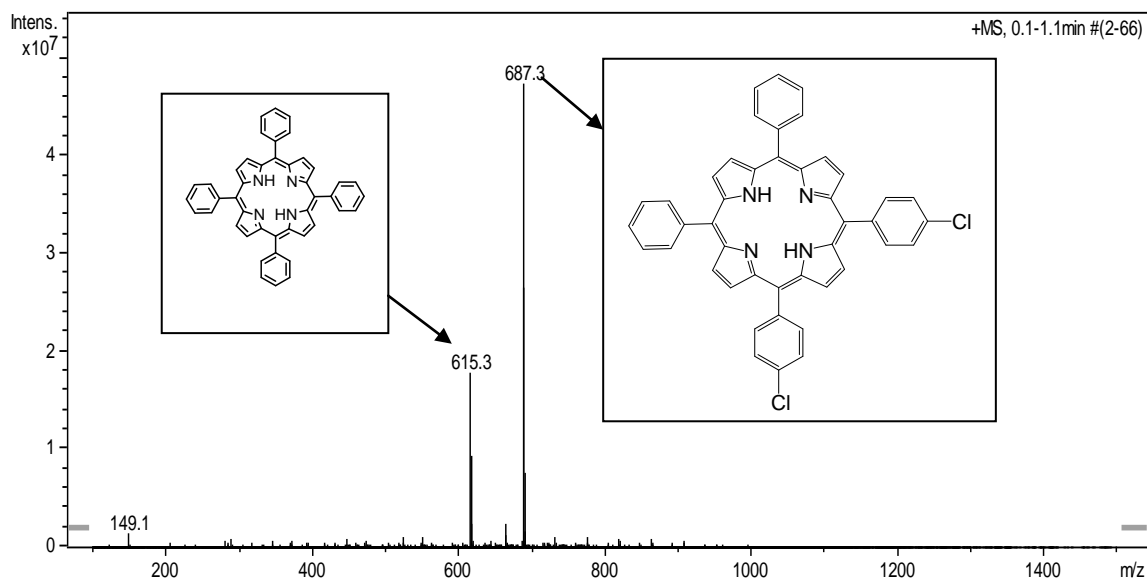
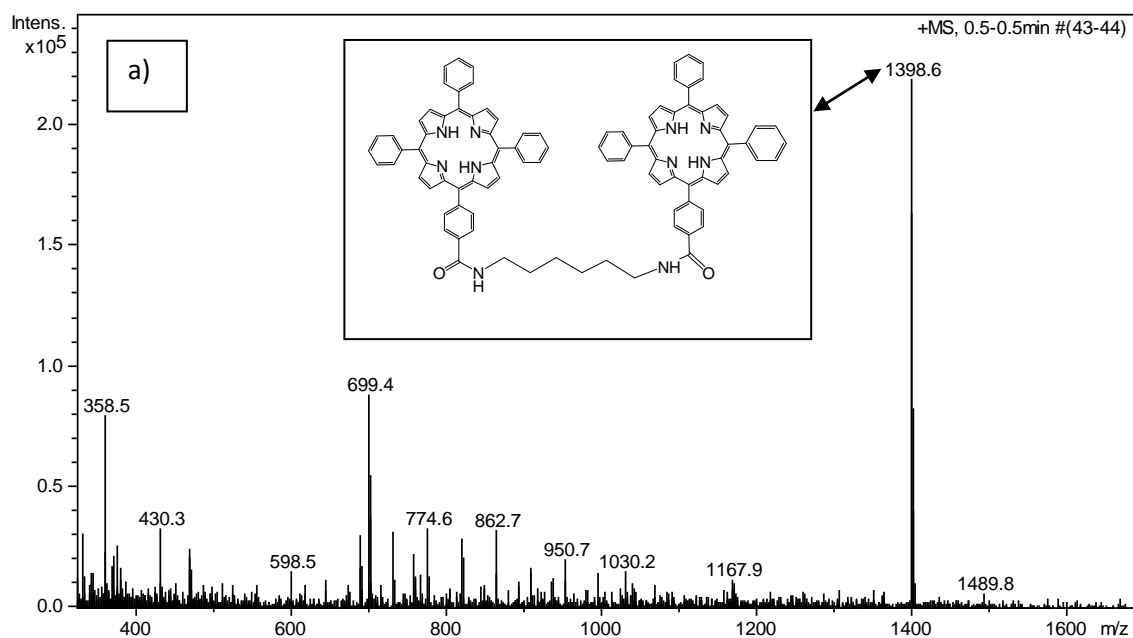
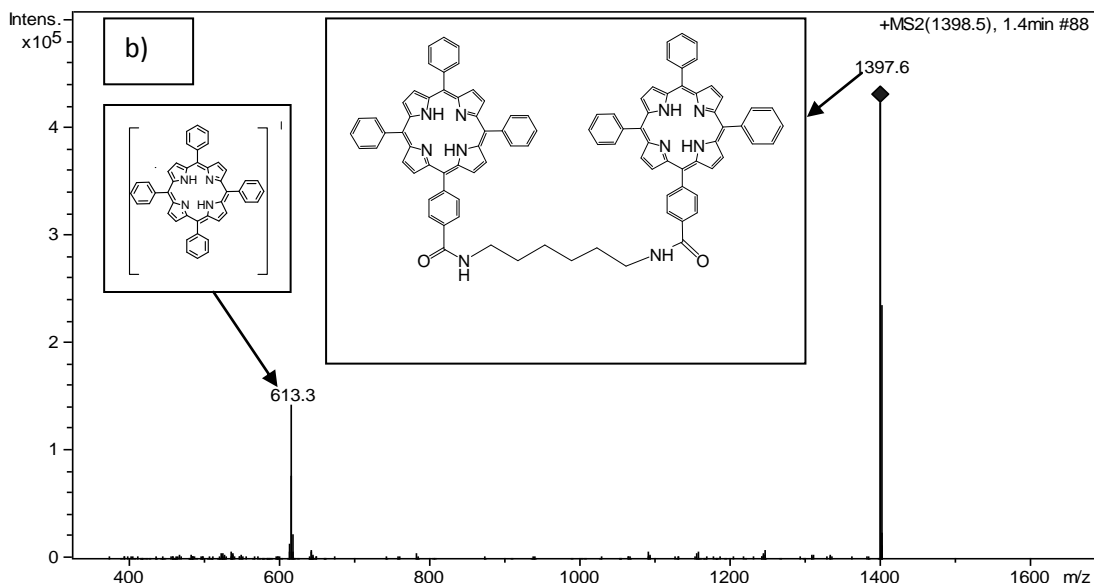


Figura 47: Espectro de massa da amostra A.





**Figura 48:** a) Espectro de massa da amostra B, b) Respetiva fragmentação  $m/z$  do ião 1397,6.

Na amostra A (figura 47), por MS direto foram detetadas duas porfirinas diferentes, a TPP e a TPPCl, uma vez que amostra de MF que foi utilizada nesta síntese e sintetizada na secção 2.4 ainda continha uma pequena quantidade de TPP, apesar ser uma quantidade pequena, e esta por sua vez sofreu cloração na presença do cloreto de tionilo.

Na amostra B (figura 48), apresenta um espectro de massa direto onde foi identificado o dímero de interesse, este dímero apresenta uma massa do ião molecular  $[M+H]^+$  com  $m/z=1397,6$ , sendo que o seu valor teórico calculado é de 1396,5.

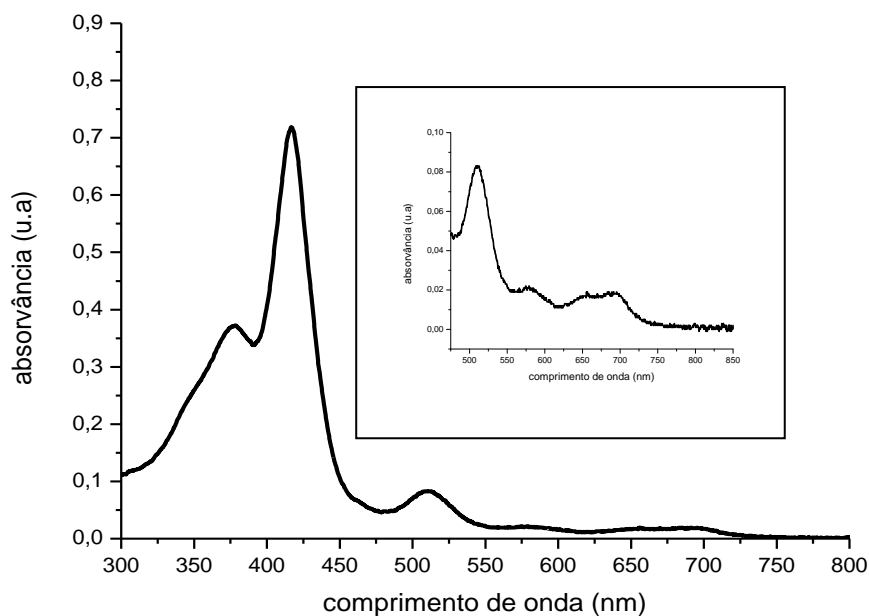
Nas duas amostras seguintes, D e F não foi detetada qualquer porfirina pelo espectro de massa, logo estas duas amostras foram consideradas subprodutos da reação ou polímeros formados ao longo da síntese.

### 3.6) Discussão sobre a síntese da 5,10,15,20-*meso*-tetra-fenil-ferro(II)-porfirina (TPP-Fe (II))

A metalção de porfirinas com Fe(II) é muito importante para este estudo uma vez que a porfirina do grupo heme está metalada com o ião  $Fe^{2+}$ . Assim pretende-se verificar a eficiência da síntese, para depois poder usar na estrutura dimérica.

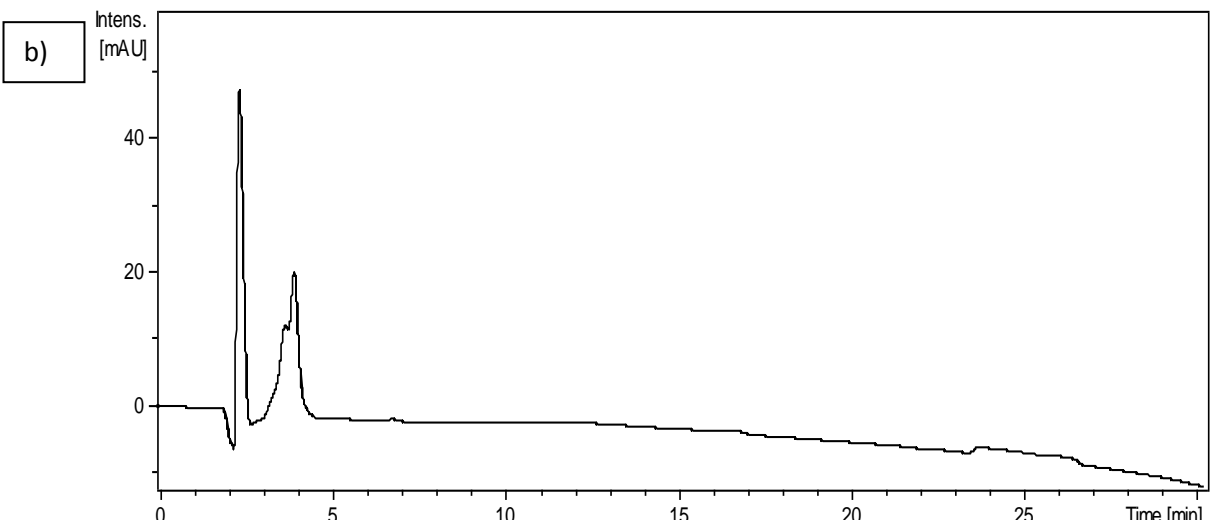
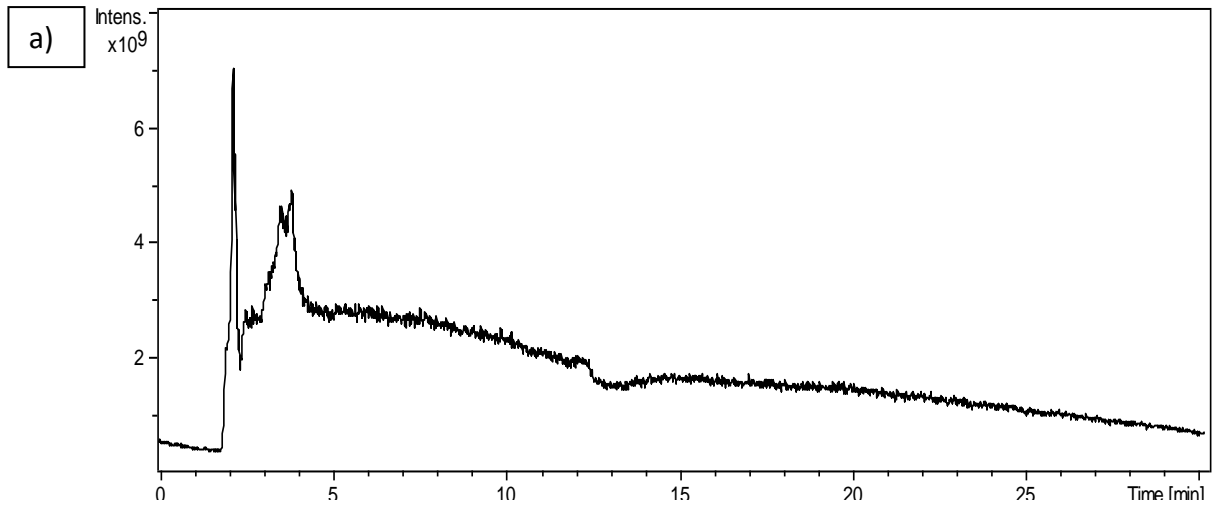
A síntese da TPP-Fe(II) foi descrita na secção 2.7. Após a síntese e cristalização do composto foi feito o espectro UV/vis ( figura 49) para se poder comparar os resultados, e

verificar-se se houve ou não metalação da porfirina. Seguidamente foi também feita a análise da amostra por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção de UV/Vis e detecção de espectrometria de massa, para se estudar esta amostra.

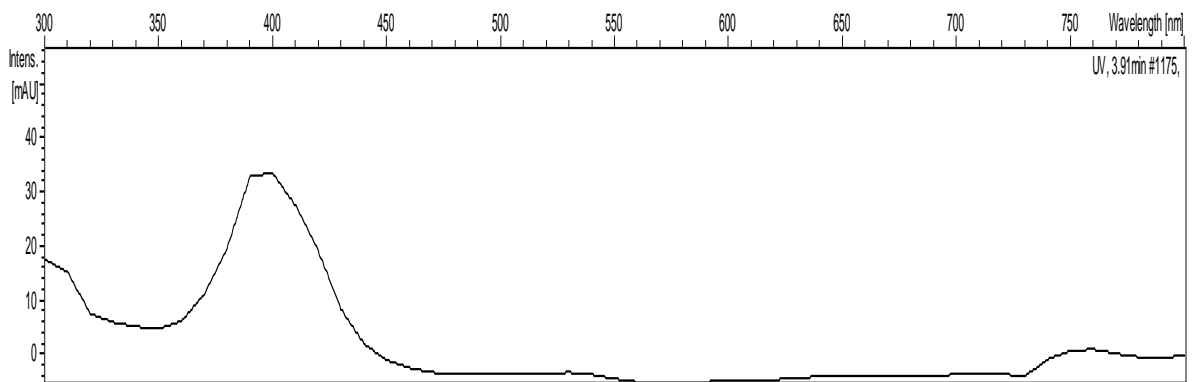


**Figura 49:** Espectro UV/vis da TPP-Fe (II).

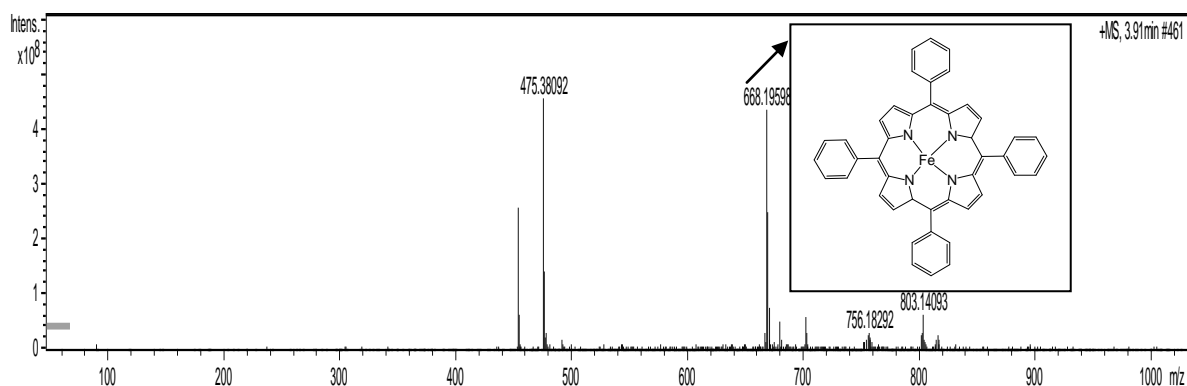
Pelo espectro de UV/vis da figura 49, vemos a presença da banda Soret, com um máximo no comprimento de onda de 418 nm, e a presença de duas bandas Q características das metaloporfirina de comprimentos de onda de 510 nm e 582 nm. No caso das metaloporfirinas a presença de um metal no centro do macrociclo, afeta de forma determinante o respetivo espectro de UV/vis, na medida em que ocorre um aumento de simetria do anel porfirínico, relativamente às porfirinas de base livre e também devido à existência de acoplamento spin-orbital entre os eletrões  $\pi$  do macrociclo e os eletrões do metal central [32, 58].



**Figura 50:**a) TIC ( total ion current) da espectrometria de massa para a mesma análise, b) Perfil do cromatograma com detecção por UV/vis a 420 nm.



**Figura 51:** Espectro UV/vis do analito a 3,91 minutos.



**Figura 52:** Espectro de MS da TPP-Fe (II).

Nas análises por HPLC (figura 50) e respetivo MS (figura 52) foi detetada a TPP-Fe(II), com uma massa do ião molecular  $[M+H]^+$  com  $m/z=668,1$ , sendo que a sua massa teórica calculada do ião molecular é de 670,1.

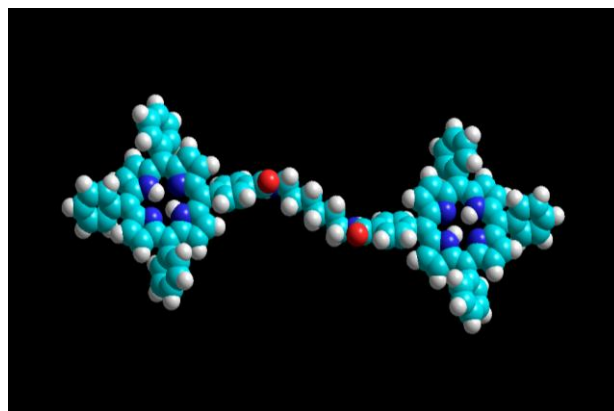
### **3.7) Modelação computacional da bis (*meso*-tetraquis-5,10,15-trifenil-20-(*p*-carboxifenil)-porfirinil) -1,6-hexanodiamida, coordenado com ferro (II)**

Os estudos de substitutos do heme requerem tanto um componente sintético para a preparação de estruturas supramoleculares como também estudos sobre a inserção de ferro nessas supra-estruturas.

Em paralelo, precisamos de realizar estudos computacionais para avaliar se o ferro (II) não vai perturbar a estabilidade das supramoléculas.

De facto a síntese do dímero requer, a síntese de porfirina monofuncionalizada, e a capacidade de introduzir catiões Fe (II) dentro das porfirinas, sem haver grandes alterações no seu comportamento.

### 3.7.1) Otimização geométrica da estrutura



**Figura 53:** Estrutura do dímero da porfirina após AM1.

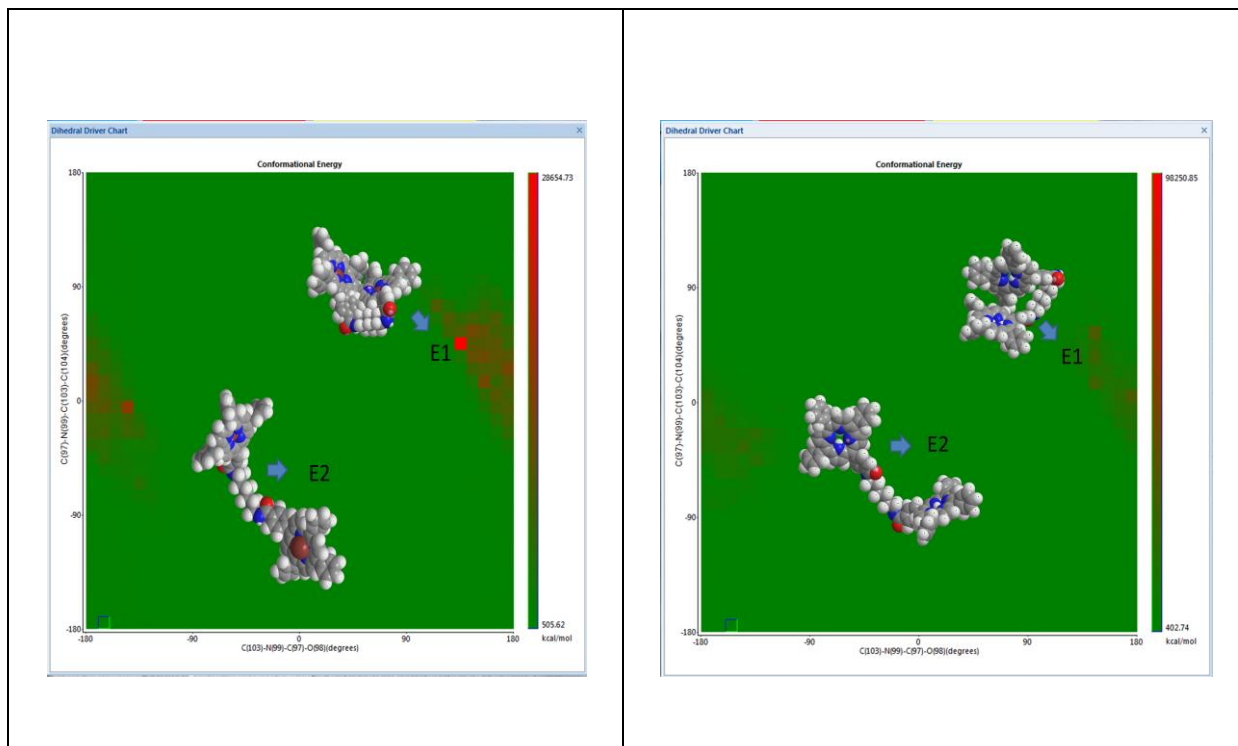
A figura 53 apresenta a estrutura do dímero da porfirina após a otimização geométrica semi empírica (AM1). AM1 é um método semi-empírico para o cálculo do quantum de estrutura eletrônica molecular com base na negligência de aproximação integral da sobreposição diferencial diatômica. A otimização da geometria usa um algoritmo de gradiente conjugado para minimização de energia no vácuo, com um gradiente final de 0,1 Kcal / A mol.

Para a simulação realizada foi usado o software Chem Bio 3D Ultra de 2012.

### 3.7.2) Análise conformacional

A busca conformacional em torno da principal ligação da amida que liga as duas unidades da porfirina dimérica e o seu complexo de ferro (II), mostrou que a coordenação de Fe (II) induz conformações de mais elevada de energia (devido à posição de "fora do plano" do ferro no interior da porfirina), o comportamento geral é o mesmo tanto para o complexo de Fe (II), como para o dímero de porfirina de base livre: ambos têm uma região de alta energia (E1), onde há aproximação das duas partes da porfirina e um vale de baixa energia principal (E2) em que o dímero é basicamente alargado. Isto mostra que o dímero será principalmente estendido na ausência de forças externas, e também que o Fe (II) não afetará significativamente as propriedades conformacionais da supramolécula, o que é exatamente o que pretendemos, pois assim mostra a possibilidade de introduzir o ferro (II) na estrutura dimérica, sem haver grandes alterações na sua estabilidade (figura 54).





**Figura 54:** Mapa coMFormacional com ferro(II) e sem ferro(II) do dímero.

O modelo do dímero de porfirina coordenado com ferro (II), mostra a estabilidade conformacional da nossa supramolécula dimérica. Isso reforça a potencial aplicabilidade desta molécula, prevendo que a coordenação e transporte de oxigênio nestas moléculas podem ser úteis para o estudo de materiais substitutos de sangue.



# Capítulo 4



## 4) Conclusão

A busca de novos modelos de porfirinas para transporte de oxigênio no sangue é um fator muito importante nos dias de hoje devido à escassez de sangue e aos problemas que existem para a saúde relativos à sua pureza.

A nível forense, é muito importante o estudo destas novas estruturas uma vez que o sangue é uma matriz biológica de grande interesse na investigação forense.

O trabalho que deu origem aos resultados apresentados nesta dissertação de mestrado, foi a construção de sistemas porfirínicos diméricos, bis (*meso*-tetraquis-5,10,15-trifenil-20-(*p*-carboxifenil)-porfirinil) -1,6 hexanodiamida), como modelos de estruturas com grande possibilidade de fazerem transporte de oxigênio no sangue e serem um bom substituto da hemoglobina.

Assim, numa primeira fase foi possível sintetizar várias porfirinas e foi possível caracterizá-la por HPLC-MS (ESI), por espectroscopia de UV/vis e também, no caso da MF, por RMN <sup>1</sup>H.

Para se iniciarem os estudos da estrutura dimérica foi necessário sintetizar a 5-(4-carboxi-fenil)-10,15,20-*meso*-trifenil-21*H*, 22*H*-porfirina (MF), sendo então esta estrutura capaz de se ligar à diamida desejada, (hexa-metileno-diamida) depois de ativada com o cloreto de tionilo e assim formar o dímero pretendido

Os resultados obtidos na síntese da MF foram bastante positivos, uma vez que foi possível caracterizar e isolar esta estrutura. Através do HPLC, vê-se que a MF tem um tempo de retenção de aproximadamente 9,11 minutos e pelo MS vemos que tem uma razão *m/z* de 659,3.

O estudo da porfirina (MF) por RMN <sup>1</sup>H veio a enriquecer esta análise, uma vez que este RMN <sup>1</sup>H apresenta as características estruturais esperada da MF.

Depois do estudo da MF, foi possível prosseguir com a síntese do dímero. O método de síntese utilizado permitiu obter a estrutura dimérica desejada, tendo a espectrometria de massa mostrado o íão molecular que se pretendia.

Por fim, o modelo do dímero de porfirina coordenado com ferro (II), mostra a estabilidade conformacional da supramolécula dimérica. Segundo os cálculos computacionais realizados verificou-se que a estabilidade do dímero não sofre grandes alterações quando ocorre a metalação com o Fe (II). Isso reforça a potencial aplicabilidade desta molécula,

prevendo-se que a coordenação e transporte de oxigénio nestas moléculas possam ser úteis para o estudo de materiais substitutos de sangue.

# Referências

- [1] Walker P., Wood E., “Forensic Science Experiments”, Text and artwork copyright 2010 by Infobase Publishing.
- [2] Marinkovic N., Vilic J.V, “ Correlation between the lengths of the long bones of the forearm and the fibula with body height in our population”, *Vojnosanitetski pregled* 2012 Volume 69, 5, 394.
- [3] Hoeffler, K., “Risk Criminology”, *Monatsschrift fur kriminologie and strafrechtsreform* , 2012, vol 9, 4, 252.
- [4] Pollanen, Michael S., ”Forensic Science Medicine and Pathology”, 2012, vol 8, 3, 285.
- [5] Goodman, J., “Crime and socioeconomic conditions: Evidence for non-cultural domain specificity in evolutionary forensic psychology”, *Aggression Violentebehavior*, 2012, vol 17, 6, 523.
- [6] Bell, S., “Forensic Chemistry”, Upper Saddle River, New Jersey, 07458.
- [7] Manso, C., “Bioquímica Humana” 2ª edição, Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, 1977.
- [8] Zhao, GJ (Zhao, Guanjia); Viehrig, M (Viehrig, Marlitt); Pumera, M (Pumera, Martin), “Challenges of the movement of catalytic micromotors in blood”, *Lab on a Chip*, 2013, vol 13, 10, 1930.
- [9] Nelson, D. L., Cox, M. M., “ Lehninger Princípios de Bioquímica”, W.H.Freeman and Company, New York, New York and Basingstoke, Copyright 2000 by Worth Publishers, Inc.
- [10] Castro, C. I. and Briceno, J. C., “Perfluorocarbon-Based Oxygen Carriers: Review of Products and Trials”, *Artif. Organs*, 2010, vol 34.
- [11] Sobral A. J. F. N., Melo S. M., Ramos M. L., Teixeira R., Andrade S. M. and Costa S. M. B.; *Tetrahedron Letters*, 2007, 48, 3145.
- [12] Di Natale C., Monti D., Paolesse R., *Mater. Today*, 2010, 13, 46.
- [13] Milgrom, L.R., “The Colors of Life: An introduction to the Chemistry of Porphyrins and Related Coumpounds”, 1997, Oxford University Press Inc: New York.
- [14] Smith K., Smith (ed.), K., “Porphyrins and Metalloporphyrins”, Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam, 1975.
- [15] Longuet-Higgins H.C., Rector C.W., Platt J.R., *J. Chem. Phys.*, 1950, 18, 1174.

- [16] Gosh A., *J. Porphyrins Phtalocyanines*, 2000,4,380.
- [17] Gouterman M. *J. Mol Spectrosc.*, 1961,6,138.
- [18] Platt P.R., *J. Chem. Phys.*, 1950, 18, 1168.
- [19] Gisbergen S. J. A., Ricciardi G., Rosa A., Baerends E. J., *J. Chem. Phys.*, 1999,111,2499.
- [20] Minaev. B., Wang J. H., Wang C. K., Luo Y., Agren H., *Spectrochim. Acta Part A*, 2006,65,308.
- [21] Akins D.L., Zhu H.-R., Guo C., *J. Phys. Chem.*, 1996, 100, 5420.
- [22] Guo X. M., *J. Molec. Struc.*, 2008, 892, 378.
- [23] Arnaut L. G., in *Inorganic Photochemistry*, 2011, Rudi Van Eldik, Grazyna Stochel, Poland.
- [24] Smith, K. M., “*Comprehensive Organic Chemistry- The Synthesis and Reactions of Organic Compounds*”, editado por Barton, D.; Ollis, W. D., Pergamon Press, Oxford, 1979.
- [25] Smith K. M., “*Porphyrins and Metalloporphyrins*”, Elsevier, Amsterdam, 1975, 10, 757.
- [26] Falk, J. E., “*Porphyrins and Metalloporphyrins*”, Elsevier, Amsterdam, 1964, 129.
- [27] Bearden, A. J., Moss, T. H., Caughey, W. S. and Beaudreau, C. A., “*Mossbauer Spectroscopy of Heme and Hemin Compounds*”, April 20, 1965.
- [28] Falk, J.E., “*Porphyrins and Metalloporphyrins: their general, physical and coordination chemistry, and laboratory methods*”, vol 2, 1<sup>a</sup> Edição Elsevier Publishing Company, Amsterdam, 1964, 3-94.
- [29] Gouterman M. *J. Chem. Phys.*, 1959, 30, 1139.
- [30] Sanders J.K.M., Bampos N., Clyde-Watson Z., Darling S.L., Hawley J.C., Kim H.-J., Mak C.C., Webb S.J., “*Axial Coordination Chemistry of Metalloporphyrins*” in *The Porphyrin Handbook*, 1999, Karl M. Kadish, Kevin M. Smith, Roger Guilard, Academic Press – Elsevier Science, USA.
- [31] Wijesekera T., Dolphin D., “*Synthetic Aspects of Porphyrin and Metalloporphyrin Chemistry*” in *Metalloporphyrins in Catalytic Oxidations 1994*, R.A. Sheldon, Marcel Dekker Inc., USA.
- [32] Adler A. D., Longo F. R., Kampas F., Kim J., *J. Inorg. Nucl. Chem.*, 1970, 32, 2443.
- [33] Rebelo S. L. H., Pereira M. M., Simões M. M. Q., Neves M. G. P. N. S. e Cavaleiro J.A.S., *J. Catalysis*, 2005, 76, 234.



- [34] Pires S. M. G., Paula R. D., Simões M. M. Q., Neves M. G. P. M. S., Santos I. C. M. S., Tomé A. C. e Cavaleiro J. A. S., *Catalysis Commun.*, 2009, 24, 11.
- [35] Balaban T. S., *Acc. Chem. Res.*, 2005, 38, 8.
- [36] Nardis S. e Donato M., *Sensors and Actuators B*, 2004, 103, 339.
- [37] Carré V., Gaud O., Bourdon I, Sylvain O., Spiro M., Blais J., Krausz, R. P. e Guilloton M., *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, 1999, 48, 57.
- [38] Pederson T. G. e Lynge T.B., *Thin Solid Films*, 2005, 477, 182.
- [39] Eichhorn H., *J. Porphyrins Phthalocyanines*, 2000, 4, 88.
- [40] Mittra R. A., Singerman L. J., *Optom. Vis. Sci.*, 2002, 79, 218.
- [41] Kulkarni A. D., Kuppermann B.D., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2005, 57, 1994.
- [42] Carvalho C. M. B., Gomes A. T. P. C., Fernandes S. C., Prata A. C. B., Faustino M. A. F., Tomé J. P. C., Neves M. G. P. M. S., Tomé A. C., Lin Z., Rainho J. P., Almeida M. A., Cunha M. A., Rocha J. e Cavaleiro J. A. S., *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, 2007, 88, 112.
- [43] Tomé J. P. C., Silva E. M. P., Pereira A. M. V. M., Alonso C. M. A., Faustino M. A. F., Neves M. G. P. M. S., Tomé A. C., Cavaleiro J. A. S., Tavares S. P. A., Duarte R. R., Caeiro M. F. e Valdeira M. L., *Bioorg. Med. Chem.*, 2007, 15, 4705.
- [44] Skoog D.A., Holler F. J., Nieman T. A., “Princípios de Análise Instrumental” Bookman, São Paulo, 2002.
- [45] Mohrig, J. R., Hammond, C. N., Schatz, P. F., “Techniques in Organic Chemistry”, third edition, W. H. Freeman and Company.
- [46] Simpson, CF, “Practical High Performance Liquid Chromatography”, Edited by Simpson CF. London: Heyden & Son; 1978.
- [47] Prichard E, MacKay GM, Points J, “Trace analysis: a structured approach to obtaining reliable results”, Cambridge: The Royal Society of Chemistry; 1996.
- [48] Sentell KB, Dorsey JG., *Anal. Chem.* 1989, 61, 930
- [49] Neue UD: *HPLC Troubleshooting*, Waters Corporation, 1999.
- [50] Stulik K, Pacakova V., *J. Electroanal. Chem.* 1981, 129:1-24.
- [51] Lim, Chang K., “High- Performance Liquid Chromatography and Mass Spectrometry of Porphyrins, Chlorophylls and Bilins”, 2010, vol.2, World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd.
- [52] Flanagan, R., et al., “Fundamentals of Analytical Toxicology”, 2007 West Sussex, England John Wiley & Sons, Ltd.

[53] Dass, C., *Fundamentals of Contemporary Spectrometry 2007*, John Wiley & Sons, Inc.

[54] Ashcroft, A.E. “Ionization Methods in Organic Mass Spectrometry”, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1997.

[55] Manisali, I., D.D.Y. Chen, and B.B. Schneider, “Trac-Trends in Analytical Chemistry”, 2006. 25(3), 243.

[56] Dehghani, H. et al, *J. Heterocyclic. Chem.*, 2009, 46, 610.

[57] Burrows, H.,. Pereira, M. M, “Química Síntese e Estrutura uma abordagem prática”, Escolar Editora 2006.

[58] Papkovsky D. B., O’ Riordan T.C., *Journal of Fluorescence*, 2005, 15,569.

[59] [Webofknowledge.com](http://Webofknowledge.com) (hiperligação ativa em 25 de Junho de 2013).

