

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

“Tetra(tien-2-il)porfirina e seus complexos com metais da primeira-série de transição: síntese, caracterização, investigação da citotoxicidade e interação com DNA”

George Bueno Santana Pereira*

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE EM QUÍMICA, área de concentração: QUÍMICA INORGÂNICA.

Orientador: Prof. Dr. Fillipe Vieira Rocha

*** bolsista: CNPq**

São Carlos - SP

2020



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Química

Folha de Aprovação

Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato George Bueno Santana Pereira, realizada em 21/07/2020.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Fillipe Vieira Rocha (UFSCar)

Prof. Dr. Gustavo Von Poelhsitz (UFU)

Prof. Dr. Victor Marcelo Deflon (IQSC/USP)

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Química.

Dedico essa dissertação a minha avó, Maria Cosme Pereira (in memoriam), e a toda sua representatividade a nossa família.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente ao Pai Celestial pela existência e por colocar ótimas pessoas na minha caminhada.

Agradeço ao berço da minha existência, meus pais Jorge e Flora por me dar amor, carinho e acompanhar todos os meus passos. E ao meu irmão, Ricardo, por me apoiar em todas as minhas decisões. Obrigado!

Agradeço ao Prof. Dr. Fillipe Vieira Rocha pela atenção, confiança e orientação. Obrigado professor por contribuir com meus conhecimentos químicos e pela disponibilidade na realização desse trabalho.

Agradeço aos meus amigos de laboratório: Josinho da M..., Kiita, Lapiseira, Maurindio, LekuLeku, LudiBrigs, Vitão, Dário, Vaze, Catê e Belém pela amizade, rolês, ajudas e tornarem o ambiente de trabalho agradável.

Agradeço a todos os amigos do LQBO pelo acolhimento durante o período que passei sintetizando. Em especial, ao Prof. Dr. Kléber Thiago de Oliveira pela amizade, infraestrutura e experiência com compostos porfirínicos. Obrigado!

À Mykaelli, minha colega de casa e graduação, pela amizade e companhia durante esses seis anos de convivência.

Aos colegas do LERCI, LABMeeb e GAIA pela ajuda, amizade e momentos de confraternização.

Ao Prof. Dr. Moacir Rossi Forim (PN-UFSCAR) pelas medidas de massas.

Aos doutorandos Mauro e Gabriela (CCQM) pelos ensaios de citotoxicidade.

Agradeço ao doutorando Sirlon (LIEC) pelo auxílio com as medidas de fluorescência.

Agradeço aos órgãos de fomento FAPESP, CAPES e especialmente a CNPq pela bolsa concedida.

Lista de abreviaturas e siglas

CCD	Cromatografia em camada delgada
DDQ	2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> (meio de cultura)
DMF	N,N-dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Deoxyribonucleic acid
DNase	Deoxyribonuclease
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ESI	Electrospray Ionization
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
J	Constante de acoplamento
MS	Mass Spectrometry
pH	Potencial hidrogeniônico
RMN	Ressonância magnética nuclear
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
TBE	Solução tampão constituído de mistura de Tris, ácido bórico e EDTA.
TMS	Tetrametilsilano
Tris-HCl	Cloridrato de tris(hidroximetil)aminometano
UV-vis	Região do ultravioleta-visível

LISTA DE TABELAS

TABELA 3.1 - Procedência de reagentes e solventes.....	15
TABELA 3.2 - Parâmetros empregados para a ionização utilizando ESI.....	20
TABELA 4.1 - Condições sintéticas utilizadas nas tentativas de obtenção da 5,10,15,20-tetra-(feniletilene)-21H,23Hporfirina.	25
TABELA 4.2 - Condições sintéticas, rendimento e referência para as sínteses realizadas com o aldeído 1.	27
TABELA 4.3 - Condições sintéticas e rendimentos dos complexos a base de H ₂ TTP.	29
TABELA 4.4 - Tabela de caracterizações não espectrais: fórmula química, massa molar, condutividade molar, aparência física e análise elementar dos complexos de zinco(II), níquel(II), cobre(II), manganês(III), cobalto(II) com H ₂ TTP	31
TABELA 4.5: Valores de raios iônicos do cristal e raio iônico efetivo em picometro para os cátions zinco(II), níquel(II), cobre(II) e cobalto(II).....	38
TABELA 4.6 - Comprimentos de onda e logaritmo da absorvidade molar para as bandas Soret (em preto), Q (em vermelho) e grupos pontuais de todos os compostos e transferência de carga do complexo [Mn(TTP)Cl] (em verde) utilizando diclorometano como solvente.....	39
TABELA 4.7 - Atribuições dos sinais de RMN, com valores de deslocamento químico e integrais para os respectivos compostos a base de H ₂ TTP.....	47
TABELA 4.8 - Íon molecular detectado com seus respectivos m/z experimental e calculado para H ₂ TTP, [Zn(TTP)], [Cu(TTP)], [Co(TTP)] e [Mn(TTP)Cl]......	50
TABELA 4.9 - Atribuições das principais bandas obtidas por IV para os compostos porfirínicos estudados.	54
TABELA 4.10 - Logaritmos do coeficiente de partição dos respectivos complexos porfirínicos.	60
TABELA 4.11- Valores de constante de ligação, deslocamento batocrômico e hipocromismo dos composto porfirínicos a base de H ₂ TTP.	64
TABELA 4.12 - Citotoxicidade dos compostos a base da TTP e cisplatina frente às linhagens de DU-145 e A2780cis.	67

LISTA DE FIGURAS

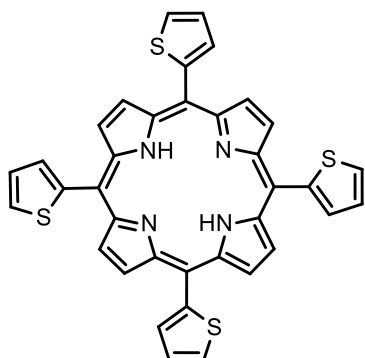
FIGURA 1.1 - Distribuição proporcional de câncer entre homens e mulheres estimados em 2020.....	1
FIGURA 1.2–Estrutura química da <i>cis</i> -diaminodicloridoplatina(II), cisplatina.	2
FIGURA 1.3 - Representação dos modos de interação de pequenas moléculas com a dupla-fita do DNA.....	3
FIGURA 1.4 - Complexos contendo ligantes planares (a) e complexos com centros metálicos quadráticos planos (b) estudados como intercaladores.....	4
FIGURA 1.5 - Estruturas genéricas dos compostos porfirínicos e seus derivados realçando as respectivas saturações dos anéis pirrólicos.	5
FIGURA 1.6 - Designação das posições do anel porfirínicos seguindo os sistemas de nomenclaturas de Hans Ficher (a) e da IUPAC (b).	6
FIGURA 1.7 - Estruturas do anel porfirínico quando submetidas às condições ácidas (a), básicas (b) e complexação com centros metálicos com estado de oxidação +II(c).	7
FIGURA 1.8 - Estruturas químicas de porfirinóides de ocorrência natural: protoporfirina IX (a), clorofila (b), bacterioclorofila (c) e vitamina B12 (d).	8
FIGURA 1.9 - Esquema representativo indicando os modos de interação do DNA com porfirinas: intercalação (a), interação via sulco menor (b) e maior (c), complexo externo (d) e G-quadruplex (e).....	9
FIGURA 1.10 - Estrutura química da 5,10,15,20-tetra(N-metil(4-piridil)porfirina (H ₂ TPyP ₄).....	10
FIGURA 1.11 - Representação das estruturas químicas dos complexos Cu-Por1, Cu-Por2 e Cu-Por3 ³³	11
FIGURA 1.12 - Representação simplificada das estruturas químicas dos complexos de zinco(II), cobre(II), níquel(II), manganês(III) e cobalto(III) com a TNafPor ³⁴	12
FIGURA 1.13 - Diminuição do tamanho dos tumores sólidos em ratos tratados e não tratados (controle) (A) e representação das estruturas química dos complexos tetrakis e octaacetil (B).	13
FIGURA 1.14 - Representação das estruturas químicas da 5,10,15,20-tetra-(tien-2-il)-21H,23H-porfirina (a) e metaloporfirinas análogas de zinco(II), cobalto(II), níquel(II), cobre(II) (b); e manganês(III) (c).	14

FIGURA 4.1 -Procedimento sintético genérico para a obtenção de 5,10,15,20-tetra-(feniletilene)-21H,23H-porfirina.	24
FIGURA 4.2 - Procedimento sintético para a síntese de porfirinas contendo o grupo maleimida.	26
FIGURA 4.3 –Mecanismo de reação para a obtenção da meso-tetra-(2-tienil)porfirina catalisada por cloridrato de hidroxilamina proposto por Momo ¹⁷	28
FIGURA 4.4 - Representação das transições eletrônicas entre orbitais moleculares que são possíveis de ocorrer após a incidência de radiação eletromagnética na região do ultravioleta visível.	32
FIGURA 4.5 - Ilustrações das operações de simetria dos grupos pontuais D _{2h} (a), D _{4h} (b), C _{4v} (c) para as estruturas simplificadas dos compostos porfirínicos.	33
FIGURA 4.6 - Espectro na região do UV-vis para a H ₂ TTP utilizando diclorometano como solvente em preto e região 470 a 750 nm ampliada para melhor visualização das bandas Q em vermelho.	34
FIGURA 4.7 - Características das intensidades das bandas Q para as etioporfirinas. [Adaptada de Costa ⁶¹].....	34
FIGURA 4.8 - Espectro na região do ultravioleta visível para a [Zn(TTP)] utilizando diclorometano como solvente em preto e região 470 a 750 nm ampliada para melhor visualização das bandas Q.	35
FIGURA 4.9 - Espectro na região do ultravioleta visível para a [Cu(TTP)]utilizando diclorometano como solvente em preto e região 460 a 750 nm ampliada para melhor visualização das bandas Q.	36
FIGURA 4.10 - Espectros na região do ultravioleta visível para a utilizando diclorometano como solvente dos composto [Co(TTP)](a) e [Ni(TTP)](b) com regiões coloridas ampliadas para melhor visualização das bandas Q.	36
FIGURA 4.11 - Espectro na região do ultravioleta visível para a [Mn(TTP)Cl] utilizando diclorometano como solvente em preto e região 510 a 750 nm ampliada para melhor visualização das bandas Q.	37
FIGURA 4.12 - Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio da H ₂ TTP utilizando CDCl ₃ como solvente.	40
FIGURA 4.13 - Representação da estrutura do híbrido de ressonância do tiofeno com seus respectivos contribuintes de ressonância ligado a uma espécie retiradora de densidade eletrônica.	41

FIGURA 4.14 - Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio do complexo [Zn(TTP)] utilizando CDCl_3 como solvente.	41
FIGURA 4.15 - Representação simplificada de ligação σ (a) e π (b) entre centros metálicos e ligante porfirínico.	42
FIGURA 4.16 - Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio do complexo [Ni(TTP)] utilizando CDCl_3 como solvente.	43
FIGURA 4.17 - Espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio do complexo [Mn(TTP)Cl] (a) e [Cu(TTP)] (b) utilizando CDCl_3 como solvente.	44
FIGURA 4.18 - Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio do complexo [Co(TTP)] utilizando CDCl_3 como solvente.	45
FIGURA 4.19 - Digrama de energia simplificado com o preenchimento eletrônico dos orbitais 3d para os cátions zinco(II), cobre(II), níquel(II), cobalto(II) e manganês(III).	46
FIGURA 4.20 - Espectro geral (a) e padrão isotópico (b) obtidos por HRMS-ESI para o composto [Mn(TTP)Cl].	48
FIGURA 4.21 - Espectros de infravermelho dos compostos a base de H_2TTP destacando a presença do estiramento a presença e ausência dos estiramento N-H na porfirina livre e nos complexos análogos, respectivamente.	51
FIGURA 4.22 - Aproximação dos espectros na região do infravermelho destacando em azul as bandas relacionadas ao estiramento da ligação metais nitrogênio dos compostos porfirínicos a base de H_2TTP , sendo que os espectros da porfirina livre e o complexo [Zn(TTP)] destacados apenas para melhor organização.	52
FIGURA 4.23 - Aproximação dos espectros na região do infravermelho demonstrando a quantidade de bandas relacionadas a deformações angulares dos anéis pirrólicos dos compostos porfirínicos a base de H_2TTP , sendo que os espectros da porfirina livre e o complexo [Zn(TTP)] destacados apenas para melhor organização.	53
FIGURA 4.24 - Diagrama simplificado de Jablonsky representando os processos físicos de absorção, fluorescência, fosforescência, conversão interna (CI) e conversão intersistemas (CIS).	55
FIGURA 4.25 - Espectros de luminescência dos compostos a base de H_2TTP , com as respectivas atribuições das bandas.	56
FIGURA 4.26 - Medidas de estabilidade por espectrofotometria da H_2TTP (a) [Zn(TTP)] (b) e [Cu(TTP)] (c) 3 μM em DMSO por 0, 24 e 48h.	57

FIGURA 4.27 - Medidas de estabilidade por espectrofotometria da [Ni(TTP)] (a) [Mn(TTP)Cl] (b) e [Co(TTP)] (c) 3 μ molar em DMSO por 0, 24 e 48h.....	58
FIGURA 4.28 - Medidas de estabilidade por espectrofotometria da [Co(TTP)] 3 μ molar em n-octanol e 3% de DMSO no escuro em luz ambiente.	59
FIGURA 4.29- Espectros na região do UV-vis de [Mn(TTP)Cl] na presença de diferentes concentrações de ct-DNA e regressão linear para determinação de K_b ...	63
FIGURA 4.30 - Interação dos complexos porfirínicos a base da <i>meso</i> -tetra(tien-2-il)porfirina com o plasmídeo pBR322.	65
FIGURA 4.31 - Esquema reacional para a redução de MTT para formação de <i>formazan</i>	66
FIGURA 4.32- Placas de 98 poços utilizadas nos ensaios de IC_{50} dos compostos porfirínicos na linhagem A2780cis.....	66

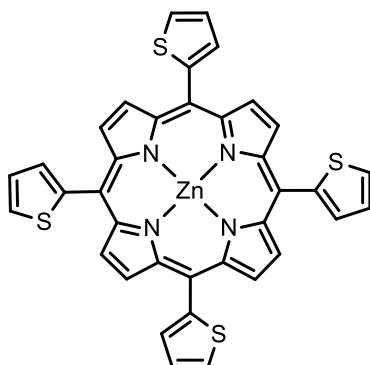
Estruturas e massas moleculares



H₂TTP

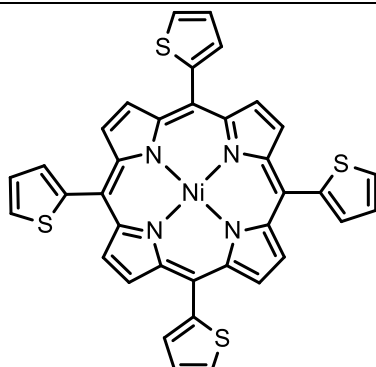
Massa molecular: 638,85 g.mol⁻¹

[Zn(TTP)]



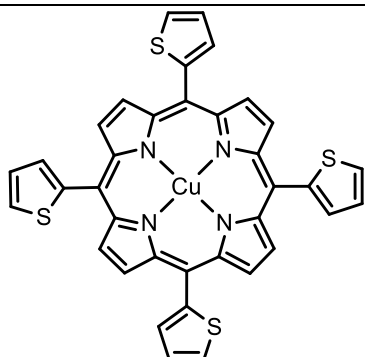
Massa molecular: 702,21 g.mol⁻¹

[Ni(TTP)]

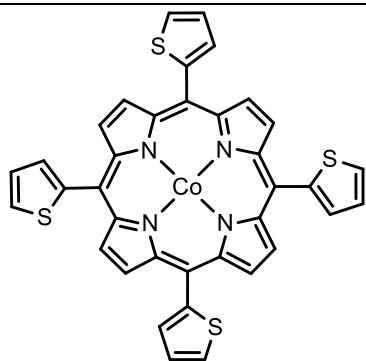


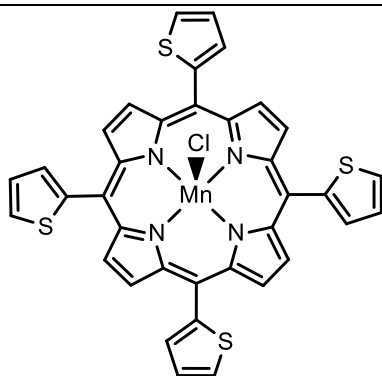
Massa molecular: 695,52 g.mol⁻¹

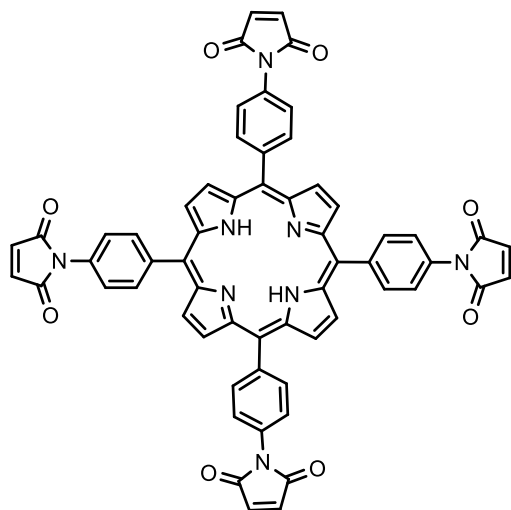
[Cu(TTP)]

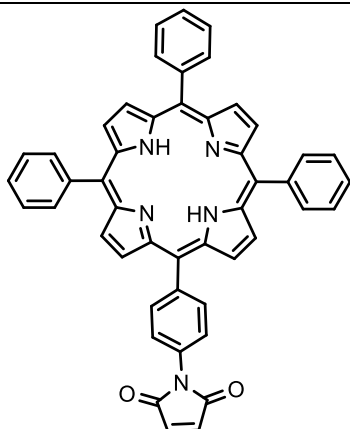


Massa molecular: 700,38 g.mol⁻¹

[Co(TTP)]Massa molecular: 695,76g.mol⁻¹

[Mn(TTP)Cl]Massa molecular: 727,22 g.mol⁻¹

H₂TMPPMassa molecular: 994,96 g.mol⁻¹

H₂MMTPPMassa molecular: 709,79 g.mol⁻¹

RESUMO

“Tetra(tien-2-il)porfirina e seus complexos com metais da primeira-série de transição: síntese, caracterização, investigação da citotoxicidade e interação com DNA”

O câncer é um conjunto de mais de 100 doenças caracterizadas pelo crescimento descontrolado de células e representa a segunda maior causa das mortalidades, relacionadas a doenças, no mundo. Por conta disso, há uma busca por novos compostos que funcionam como quimioterápicos que apresentem diferentes tipos de interação com alvos oncológicos, como, por exemplo, o DNA. O uso de metaloporfirinas tem sido promissor, uma vez que essas substâncias apresentam estruturas planares, que podem maximizar interações intermoleculares com o DNA. Após a inserção de metais de transição em sua estrutura pode-se aumentar a solubilidade e a planaridade dessa classe de compostos, possibilitando uma maior diversidade de tipos de interação com a dupla-fita do DNA. Sabe-se que a 5,10,15,20-tetra-(tien-2-il)-21*H*,23*H*-porfirina (H₂TTP) contém seus substituintes em posição *meso* quase coplanar ao anel porfirínico, proporcionando uma maior planaridade, quando comparada a compostos análogos *meso* substituídos. Desta forma, nesse trabalho foram sintetizados complexos porfirínicos de zinco(II), níquel(II), cobalto(II), cobre(II) e manganês(III) utilizando H₂TTP como ligante. Todos os compostos foram caracterizados pelas técnicas de espectroscopia UV-vis, infravermelho, fluorescência, RMN ¹H, HRMS-ESI, condutividade molar e análise elementar. Foi verificado que todos os complexos foram capazes de interagir com ct-DNA utilizando espectroscopia na região do UV-vis, obtendo-se constantes de ligação na ordem de 10⁵ M⁻¹, indicando interações por vias não-covalentes. Também foi observado uma mudança na mobilidade eletroforética do plasmídeo pBR322, após a incubação por 24h com o complexo [Mn(TTP)Cl]. A partir da avaliação da citotoxicidade dos compostos frente às linhagens celulares A2780cis (tumoral de ovário resistente a cisplatina) e DU-145 (tumoral de próstata) foi verificado que o complexo [Mn(TTP)Cl] mostrou atividades promissoras frente ambas as linhagens, A2780cis (IC₅₀ = 3,45 ± 0,14 μmol.L⁻¹) e DU-145 (5,28 ± 0,23 μmol.L⁻¹), porém os demais compostos não apresentaram atividade citotóxica (IC₅₀ > 50 μmol.L⁻¹). Destaca-se que o composto [Mn(TTP)Cl] mostrou-se mais ativo do que a cisplatina. Com esses resultados, pode-se afirmar que o DNA não é principal alvo envolvido na citotoxicidade do complexo [Mn(TTP)Cl], abrindo uma maior possibilidade na investigação biológica.

ABSTRACT

“Tetra(thien-2-yl)porphyrin and their complexes with first transition series metals: synthesis, characterization, cytotoxicity investigation, and interaction with DNA”

Cancer is a generic term for over 100 diseases with uncontrolled cell growth. Each year, all cancer forms are responsible for millions of deaths worldwide and are the leading cause of deaths linked to disease. Therefore, the scientific community is searching for new compounds that serve as agents for chemotherapy. However, there has been a promising application of metalloporphyrins, as these substances have planar structures that interact intermolecularly with DNA molecule. Incorporation of transition metals can increase the solubility and planarity of this class of compounds, enabling different forms of interaction with the DNA double-strand. It is known that 5,10,15,20-tetra- (thien-2-yl) -21*H*, 23*H*-porphyrin (H₂TTP) contains substituents in a meso position almost coplanar to the porphyrin ring, providing greater planarity when compared to meso-substituted analog compounds. Thus, in this work, porphyrinic complexes of zinc(II), nickel(II), cobalt(II), copper(II), and manganese(III) were synthesized using H₂TTP as a ligand. The compounds were characterized by spectroscopic techniques such as UV-vis, Infrared, fluorescence, and ¹H NMR, as well as HRMS-ESI, molecular conductivity and elementary analysis. Data from spectroscopy in the UV-vis region showed that all complexes were able to interact with ct-DNA, obtaining a binding constant in the order of 10⁵ M⁻¹, indicating a non-covalent interaction. Changes in the electrophoretic mobility of the plasmid pBR322 were also observed after incubation (24h) with the [Mn(TTP)Cl] complex. Cytotoxicity of all compounds were evaluated towards two cell lines, A2780cis (cisplatin-resistant ovarian tumor) and DU-145 (prostate tumor). It has been confirmed that the [Mn(TTP)Cl] complex was active against both cell lines, A2780cis (IC₅₀ = 3.45 ± 0.14 μmol.L⁻¹) and DU-145 (5.28 ± 0.23 μmol.L⁻¹) were more cytotoxic than cisplatin. However much, the other complexes did not demonstrate activity in concentrations at 50 μmol.L⁻¹ or lowest. Analyzing the results, it can be concluded that DNA is not the key target involved in [Mn(TTP)Cl] complex cytotoxicity, which further opens up greater possibilities for biological investigation.

Sumário

1 - Introdução	1
1.1 - Câncer	1
1.2 - DNA, um alvo dos agentes quimioterápicos	2
1.3 - Porphirinas e metaloporphirinas.....	5
1.3.1 - Generalidades, reatividade e ocorrência natural	5
1.3.2 - Interação como DNA e citotoxicidade de porfirinas e seus complexos	8
1.4 - Planejamento estrutural	13
2 - Objetivos	14
2.1 - Objetivos específicos	14
3 - Parte experimental	15
3.1 - Procedência de solventes e reagentes	15
3.2 - Metodologias de síntese	16
3.2.1 - Síntese da 5,10,15,20-tetra-(tien-2-il)-21H,23H-porfirina - H ₂ TTP ⁴²	16
3.2.2 - Síntese do 5,10,15,20-tetra-(tien-2-il)-porfirinato de zinco(II) - [Zn(TTP)] ⁴²	16
3.2.3 - Síntese do 5,10,15,20-tetra-(tien-2-il)-porfirinato de níquel(II)- [Ni(TTP)] ¹⁷	16
3.2.4 - Síntese do 5,10,15,20-tetra-(tien-2-il)-porfirinato de cobre(II) - [Cu(TTP)] ⁴³ ...	17
3.2.5 - Síntese do 5,10,15,20-tetra-(tien-2-il)-porfirinato de cobalto(II) - [Co(TTP)] ⁴⁴	17
3.2.6 - Síntese do clorido-[(5,10,15,20-tetra-(tien-2-il)-porfirinato] de manganês(III) - [Mn(TTP)Cl] ⁴⁵	17
3.3 - Métodos instrumentais e procedimentos	18
3.3.1 - Condutividade molar	18
3.3.2 - Espectroscopia na região do UV-vis	18
3.3.3 - Ressonância magnética nuclear de hidrogênio	18
3.3.4 - Espectroscopia na região do infravermelho	18
3.3.5 - Espectroscopia de fotoluminescência	19
3.3.6 - Análise elementar de C, H, N	19
3.3.7 - Espectrometria de massas	19

3.3.8 - Coeficiente de partição	20
3.3.9 - Interação com ct-DNA por espectroscopia ultravioleta visível	21
3.3.10 - Interação com plasmídeo pBR322	22
3.3.11 - Citotoxicidade	22
4 - Resultados e discussão	24
4.1 - Síntese de <i>meso</i> -porfirinas e metaloporfirinas a base de H ₂ TTP	24
4.2 - Caracterização de compostos porfirínicos a base de H ₂ TTP.....	29
4.2.1 - Caracterização não espectral de compostos porfirínicos a base de H ₂ TTP ..	29
4.2.2 - Espectroscopia na região do Ultravioleta visível	32
4.2.3 - Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio	39
4.2.4 - Espectrometria de massas.....	48
4.2.5 - Espectroscopia na região do infravermelho	50
4.2.6 - Espectroscopia de fotoluminescência	54
4.3 - Caracterizações físico-químicas	56
4.3.1 - Testes de estabilidade	56
4.3.2 - Coeficiente de partição	59
4.4 - Estudos de interação com DNA	60
4.4.1 - Espectroscopia na região do UV-vis	61
4.4.2 - Interação com o plasmídeo pBR322	64
4.5 - Citotoxicidade	65
5 - Considerações finais	69
5.1 - Conclusão.....	69
5.2 - Perspectivas futuras.....	70

1 - Introdução

1.1 - Câncer

O câncer é um conjunto de mais de 100 doenças caracterizadas pelo crescimento descontrolado de células, que não têm a mesma função das células saudáveis em seus tecidos originais. Devido a essa alta proliferação, que ocasiona a formação de tumores, as células tornam-se muito agressivas ao organismo podendo se espalhar por diversos tecidos e/ou órgãos do corpo, esse processo é denominado de metástase e o grande motivo das causas de óbito ¹.

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que, o câncer foi responsável por 9,6 milhões de mortes no ano de 2018, tornando-o a segunda maior causa de morte em todo mundo, perdendo somente para as doenças cardiovasculares². No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) estima que para o ano de 2020 os cânceres mais incidentes são: o de próstata e mama, entre os homens e mulheres³, respectivamente, FIGURA 1.1.

FIGURA 1.1 - Distribuição proporcional de câncer entre homens e mulheres estimados em 2020.

Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2020 por sexo, exceto pele não melanoma*

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	65.840	29,2%	Homens	Mulheres	Mama feminina	66.280	29,7%
Cólon e reto	20.520	9,1%			Cólon e reto	20.470	9,2%
Traqueia, brônquio e pulmão	17.760	7,9%			Colo do útero	16.590	7,4%
Estômago	13.360	5,9%			Traqueia, brônquio e pulmão	12.440	5,6%
Cavidade oral	11.180	5,0%			Glândula tireoide	11.950	5,4%
Esôfago	8.690	3,9%			Estômago	7.870	3,5%
Bexiga	7.590	3,4%			Ovário	6.650	3,0%
Linfoma não Hodgkin	6.580	2,9%			Corpo do útero	6.540	2,9%
Laringe	6.470	2,9%			Linfoma não Hodgkin	5.450	2,4%
Leucemias	5.920	2,6%			Sistema nervoso central	5.220	2,3%

*Números arredondados para múltiplos de 10.

Embora seja uma das grandes causas de mortalidade no planeta, quando o câncer é diagnosticado no início, ele pode ser tratado apresentando grande porcentagem de cura. Após a análise do caso, existem três formas principais para o tratamento da doença, dentre elas: a quimioterapia, a cirurgia e a radioterapia⁴. Sendo que, a quimioterapia é uma das formas mais abrangentes por ser utilizada em diferentes momentos do tratamento e, além do mais, é indicada em casos de cânceres

metastáticos^{4,5}. Embora, dependendo do caso, pode ocorrer o uso da combinação desses tratamentos^{4,5}.

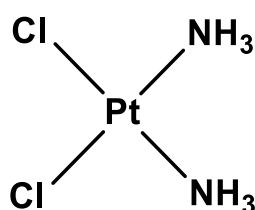
A administração de fármacos para tratamento do câncer, que é a característica intrínseca da quimioterapia, é em grande maioria realizada por via intravenosas, podendo ser também aplicados por via oral, subcutânea e intramuscular⁶. Uma vez administrados, os medicamentos misturam-se ao sangue e são transportados para todo o corpo⁶. Após interagirem com alvos específicos, as células cancerosas são destruídas ou impedidas de se multiplicar, inibindo a formação de novos tumores⁶.

1.2 - DNA, um alvo dos agentes quimioterápicos

O DNA é o alvo farmacológico mais visado para a interação de pequenas moléculas que possam atuar no combate ao câncer. Uma vez que, essa biomolécula detém as informações gênicas e é responsável pela disseminação do câncer a partir da replicação de células mutadas. A inibição da replicação e transcrição do DNA, a partir de interações com compostos biologicamente ativos, torna-se intuitivo e de grande interesse na busca de novos quimioterápicos, justamente por impossibilitar a multiplicação da célula^{6,7}.

Complexos a base de platina são extremamente utilizados no combate do câncer como quimioterápicos. Embora, correspondam a somente 6% do total dos agentes quimioterápicos registrados como fármacos, esta classe é utilizada em pelo menos 50% dos tratamentos dos diversos tipos de cânceres^{8,9}. Dentre os compostos tradicionalmente utilizados a base de platina, o que mais se destaca é a *cis*-diaminodicloridoplatina(II), cisplatina, FIGURA 1.2:

FIGURA 1.2—Estrutura química da *cis*-diaminodicloridoplatina(II), cisplatina.



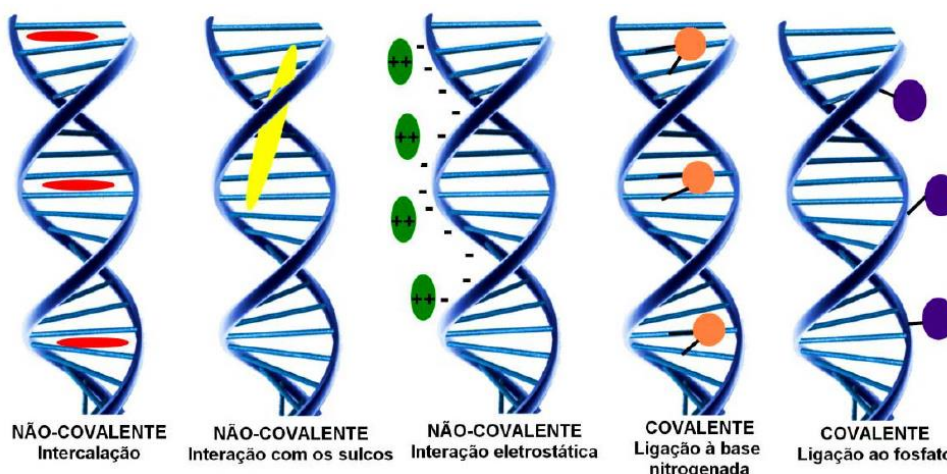
Cisplatina

A cisplatina é capaz de formar ligações covalentes com bases nitrogenadas do DNA, preferencialmente a duas guaninas vicinais. Apesar do seu sucesso, da mesma forma que os fármacos orgânicos destinados ao mesmo propósito, os tratamentos com esse complexo apresentam efeitos adversos, tais como: neurotoxicidade, ototoxicidade, náuseas e vômitos¹⁰. Além disso, outra problemática é a resistência desses compostos frente a alguns tumores. Logo, a busca por novos candidatos a fármacos é de grande importância para o aumento do espectro de ação da quimioterapia^{6,8,11}.

Os compostos de coordenação, embora sejam relativamente poucos utilizados na medicina, apresentam inúmeras vantagens quando comparados aos compostos orgânicos¹², como: diferentes geometrias, diversos estados de oxidação assumidos pelos centros metálicos e a possibilidade de coordenação de ligantes com diferentes funções⁸. Todas essas características permitem que os complexos tenham uma diversificação, no que diz respeito, às propriedades termodinâmicas e cinéticas, proporcionando aplicações em diversos sistemas biológicos⁶.

Diante do exposto, há uma busca por complexos candidatos a fármacos, que apresentem modos de interação diferentes da ligação covalente que acontece entre a cisplatina e o DNA¹³. Dentre os modos de interação não-covalentes com esta biomolécula, podem-se destacar a intercalação, interação eletrostática e via sulcos¹⁴, FIGURA1.3:

FIGURA 1.3 - Representação dos modos de interação de pequenas moléculas com a dupla-fita do DNA.

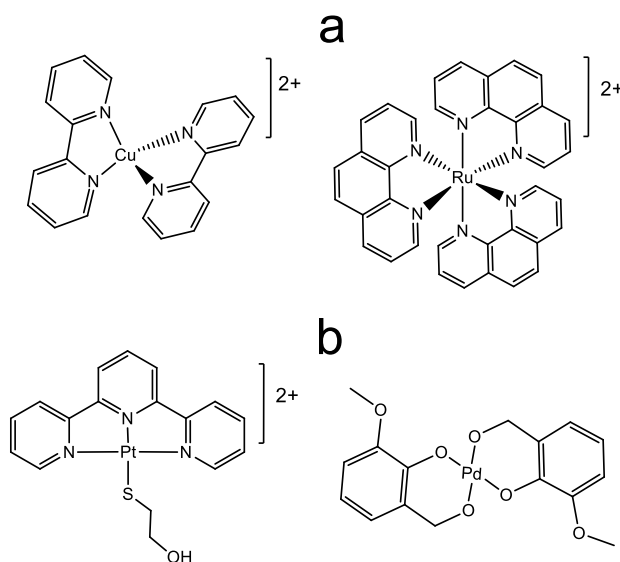


Fonte: Adaptada de Barra e Netto¹⁴.

É importante ressaltar, que depois da ligação covalente, a intercalação é a segunda interação que causa maiores efeitos na estrutura do DNA dentre as citadas. Esse modo de ação ocorre, pela inserção de estruturas planares entre as bases nitrogenadas do DNA, que devido às ligações de hidrogênio e interações π - π promove uma estabilização da estrutura intercalador-DNA¹⁴. Após tal interação, o DNA perde sua conformação helicoidal resultante do efeito de enrijecimento e alongamento da dupla-fita¹⁴.

Com base nessa teoria, alguns complexos que contém ligantes aromáticos e planares como fenantrolinas¹⁴ e bipyridinas¹⁴ (FIGURA 1.4a) têm a capacidade de intercalarem com DNA. Apresentando-se como possíveis candidatos a quimioterápicos. Adicionalmente, a utilização de centros metálicos que possuem geometria quadrática plana e como platina(II) e paládio(II)¹⁵ (FIGURA 1.4b), também são de grande interesse, uma vez que a conformação estrutural ao redor do centro metálico será plana, o que pode auxiliar em uma possível interação. Outra vantagem apresentada pela inserção de um centro metálico no arcabouço molecular, é a presença de uma carga parcial positiva, que pode proporcionar uma aproximação mais efetiva entre o complexo e a molécula de DNA, devido a uma interação eletrostática.¹⁴

FIGURA 1.4 - Complexos contendo ligantes planares (a) e complexos com centros metálicos quadráticos planos (b) estudados como intercaladores.



Outra alternativa interessante é o uso de porfirinas como agentes intercaladores, uma vez que, estas estruturas, dependendo dos seus substituintes (vide seção 1.3.2), atendem todos os requisitos necessários para essa aplicação, como alta planaridade e aromaticidade¹⁶.

1.3 - Porphirinas e metaloporphirinas

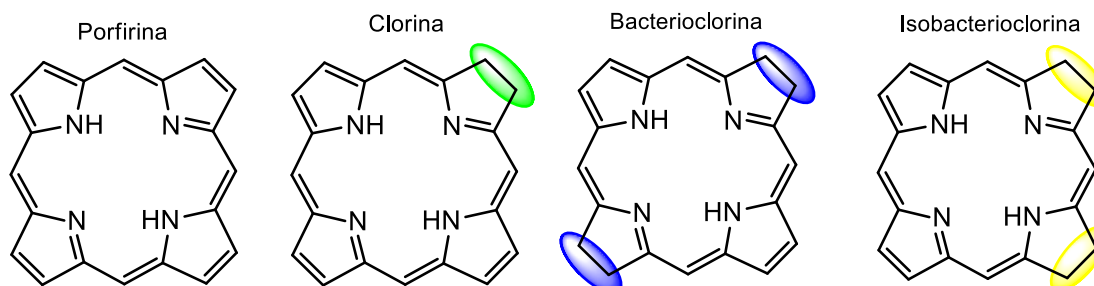
1.3.1 - Generalidades, reatividade e ocorrência natural

As porfirinas e seus derivados fazem parte de uma classe de heterocíclios chamados de compostos tetrapirrólicos e apresentam características biológicas que são extremamente importantes para a manutenção da vida no planeta Terra¹⁷. Desempenhando funções cruciais em processos catalíticos, fotocatalíticos e de transporte¹⁷.

Por conta disso, os compostos tetrapirrólicos são extensamente estudados em diferentes áreas da ciência e utilizados tanto para fins biológicos quanto tecnológicos. Dentre eles, pode-se citar o uso de porfirinóides em células solares¹⁸, terapia fotodinâmica¹⁹, corantes²⁰, sensores óticos²¹ e eletroquímicos²², catálise²³ e ótica não-linear²⁴.

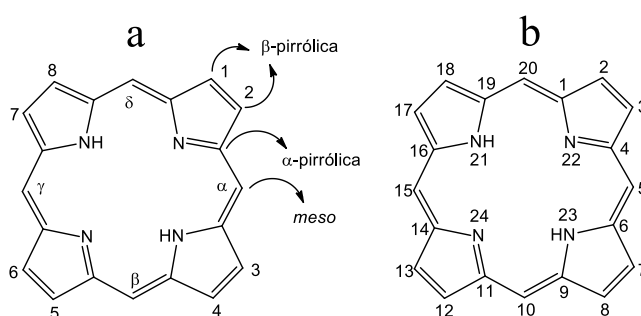
Os compostos porfirínicos são caracterizados pelo macrociclo formado pela alta conjugação dos anéis pirrólicos. Quando há uma saturação em um anel pirrólico, esses compostos são chamados de clorinas¹⁷. Já os denominados bacterioclorinas e isobacterioclorinas¹⁷, possuem saturações em dois anéis pirrólicos, FIGURA 1.5.

FIGURA 1.5 - Estruturas genéricas dos compostos porfirínicos e seus derivados realçando as respectivas saturações dos anéis pirrólicos.



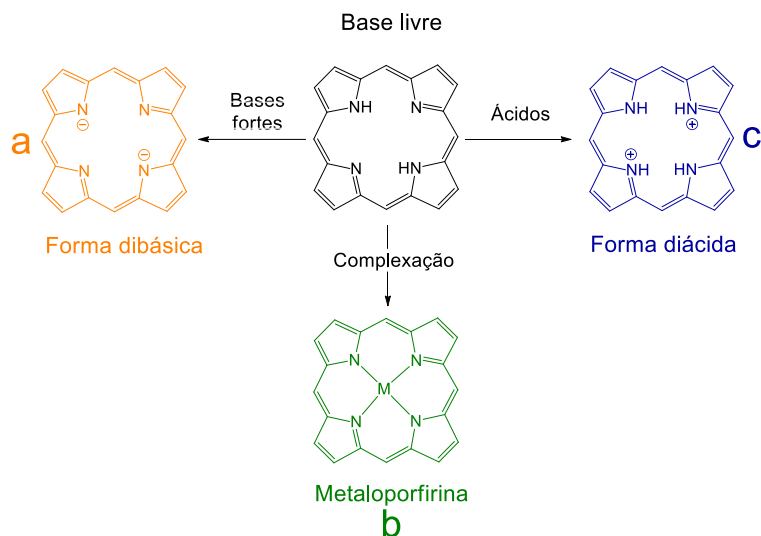
Dois sistemas de nomenclatura podem ser aplicados para esses compostos: o proposto por Hans Fisher e pela IUPAC²⁵. A nomenclatura definida por Hans Fisher baseia-se em uma forma simples de definição. Ela enumera os carbonos presentes nos anéis pirrólicos de 1 a 8, definindo-os como posições β ; enquanto os carbonos laterais são designados pelas letras gregas α , β , γ e δ , genericamente chamadas de posições *meso*²⁵, FIGURA 1.6a. Em contrapartida, a nomenclatura definida pela IUPAC uniformiza esses macrociclos enumerando carbonos e nitrogênios de 1 a 24²⁵, FIGURA 1.6b. Embora o sistema da IUPAC prevaleça para nomear os compostos tetrapirrólicos, as posições chamadas de *meso*, α e β -pirrólicas são muito utilizadas em discussões estruturais de compostos mais simples.

FIGURA 1.6 - Designação das posições do anel porfirínico seguindo os sistemas de nomenclaturas de Hans Fisher (a) e da IUPAC (b).



As porfirinas, em sua forma de base livre, contêm átomos de hidrogênio ligados aos nitrogênios 21 e 23²⁶. Os prótons, por sua vez, podem ser retirados quando submetidos a pH altamente alcalino, exibindo a sua forma dibásica, FIGURA 1.7a; ou promovendo reações de complexação com metais de raios iônicos passíveis de entrar na cavidade da porfirina, formando assim complexos estáveis denominados de metaloporfirinas, FIGURA 1.7b^{17,26}. Por outro lado, quando as mesmas são expostas ao meio ácido os nitrogênios 22 e 24 podem ser protonados, gerando sua forma diácida, FIGURA 1.7c^{17,26}.

FIGURA 1.7 - Estruturas do anel porfirínico quando submetidas às condições ácidas (a), básicas (b) e complexação com centros metálicos com estado de oxidação +II(c).



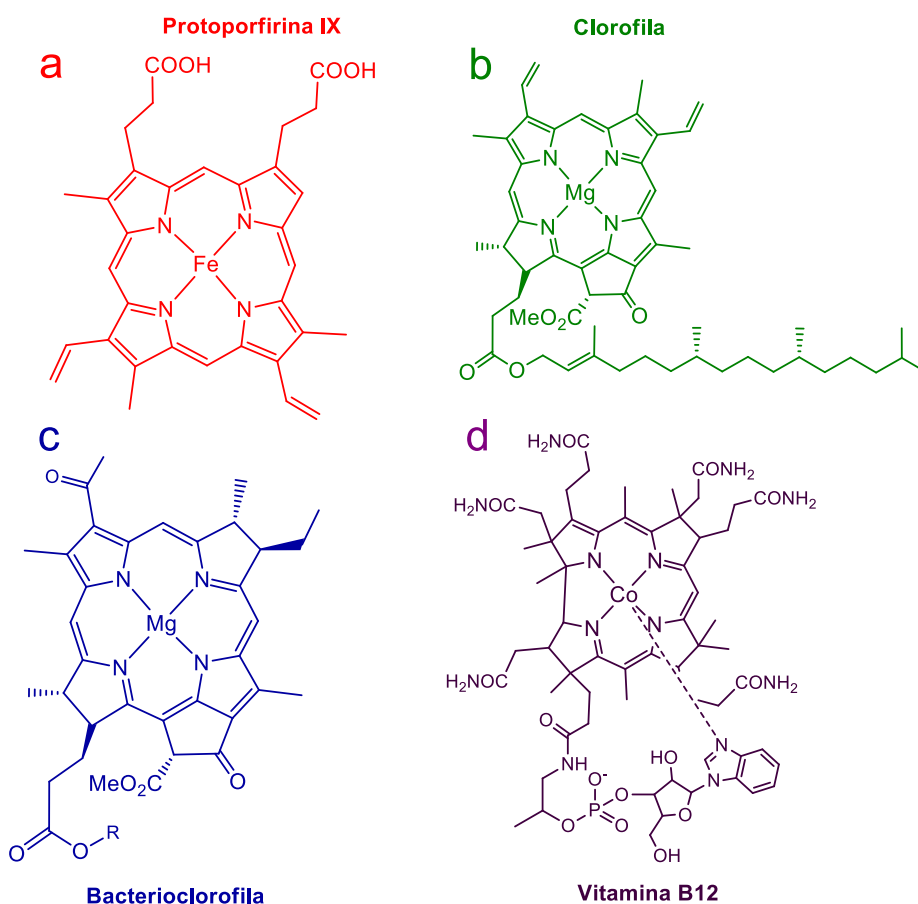
Os compostos de coordenação tetrapirrólicos exercem funções importantes para manutenção de diversos sistemas biológicos nos quais são encontrados, como: transporte de moléculas, transferência de energia e captação de energia solar¹⁷.

O transporte de oxigênio pelo corpo nos seres vivos aeróbicos que apresentam sangue vermelho ocorre através da hemoglobina. Nessas macromoléculas estão situados grupos heme que são formados por centros metálicos de ferro(II) coordenados à protoporfirina IX, FIGURA 1.8a^{17,27}. Durante o processo de respiração, uma molécula de oxigênio coordena-se na posição axial de forma reversível e são transportadas pelo sangue ou armazenada nos músculos pela mioglobina^{17,27}.

Os compostos tetrapirrólicos também estão presente em seres vivos autotróficos, ou seja, aqueles que produzem seu próprio alimento. Eles são responsáveis processo de fotossíntese, que é primordial para a manutenção da vida desses organismos¹⁷. Nas plantas e bactérias estão presentes as clorofilas e bacterioclorofila, que contém cátions magnésio(II) coordenados às clorinas e bacterioclorinas, FIGURA 1.8b e 1.8c, respectivamente¹⁷. Esses complexos estão associados a captura de energia solar que é convertida em energia química¹⁷.

Outro composto de coordenação que contém ligantes tetrapirrólicos, encontrado na natureza é a vitamina B₁₂ ou cobalamina. Essa macromolécula é precursora da coenzima B₁₂, um complexo de cobalto(III) (FIGURA 1.8d), que tem a função de promover reações de oxidação de ácidos graxos²⁸. A falta dessa vitamina, que é sintetizada por bactérias intestinais ou obtidas pela digestão de carne, pode provocar uma doença grave chamada de anemia perniciosa²⁸.

FIGURA 1.8 - Estruturas químicas de porfirinóides de ocorrência natural: protoporfirina IX (a), clorofila (b), bacterioclorofila (c) e vitamina B12 (d).



1.3.2 - Interação como DNA e citotoxicidade de porfirinas e seus complexos

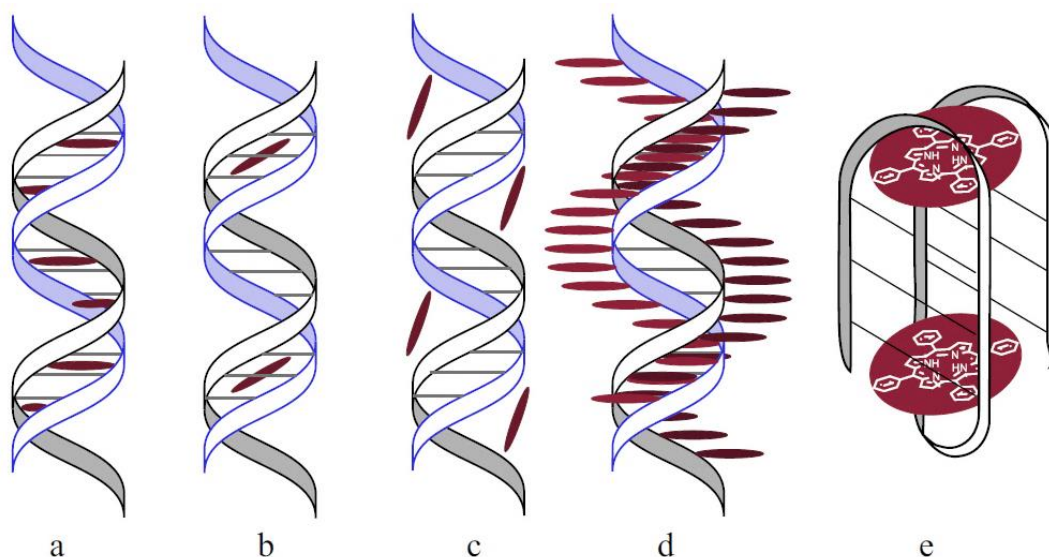
Por conta das suas propriedades físicas, químicas e da presença desses compostos em diversos sistemas biológicos, existem muitas pesquisas com porfirinas voltadas a estudos como fotossensibilizantes para terapia fotodinâmica, e a busca por possíveis interações com biomoléculas.

A terapia fotodinâmica é umas das aplicações biológicas clássicas para esses compostos. Essa técnica é um tratamento médico-terapêutico que é caracterizado pela combinação de luz, fotossensibilizante e oxigênio os quais são utilizados nos tratamentos de acne, micoses, herpes, doenças bacterianas, doença neoplásicas, dentre outras¹⁷. Embora ela seja promissora para o tratamento de neoplasias por ser altamente seletiva, ela apresenta um pequeno espectro de ação. Uma vez que, até o momento, não há a possibilidade de ter uma irradiação efetiva, em tecidos mais internos do corpo humano, inviabilizando o uso destes compostos como fotossensibilizantes, nestes casos. Além do mais, esse tratamento não é indicado para os casos de câncer metastático.

Sendo assim, há uma vertente de pesquisa voltada para a atuação desses compostos como agentes quimioterápicos, a partir da interação com biomoléculas alvos. Embora exista um estudo de interação com topoisomerase II β utilizando metodologias computacionais²⁹, a interação de porfirinas com o DNA é um objetivo de estudo mais decorrente na literatura. Entre as formas mais comuns de interações dessa classe de compostos com DNA, é possível citar: a intercalação, interações via sulco menor e maior, complexo externo e via DNA G-quadruplex³⁰,

FIGURA 1.9:

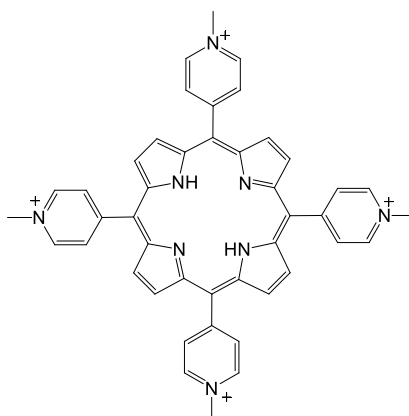
FIGURA 1.9 - Esquema representativo indicando os modos de interação do DNA com porfirinas: intercalação (a), interação via sulco menor (b) e maior (c), complexo externo (d) e G-quadruplex (e).



Fonte: Adaptado de Lebedeva e col.³⁰

Os estudos de interação de metaloporfirinas com DNA são diversificados no que diz respeito a estrutura dos compostos utilizados. Normalmente, as porfirinas catiônicas (PCs) são amplamente estudadas como intercaladores clássicos com DNA, como a 5,10,15,20-tetra(N-metil(4-piridil)porfirina (H_2TPyP4)³¹, FIGURA 1.10. Esse fato está relacionado com o aumento das interações eletrostáticas formadas por essas moléculas e o DNA. Uma vez que, elas apresentam cargas positivas em seus substituintes nas posições *meso* e o DNA têm uma carga parcial negativa pela presença dos grupos fosfatos.

FIGURA 1.10 - Estrutura química da 5,10,15,20-tetra(N-metil(4-piridil)porfirina (H_2TPyP4).

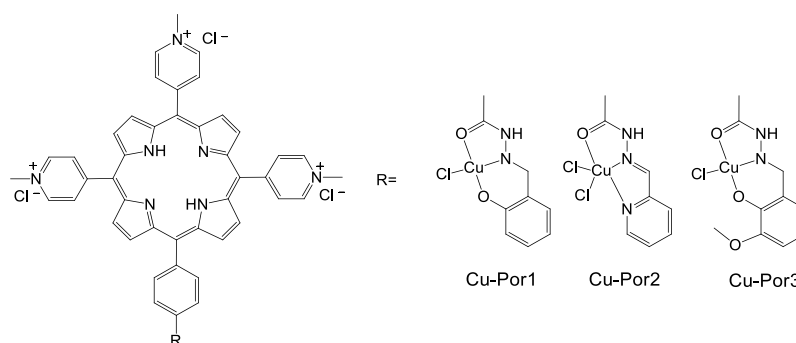


Embora, os compostos carregados apresentem efeitos de intercalação mais significativos, a diminuição da carga e a mudança de substituintes provocam efeitos acentuados nas intensidades de interação determinadas por espectroscopia na região do ultravioleta visível. Esta é uma das técnicas mais importantes no estudo de interação entre porfirinas e DNA, sendo crucial salientar que deslocamentos batocrômicos e hipocromismo maior ou igual a 15 nm e 35%, respectivamente, são características de intercaladores clássicos. Já interações externas às bases nitrogenadas configuram efeitos abaixo de 8 nm e 10%³².

Neste sentido, Feng e colaboradores³³ sintetizaram e caracterizaram metaloporfirinas tricatiônicas de cobre(II) (FIGURA 1.11) na qual foi observado um efeito de hipocromismo bastante acentuado (acima de 46%, condizente com uma ação intercalativa) para todos os complexos, quando submetidos a interação com ct-DNA. Porém, os efeitos batocrômicos foram menores do que o esperado, apresentando valores abaixo de 8nm e constantes de ligação entre $1,5$ e $0,26 \cdot 10^4 M^{-1}$

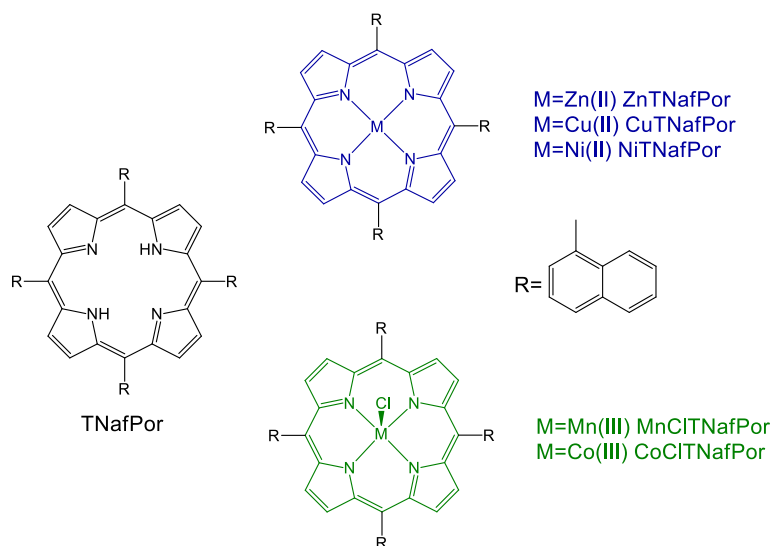
1. No entanto, devido ao seu alto efeito hipocrômico, foi sugerido que esses compostos pudessem estar atuando como intercaladores³³. Vale ressaltar a grande complexidade do sistema complexo-DNA, sendo os efeitos observados na espectroscopia eletrônica, uma indicação do tipo de interação, e não uma determinação concreta.

FIGURA 1.11 - Representação das estruturas químicas dos complexos Cu-Por1, Cu-Por2 e Cu-Por3³³.



Silveira e colaboradores³⁴ sintetizaram complexos porfirínicos de zinco(II), cobre(II), níquel(II), cobalto(III) e manganês(III), sendo que as posições *meso* foram substituídas com α -naftil, FIGURA 1.12. A partir dos resultados obtidos pelo estudo de interação com DNA, não foi possível verificar efeitos de batocromismo para nenhum dos compostos. Adicionalmente, os valores de porcentagem de hipocromismo variaram entre 3,4 e 19,4% para os complexos de níquel(II) e a base livre, respectivamente, logo foi caracterizado que essas metaloporfirinas apresentam interações adjacentes às bases nitrogenadas³⁴. Em contrapartida, essas moléculas tiveram constantes de ligação entre 9,72 e $1,44 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ que são relativamente altas para esse tipo de interação.

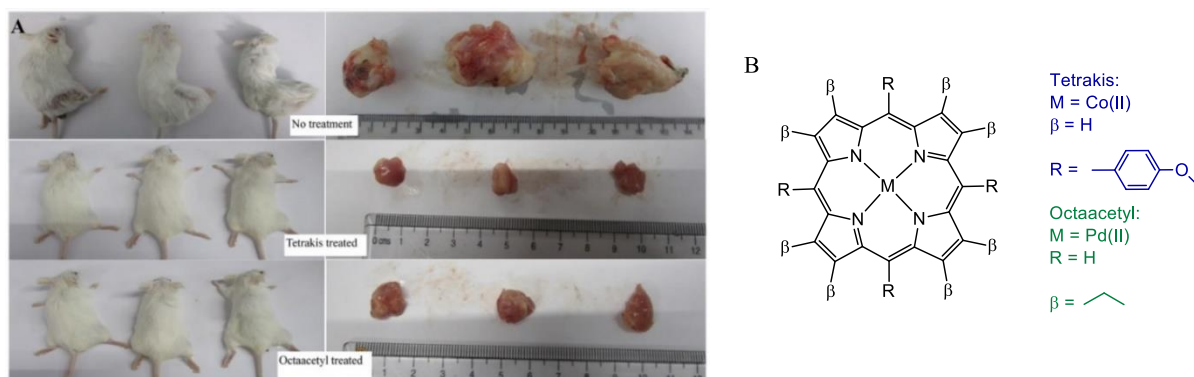
FIGURA 1.12 - Representação simplificada das estruturas químicas dos complexos de zinco(II), cobre(II), níquel(II), manganês(III) e cobalto(III) com a TNafPor³⁴.



Os trabalhos de Feng³³ e Silveira³⁴ são exemplos que, embora as PCs sejam amplamente estudadas na literatura por conta dos seus efeitos de intercalação, as porfirinas não catiônicas (PNCs) podem apresentar valores de constantes de ligação superiores quando comparadas às PCs. Nesses casos apresentados, foram verificadas constantes de ligação quase 10 vezes maiores quando são comparados complexos não catiônicos e catiônicos com o mesmo centro metálico. De forma mais evidente, quando se compara os máximos das constantes de ligação para cada sistema, verifica-se valores 65 vezes maior da PNC sintetizada por Silveira em relação a PC descrita por Feng. Esse fato pode estar relacionado com a maior planaridade dos grupos substituintes nas posições *meso*.

O uso de porfirinas como possíveis quimioterápicos não é muito verificado na literatura por conta da sua baixa citotoxicidade frente às células tumorais, logo, muitos compostos são aplicados em terapia fotodinâmica. Porém, estudos *in silico*, *in vitro* e *in vivo* desenvolvidos por Pattanayak e colaboradores³⁵ mostraram que metaloporfirinas de cobalto(II) e paládio(II) não catiônicas (FIGURA 1.13B) tiveram interação com o KRAS G-quadruplex (proteína que funciona como alvo oncológico e apresentam oligonucleotídeos em sua estrutura). Além do mais, o tratamento do tumor de pâncreas em ratos foi reduzido durante vinte e um dias de tratamento com dosagens não tóxicas³⁵, FIGURA 1.13A.

FIGURA 1.13 - Diminuição do tamanho dos tumores sólidos em ratos tratados e não tratados (controle) (A) e representação das estruturas químicas dos complexos tetrakis e octaacetil (B).



1.4 - Planejamento estrutural

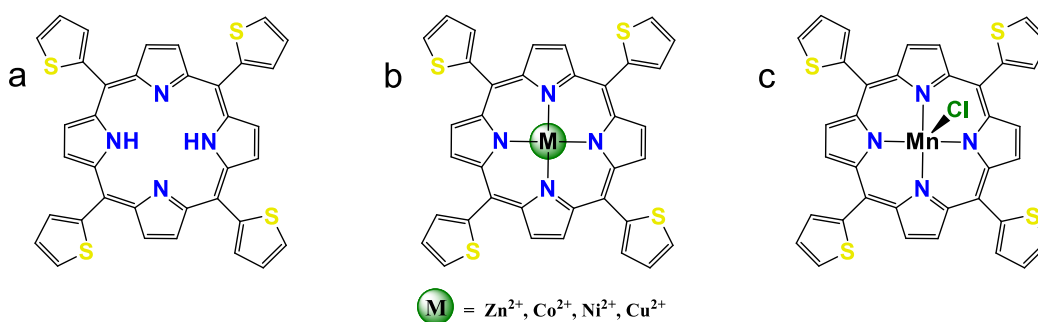
Com o intuito de obter estruturas porfirínicas planares, nesse trabalho foi utilizada a 5,10,15,20-tetra-(tien-2-il)-21H,23H-porfirina (H_2TTP), que diferentemente da 5,10,15,20-tetra-fenil-21H,23H-porfirina (H_2TPP) e seus análogos, apresenta seus substituintes tie-2-nil nas posições *meso* de forma quase coplanar ao anel porfirínico, conforme o estudo estrutural e espectroscópico realizado por Brückner e colaboradores³⁶. Essa diferença estrutural pode afetar as propriedades biológicas da H_2TTP .

Embora, H_2TTP e complexos análogos sejam descritos na literatura³⁷, existe somente uma aplicação biológica de um dos complexos de estanho(IV)³⁸ utilizado em terapia fotodinâmica. Tornando assim, a investigação da citotoxicidade e interação de tal porfirina e complexos análogos com biomoléculas, especialmente o DNA, um estudo singular.

Por conta da quase coplanaridade dos anéis 2-tiofeno em relação ao anel porfirínico, a H_2TTP apresenta uma baixa solubilidade em diversos solventes. Uma forma fácil de contornar essa situação, sem a utilização de sínteses orgânicas complexas, é através da obtenção de metaloporfirinas, uma vez que esses compostos (dependente do metal) apresentam maior solubilidade quando comparadas às bases livres, pela possibilidade de interações ou coordenação em posição axial. Logo, nesse trabalho foram utilizados centros metálicos de zinco(II), níquel(II), cobalto(II), cobre(II)

e manganês(III) (FIGURA 1.14), uma vez que todos esses cátions são elementos traços no corpo humano (com exceção do níquel)³⁹, que tornam mais viáveis de serem excretados. De forma estrutural, os raios iônicos dos centros metálicos escolhidos são compatíveis com a cavidade do macrociclo da porfirina, uma vez que essa lacuna apresenta a distância entre os nitrogênios opostos de aproximadamente 4,12 Å⁴⁰ e os centros metálicos apresentam raios iônicos inferiores a 0,9 Å⁴¹.

FIGURA 1.14 - Representação das estruturas químicas da 5,10,15,20-tetra-(tien-2-il)-21H,23H-porfirina (a) e metaloporfirinas análogas de zinco(II), cobalto(II), níquel(II), cobre(II) (b); e manganês(III) (c).



2 - Objetivos

O objetivo desse trabalho foi avaliar a influência de centros metálicos da primeira série de transição em complexos porfirínicos frente a citotoxicidade e interação com DNA.

2.1 - Objetivos específicos

- Sintetizar e caracterizar o ligante 5,10,15,20-tetra-(tien-2-il)-21*H*,23*H*-porfirina;
- Sintetizar e caracterizar complexos porfirínicos de zinco(II), níquel(II), cobre(II), cobalto(II) e manganês(III);
- Realizar testes físico-químicos de estabilidade e lipofilicidade dos compostos estudados;
- Avaliar a citotoxicidade dos compostos a base de H₂TTP;
- Investigar a capacidade de interação dos compostos sintetizados com o DNA.

3 - Parte experimental

Nessa seção será descrita a procedência de todos os solventes, reagentes e metodologias utilizadas para aquisição de resultados nesse trabalho.

3.1 - Procedência de solventes e reagentes

Todos os reagentes e solventes utilizados para obtenção da 5,10,15,20-tetra-(tien-2-il)-21H,23H-porfirina, como também seus fabricantes estão descritos na TABELA 3.1. É importante ressaltar que o pirrol foi destilado previamente para as sínteses das porfirinas na forma de base livre e utilizado DMF seco para síntese do complexo [Co(TTP)].

TABELA 3.1 - Procedência de reagentes e solventes.

Reagentes	Procedência	Solventes	Procedência
Pirrol	Sigma-Aldrich [®]	Monoclorobenzeno	Vetec [®]
2-tiofenocarboxialdeído	Sigma-Aldrich [®]	Clorofórmio	Synth [®]
Cloridrato de hidroxilamina	Sigma-Aldrich [®]	CDCl ₃	Sigma-Aldrich [®]
Nitrobenzeno	Sigma-Aldrich [®]	Metanol	Synth [®]
DDQ	Sigma-Aldrich [®]	DMF	Synth [®]
Zn(CH ₃ CO ₂) ₂ ·2H ₂ O	Vetec [®]	Hexano	Synth [®]
Ni(CH ₃ CO ₂) ₂ ·4H ₂ O	Synth [®]	Diclorometano	Synth [®]
Co(CH ₃ CO ₂) ₂ ·4H ₂ O	Neon [®]	Iodeto de cézio	Sigma-Aldrich [®]
Cu(CH ₃ CO ₂) ₂ ·H ₂ O	Vetec [®]	DMSO	Synth [®]
MnCl ₂ ·4H ₂ O	Neon [®]		
NaCl	Synth [®]		
Sulfato de sódio anidro	Synth [®]		
Agarose Padrão	Kasvy [®]		

3.2 - Metodologias de síntese

Com a finalidade de diminuir a quantidade procedimentos sintéticos descritos nessa seção, as metodologias empregadas para as sínteses de porfirinas obtidas com massa insuficiente para prosseguir com as caracterizações e testes biológicos, estão em anexo.

3.2.1 - Síntese da 5,10,15,20-tetra-(tien-2-il)-21H,23H-porfirina - H₂TTP⁴²

Foram dissolvidos pirrol, previamente destilado (1,75 mL, 25,00 mmols), 2-tiophenocarboxaldeído (2,35 mL, 25,00 mmols) e cloridrato de hidroxilamina (1,74 g, 25,00 mmols) em monoclorobenzeno (125 mL). Essa mistura foi agitada em temperatura ambiente por 24h. Após esse período, foi adicionado *in situ* nitrobenzeno (100 mL), sendo esta mistura submetida a agitação magnética durante 2h a 130 °C. Em seguida, o monoclorobenzeno e nitrobenzeno foram destilados sob pressão reduzida, até a total retirada aparente de ambos os compostos. O produto foi submetido a agitação sonora em metanol e purificado através de 10 cristalizações, utilizando clorofórmio e metanol na proporção de 2:1, sendo que a purificação do composto foi acompanhada por CCD. A porfirina H₂TTP foi obtida com 32% de rendimento (1,20 g; 2,00 mmol).

3.2.2 - Síntese do 5,10,15,20-tetra-(tien-2-il)-porfirinato de zinco(II) - [Zn(TTP)]⁴²

H₂TTP (77,00 mg, 0,12 mmol) foi solubilizada em 25 mL de clorofórmio e agitada por 5 minutos a 40 °C. Em seguida, foi adicionado Zn(CH₃CO₂)₂·2H₂O (800 mg, 3,64 mmol) dissolvido em 7,00 mL de metanol. A reação permaneceu a 40 °C durante 40 minutos. Após esse processo, a purificação se deu por extração líquido-líquido, adicionando 100 mL de CH₂Cl₂ e extraído com 3x150 mL de água destilada. Em seguida, o extraído foi seco com sulfato de sódio anidro e o solvente evaporado sob pressão reduzida. Finalmente, o produto foi cristalizado com CH₂Cl₂ e hexano obtendo o complexo de [Zn(TTP)] com 76% de rendimento (63,90 mg; 0,091 mmol).

3.2.3 - Síntese do 5,10,15,20-tetra-(tien-2-il)-porfirinato de níquel(II)- [Ni(TTP)]¹⁷

H₂TTP (70,00 mg, 0,11 mmol) foi solubilizada em 6 mL de dimetilformamida e agitada por 5 minutos a 150 °C, em seguida, foi adicionado Ni(CH₃CO₂)₂·4H₂O (194,60 mg, 1,10 mmol). A reação permaneceu a 160 °C durante

24 horas. Finalmente, o produto foi cristalizado em 50 mL de água e 35 mL de metanol obtendo o complexo [Ni(TTP)] com 87% de rendimento (66,40 mg; 0,096 mmol).

3.2.4 - Síntese do 5,10,15,20-tetra-(tien-2-il)-porfirinato de cobre(II) - [Cu(TTP)]⁴³

H₂TTP (70,0 mg, 0,11 mmol) foi solubilizada em 15 mL de clorofórmio e agitada por 5 minutos a 40 °C, em seguida, foi adicionado Cu(CH₃CO₂)₂·H₂O (110,3mg, 0,61mmol) dissolvido em 7 mL de metanol. A reação permaneceu sob agitação magnética durante 4 horas a 70°C. A purificação foi sucedida através de extração em 70 mL de CH₂Cl₂ e 3x120 mL de água destilada, sendo que a emulsão foi retirada adicionando se pequenas quantidades de solução saturada de NaCl. Depois, o extraído foi seco com sulfato de sódio anidro e o solvente evaporado sob pressão reduzida. Finalmente, o produto foi cristalizado com CH₂Cl₂ e hexano para obtenção do complexo [Cu(TTP)] com rendimento de 82% (62,70 mg; 0,090 mmol).

3.2.5 - Síntese do 5,10,15,20-tetra-(tien-2-il)-porfirinato de cobalto(II) - [Co(TTP)]⁴⁴

H₂TTP (89,90 mg, 0,14 mmol) foi solubilizada em 10 mL de DMF seco, em seguida foi adicionado Co(CH₃CO₂)₂·4H₂O (175,60 mg, 0,70 mmol), essa mistura permaneceu em refluxo por 1,5h, sob atmosfera de argônio. Após esse período, o produto foi precipitado com água destilada e filtrado. A purificação do produto sucedeu-se com a adição de clorofórmio (30 mL) e extração com água destilada (2x50 mL). A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e solvente foi evaporado sob pressão reduzida até aproximadamente 3 mL. Finalmente, o produto foi recristalizado com adição de 15 mL de hexano. E após a filtração, o complexo [Co(TTP)] foi obtido com 69% de rendimento (68,10 mg; 0,098 mmol).

3.2.6 - Síntese do clorido-[(5,10,15,20-tetra-(tien-2-il)-porfirinato] de manganês(III) - [Mn(TTP)Cl]⁴⁵

H₂TTP (90,10 mg, 0,14 mmol) foi solubilizada em 20 mL de DMF, em seguida, foi adicionado MnCl₂·4H₂O (558,50 mg; 2,80 mmol). A reação foi acompanhada por espectroscopia ultravioleta-visível, para verificar o aparecimento da banda em torno de 480 nm, que é uma característica da formação de metaloporfirinas de manganês(III). Após 1,5h a reação foi resfriada e cristalizada com água destilada

a baixa temperatura. O produto foi filtrado, solubilizado em clorofórmio e extraído com água (3x50 mL) para remover o excesso de sal. Depois, a fase orgânica foi seca e o solvente evaporado sob pressão reduzida. Finalmente, o produto foi cristalizado com hexano:clorofórmio 7:1 e filtrado obtendo o complexo [Mn(TTP)Cl] com 80% de rendimento (82,00 mg; 0,113 mmol).

3.3 - Métodos instrumentais e procedimentos

3.3.1 - Condutividade molar

Os compostos foram solubilizados em diclorometano para obter uma concentração de 1.10^{-3} mol.L⁻¹ e analisadas por um condutivímetro MARCONI MA-521. Antes da análise o equipamento foi calibrado com uma solução padrão 146,9 μ S.cm⁻¹ da MS TECPON Instrumentação.

3.3.2 - Espectroscopia na região do UV-vis

Os espectros na região do Ultravioleta visível foram obtidos com auxílio de um espectrofotômetro SHIMADZU UV-1650PC. Sendo que, as caracterizações dos complexos foram realizadas em diclorometano 3.10^{-6} mol.L⁻¹, utilizando cubetas de quartzo com caminho ótico de 1cm e a varredura foi feita na região de 750 a 300 nm. Os espectros foram obtidos e tratados utilizando os softwares UVProb 2.42 e Origin 9.0.0, respectivamente. Durante os experimentos foram obtidas as linhas base utilizando o software de aquisição e o branco foi subtraído utilizando segundo feixe de luz.

3.3.3 - Ressonância magnética nuclear de hidrogênio

Os espectros de ressonância magnética nuclear de ¹H foram obtidos utilizando o espectrômetro Bruker 9,4 Tesla (400 MHz para frequência de hidrogênio), NanoBay do Departamento de Química da UFSCar. As amostras foram preparadas utilizando 2 mg dos compostos, dissolvidas em 500 μ L CDCl₃. Os espectros foram tratados utilizando o software MestReNovaversão 12.0.2-20910.

3.3.4 - Espectroscopia na região do infravermelho

As amostras foram analisadas usando um equipamento IRPrestige-21 da SHIMADZU utilizando pastilhas de Csl. Os espectros foram coletados com 64 varreduras para maior precisão em uma faixa de varredura de 4000 a 240 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} . Os espectros foram obtidos e a linha de base corrigida utilizando o programa ShimadzuIRsolution 1.60.

3.3.5 - Espectroscopia de fotoluminescência

Os espectros de emissão foram obtidos em um espectrofluorofotômetro SHIMADZU modelo RF-5301PC do Laboratório Interdisciplinar de Eletroquímica e Cerâmica (LIEC). As amostra foram preparadas em clorofórmio a $10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$. E para aquisição e tratamento dos dados foram utilizados os softwares RFPC e Origin 9.0.0, respectivamente.

3.3.6 - Análise elementar de C, H, N

As porcentagens de carbono, nitrogênio e hidrogênio foram obtidas utilizando o equipamento EA1108 (CHNS-O) da Fisons Instruments com auxílio do programa EAGER 200 – RESULTS disponíveis na Central Analítica do Departamento de Química da UFSCar. Foram pesadas aproximadamente 1 mg das amostras em uma balança Sartorius Micro (XM-1000 P) que apresenta um erro de 0,005 mg.

3.3.7 - Espectrometria de massas

Após a diluição da amostra na concentração de 500,0 ng.mL^{-1} foi utilizando um cromatógrafo líquido de ultra alta eficiência para injeção em fluxo e aumento da energia de colisão (0, 20 e 40 eV). Nesta análise foi empregada uma fase móvel de arraste que consistiu em água (solvente A) e acetonitrila (solvente B) com ácido fórmico 0,1% (v/v). O fluxo foi de 0,400 mL.min^{-1} com um volume de injeção de 10,0 μL .

A análise qualitativa dos compostos foi realizada no modo positivo sendo empregados os seguintes parâmetros para ionização, TABELA 3.2:

TABELA 3.2 - Parâmetros empregados para a ionização utilizando ESI.

Temperatura do gás (°C)	250
Fluxo de gás (l/min)	8
Nebulizador (psi)	45
Temperatura da barreira térmica do gás (°C)	300
Temperatura da barreira térmica do fluxo (°C)	11
Voltagem do Nozze (V)	0
Fragmentador (eV)	350
Skimmer	65

O íon molecular e os íons fragmentos foram simultaneamente obtidos pelo modo de aquisição MS². Os espectros foram adquiridos monitorando uma faixa entre 100 e 1.500 Da e processados pelo *software* MassHunder Workstation versão B.08.00.

3.3.8 - Coeficiente de partição

Por conta da baixa solubilidade em água e n-octanol dos compostos estudados, primeiramente as soluções de concentração de $3 \cdot 10^{-4}$ mol.L⁻¹ foram preparadas em DMSO e diluídas para se obter $3 \cdot 10^{-6}$ mol.L⁻¹ em n-octanol. Em seguida, misturas heterogêneas foram feitas com 750 µl da solução previamente preparada em n-octanol e 750 µl de água destilada em um microtubo de 2 ml. Após o período de incubação de 24h a 37 °C sob agitação a 200 rpm utilizando o Termo-ShakerAgmaxx modelo AG-100 as amostras foram analisadas em triplicata utilizando espectrofotômetro UV-vis Shimadzu em uma concentração de aproximadamente $8,6 \cdot 10^{-7}$ mol.L⁻¹ (concentração inicial dos compostos ([n-Oc]_{inicial})). Depois foram feitas curvas de calibração com sete pontos na faixa de concentração entre $1,8 - 9,5 \cdot 10^{-7}$ mol.L⁻¹ com as soluções estoque em n-octanol.

A partir das equações de primeiro grau obtidas com as regressões lineares, foram verificadas as concentrações dos compostos em n-octanol após incubação ([n-Oc]_{final}). E utilizando a equação 1, foi verificado a quantidade dos compostos em água [H₂O]:

Equação 1: Cálculo para obtenção da concentração dos compostos em fase aquosa, em que $[n-Oc]_{inicial}$ é a concentração adicionada antes da incubação, $[n-Oc]_{final}$ e $[H_2O]$ as concentrações dos compostos na fase lipofílica e aquosa, respectivamente.

$$[n - Oc]_{inicial} = [n - Oc]_{final} + [H_2O]$$

A lipofilicidade ($\log P$) dos compostos foram calculadas dividindo a concentração de composto em n-octanol pela concentração em água e aplicando o logaritmo de P na base 10, equação 2:

Equação 2: Cálculo do logaritmo do coeficiente de partição, em que $[n-Oc]_{final}$ e $[H_2O]$ as concentrações dos compostos na fase lipofílica e aquosa, respectivamente.

$$\log P = \log \frac{[n - Oc]_{final}}{[H_2O]}$$

3.3.9 - Interação com ct-DNA por espectroscopia ultravioleta visível

Para realizar o teste de interação com DNA, primeiramente, foi preparada uma solução aquosa $10,0 \text{ mmol.L}^{-1}$ de tris-HCl, $10,0 \text{ mmol.L}^{-1}$ de NaCl (pH = 7,4) em temperatura ambiente. Nesse trabalho foi utilizada uma solução estoque de DNA do timo de bezerro (*calftymus* / ct-DNA) 1 mg/mL preparada na solução tris-HCl a $4 - 9 \text{ }^\circ\text{C}$. Antes do procedimento a solução foi estocada em geladeira a aproximadamente $4 \text{ }^\circ\text{C}$ para evitar degradação da biomolécula e verificado a razão da absorbância comprimentos de onda 260 e 280 nm (A_{260} / A_{280}) acima de 1,8 indicando que o ct-DNA está com a quantidade aceitável de proteínas contaminantes que podem prejudicar a interação com os compostos estudados. Para determinar a concentração molar de DNA na solução, foi utilizado a absorvidade molar ($\epsilon = 6600 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$; $\lambda = 260 \text{ nm}$) relatada pela literatura⁴⁶. Após obter a concentração através da Lei de Lambert-Beer, equação 3, a solução foi diluída para $10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$.

Equação 3: Equação de Lambert-Beer, em “A” é a absorbância, “l” o caminho ótico, “ ϵ ” a absorvidade molar e “c” a concentração da espécie química.

$$A = \epsilon . c . l$$

A constante de ligação (K_b) foi calculada utilizando a técnica de titulação espectrofotométrica. Em que soluções dos compostos estudados a $0,160 \text{ mmol.L}^{-1}$ foram preparadas em DMSO por conta da baixa solubilidade. Em seguida, foi adicionado à cubeta de quartzo (3,00 mL) $125 \text{ } \mu\text{L}$ do composto e adicionado tampão tris-HCl para completar $2,00 \text{ mL}$. Os espectros foram obtidos adicionando à cubeta de

trabalho ct-DNA afim de que a razão [DNA]/ [composto] estivesse entre 0,1 – 2,0. Durante a obtenção dos espectros, o branco apresentava a mesma concentração de CT-DNA para evitar possíveis erros. Nesse experimento a banda Soret dos compostos porfirínicos foi escolhida para monitorar a interação com a biomolécula.

3.3.10 - Interação com plasmídeo pBR322

Para os testes de interação com o plasmídeo pBR322, primeiramente os complexos foram solubilizados em DMSO, em seguida, em um microtubo de 1500 µL livre de DNase foram adicionados 1 µL dessas soluções, 25 µL de água deionizada e 4 µL do plasmídeo totalizando assim um volume de 30 µL, obtendo concentrações finais dos compostos de 1, 10 e 100 µM. As soluções então foram incubadas a 37 °C por 24 horas. Após o tempo transcorrido as amostras foram retiradas do banho termostático, foram centrifugadas a 5000 rpm durante 5 minutos e adicionou-se 15 µL de STEB (40% de sacarose, 100 mM de tris-HCl, pH = 7,5; 1 mM de EDTA; 0,5 mgmL⁻¹ de azul de bromofenol). Em seguida 20 µL das amostras foram adicionadas nos respectivos poços do gel de agarose 1%, que foi preparado previamente com 750 mg de agarose e 75 mL de TBE 1x. A corrida eletroforética ocorreu em solução TBE 1x a 40 mA durante 720 minutos, após esse período o gel foi adicionado em solução corada de brometo de etídio e revelado no fotodocumentador Gel Doc™ EZ, a imagem obtida foi tratada utilizando o software ImageLab™ 6.0.0 fornecido pela BioRad.

3.3.11 - Citotoxicidade

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados pelos doutorandos Mauro Almeida (CCQM-UFSCAR) e Gabriela Porto (CCQM-UFSCAR), utilizando as seguintes linhagens celulares: A2780cis (tumoral de ovário resistente a cisplatina), DU-145 (tumoral de próstata). Ambas foram cultivadas em meio RPMI1640 com 10% (v/v) de FBS (soro fetal bovino) dentro de garrafas de plástico (Corning) armazenadas em estufa a 37 °C com atmosfera de 5% de CO₂. O processo de ativação de resistência da linhagem A2780cis foi realizado por ciclos celulares na presença de 1,00 µM de cisplatina.

As células foram suspensas em tripsina e incubadas na estufa a 37 °C por dois minutos. Em seguida, adicionou-se o meio de cultura com 10% de FBS para inibir a ação enzimática. A suspensão foi centrifugada (centrífuga Sorval ST8-Thermo

Scientific), para retirada da Tripsina, a 150 rpm por cinco minutos, com descarte do sobrenadante e suspensão em meio de cultura.

A contagem das células foi realizada utilizando o corante Azul de Tripiano em uma câmara de Neubauer no Microscópio Nikon Eclipse TS100. Após a contagem da suspensão, foram adicionadas às placas de 96 poços alíquotas com 150 μL contendo $1,5 \cdot 10^4$ células mL^{-1} . As placas foram mantidas por 24h na estufa e em seguida foi adicionado a cada poço 0,75 μL de uma solução de DMSO contendo o ligante ou os complexos. As concentrações finais dos compostos nos poços foram de 0,80; 1,58; 3,16; 6,25; 12,50; 25,00; 50,00; 100,00 $\mu\text{mol.L}^{-1}$; para o composto mais ativo as concentrações precisaram ser ajustadas para: 0,20; 0,39; 0,78; 1,58; 3,16; 6,25; 12,50; 25,00 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Em seguida, as placas foram incubadas novamente na estufa por mais 48h^{47,48,49}.

Após a incubação das microplacas foram adicionados a cada poço 50 μL de uma solução de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difenil 24 μL brometo de tetrazolio) (1 mg.mL^{-1}) e incubada novamente na estufa por 4h. Por fim, se retirou a solução de cada poço e adicionou-se 100 μL de álcool isopropílico. Em seguida foram realizadas as medidas de absorbância em cada poço com o leitor de microplacas híbrido da BioTek modelo SYNERGY H1. Os dados obtidos foram tratados utilizando Excel 2010 e GraphPadPrism 6.01.

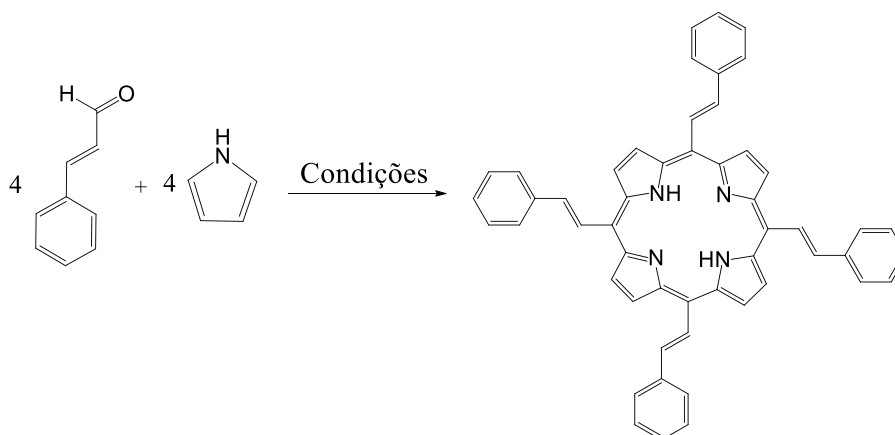
4 - Resultados e discussão

Nessa seção serão discutidos todos os resultados sintéticos, técnicas de caracterização, interação com DNA e citotoxicidade de porfirinas e seus compostos metálicos.

4.1 - Síntese de *meso*-porfirinas e metaloporfirinas a base de H₂TTP

Durante a realização do projeto de pesquisa foram realizadas algumas sínteses anteriores a da H₂TTP com intuito de obter compostos porfirínicos que pudessem apresentar atividades biológicas. Sendo que, as primeiras tentativas sintéticas foram para obter a porfirina 5,10,15,20-tetra(feniletilene)-21H,23Hporfirina (FIGURA 4.1), as condições estão descritas na TABELA 4.1. Essa estrutura química poderia ser interessante para estudos biológicos, uma vez que a molécula apresenta uma porção derivada do cinamaldeído, presente na canela. A presença deste grupo em compostos orgânicos e ou complexos vem demonstrando ser interessante na obtenção de compostos com atividade anticâncer⁵⁰. Além do mais, um estudo descrito por Fadda e colaboradores mostrou que a porfirina, contendo cinamaldeído, apresenta citotoxicidade significativa frente às linhagens MCF-7 (tumoral de mama) e HepG2 (tumoral de fígado)⁵¹.

FIGURA 4.1 -Procedimento sintético genérico para a obtenção de 5,10,15,20-tetra(feniletilene)-21H,23H-porfirina.



Durante a execução dos experimentos, o primeiro método sintético testado foi o descrito por Fadda e colaboradores⁵¹, TABELA 4.1. Usando-se DMF como solvente e ácido tolueno-4-sulfônico sob atmosfera inerte. Porém, ao final dessa

reação não foi possível identificar a banda Soret, característica em compostos porfirínicos. O artigo descreve que o produto formado era um pó marrom com 82% de rendimento. Acredita-se que este produto formado por Fadda esteja relacionado com porfirina contaminada por polipirrol e não ao produto de fato, uma vez que o rendimento é extremamente fora do comum para este tipo de composto e a banda característica do anel porfirínico não foi observada. Diante disso, o procedimento sintético foi trocado por outros mais descritos na literatura.

TABELA 4.1 - Condições sintéticas utilizadas nas tentativas de obtenção da 5,10,15,20-tetra-(feniletilene)-21H,23Hporfirina.

Entrada	Pirrol (mmol)	Aldeído (mmol)	Condições	Rendimento
1	1,44	1,44	DMF, 100 °C, Ar, 5min; (ii) PTSA, 150 °C, 1h (Fadda e col. ⁵¹)	-
2	24,1	24,1	Ácido propiônico, nitrobenzeno, 120 °C, 3h (Gonsalves e col. ⁵²)	-
3	0,25	0,25	CH ₂ Cl ₂ , Ar, TFA, 2h (Lindsey e col. ⁵³)	-
4	0,25	0,25	CH ₂ Cl ₂ , Ar, eterato-BF ₃ , 2h (Lindsey e col. ⁵³)	-

Uma parceria foi estabelecida com o Prof. Dr. Kléber Thiago de Oliveira do Laboratório de Química Bio-orgânica (LQBO) da UFSCar, devido sua ampla experiência na síntese desta classe de compostos. Sob sua orientação foram desenvolvidos os procedimentos sintéticos para a obtenção das porfirinas.

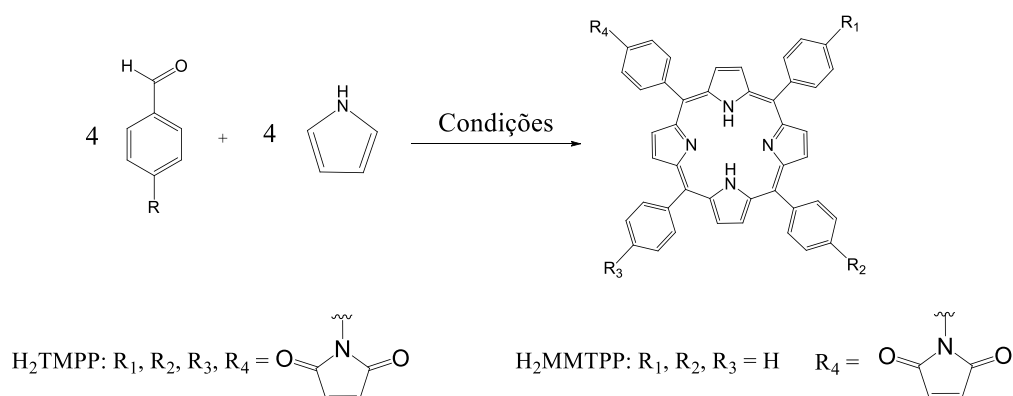
No intuito de se obter a porfirina derivada do cinamaldeído, foi testada a metodologia de Gonsalves e colaboradores⁵², que é uma das mais descritas na literatura para síntese de porfirinas. Essa metodologia utiliza ácido propiônico como solvente/catalisador e nitrobenzeno como agente oxidante a 120 °C durante 3h. A síntese foi monitorada por espectroscopia na região do UV-vis, porém não foi verificada a presença da banda Soret. Essa metodologia, embora seja uma das mais utilizadas, ocorre sob condições drásticas de pH e temperatura, que pode ser problemática quando utiliza-se aldeídos mais sensíveis a tais condições.

A fim de contornar essa situação, foi utilizada a metodologia de Lindsey⁵⁴, que apresenta condições reacionais menos extremas. A síntese

primeiramente foi realizada em diclorometano como solvente, atmosfera inerte de argônio e ácido trifluoroacético como catalisador durante 2h. A reação foi monitorada por espectroscopia na região do UV-vis, com a utilização de 2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona (DDQ) como agente redutor, porém, não foi possível verificar a formação da banda Soret. A partir desse resultado, a mesma metodologia de Lindsey foi testada mudando apenas o catalisador para eterato-BF₃, mas também não foi possível verificar a formação da banda Soret. Possivelmente, a ligação vinílica, entre o anel aromático e a carbonila do cinamaldeído, seja muito instável às condições mais usuais, induzindo a formação de subprodutos de reação.

Face ao exposto, a porfirina contendo o cinamaldeído foi abandonada, e passou-se a trabalhar na síntese de porfirinas utilizando o 4-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)benzaldeído (Aldeído 1), seguindo a condição sintética proposta por Lindsey e colaboradores⁵³ descritas na TABELA 4.2. É importante salientar que a escolha dessa porfirina está relacionada com a presença de grupos maleimidas nas extremidades. Que por sua vez, apresentam características de bioconjugadores, ou seja, podem fazer ligações covalentes com biomoléculas⁵⁵. Porém, a primeira síntese que foi realizada para obtenção do composto H₂TMPP obteve rendimento menor do que 1%. Então, pela impossibilidade de alcançar os objetivos do trabalho, por conta de massa insuficiente, tal porfirina foi resguardada para projetos futuros.

FIGURA 4.2 - Procedimento sintético para a síntese de porfirinas contendo o grupo maleimida.



De forma análoga, foi realizada a síntese da H₂MMTPP (condições sintéticas e estruturas na TABELA 4.2 e FIGURA 4.2, respectivamente) na qual foi

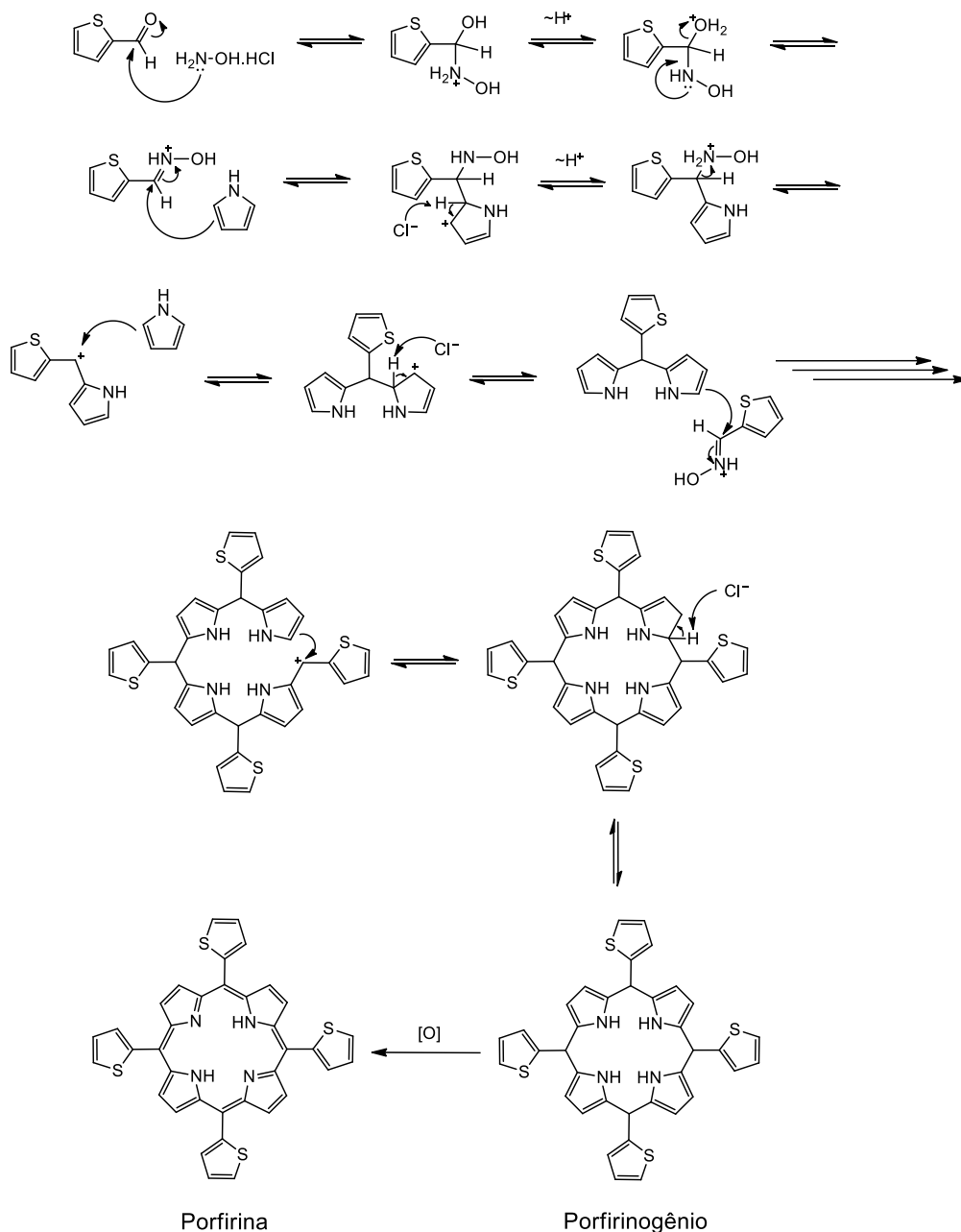
obtido um rendimento de 8%. Pelas condições sintéticas empregadas para obtenção de porfirinas, tal rendimento é considerado satisfatório. Porém, sendo que o objetivo desse trabalho é sintetizar, caracterizar e aplicar biologicamente compostos de coordenação foi necessário abdicar do composto e buscar por metodologias sintéticas que apresentassem melhores rendimentos.

TABELA 4.2 - Condições sintéticas, rendimento e referência para as sínteses realizadas com o aldeído 1.

Composto	Pirrol (mmol)	Aldeído 1 (mmol)	Aldeído 2 (mmol)	Condições	Rendimento (%)
H ₂ TMPP	0,5	0,5	-	(i) CH ₂ Cl ₂ , Ar, eterato-BF ₂ , -1°C, 3h; (ii) DDQ, t.a., 3h. (Lindsey e col. ⁵³)	<1
H ₂ MMTPP	2,0	0,5	1,5	(i) CH ₂ Cl ₂ , Ar, eterato-BF ₂ , -1°C, 3,5h; (ii) DDQ, t.a., 3h. (Lindsey e col. ⁵³)	8

Sendo o rendimento um fator primordial para o avanço do trabalho, foi proposta a síntese da 5,10,15,20-tetra-(tien-2-il)-21H,23H-porfirina (H₂TTP) utilizando a metodologia descrita por Momo e colaboradores⁴². Nessa síntese foram utilizados pirrol e 2-tiofenocarboxialdeído como reagentes, clorobenzeno como solvente, cloridrato de hidroxilamônio atuando como catalisador ácido/básico e nitrobenzeno, agente oxidante na etapa de oxidação do porfirinogênio em porfirina, como descreve o mecanismo de reação proposto por Momo¹⁷, FIGURA 4.3. Foram realizadas três sínteses com rendimentos de 20, 23 e 32%, sendo o produto reacional submetido a 10 cristalizações com clorofórmio e metanol para a retirada de polipirrol e sua obtenção em elevado grau de pureza.

FIGURA 4.3 –Mecanismo de reação para a obtenção da meso-tetra-(2-tienil)porfirina catalisada por cloridrato de hidroxilamina proposto por Momo¹⁷.



As reações de complexação foram realizadas nas condições reacionais que são mais descritas na literatura, para tal finalidade. Para isso, foi necessário utilizar a base de dados *SciFinder* e buscar sais, solventes, tempo de reação e temperatura capazes de otimizar o processo sintético. Desta forma, as condições sintéticas para obtenção desses complexos estão descritas na TABELA 4.3.

TABELA 4.3 - Condições sintéticas e rendimentos dos complexos a base de H₂TTP.

Composto	TTP (mmol)	Sal (mmol)	Condições	Rendimentos
[Zn(TTP)]	0,12	3,64	Zn(OOAc) ₂ ·2H ₂ O, CH ₂ Cl ₂ /MeOH, 40°C, 40 min (Momo e col. ⁴²)	76
[Ni(TTP)]	0,11	1,10	Ni(OOAc) ₂ ·4H ₂ O, DMF, 160°C, 24h (Momo, tese ¹⁷)	87
[Cu(TTP)]	0,11	0,61	Cu(OOAc) ₂ ·H ₂ O, CH ₂ Cl ₂ /MeOH, 70°C, 4h (Al-Shewiki e col. ⁵⁶)	82
[Mn(TTP)Cl]	0,14	2,80	MnCl ₂ ·4H ₂ O, DMF, 160°C, 1,5h (Chizhova e col. ⁴⁵)	80
[Co(TTP)]	0,14	0,70	Co(OOAc) ₂ ·4H ₂ O, DMF, 160°C, 2h (Bichan e col. ⁴⁴ .)	69

4.2 - Caracterização de compostos porfirínicos a base de H₂TTP

Nessa seção foram descritas e discutidas todas as análises de caracterização para os compostos, sendo divididas em duas categorias: não espectral (análise elementar, massa molar, aparência física e condutividade molar) e espectral (espectroscopia na região do Infravermelho, UV-vis, fluorescência, ressonância magnética nuclear de hidrogênio e espectrometria de massas).

4.2.1 - Caracterização não espectral de compostos porfirínicos a base de H₂TTP

Após a síntese de H₂TTP, [Zn(TTP)], [Ni(TTP)], [Cu(TTP)] e [Co(TTP)] foi percebido que todos os produtos são de coloração púrpura. Porém, o composto [Mn(TTP)Cl] apresenta coloração verde musgo, que condiz com complexos porfirínicos de manganês(III)⁴⁵.

Com a obtenção das porcentagens de carbono, nitrogênio e hidrogênio por análise elementar, TABELA 4.4, foi possível verificar as fórmulas mínimas dos compostos sintetizados. As moléculas de solventes utilizadas foram confirmadas por técnicas espectroscópicas (Infravermelho e RMN ¹H). Sendo que, possivelmente as presenças dessas moléculas estejam relacionadas com os sais hidratados e com os solventes utilizados nas sínteses dos respectivos compostos.

As medidas de condutividade molar mostraram que todos os compostos são não-eletrólitos, TABELA 4.4, quando em solução de diclorometano⁵⁷. Essa informação apresenta grande relevância para caracterizar compostos que contém em suas estruturas centros metálicos que apresentam instabilidade de estado de oxidação durante a síntese, por exemplo, cobalto(II): $\text{Co}^{2+} \rightarrow \text{Co}^{3+} + e^-$. Com a obtenção do valor de condutividade molar inferior a $12 \text{ } \Omega \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$ ($0,91 \text{ } \Omega \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$) evidenciando que o complexo $[\text{Co}(\text{TTP})]$ não é carregado⁵⁷.

Para o complexo $[\text{Mn}(\text{TTP})\text{Cl}]$ a medida de condutividade molar foi decisiva para caracterização estrutural. Pois, a síntese de tal complexo parte do sal $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, no entanto, durante o processo sintético ocorre oxidação do cátion, segundo a seguinte semirreação: $\text{Mn}^{2+} \rightarrow \text{Mn}^{3+} + e^-$. A partir dessa oxidação, ocorre a coordenação ao íon Mn^{3+} e a saída de dois hidrogênios do anel porfirínico, desta forma, o complexo formado apresentaria uma carga residual 1+. Porém, o valor de condutividade molar de $0,27 \text{ } \Omega \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$ demonstra que o produto é não-eletrólito, indicando a presença um ligante clorído (Cl^-) em posição axial.

TABELA 4.4 - Tabela de caracterizações não espectrais: fórmula química, massa molar, condutividade molar, aparência física e análise elementar dos complexos de zinco(II), níquel(II), cobre(II), manganês(III), cobalto(II) com H₂TTP .

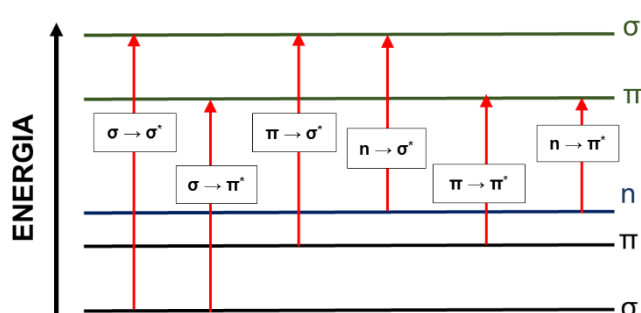
Símbolo	Fórmula química	Massa molar g/mol	Condutividade CH ₂ Cl ₂ Ω.cm ² . mol ⁻¹	Aparência física	Análise elementar		
					%C	%H exp. (cal.)	%N
H ₂ TTP	C ₃₆ H ₂₂ N ₄ S ₄	638,8	-	Púrpura	-	-	-
[Zn(TTP)]	ZnC ₃₆ H ₂₀ N ₄ S ₄ ·2H ₂ O	738,2	0,28	Púrpura	58,49 (58,57)	3,27 (3,28)	7,73 (7,59)
[Ni(TTP)]	NiC ₃₆ H ₂₀ N ₄ S ₄ ·2H ₂ O·0,5DMF	768,1	0,44	Púrpura	58,01 (58,64)	3,12 (3,61)	8,31 (8,21)
[Cu(TTP)]	CuC ₃₆ H ₂₀ N ₄ S ₄ ·3,5H ₂ O	763,4	2,07	Púrpura	56,24 (56,64)	2,97 (3,56)	7,51 (7,34)
[Mn(TTP)Cl]	MnC ₃₆ H ₂₀ N ₄ S ₄ Cl·4H ₂ O	799,3	0,27	Verde musgo	54,23 (54,10)	3,20 (3,53)	7,25 (7,01)
[Co(TTP)]	CoC ₃₆ H ₂₀ N ₄ S ₄ ·4H ₂ O·0,5DMF	804,4	0,91	Púrpura	55,23 (55,99)	3,30 (3,95)	8,00 (7,84)

4.2.2 - Espectroscopia na região do Ultravioleta visível

As escolhas dos solventes são de extrema importância para se obter dados confiáveis em cada uma das técnicas de análise. No caso das medidas de condutância e para obtenção dos espectros na região do UV-vis foi utilizado diclorometano, pois é um solvente não coordenante, o que diminui a possibilidade de reações de inserção ou troca de ligante, principalmente, no complexo [Mn(TTP)Cl].

A espectroscopia na região do ultravioleta visível é uma técnica de grande importância para caracterização de compostos orgânicos e inorgânicos. A técnica trabalha com radiações eletromagnéticas que estão na faixa de comprimento de onda em torno de 180 e 800 nm, absorções nessas regiões podem provocar transições eletrônicas de um nível de menor energia (estado fundamental) para um nível de maior energia (estado excitado)⁵⁸, FIGURA 4.4., nas espécies analisadas⁵⁸.

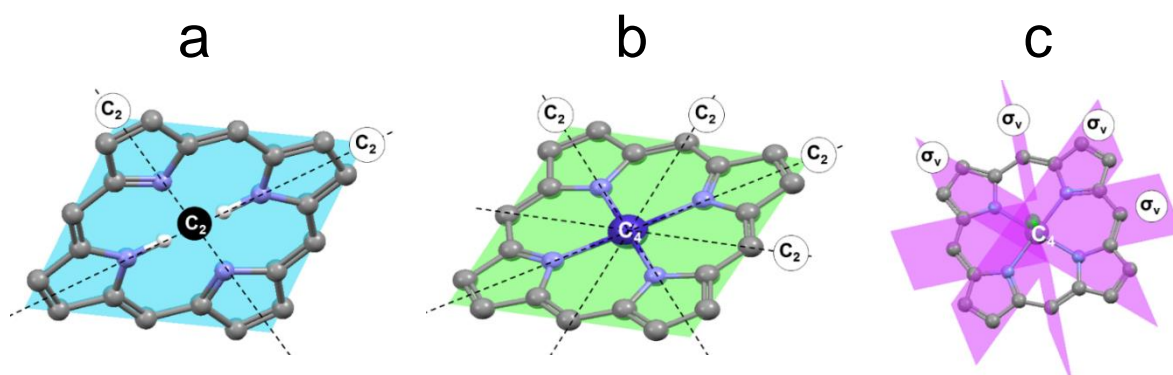
FIGURA 4.4 - Representação das transições eletrônicas entre orbitais moleculares que são possíveis de ocorrer após a incidência de radiação eletromagnética na região do ultravioleta visível.



Vale ressaltar que embora sejam relativamente pouco encontradas em sistemas porfirínicos, devido à alta absorvidade molar das bandas Soret e Q, os compostos de coordenação podem apresentar transições de carga metal-ligante (TCML), ligante-metal (TCLM) e transições d-d⁵⁹. Para os compostos porfirínicos, as transições eletrônicas mais verificadas são de caráter $\pi \rightarrow \pi^*$, como explica o “modelo de quatro orbitais” proposto por Martin Gouterman em 1961⁶⁰. De forma simplificada, os espectros de absorção de porfirinas livres apresentam uma banda de maior absorvidade molar em torno de 410 a 430 nm, denominada banda Soret, relacionada com a transição $S_0 \rightarrow S_2$; e quatro bandas de menores absorvidades molares entre 500 e 700 nm nomeadas como bandas Q e estão associadas a transições $S_0 \rightarrow S_1$.

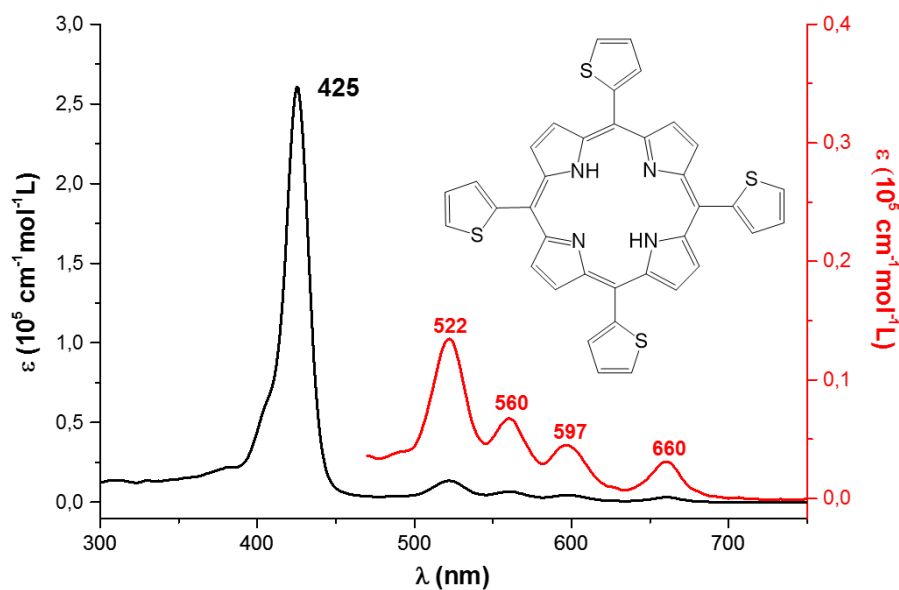
Os grupos pontuais estão diretamente relacionados com as quantidades de bandas nos espectros na região do UV-vis. Logo, há uma necessidade de definir e aplicá-los ao sistema trabalhado: a porfirina livre pertence ao grupo pontual D_{2h} , caracterizado por um C_2 (principal) no centro da porfirina, dois C_2 perpendiculares ao C_2 ($2C_2 \perp C_2$) principal e um plano horizontal (σ_h), FIGURA 4.5a; todos os complexos porfirínicos de estado de oxidação +II fazem parte do grupo pontual D_{4h} , definido por $4C_2 \perp C_4$ e um σ_h , FIGURA 4.5b; e o complexo $[Mn(TTP)Cl]$ faz parte do grupo pontual C_{4v} , identificado pela presença de um C_4 e 4 planos verticais (σ_v), FIGURA 4.5c. A partir dessas definições estabelecidas pela teoria de grupos, foi possível verificar que a diminuição da simetria, $D_{4h} > D_{2h} > C_{4v}$, acarreta no aumento de bandas nos espectros na região do UV-vis, TABELA 4.6.

FIGURA 4.5 - Ilustrações das operações de simetria dos grupos pontuais D_{2h} (a), D_{4h} (b), C_{4v} (c) para as estruturas simplificadas dos compostos porfirínicos.



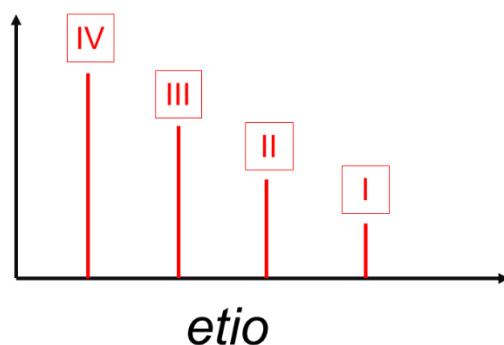
A partir da espectroscopia na região do UV-vis, foi verificado que a H_2TTP apresentou uma banda Soret em 425 nm e quatro bandas Q em 522, 560, 597 e 660 nm, FIGURA 4.6.

FIGURA 4.6 - Espectro na região do UV-vis para a H₂TTP utilizando diclorometano como solvente em preto e região 470 a 750 nm ampliada para melhor visualização das bandas Q em vermelho.



É verificado também que tal porfirina pertence ao grupo *etio* também chamadas de *etioporfirinas*⁶¹. Essa subclasse está relacionada às absorvidades decrescentes das bandas Q, IV > III > II > I, FIGURA 4.7. Sendo que, a característica desse grupo de moléculas é a presença de seis ou mais substituintes alquilas nas posições β -pirrólicas, como nesse caso, em que todos os substituintes são átomos de hidrogênio.

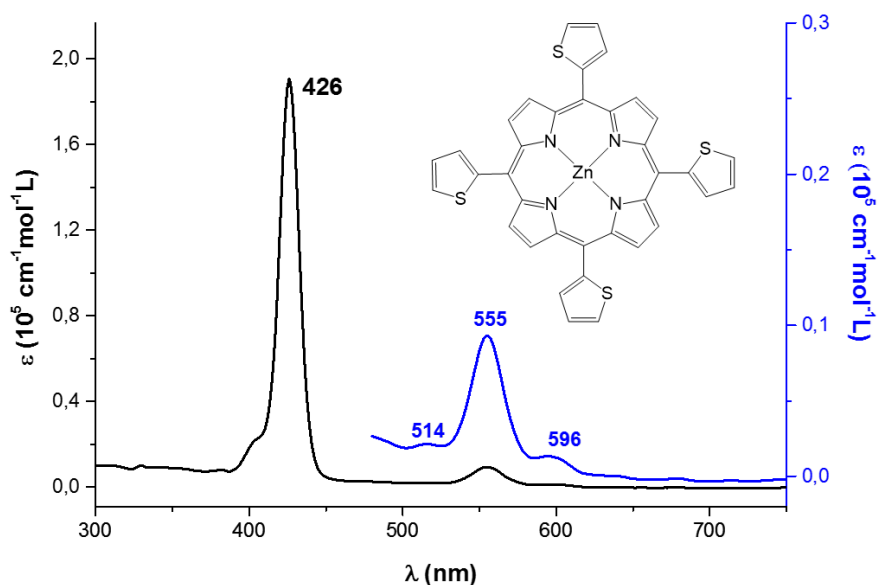
FIGURA 4.7 - Características das intensidades das bandas Q para as etioporfirinas. [Adaptada de Costa⁶¹]



Outra característica importante desse composto é o deslocamento batocrômico da banda Soret de 8 nm, em relação a H₂TPP. Esse comportamento está relacionado com o aumento da densidade eletrônica do anel porfirínico causado pela quase planaridade dos anéis 2-tiofeno nas posições *meso*³⁶.

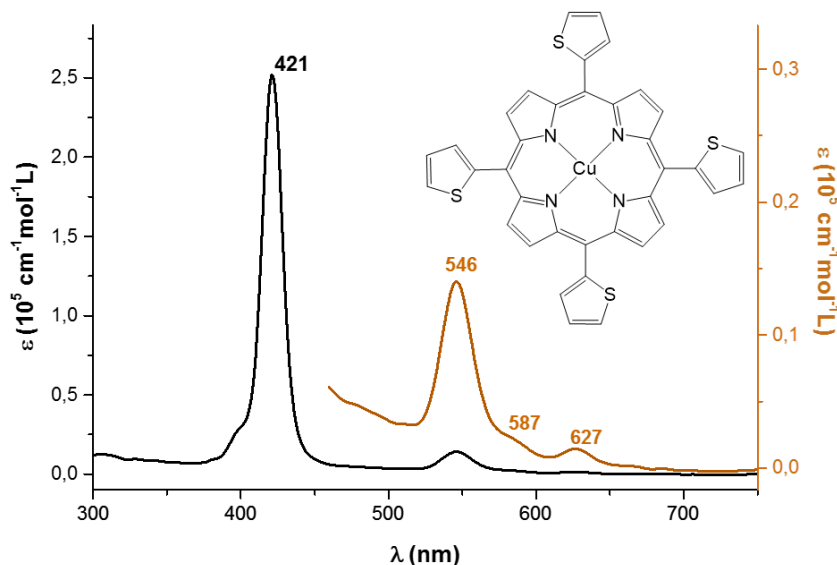
Após a obtenção do espectro na região do UV-vis, foi verificado que o complexo [Zn(TTP)] apresenta uma banda Soret em 426 nm e três bandas Q em 514, 555 e 596 nm. Sendo que, a banda de comprimento de onda em 555 nm apresenta maior absorvidade molar, como foi verificado para um complexo [Zn(TPP)] descrito por Gouterman⁶⁰, FIGURA 4.8.

FIGURA 4.8 - Espectro na região do ultravioleta visível para a [Zn(TTP)] utilizando diclorometano como solvente em preto e região 470 a 750 nm ampliada para melhor visualização das bandas Q.



O composto [Cu(TTP)] apresenta um espectro de UV-vis com comportamento semelhante ao composto [Zn(TPP)]. No qual, foi possível observar a presença de uma banda Soret em 426 e três bandas Q em 546, 587 e 627 nm, sendo que a banda em 546 nm apresenta absorvidade molar maior do que as duas em maiores comprimento de onda, FIGURA 4.9.

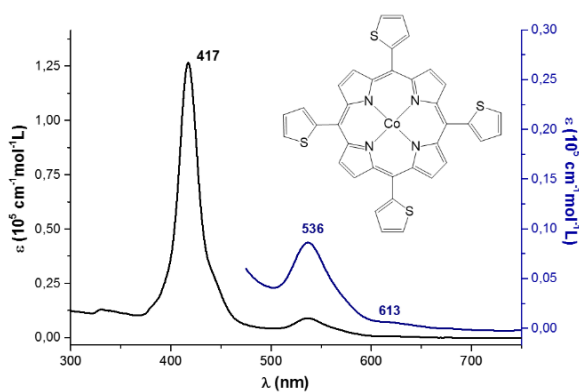
FIGURA 4.9 - Espectro na região do ultravioleta visível para a [Cu(TTP)]utilizando diclorometano como solvente em preto e região 460 a 750 nm ampliada para melhor visualização das bandas Q.



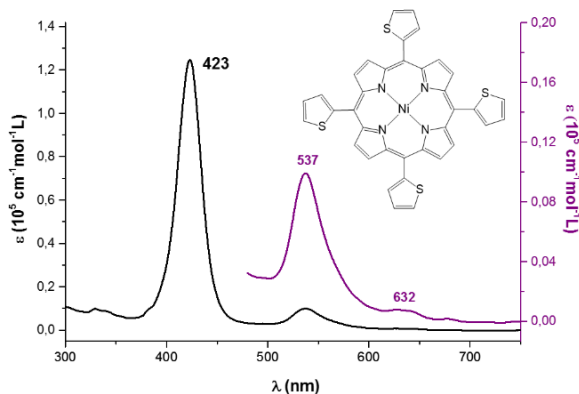
Para os complexos porfirínicos [Co(TTP)] foi verificada uma banda Soret e duas bandas Q em 417, 536 e 613 nm, respectivamente, FIGURA 4.10a. De forma análoga foi verificado para o complexo [Ni(TTP)] com bandas Soret e Q em 423 e 537, 632 nm, FIGURA 4.10b.

FIGURA 4.10 - Espectros na região do ultravioleta visível para a utilizando diclorometano como solvente dos composto [Co(TTP)](a) e [Ni(TTP)](b) com regiões coloridas ampliadas para melhor visualização das bandas Q.

a

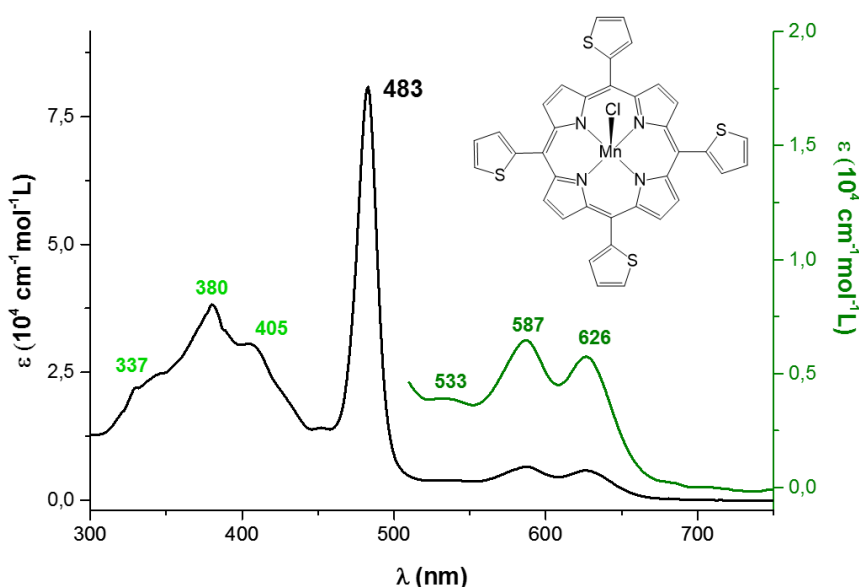


b



De forma adversa a todos os complexos sintetizados, foi observado para o composto $[\text{Mn}(\text{TTP})\text{Cl}]$ um deslocamento batocrômico da banda Soret de 58 nm. Foram verificadas três bandas Q em 533, 587, 626 nm e três novas bandas em 337, 380 e 405 nm, com absorvidade molar maior quando comparadas às bandas Q, FIGURA 4.11. Todas essas características estão relacionadas a complexos porfirínicos de manganês(III), substituídos na posição *meso* e contendo um ligante clorido em posição axial⁶².

FIGURA 4.11 - Espectro na região do ultravioleta visível para a $[\text{Mn}(\text{TTP})\text{Cl}]$ utilizando diclorometano como solvente em preto e região 510 a 750 nm ampliada para melhor visualização das bandas Q.



Os valores de comprimento de onda e a absorvidade molar das bandas Soret e Q dos compostos sintetizados foram resumidos na TABELA 4.6. Foi verificado que as bandas Soret para os complexos $[\text{Zn}(\text{TTP})]$, $[\text{Ni}(\text{TTP})]$ e $[\text{Cu}(\text{TTP})]$ não apresentam deslocamentos hipsocrômicos ou batocrômicos consideráveis. Porém, o composto $[\text{Co}(\text{TTP})]$, embora apresente o mesmo estado de oxidação dos demais complexos citados, teve um deslocamento hipsocrômico de 8 nm em relação a porfirina livre, ou seja, é necessário maior energia para que a transição eletrônica $S_0 \rightarrow S_2$ ocorra. Esse comportamento pode estar relacionado com a baixa densidade eletrônica nos orbitais “d” e um menor raio iônico (TABELA 4.5) do cátion cobalto(II), frente aos outros centros metálicos de estado de oxidação +II, estudados nesse trabalho⁴¹.

TABELA 4.5: Valores de raios iônicos do cristal e raio iônico efetivo em picometro para os cátions zinco(II), níquel(II), cobre(II) e cobalto(II).

bs= baixo spin

Cátion	Raio iônico do cristal (pm)	Raio iônico efetivo (pm)
Zn ²⁺	88	74
Cu ²⁺	87	73
Ni ²⁺ (bs)	83	69
Co ²⁺ (bs)	79	65

A partir do estudo de Galinato e colaboradores⁶², foi possível verificar as contribuições dos orbitais moleculares nas transições eletrônicas do composto [Mn(TPP)Cl]. Embora o composto de coordenação utilizado seja diferente do sistema desse trabalho, a H₂TPP e a H₂TTP são porfirinas *meso* substituídas com anéis aromáticos. Logo, é possível estabelecer um paralelo entre as transições eletrônicas para os complexos análogos de manganês(III), uma vez que apresentam espectros na região do UV-vis com perfis bastante semelhantes.

Sendo assim, embora a molécula [Mn(TTP)Cl] pertença ao grupo pontual C_{4v}, FIGURA 4.11c, no que diz respeito, às transições eletrônicas referentes ao modelo de “quatro orbitais” proposto por Gouterman⁶³, esses compostos apresentam comportamentos de moléculas do grupo pontual D_{4h}, FIGURA 4.11b. Que é caracterizado pela diminuição quantidade de bandas Q em relação a porfirina livre.

Galinato e colaboradores ressaltam também que as transições eletrônicas envolvidas nos comprimentos de onda em 337, 380 e 405 nm estão relacionadas com transferências de carga ligante-metal. Sendo que, uma mistura complexa de orbitais moleculares tanto do anel porfirínico quanto do ligante clorido participam de tais transições.

TABELA 4.6 - Comprimentos de onda e logaritmo da absorvidade molar para as bandas Soret (em preto), Q (em vermelho) e grupos pontuais de todos os compostos e transferência de carga do complexo [Mn(TTP)Cl] (em verde) utilizando diclorometano como solvente.

Compostos											
H ₂ TTP		[Mn(TTP)Cl]		[Zn(TTP)]		[Cu(TTP)]		[Ni(TTP)]		[Co(TTP)]	
λ(nm)	logε	λ (nm)	logε	λ (nm)	logε	λ (nm)	logε	λ (nm)	Logε	λ (nm)	logε
425	5,42	483	4,91	426	5,28	421	5,41	423	5,10	417	5,10
522	4,13	533	3,59	514	3,33	546	4,15	537	4,00	536	3,95
560	3,83	587	3,81	556	3,98	627	3,16	632	2,87	613	2,30
597	3,66	626	3,76	596	3,12	587	3,31				
660	3,49	337	4,36								
		380	4,58								
		405	4,49								
D _{2h}		C _{4v}		D _{4h}		D _{4h}		D _{4h}		D _{4h}	
Grupos pontuais											

O efeito de batocromismo da banda Soret do complexo [Mn(TTP)Cl], quando comparado a seus complexos análogos de estado de oxidação +II, está relacionado com o aumento de carga positiva no centro da porfirina. Nesse caso, a complexação do cátion manganês(III) possibilita que a transição S₀→S₂ ocorra na incidência de menores energias⁶².

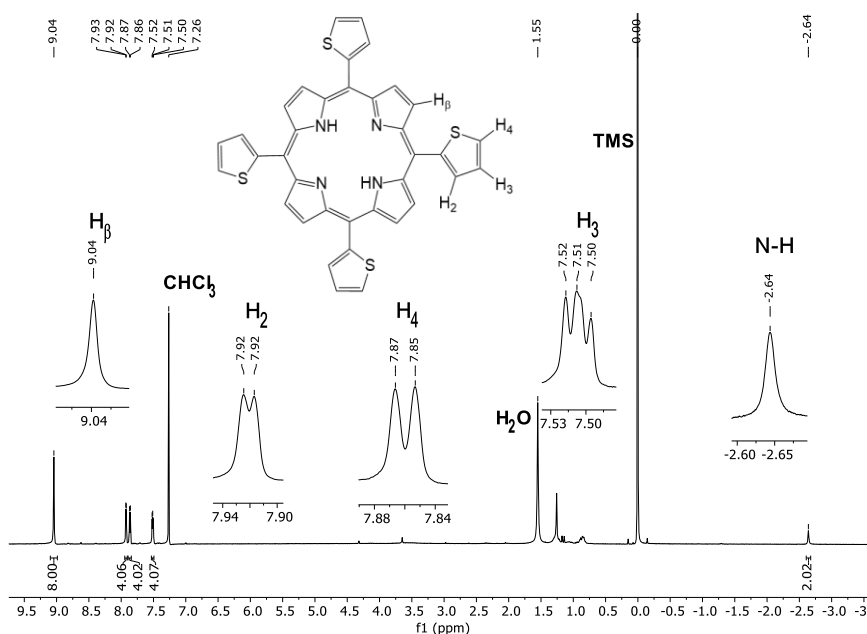
4.2.3 - Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ¹H é uma técnica que comprova a natureza aromática das porfirinas¹⁷. Os espectros de RMN de ¹H em porfirinas simétricas *meso* substituídas são caracterizadas pelo sinal em regiões desblindadas referente aos hidrogênios na posição β-pirrólicas em torno de δ 7-9. Esse comportamento está relacionado com a retirada de densidade eletrônica do anel porfirínico, tornando os hidrogênios na posição β mais deficientes de elétrons⁴².

Por outro lado, os hidrogênios imínicos são normalmente observados em uma região muito blindada do espectro de RMN de ¹H, em torno de δ -2 a -3 comparado ao sinal do TMS. Essa característica comprova que a blindagem desses prótons está relacionada ao efeito anisotrópico, que é mais uma evidência da alta aromaticidade das porfirinas.

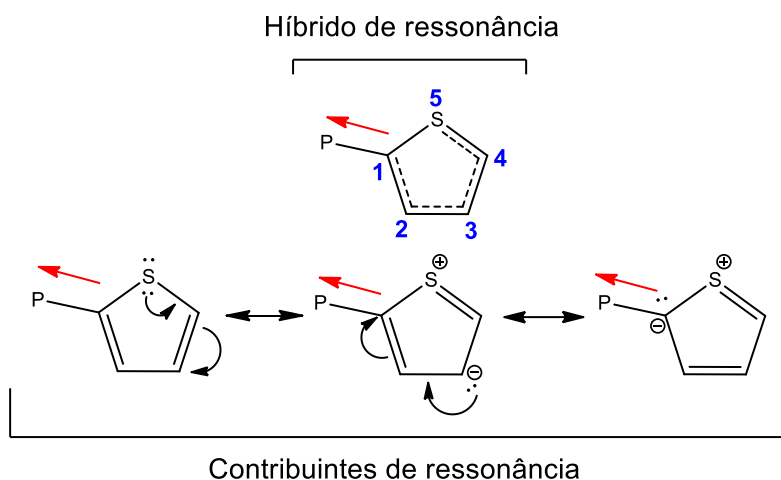
No espectro de RMN de H^1 da H_2TTP foi verificado um singlete em 9,04 ppm integrando para oito hidrogênios, que estão relacionados com os hidrogênios na posição β , o que confirma a retirada de densidade eletrônica do anel porfirínico, FIGURA 4.12.

FIGURA 4.12 - Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio da H_2TTP utilizando $CDCl_3$ como solvente.



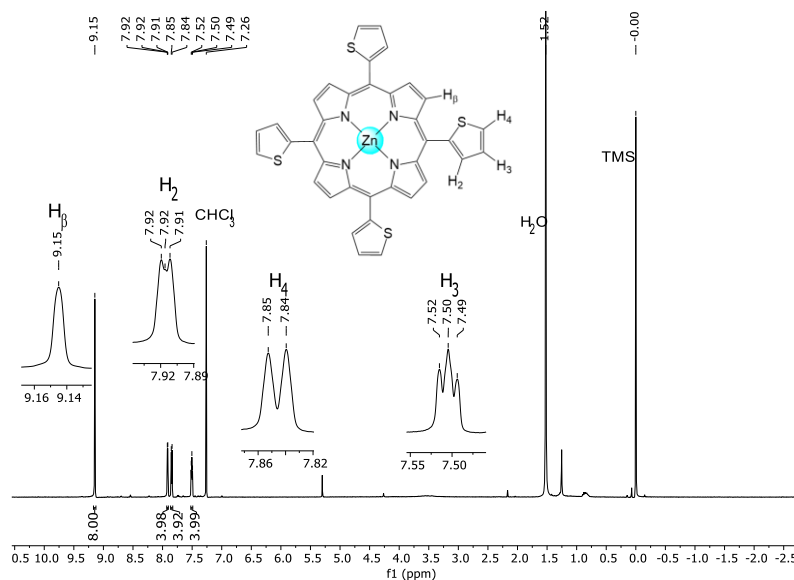
Para o composto H_2TTP foi verificado um sinal em -2,64 ppm que está relacionado com os hidrogênios imínicos H-N integrando para 2H. Uma vez que, esses átomos são mais blindados por conta da proteção ocasionada pela alta densidade eletrônica presente no anel porfirínico. Além deste sinal, foram verificados três sinais em 7,92; 7,86 e 7,51 ppm, referentes a H_2 , H_4 e H_3 do anel tiofeno, respectivamente. Os hidrogênios H_2 e H_4 estão em regiões mais desblindadas do espectro. Esse comportamento é uma consequência da atuação de espécie retiradora de densidade eletrônica, como o anel porfirínico, na deslocalização da densidade eletrônica do anel tiofen-2-il, FIGURA 4.13. Pelos contribuintes de ressonância, é verificado que H_3 contém uma densidade eletrônica maior do que H_2 e H_4 .

FIGURA 4.13 - Representação da estrutura do híbrido de ressonância do tiofeno com seus respectivos contribuintes de ressonância ligado a uma espécie retiradora de densidade eletrônica.



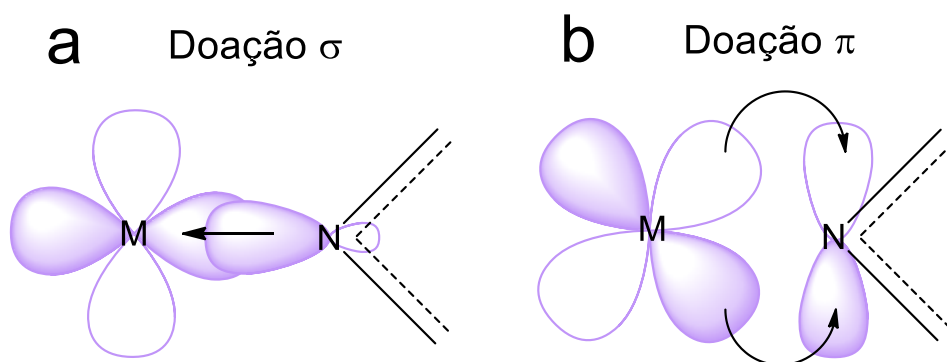
A partir do espectro de RMN do complexo [Zn(TTP)] foi verificado um leve deslocamento para regiões mais desblindadas, 0,11 ppm, no sinal referente aos hidrogênios β quando comparado a H_2TTP . Juntamente com o desaparecimento do sinal referente aos hidrogênios imínicos, caracterizando a formação da metaloporfirina de zinco(II). Porém, não foi percebido deslocamento no sinal dos hidrogênios do anel tiofeno, FIGURA 4.14.

FIGURA 4.14 - Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio do complexo [Zn(TTP)] utilizando $CDCl_3$ como solvente.



No espectro de RNM ^1H do complexo $[\text{Ni}(\text{TTP})]$ foi verificado o deslocamento de 0,16; 0,24; 0,17 e 0,14 ppm para regiões mais blindadas referente a H_β , H_2 , H_4 , e H_3 , respectivamente, quando comparado a porfirina livre. Este comportamento mais acentuado em relação ao complexo $[\text{Zn}(\text{TPP})]$ pode estar de acordo com a capacidade do níquel(II) em formar ligações mais efetivas com a porfirina em comparação ao zinco(II), ocasionado no aumento de densidade eletrônica em orbitais π^* da porfirina através do mecanismo de retrodoação, FIGURA 4.15. Porém, um embasamento mais robusto, utilizando cálculos computacionais, é necessário para comprovar essa teoria.

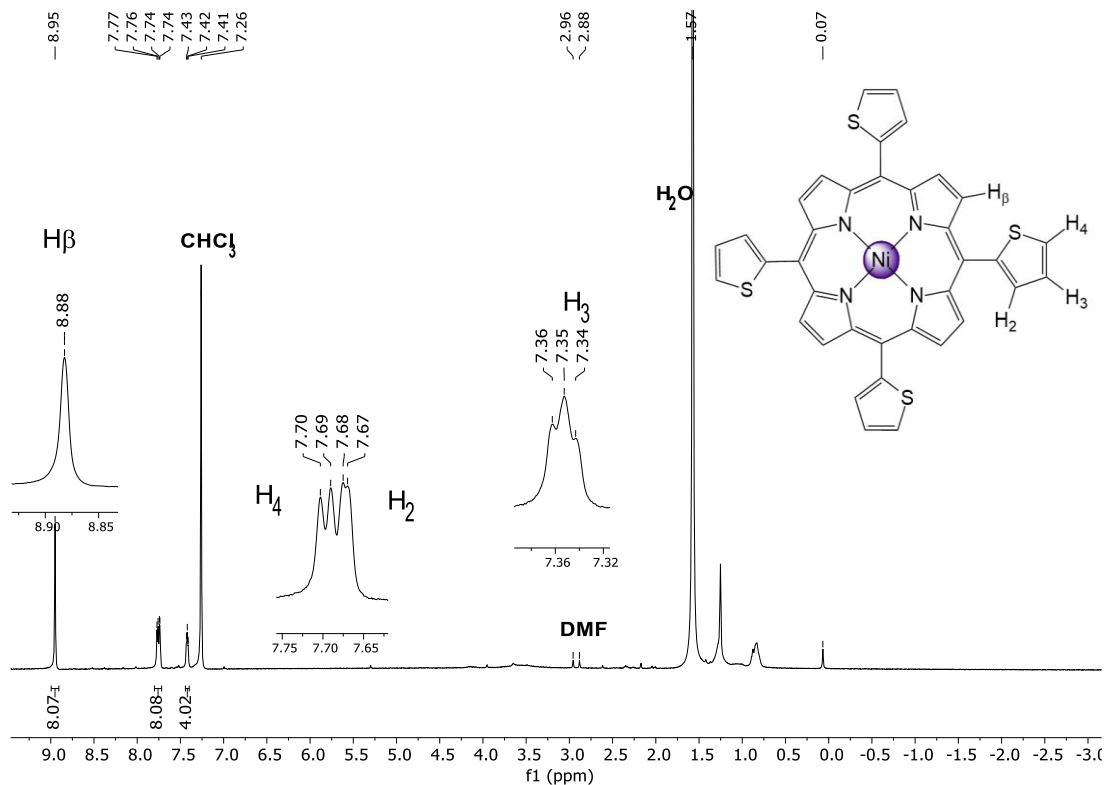
FIGURA 4.15 - Representação simplificada de ligação σ (a) e π (b) entre centros metálicos e ligante porfirínico.



A partir dos deslocamentos químicos em relação a H_2TTP para o complexo de $[\text{Ni}(\text{TTP})]$, foi verificado que o H_4 está em um ambiente químico mais desprotegido do que o H_2 . Evidenciando que após a coordenação os hidrogênios nas posições 2 do anel tiofeno, contêm uma maior densidade eletrônica.

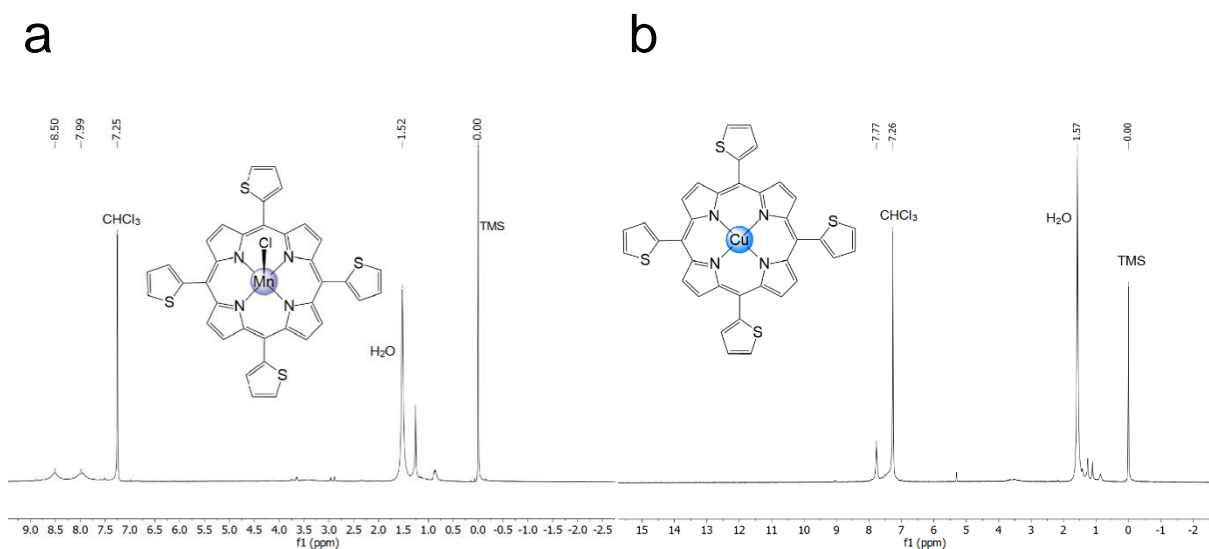
É importante salientar que foi observado a presença de DMF nos espectros de RMN para os complexos $[\text{Ni}(\text{TTP})]$ e $[\text{Co}(\text{TTP})]$, FIGURA 4.16 e 4.18. Corroborando com as fórmulas mínimas sugeridas na análise elementar.

FIGURA 4.16 - Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio do complexo [Ni(TTP)] utilizando CDCl_3 como solvente.



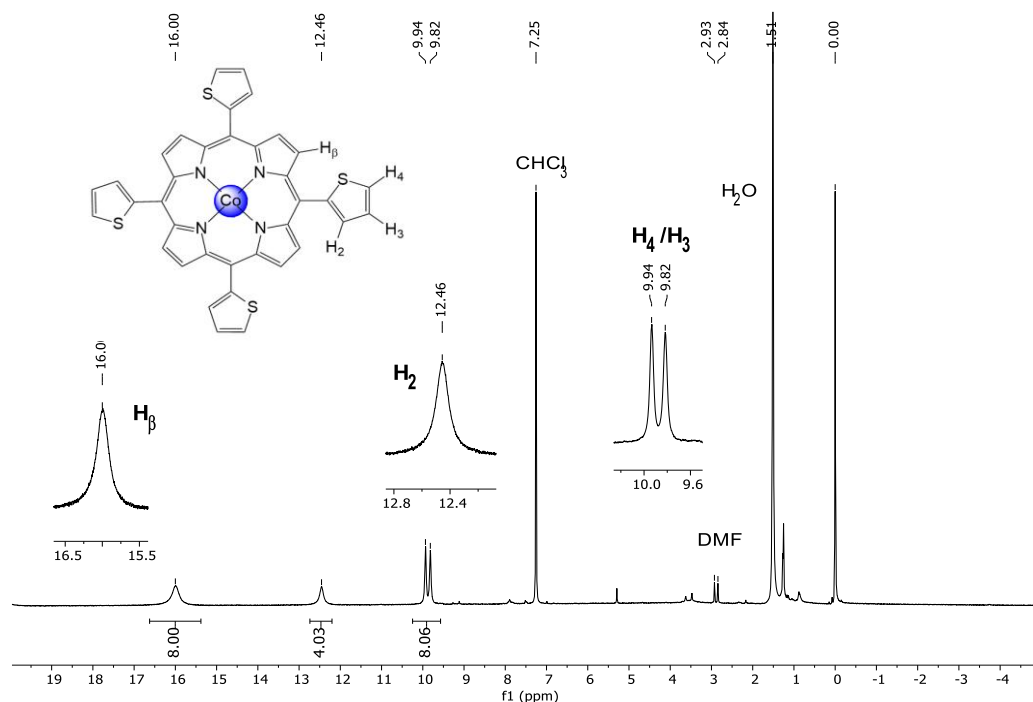
Não foi possível verificar sinais nítidos para obtenção de integrais ou deslocamento químicos para os complexos $[\text{Mn}(\text{TTP})\text{Cl}]$ e $[\text{Cu}(\text{TTP})]$, FIGURA 4.17a e 4.17b, respectivamente. Resultado esperado, devido à característica paramagnética dos centros metálicos de cobre(II) e manganês(III), cuja apresentam configurações eletrônicas d^9 e d^4 de baixo spin, respectivamente. Não obstante, ligantes porfirínicos sejam considerados de campo forte, para metaloporfirinas de manganês(III) coordenado com halogênios em posição axial, a energia de pareamento dos spins são maiores do que a energia fornecida pelo campo ligante, tornando esses compostos paramagnéticos.

FIGURA 4.17 - Espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio do complexo [Mn(TTP)Cl] (a) e [Cu(TTP)] (b) utilizando CDCl_3 como solvente.



Para o complexo [Co(TTP)], que embora contenha um metal com configuração eletrônica d^7 , com característica paramagnética, foi possível verificar em seu espectro sinais propícios para integração. Em decorrência deste paramagnetismo, os sinais sofreram um alargamento e um acentuado deslocamento para regiões mais desblindadas do espectro de RMN, quando comparado a porfirina livre e os demais complexos. Estas mudanças estão de acordo com metaloporfirinas de cobalto(II), como demonstram Bichan e colaboradores⁴⁴.

FIGURA 4.18 - Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio do complexo [Co(TTP)] utilizando CDCl_3 como solvente.



Em conclusão, a ressonância magnética nuclear foi importante para a caracterização estrutural e determinação das propriedades magnéticas dos complexos. Desse modo, foram verificados espectros condizentes às estruturas diamagnéticas, proporcionadas pela coordenação de ligantes porfirínicos aos centros metálicos de Zn^{2+} ($3d^{10}$) e Ni^{2+} ($3d^8$), FIGURA 4.19. De forma semelhante, foram observados os efeitos paramagnéticos dos cátions Cu^{2+} ($3d^9$), Co^{2+} ($3d^7$) e Mn^{3+} ($3d^4$) coordenados a porfirina. Em que, embora os espectros dos compostos [Co(TTP)], [Mn(TTP)Cl] e [Cu(TTP)] apresentem grandes distorções quando comparados à porfirina livre, tal característica é uma indicação de que as reações de complexação foram efetivas.

FIGURA 4.19 - Digrama de energia simplificado com o preenchimento eletrônico dos orbitais 3d para os cátions zinco(II), cobre(II), níquel(II), cobalto(II) e manganês(III).

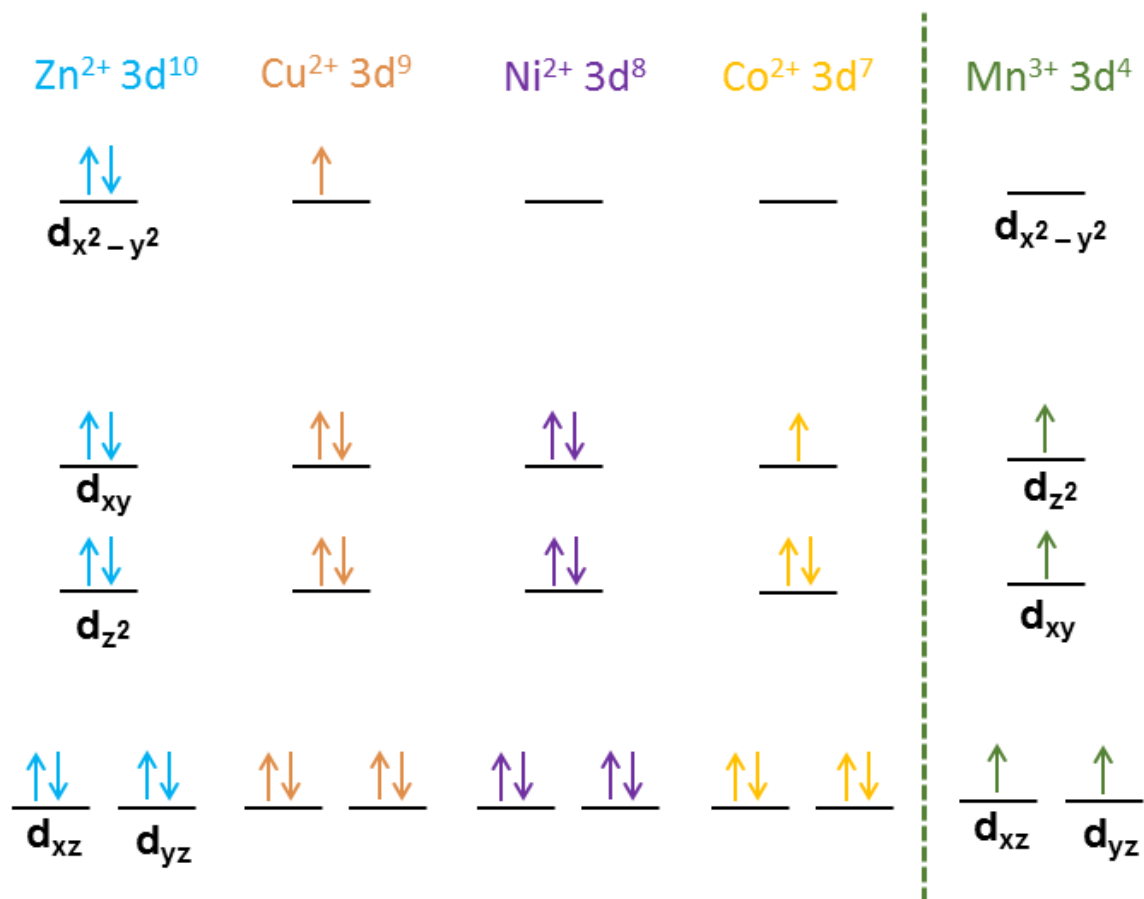


TABELA 4.7 - Atribuições dos sinais de RMN, com valores de deslocamento químico e integrais para os respectivos compostos a base de H₂TTP.

Compostos	Atribuições				
	H-N	H _β	H ₂	H ₃	H ₄
H₂TTP	-2,64 (s, 2H)	9,04 (s, 8H)	7,92 (m, 4H)	7,52 – 7,49 (m, 4H)	7,86 (m, 4H)
[Zn(TTP)]	-	9,15 (s, 8H)	7,93 – 7,90 (m, 4H)	7,52 – 7,49 (m, 4H)	7,85 (m, 4H)
[Ni(TTP)]	-	8,88 (s, 8H)	7,67 (m, 4H)	7,37–7,33 (m, 4H)	7,70 (m, 4H)
[Co(TTP)]	-	15,98 (s, 8H)	12, 46 (s, 4H)	9,94 (s, 4H)*	9,82 (s, 4H)*
[Mn(TTP)Cl]	-	-	-	-	-
[Cu(TTP)]	-	-	-	-	-

* Não sabe ao certo a atribuição do sinal.

4.2.4 - Espectrometria de massas

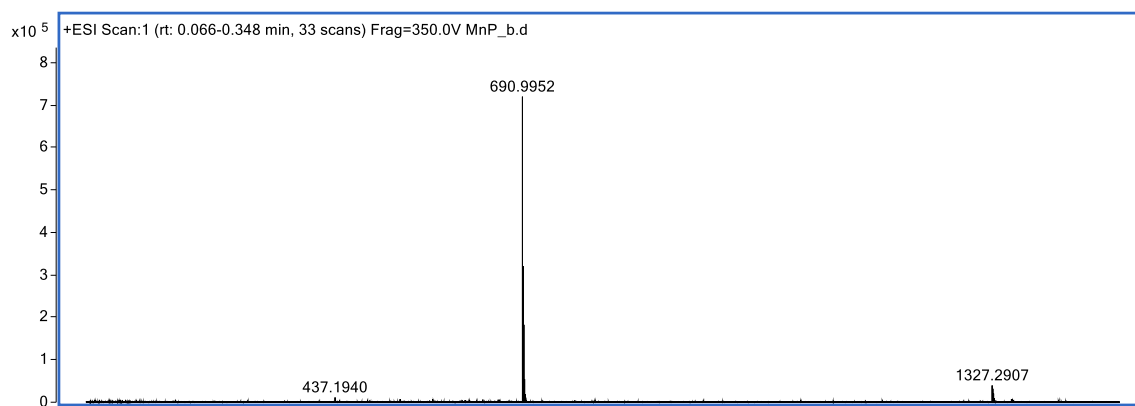
A espectroscopia de massas com ionização eletronspray (ESI-MS) é uma importante ferramenta para a determinação da massa molecular do íon/carga do íon (m/z) e do padrão isotópico de organometálicos e compostos de coordenação⁶⁴. Entretanto, a utilização dessa técnica pode provocar altas fragmentações, ganho ou perda de ligantes lábeis, bem como oxidação e redução dos compostos analisados.

Para os compostos porfirínicos diamagnéticos e [Cu(TTP)] foi observado alta fragmentação por conta da baixa capacidade de ionização quando são submetidas ao modo ESI e detecção no modo positivo. No entanto, espectros dos complexos de [Co(TTP)] e [Mn(TTP)Cl] foram verificados baixa fragmentação, FIGURA 4.20. Para melhor organização, os espectros gerais de todos os compostos analisados estão na seção anexos Figura 6.1-5.

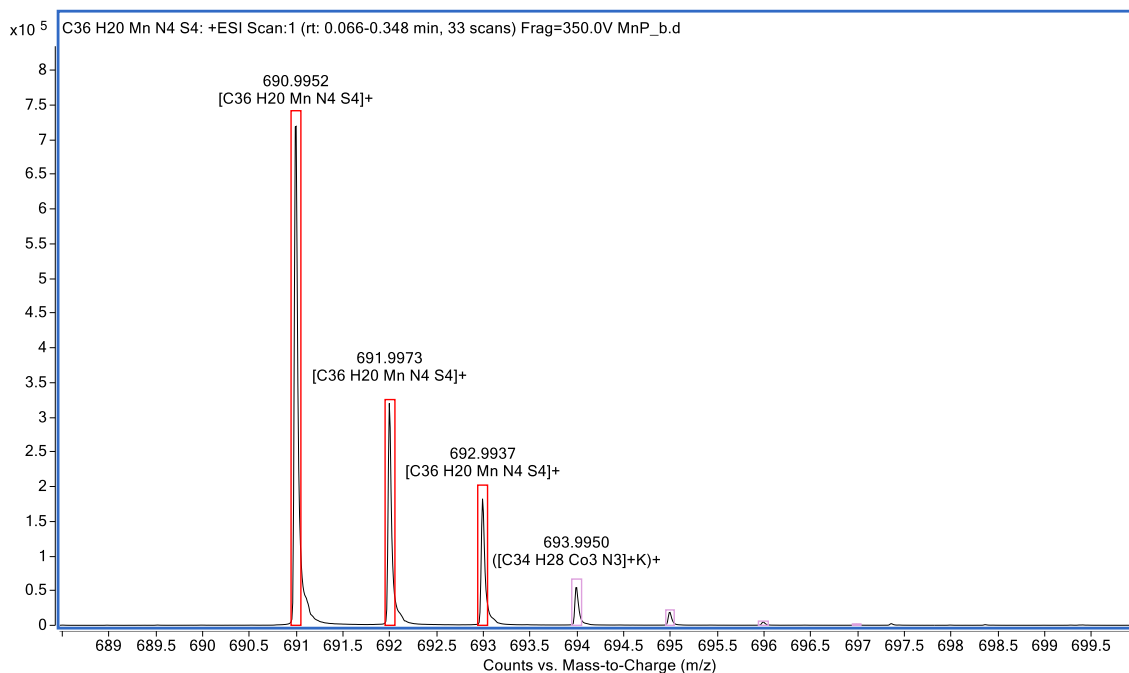
Foram observados padrões isotópicos condizentes para todos os compostos sintetizados com exceção do complexo [Ni(TTP)], esse comportamento pode estar relacionado com a sua solubilidade extremamente baixa.

FIGURA 4.20 - Espectro geral (a) e padrão isotópico (b) obtidos por HRMS-ESI para o composto [Mn(TTP)Cl].

a



b



O íon molecular detectado na porfirina livre e no complexo [Zn(TTP)] foi o $[M+H]^+$, conforme foi mencionado, são compostos diamagnéticos que apresentam baixa suscetibilidade para serem oxidados. Entretanto, o íon molecular detectado nos compostos [Co(TTP)] e [Cu(TTP)] foi o $[M]^+$, indicando que durante o processo de ionização ocorre a oxidação dos complexos. Esse processo químico pode acontecer pelo centro metálico, ou pela porfirina, que após a coordenação fica mais suscetível a sofrer esse processo.

De outro modo, durante o processo de ionização ocorre a dissociação da ligação Mn-Cl no complexo [Mn(TTP)Cl]. É importante ressaltar que, embora a identificação de tal ligante não tenha sido possível de ser determinada por essa técnica, as caracterizações de espectroscopia na região do UV-vis e espectroscopia vibracional, que será descrita na próxima seção, confirmam a presença de tal espécie em posição axial na esfera de coordenação.

TABELA 4.8 - Íon molecular detectado com seus respectivos m/z experimental e calculado para H₂TTP, [Zn(TTP)], [Cu(TTP)], [Co(TTP)] e [Mn(TTP)Cl].

Composto	H ₂ TTP	[Zn(TTP)]	[Cu(TTP)]	[Co(TTP)]	[Mn(TTP)Cl]
Íon detectado	[M+H] ⁺	[M+H] ⁺	[M] ⁺	[M] ⁺	[M-Cl] ⁺
(m/z) Exp.	639,0797	700,9910	698,9853	694,9894	690,9946
(m/z) Cal.	639,0800	700,9935	698,9861	694,9897	690,9952

Por fim, os valores experimentais e teóricos dos íons moleculares para os respectivos compostos apresentam uma diferença menor do que 0,003, TABELA 4.8, que é o erro aceitável para publicações na *The Journal of Organic Chemistry*⁶⁵, embora muitos jornais não especificam esse erro em seus guias para autor⁶⁴.

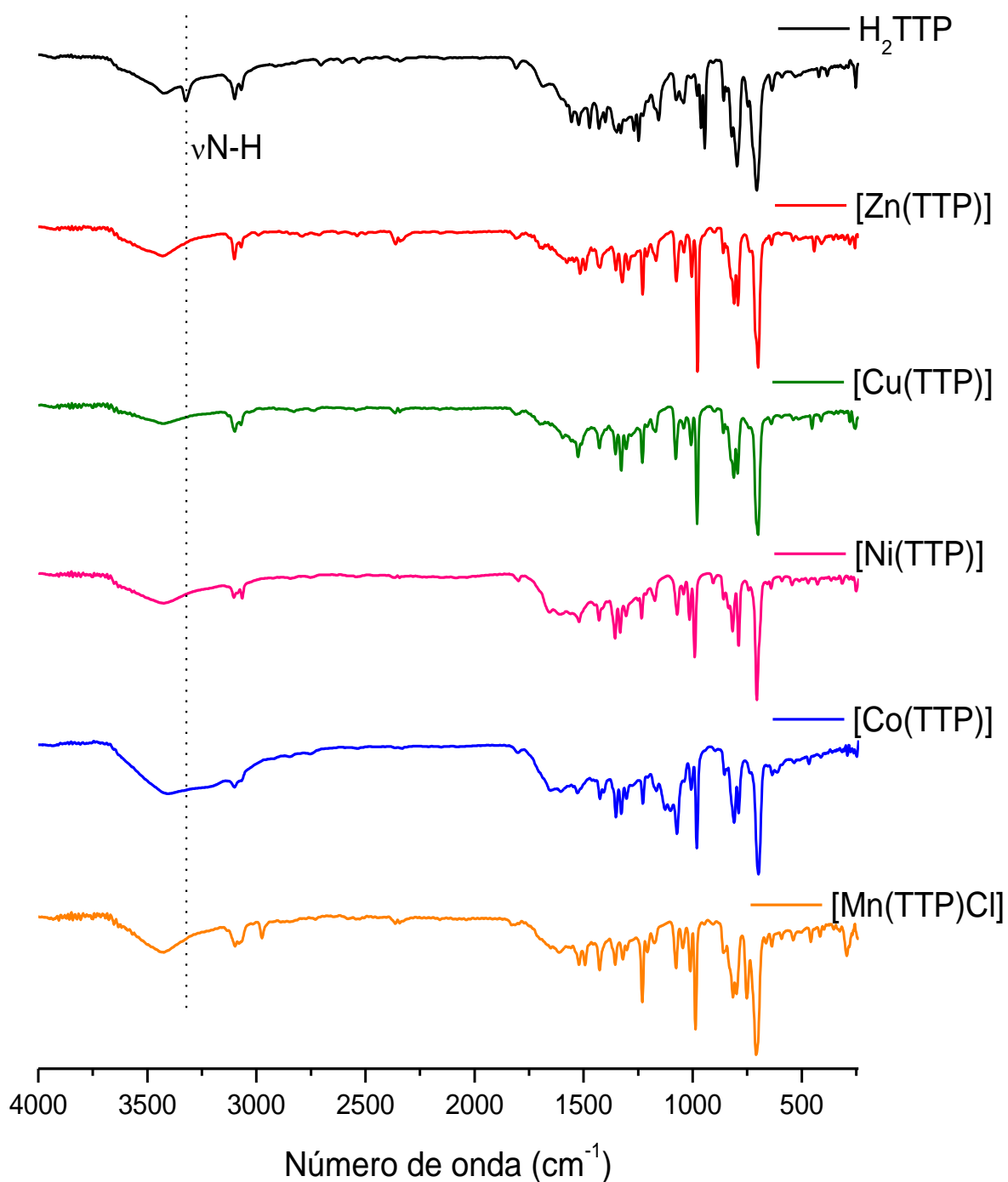
4.2.5 - Espectroscopia na região do infravermelho

A utilização de espectroscopia na região do infravermelho é uma técnica muito utilizada na caracterização de funções orgânicas e inorgânicas em compostos de coordenação⁶⁶. A técnica se baseia nas vibrações das ligações em moléculas após a incidência e absorção de energia, nesta faixa energética do espectro eletromagnético. Estas vibrações podem ser classificadas por dois grupos principais: os estiramentos (ν) e as deformações angulares (δ)⁵⁸. No presente trabalho foram verificados modos de vibrações de alguns grupos funcionais presentes nos compostos porfirínicos.

Para todos os compostos, foram verificadas duas bandas em torno de 3100 e 3070 cm⁻¹, que são relacionadas ao ν C-H. Visto que esses grupos funcionais são encontrados tanto no anel porfirínico quanto nos anéis tiofeno, as atribuições químicas exatas podem gerar ambiguidades.

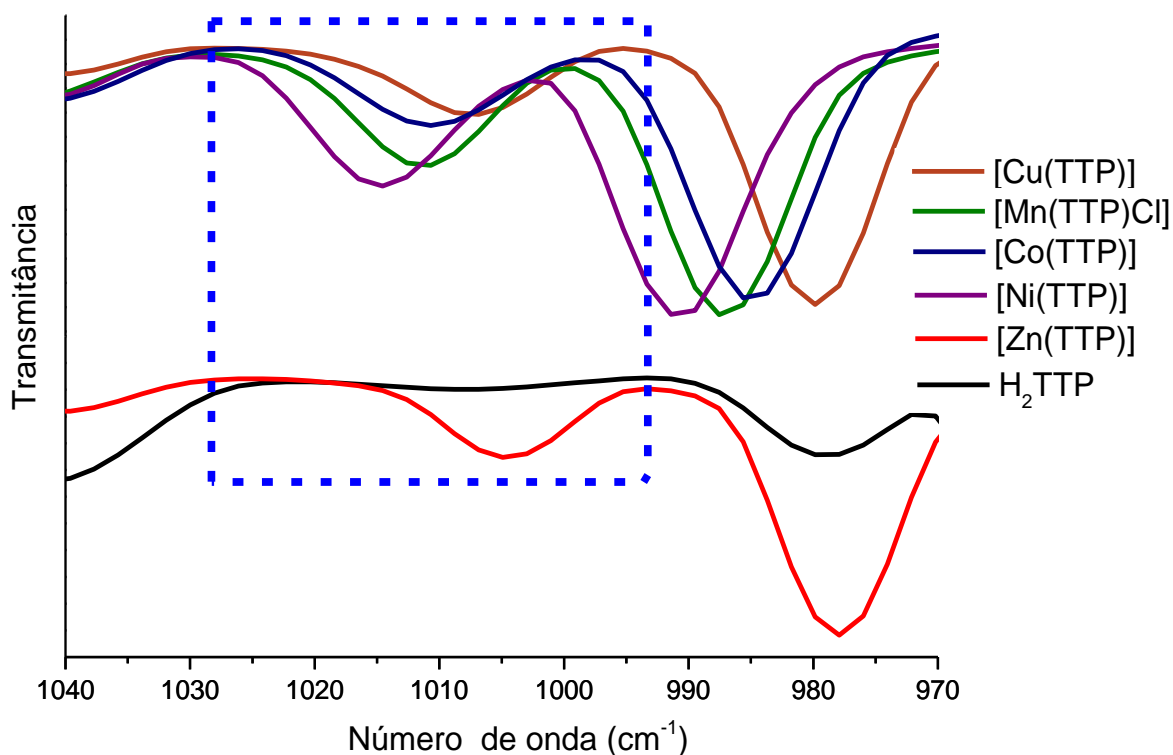
Para a H₂TTP foi verificada a presença de uma banda em 3325 cm⁻¹, relacionada com o ν N-H, FIGURA 4.23. A ausência de tal banda em todos os compostos de coordenação demonstra o desaparecimento dessa ligação, indicando a formação dos complexos. Para melhor visualização, os espectros individuais encontram-se nos anexos, Figura 6.11-16.

FIGURA 4.21 - Espectros de infravermelho dos compostos a base de H₂TTP destacando a presença do estiramento a presença e ausência dos estiramento N-H na porfirina livre e nos complexos análogos, respectivamente.



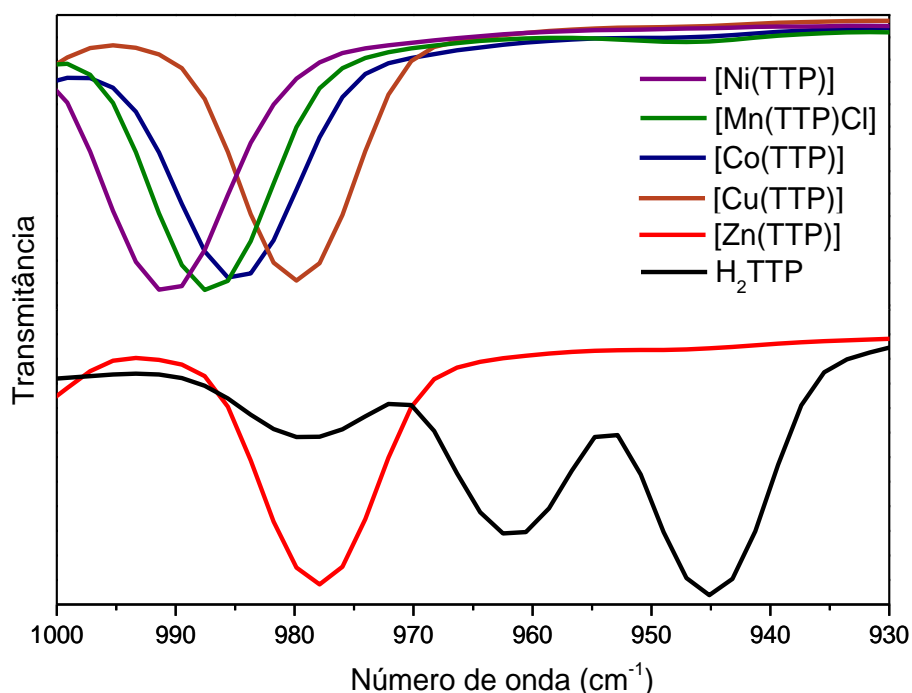
Adicionalmente, outra característica importante de metaloporfirinas quando comparadas às porfirinas livres, é o surgimento de uma banda em torno de 988-1018 cm^{-1} , relacionada ao estiramento da ligação nitrogênio-metal fora do plano ($\nu_{\text{N-P-M}}$), centro da porfirina (*core porphyrin*) ou também chamada de respiração pirrólica (*pyrrole-breathing*) (πP)^{67,68,69,70,71,72}. Foram observadas bandas em 1005, 1006, 1011, 1011 e 1014 cm^{-1} , para os complexos [Zn(TTP)], [Cu(TTP)], [Mn(TTP)Cl], [Co(TTP)] e [Ni(TTP)], respectivamente, FIGURA 4.22. A partir desses resultados, foi possível observar que após a complexação do cátion níquel(II) na cavidade porfirínica, a energia necessária para ocorrer a deformação angular do anel porfirínico é maior quando comparada a todos os demais complexos. Como mencionado anteriormente, esse comportamento pode estar relacionado com a força de ligação N-Ni.

FIGURA 4.22 - Aproximação dos espectros na região do infravermelho destacando em azul as bandas relacionadas ao estiramento da ligação metais nitrogênio dos compostos porfirínicos a base de H_2TTP , sendo que os espectros da porfirina livre e o complexo [Zn(TTP)] destacados apenas para melhor organização.



De forma análoga à espectroscopia na região do UV-vis, a mudança do grupo pontual dos compostos porfirínicos pode influenciar diretamente na quantidade de bandas relacionadas às deformações angulares dos anéis pirrólicos. Neste sentido, observaram-se três bandas para o ligante livre, H₂TTP, em 945, 961 e 979 cm⁻¹ e apenas uma banda para os respectivos complexos, FIGURA 4.23.

FIGURA 4.23 - Aproximação dos espectros na região do infravermelho demonstrando a quantidade de bandas relacionadas a deformações angulares dos anéis pirrólicos dos compostos porfirínicos a base de H₂TTP, sendo que os espectros da porfirina livre e o complexo [Zn(TTP)] destacados apenas para melhor organização.



Em todos os espectros de infravermelho foi verificada uma banda de alta intensidade em torno de 710 cm⁻¹, que está relacionada com as vibrações dos anéis tiofenos ligados na posição *meso*. Embora o deslocamento dessa banda seja pouco evidente entre as metaloporfirinas, tal mudança nos complexos em relação à base livre é significativo. Por exemplo, quando compara-se [Zn(TTP)] e H₂TTP tal banda apresenta um deslocamento de 14 cm⁻¹, TABELA 4.9. Esse comportamento demonstra que após a complexação, as energias necessárias para acontecerem tais vibrações são menores nos compostos de coordenação quando comparadas à porfirina livre, proporcionando mais uma evidência da complexação.

Para o composto [Mn(TTP)Cl] foi verificado uma banda em 293 cm^{-1} relacionado com o estiramento Mn-Cl⁷³. A baixa energia dessa vibração está de acordo com a pequena força de ligação entre os átomos envolvidos. Tal força de ligação pode justificar a ausência deste ligante no espectro de massas. Aliado a isto, as técnicas de condutância e espectroscopia na região do UV-vis, corroboram com a presença do ligante clorido na esfera de coordenação em posição axial.

É importante ressaltar a presença uma banda larga em torno de 3500 cm^{-1} relacionada ao estiramento O-H⁵⁸. Que confirma a presença de água para obtenção das fórmulas mínimas apresentadas anteriormente.

TABELA 4.9 - Atribuições das principais bandas obtidas por IV para os compostos porfirínicos estudados.

Composto	Atribuições					
	vN-H	vH-C _{arm}	v M-P ou πP	δAnel pirrólico	δTio	vM-Cl
H ₂ TTP	3325	3100 - 3069	-	979, 961, 945	714	-
[Zn(TTP)]	-	3101 - 3070	1005	978	700	-
[Ni(TTP)]	-	3103 - 3065	1014	991	706	-
[Mn(TTP)Cl]	-	3097 - 3079	1011	987	708	293
[Cu(TTP)]	-	3099 - 3070	1006	980	700	-
[Co(TTP)]	-	3102 - 3071	1011	985	702	-

4.2.6 - Espectroscopia de fotoluminescência

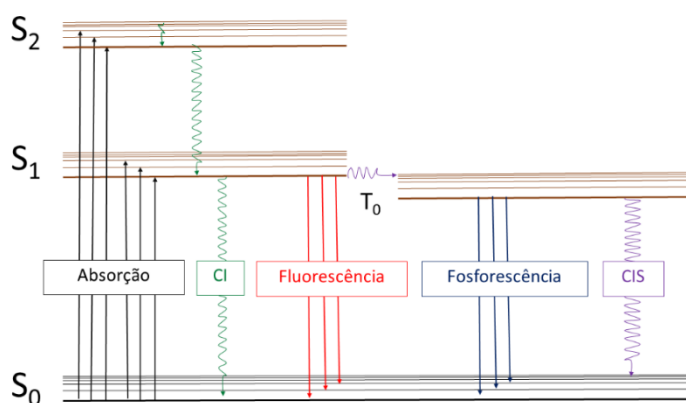
A absorção de radiação eletromagnética possibilita que as moléculas sofram transições eletrônicas, de seu estado eletrônico de menor energia (estado fundamental) para a um estado de maior energia (estado excitado)⁷⁴. Se a molécula não sofrer rearranjos (processos químicos), ela liberará energia necessária para voltar a seu para o estado fundamental (processo físico)⁷⁵. Esse processo de liberação pode ocorrer de três formas principais, sendo eles: processos de supressão do estado excitado, processos não-radiativos e radiativos^{74,76}.

Os processos radiativos são caracterizados pela desexcitação de moléculas através da emissão de radiação eletromagnética, esse fenômeno é

denominado luminescência⁷⁵. Fazem parte desse grupo, a fluorescência e fosforescência, que podem ser mensurados pela espectroscopia de fotoluminescência. É importante frisar que, a distinção de ambos os tipos está relacionada com a mudança da multiplicidade de spins entre o estado excitado e fundamental⁷⁵. Logo, o processo de emissão entre estados de mesma multiplicidade é denominado de fluorescência, por exemplo: $S_1 \rightarrow S_0$; e de diferentes multiplicidades são denominados fosforescência, como: $T_0 \rightarrow S_0$.

De outro modo, os processos não radiativos e de supressão do estado excitado não emitem radiação eletromagnética; eles são caracterizados pela transferência de elétrons do estado excitado para o estado fundamental através de vibração e reações químicas. Entre os processos não radiativos estão a conversão interna e intersistemas, como demonstrado pelo diagrama simplificado de Jablonsky⁷⁶, FIGURA 4.24.

FIGURA 4.24 - Diagrama simplificado de Jablonsky representando os processos físicos de absorção, fluorescência, fosforescência, conversão interna (CI) e conversão intersistemas (CIS).

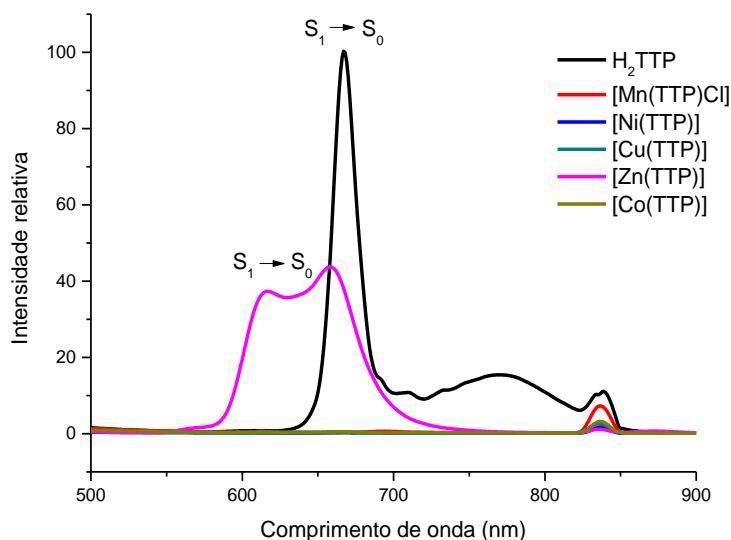


Como mencionado anteriormente, os compostos porfirícos apresentam propriedades luminescentes que podem ser de grande importância em sistemas biológicos, como por exemplo, na possibilidade de serem utilizados como marcadores de organelas⁷⁷.

Nesse trabalho foi verificado que a H_2TTP e o complexo $[Zn(TTP)]$ obtiveram um comportamento de luminescência caracterizado por duas bandas, sendo a primeira em 667 e 615 nm, e a segunda em 771 e 659 nm, respectivamente, FIGURA 4.25. A presença dessas duas transições está relacionada com passagem

de elétrons do menor estado de excitação para dois diferentes modos de vibração, com diferentes energias, do estado eletrônico fundamental^{78,79}.

FIGURA 4.25 - Espectros de luminescência dos compostos a base de H₂TTP, com as respectivas atribuições das bandas.



Para os complexos [Co(TTP)], [Mn(TTP)Cl] e [Cu(TTP)] foi possível observar uma supressão de luminescência quando comparada a porfirina livre, FIGURA 4.25, que é uma consequência do paramagnetismo desses cátions⁸⁰. Para o complexo de níquel(II), embora ele seja diamagnético, não foi possível observar fluorescência, esse comportamento provavelmente está relacionado com a conversão interna entre orbitais 3d (d-d) desocupados do centro metálico⁸⁰.

4.3 - Caracterizações físico-químicas

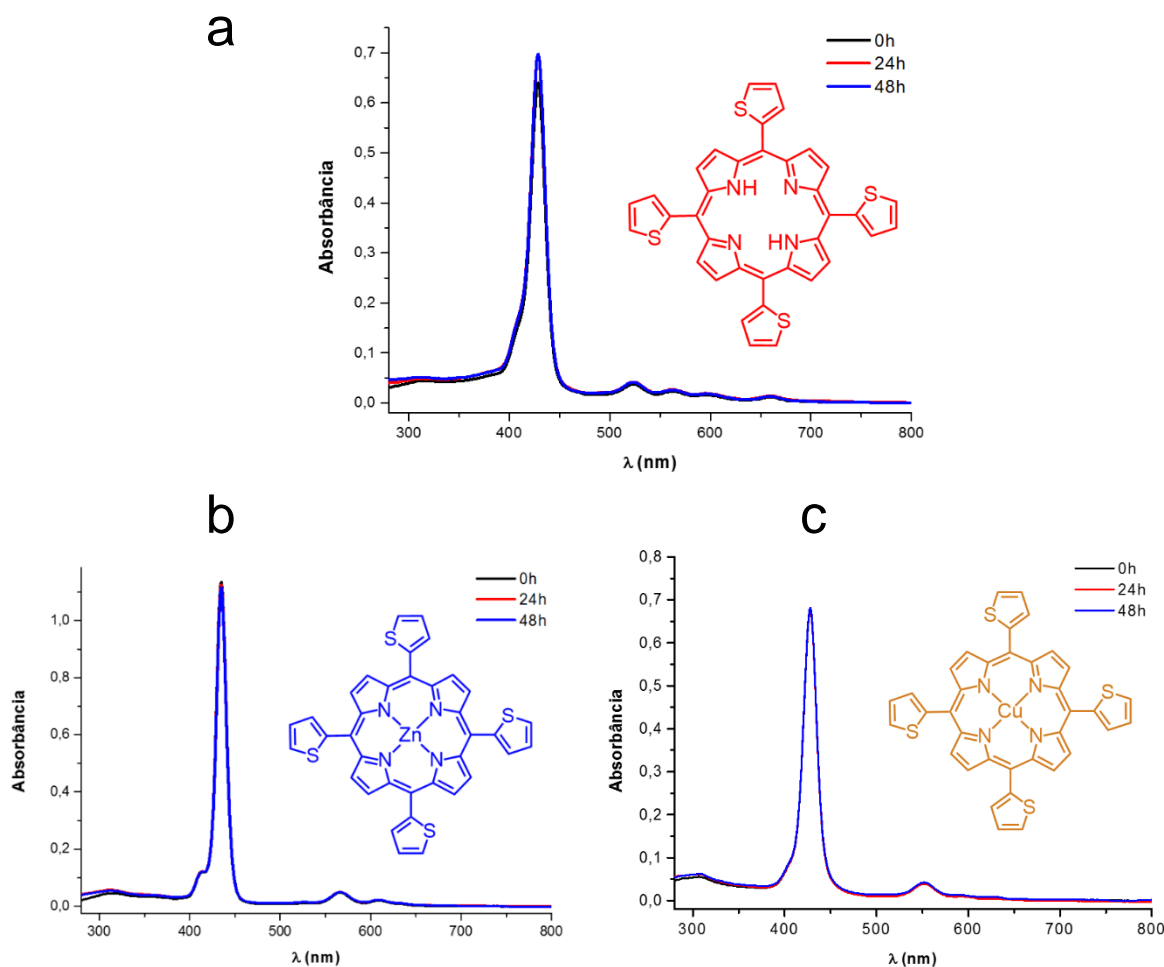
4.3.1 - Testes de estabilidade

Por conta da baixa solubilidade dos compostos porfirínicos em água, primeiramente, foi necessário realizar suas solubilizações em DMSO para realização dos testes biológicos. Por conta disso, existe a necessidade da utilização de técnicas para verificar a estabilidade dos compostos estudados na presença deste solvente⁸¹.

Neste trabalho, as medidas de estabilidade foram observadas por espectroscopia na região do UV-vis e as soluções foram preparadas em DMSO a $3 \cdot 10^{-6}$ mol.L⁻¹ e as medidas realizadas nos tempos de 0, 24 e 48h. A partir dos espectros, FIGURA 4.26, foram verificados que a porfirina livre e os complexos de zinco(II) e

cobre(II) não apresentaram deslocamentos significativos, sendo considerados como estáveis nessas condições.

FIGURA 4.26 - Medidas de estabilidade por espectrofotometria da H₂TTP (a) [Zn(TTP)] (b) e [Cu(TTP)] (c) 3 μM em DMSO por 0, 24 e 48h.

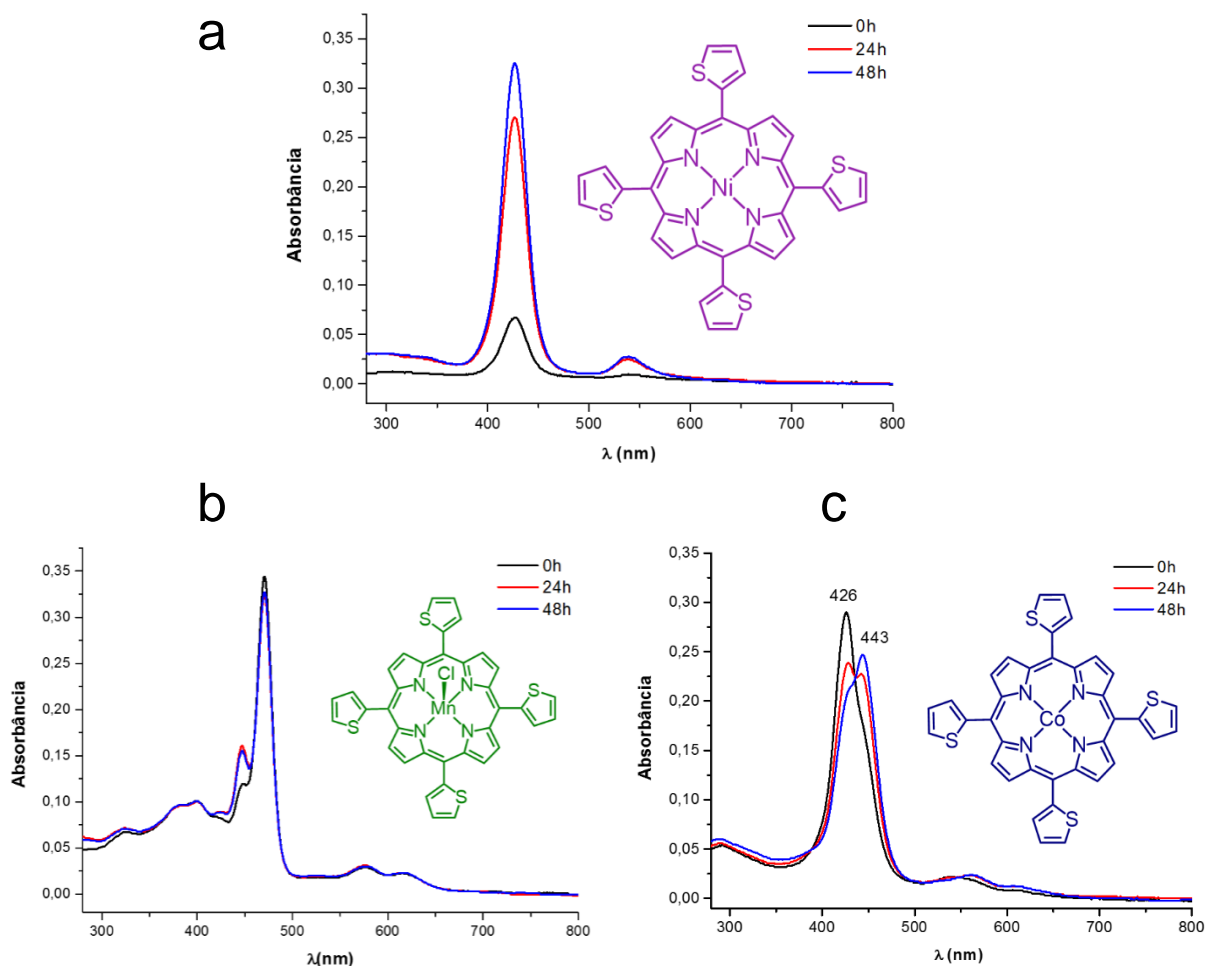


O complexo de níquel(II) apresentou um aumento considerável da banda Soret no período de 48h, FIGURA 4.27a. Esse comportamento estar associado com um problema de solubilidade deste composto no solvente utilizado. Foi verificado que com o passar do tempo, ocorre um aumento de espécies químicas dispersas no solvente, devido a uma melhor dissolução, e conseqüentemente, um aumento das absorvidades de todas as bandas relacionadas ao complexo [Ni(TTP)].

Com a obtenção dos espectros para a [Mn(TTP)Cl] no período de 0, 24 e 48h foi possível observar o aumento da banda em torno de 450 nm, FIGURA 4.27b. Porém, nenhuma distorção foi observada no perfil do espectro do complexo de manganês(III), tal comportamento foi atribuído à substituição do ligante Cl⁻ por DMSO.

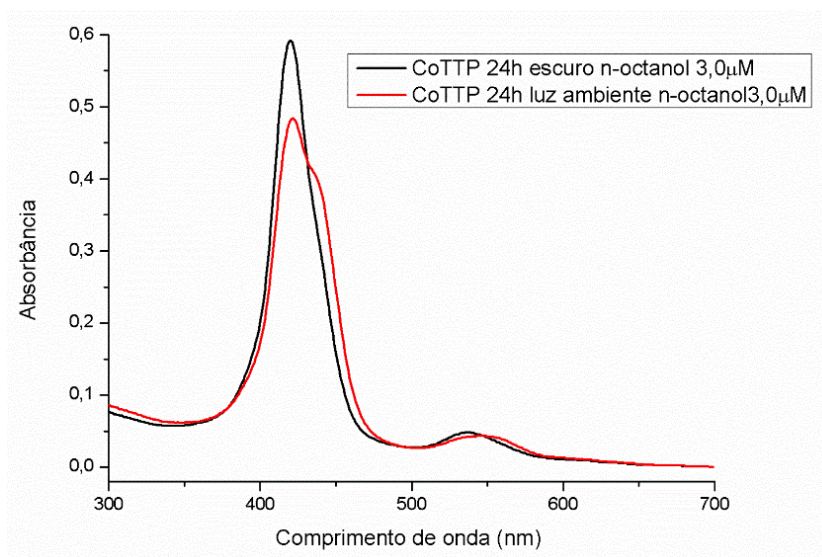
Para o complexo de cobalto(II) foi verificado um efeito de hipocromismo da banda Soret em 426 nm e proporcionalmente o efeito de hiper Cromismo de uma banda em 443 nm, FIGURA 4.27c. Esse efeito pode estar relacionado com a oxidação de cobalto(II) em cobalto(III)^{82,83}, conforme a seguinte semirreação: $\text{Co}^{2+} \rightarrow \text{Co}^{3+} + e^-$. Dado que, bandas Soret de metaloporfirinas de Co^{3+} apresentam um efeito de batocromismo quando comparadas a complexos análogos de Co^{2+} .

FIGURA 4.27 - Medidas de estabilidade por espectrofotometria da [Ni(TTP)] (a) [Mn(TTP)Cl] (b) e [Co(TTP)] (c) 3 μmolar em DMSO por 0, 24 e 48h.



Por conta desse fato, foi estudado se a luz poderia promover a mudança de estado de oxidação do centro metálico. Após a incidência de luz branca durante 24h foi observado o aumento da banda em maiores comprimentos de onda. Em contrapartida, a solução que não foi submetida a essas condições, não apresentou tal comportamento, FIGURA 4.28.

FIGURA 4.28 - Medidas de estabilidade por espectrofotometria da [Co(TTP)] 3 μmolar em n-octanol e 3% de DMSO no escuro em luz ambiente.



4.3.2 - Coeficiente de partição

O coeficiente de partição (P) é uma medida físico-química que caracteriza a lipofilia de compostos, que por sua vez pode influenciar nas propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas de substâncias biologicamente ativas⁸⁴. A determinação dessa propriedade é obtida experimentalmente através da razão da distribuição de uma determinada substância entre dois líquidos imiscíveis, sendo um deles uma fase aquosa, que pode ser água ou um tampão⁸⁴. A fase oleosa mais utilizada é composta de n-octanol, uma vez que este solvente apresenta uma grande semelhança aos fosfolipídios encontrado nas membranas celulares, por conta da sua longa cadeia lipofílica e o grupo hidroxila na extremidade, o que o torna capaz de estabelecer uma condição próxima do sistema *in vivo*^{84,85}. Com base nessas informações, o coeficiente de partição é determinado utilizando a seguinte equação:

Equação 4: Coeficiente de partição sendo [n-octanol] e [água] a concentração dos compostos porfirínicos em n-octanol e água, respectivamente.

$$P = \frac{[n - octanol]}{[água]}$$

Neste trabalho, as quantificações dos complexos porfirínicos foram feitas com auxílio da espectroscopia UV-vis, a partir da banda Soret. Sendo que, a concentração em n-octanol foi determinada diretamente da equação de Lambert-Beer

obtida da regressão linear de uma curva padrão. Desta forma, a concentração dos compostos em fase aquosa foi obtida através da diferença entre a concentração inicial e a concentração final na fase orgânica, conforme descrita pela literatura^{84,8,86}.

A partir das concentrações obtidas foi calculado os valores do coeficiente de partição, como se trata de uma longa faixa de valores, costuma-se apresentar os resultados de forma logarítmica, TABELA 4.10.

TABELA 4.10 - Logaritmos do coeficiente de partição dos respectivos complexos porfirínicos.

Composto	LogP
[Zn(TTP)]	1,74
[Ni(TTP)]	1,04
[Cu(TTP)]	1,17
[Mn(TTP)Cl]	0,93
[Co(TTP)]	0,69

A partir desses valores foi verificado que os complexos porfirínicos [Zn(TTP)], [Ni(TTP)] e [Cu(TTP)] estão em uma faixa de logP entre 1 e 3 que é considerável ótima para a absorção celular de forma passiva^{84,86,87}. Entretanto, para o complexo [Mn(TTP)Cl] foi verificado um valor de logP igual a 0,93, que pode ser explicado pelo aumento de solubilidade do composto em água devido à diferença de estado de oxidação em relação aos demais metais. O complexo [Co(TTP)] apresentou um valor destoante dos demais, possivelmente, por conta da alta instabilidade de estado de oxidação do íon cobalto(II) frente às condições submetidas neste experimento, como: a temperatura de 37 °C, agitação e baixa exposição a luz ambiente.

4.4 - Estudos de interação com DNA

No presente trabalho foram realizados dois estudos de interação dos compostos porfirínicos com DNA: utilizando a espectroscopia na região do UV-vis, verificando as mudanças de absorvidade na interação ct-DNA; observação da mobilidade eletroforética em gel de agarose com o DNA superenovelado, pBR322.

4.4.1 - Espectroscopia na região do UV-vis

A espectroscopia na região do UV-vis é umas das técnicas mais utilizadas nos estudos de interação de DNA com pequenas moléculas⁸⁸. Normalmente, esses compostos apresentam grupos cromóforos que são capazes de serem observados com a incidência de radiação eletromagnética nessa região⁸⁸. Por esse motivo, uma possível interação entre o DNA e compostos de coordenação pode ser verificada a partir de efeitos de deslocamentos de bandas, que podem estar relacionadas a qualquer uma das espécies, durante a análise⁸⁹.

Quando uma molécula interage de forma intercalativa com o DNA um dos efeitos mais verificados nas bandas dos ligantes é o hipocromismo, que está relacionado com o aumento de densidade eletrônica nos orbitais π , diminuindo as possibilidades de transições eletrônicas. Em contrapartida, os orbitais π^* dos ligantes também recebem densidade eletrônica dos orbitais π das bases nitrogenadas do DNA, diminuindo a energia da transição $\pi \rightarrow \pi^*$, proporcionando um efeito de batocromismo⁸. Logo, ambos os efeitos evidenciam que o composto interage como um intercalador clássico. Para a quantificação do efeito de batocromismo, é verificada a diferença do comprimento de onda no máximo das bandas analisadas segundo a Equação 5:

Equação 5: Quantificação do efeito de batocromismo ($\Delta\lambda_{max}$), onde λ_0 e λ_f é o comprimento de onda da absorção máxima da banda analisada do composto e da maior concentração de ct-DNA na interação, respectivamente.

$$\Delta\lambda_{max} = |\lambda_f - \lambda_0|$$

Porém, a quantificação do efeito de hipocromismo em porcentagem é determinada pela seguinte equação:

Equação 6: Porcentagem de hipocromismo, em que A_0 e A_f é a absorbância máxima do composto e a absorbância máxima da maior concentração de DNA na interação, respectivamente³².

$$Hipo(\%) = \left| \frac{A_0 - A_f}{A_0} \right| \times 100\%$$

A intensidade da interação é baseada pela constante intrínseca de ligação (K_b), que por sua vez depende da variação de absorvidade da banda relativa ao composto, a qual pode ser calculada utilizando a equação de Benesi-Hildebrand⁸⁸:

Equação 7: Equação de Benesi-Hildbrand, em que [DNA] é a concentração adicionada de DNA, $\epsilon_A = A_{\text{obs}}/[\text{complexo}]$, ϵ_f é o coeficiente de absorvidade molar do composto livre e ϵ_b é o coeficiente da absorvidade molar do composto ligado ao DNA.

$$\frac{[DNA]}{\epsilon_A - \epsilon_f} = \frac{[DNA]}{\epsilon_b - \epsilon_f} + \frac{1}{K_b(\epsilon_b - \epsilon_f)}$$

Logo, o K_b é determinado pela razão entre o coeficiente angular e linear de um gráfico $[DNA]/\epsilon_A - \epsilon_f$ vs. $[DNA]$, conforme os seguintes cálculos:

$$\frac{[DNA]}{\epsilon_A - \epsilon_f} = \frac{[DNA]}{\epsilon_b - \epsilon_f} + \frac{1}{K_b(\epsilon_b - \epsilon_f)}$$

$$y = ax + b$$

$$y = \frac{[DNA]}{\epsilon_A - \epsilon_f}; x = [DNA]$$

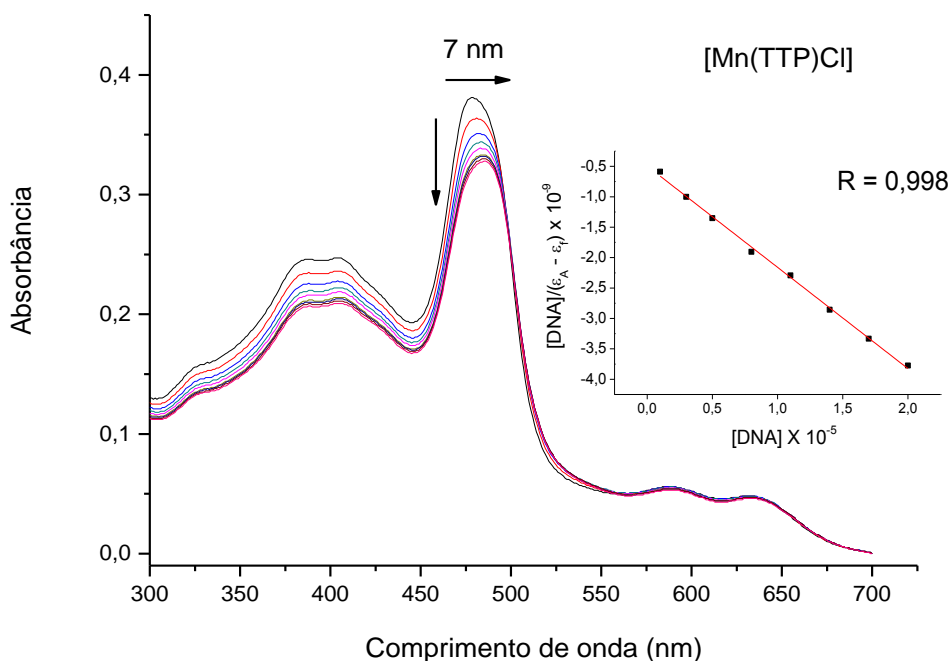
$$y = \frac{x}{\epsilon_b - \epsilon_f} + \frac{1}{K_b(\epsilon_b - \epsilon_f)}$$

$$a = \frac{1}{\epsilon_b - \epsilon_f}; b = \frac{1}{K_b(\epsilon_b - \epsilon_f)}$$

$$\frac{a}{b} = \frac{\frac{1}{\epsilon_b - \epsilon_f}}{\frac{1}{K_b(\epsilon_b - \epsilon_f)}} = K_b$$

No presente trabalho, foram realizados cálculos de K_b para todos os compostos a base da *meso*-tetra(tien-2-il)porfirina utilizando ct-DNA (*calthymus* – DNA) nas proporções entre 0 – 2,0 em relação aos respectivos compostos. É importante ressaltar que os espectros foram obtidos em tampão trisma-HCl (pH=7,4), sendo que a banda Soret, por apresentar maior absorvidade molar e por estar relacionada às transições $\pi \rightarrow \pi^*$ do anel porfirínico, foi escolhida para o monitoramento dos efeitos causados a partir de uma possível interação. Para uma melhor organização dos resultados, será apresentado os espectros de UV-Vis para a interação de ct-DNA com o complexo [Mn(TTP)Cl], FIGURA 4.29, e para os demais compostos os espectros estão apresentados no anexo, Figura 6.17-21.

FIGURA 4.29- Espectros na região do UV-vis de [Mn(TTP)Cl] na presença de diferentes concentrações de ct-DNA e regressão linear para determinação de K_b .



A intercalação em complexos porfirínicos com as bases nitrogenadas do DNA é caracterizada por maiores deslocamentos batocrômicos (≤ 15 nm) e hipocrômismos ($\leq 35\%$)^{90,91,32}. Entretanto, as interações eletrostáticas e via sulco, para essa classe de compostos, apresentam menores deslocamentos batocrômicos (≤ 8 nm) e pequenas porcentagens de hipocrômismo ($\leq 10\%$)^{92,32}.

Por esse método de investigação foi observado que todos os compostos tiveram pequenos efeitos de batocrômismo e hipocrômismo enquadrando-os como possíveis moléculas que interagem fora das bases nitrogenadas. Por outro lado, os mesmos apresentam uma intensidade de interação de moderada a forte, caracterizada pelas constantes de ligação na ordem de 10^5 , TABELA 4.11.

TABELA 4.11- Valores de constante de ligação, deslocamento batocrômico e hipocromismo dos composto porfirínicos a base de H₂TTP.

Composto	Constante de ligação (K _b)	Deslocamento batocrômico (nm)	Hipocromismo (%)
H ₂ TTP	2,53.10 ⁵	0	7
[Zn(TTP)]	4,73.10 ⁵	3	14
[Ni(TTP)]	1,81.10 ⁵	2	10
[Mn(TTP)Cl]	3,37.10 ⁵	7	13
[Cu(TTP)]	2,85.10 ⁵	2	10
[Co(TTP)]	2,30.10 ⁵	0	8

Os resultados obtidos indicam que a forma de interação que mais se assemelha aos deslocamentos apresentados é via sulco. Porém para afirmar tal comportamento, técnicas adicionais são necessárias para verificar o modo de interação predominante no sistema estudado.

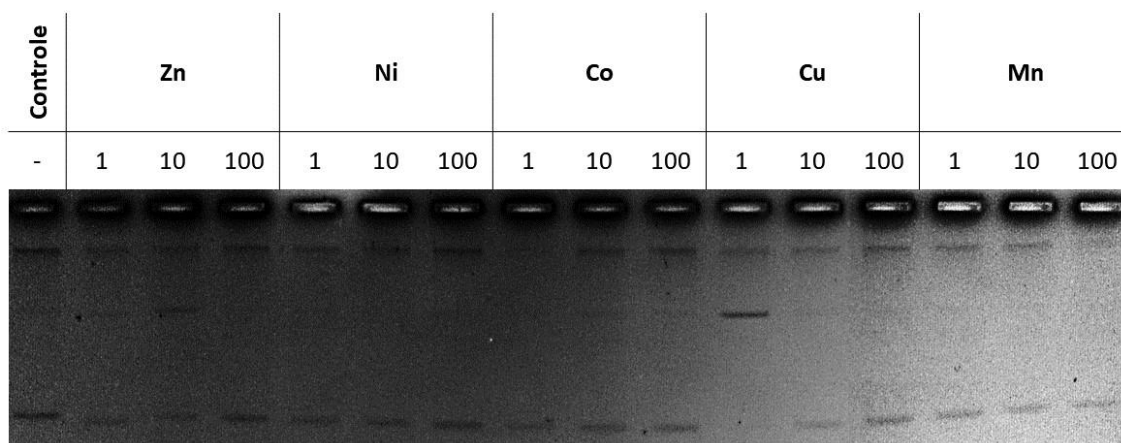
4.4.2 - Interação com o plasmídeo pBR322

Outro método capaz de nos fornecer informações a respeito da capacidade de uma molécula interagir com o DNA é a eletroforese em gel de agarose^{8,93}. Ela se baseia na aplicação de um campo elétrico sobre um gel de agarose, possibilitando a migração de diferentes conformações do DNA plasmideal para o polo oposto de sua carga⁹³. Em pH neutro, essa biomolécula apresenta uma carga parcial negativa, logo a migração ocorre do cátodo para o ânodo⁹³. Sendo que, nesse caso, a mobilidade eletroforética depende da flexibilidade, tamanho e carga do DNA⁹³. Portanto, quando uma molécula interage com o DNA, ela ocasiona uma mudança no perfil de mobilidade eletroforética.

Neste trabalho, foi avaliada a interação dos complexos sintetizados nas concentrações de 1, 10 e 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ com o plasmídeo pBR322 superenovelado, após a incubação por 24h, FIGURA 4.30, linhas 2-16. O controle negativo, representado na linha 1, foi preparado com plasmídeo pBR322, sem ação de nenhum composto. É importante ressaltar que, todas as soluções foram preparadas utilizando água deionizada e 3% de DMSO, por conta da baixa solubilidade dos complexos.

Foi observado que os compostos [Zn(TTP)], [Ni(TTP)] e [Co(TTP)] apresentaram mudanças pouco significativas nas mobilidades eletroforéticas quando comparadas ao controle negativo. Porém, foi observado uma diminuição acentuada da mobilidade eletroforética para todas as concentrações analisadas do composto [Mn(TTP)Cl], em comparação com os demais complexos. Corroborando com os resultados obtidos pela técnica de UV-Vis, quando o mesmo complexo apresentou as mudanças mais significativas de batocromismo e hiper Cromismo. Estes comportamentos podem estar associados a uma interação mais efetiva do composto [Mn(TTP)Cl] com o DNA em relação aos complexos análogos.

FIGURA 4.30 - Interação dos complexos porfirínicos a base da *meso*-tetra(tien-2-il)porfirina com o plasmídeo pBR322.



4.5 - Citotoxicidade

O estudo de citotoxicidade foi realizado pelo método MTT, para determinar a concentração mínima para a inibição de 50% da viabilidade celular. Este é um método colorimétrico que pode ser verificado pela reação de redução do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5- difeniltetrazólio (MTT) a *formazan*^{94,4}, FIGURA 4.31, que apresenta uma coloração roxa. A FIGURA 4.32 representa uma placa de teste de viabilidade celular, após a solubilização dos cristais de *formazan*. Em sistemas biológicos, essa reação é realizada pela atividade mitocondrial em células viáveis.

FIGURA 4.31 - Esquema reacional para a redução de MTT para formação de *formazan*.

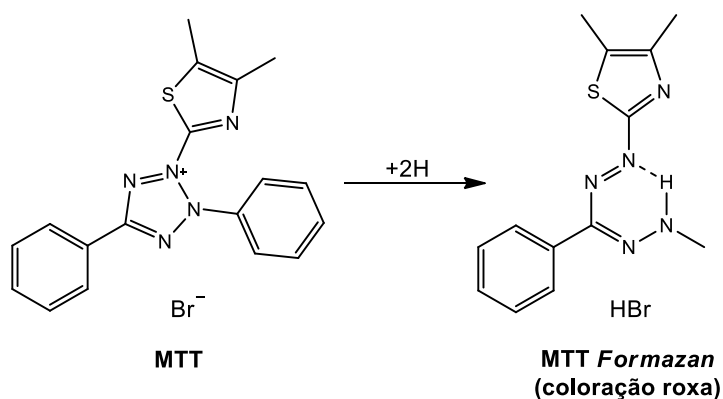
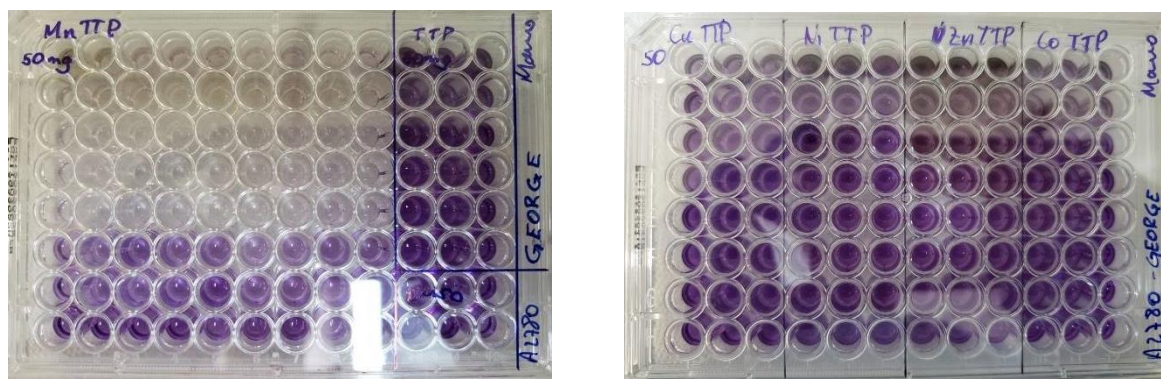


FIGURA 4.32- Placas de 96 poços utilizadas nos ensaios de IC₅₀ dos compostos porfirínicos na linhagem A2780cis.



A fim de investigar a influência dos centros metálicos frente à citotoxicidade dos compostos porfirínicos, foram realizados estudos de ação antitumoral para as linhagens DU-145 (tumoral de próstata) e A2780cis (tumoral de ovário resistente à cisplatina). A linhagem DU-145 foi escolhida com base nos dados de incidência de novos casos no Brasil, uma vez que o câncer de próstata é um dos mais verificados no país; e a A2780cis é uma linhagem celular resistente a um dos fármacos padrões mais utilizados na quimioterapia, logo a utilização dessa linhagem mostra-se de grande interesse para a compreensão da atividade citotóxica de compostos porfirínicos.

A partir dos valores de IC₅₀, foi observado que a porfirina livre e todos os complexos com exceção do compostos [Mn(TTP)Cl] não apresentaram atividade citotóxica, TABELA 4.12:

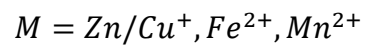
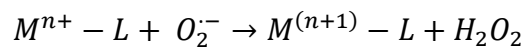
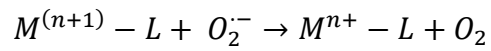
TABELA 4.12 - Citotoxicidade dos compostos a base da TTP e cisplatina frente às linhagens de DU-145 e A2780cis.

Composto	IC ₅₀ (µM)	
	DU-145	A2780cis
H ₂ TTP	>100	>100
[Zn(TTP)]	>50	>50
[Ni(TTP)]	>50	>50
[Mn(TTP)Cl]	3,45 ± 0,14	5,28 ± 0,23
[Cu(TTP)]	>50	>50
[Co(TTP)]	>50	>50
Cisplatina	15,0 ± 1,4	13,19 ± 1,84 ⁹⁵

A partir destes resultados, pode-se concluir que há uma significativa influência da esfera de coordenação na atividade citotóxica dos complexos porfirínicos. É importante destacar, que o composto [Mn(TTP)Cl] apresentou-se mais citotóxico do que a cisplatina. Mostrando ser um sistema promissor para estudos futuros. Confrontando os dados de viabilidade celular com os de interação com o DNA, propõe-se que esta biomolécula, não seja o alvo primordial deste composto. Embora sua interação seja mais efetiva que as dos demais complexos, esta diferença, não parece ser suficientemente significativa para justificar a elevada atividade do complexo de manganês e a inatividade dos outros.

Desta forma, novos alvos devem ser investigados. Através de levantamento bibliográfico, uma hipótese plausível para a elevada atividade deste composto de coordenação seja sua capacidade de mimetizar a enzima superóxido dismutase (mSOD). Complexos de manganês(III) contendo ligantes com alta densidade eletrônica (como ligantes porfirínico) já demonstraram esta capacidade⁹⁶.

Essa enzima é responsável pelo controle de espécies reativas de oxigênio. Logo, complexos que atuam como miméticos da enzima SOD são capazes de reduzir a proliferação de células cancerosas, a partir da geração de H₂O₂ (peróxido de hidrogênio) e O₂ pelas seguintes reações de oxirredução⁹⁷:



Uma vez que ocorre a intensificação desse ciclo catalítico, pelo aumento da atividade enzimática por parte de mSOD, as células tumorais entram em um processo de estresse oxidativo, levando-as a apoptose⁹⁸. No entanto, diversos ensaios deverão ser realizados para confirmar tal hipótese.

5 - Considerações finais

5.1 - Conclusão

Neste trabalho foram sintetizados complexos porfirínicos a base de 5,10,15,20-tetra-(tien-2-il)-H₂1,H₂3-porfirina contendo zinco(II), níquel(II), cobalto(II), cobre(II) e manganês(III) como centros metálicos. Todos os compostos foram caracterizados por métodos espectroscópicos de UV-vis, RMN, infravermelho e fluorescência. Nos quais foi possível demonstrar a coordenação e observar a influência de cátions do primeiro período dos elementos de transição no que diz respeito às propriedades magnéticas e eletrônicas.

Após as caracterizações dos compostos de coordenação, foram realizados estudos de interação com DNA, utilizando espectroscopia na região do UV-vis e eletroforese em gel. Os resultados indicaram que todos os compostos porfirínicos a base de H₂TTP são capazes de interagir por vias não-covalentes com DNA.

A partir da citotoxicidade dos complexos porfirínicos, foi verificado que o composto [Mn(TTP)Cl] apresentou-se mais ativos frente a linhagens de cânceres de próstata (DU-145) e de ovário resistente a cisplatina (A2780cis). Porém, não foi verificada ação citotóxica para a porfirina livre e para os complexos análogos frente a ambas as linhagens.

Embora, o complexo [Mn(TTP)Cl] apresente uma afinidade com o DNA um pouco superior em comparação às demais metaloporfirinas, a ação citotóxica para esse complexo não pode ser atribuída prioritariamente ao alvo avaliado. Portanto, existe uma possibilidade desse composto apresentar outro modo de ação predominante, como por exemplo, um mimético da superóxido dismutase (mSOD).

Apesar da baixa citotoxicidade apresentada pelos demais complexos, conclui-se que a dissertação tenha contribuído de forma significativa na compreensão desta classe de compostos pelo grupo de pesquisa. A partir das informações obtidas será possível realizar modificações estruturais para que se alcance complexos mais ativos e com propriedades óticas promissoras.

5.2 - Perspectivas futuras

A partir dos resultados adquiridos, foi verificado que há a necessidade de ensaios complementares de interação com o DNA, tais como: ensaio de competição com o brometo de etídio, dicroísmo circular e viscosidade, desta forma, será possível se determinar de maneira inequívoca o modo de interação.

Como apenas duas linhagens tumorais foram investigadas, é de grande interesse a ampliação deste estudo, realizando-se ensaios frente a outras linhagens, inclusive, não-tumorais, o que nos permitirá alcançar um maior espectro de atuação, principalmente, para o composto ativo, [Mn(TTP)Cl].

Para averiguar se o complexo [Mn(TTP)Cl] pode atuar como um mimético da enzima superóxido dismutase (mSOD), é necessário a realização do ensaio de espécies reativas de oxigênio (ROS).

Referências

- (1) O que é câncer? <https://www.inca.gov.br/o-que-e-cancer> (accessed Apr 7, 2020).
- (2) NCD mortality and morbidity https://www.who.int/gho/ncd/mortality_morbidity/en/ (accessed Apr 8, 2020).
- (3) Estimativa 2020, Câncer No Brasil. Rio de Janeiro 2019, p 122.
- (4) SILVA, L. T. P. Síntese, Caracterização e Estudos de Citotoxicidade e Alvo Biológico de Complexos Quadráticos Planos Contendo Tiossemicarbazonas, Universidade Federla de São Carlos, Programa de Pós-graduação em Química, 2019.
- (5) DEVITA, V. T.; CHU, E. A History of Cancer Chemotherapy. *Cancer Res.* 2008, 68 (21), 8643–8653.
- (6) ROCHA, F. V. Síntese, Caracterização e Estudo Da Atividade Antitumoral de Complexos de Paládio(II) Com Ligantes Sulfurados e Trifenilfosfina, Univerisade Estadual Paulista, Instituto de Química, Araraquara, 2013.
- (7) DERVAN, P. B. Molecular Recognition of DNA by Small Molecules. *Bioorg. Med. Chem.* 2001, 9, 2215–2235.
- (8) ROCHA, C. V. B. Novos Complexos de Pd(II): Síntese, Caracterização e Efeito Dos Ligantes Na Citotoxicidade e Interação Com DNA, Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química, 2014.
- (9) JAKUPEC, M. A.; GALANSKI, M.; ARION, V. B.; HARTINGER, C. G.; KEPLER, B. K. Antitumour Metal Compounds: More than Theme and Variations. *Dalt. Trans.* 2008, No. 2, 183–194.
- (10) KELLAND, L. The Resurgence of Platinum-Based Cancer Chemotherapy. *Nat. Rev. Cancer* 2007, 7 (8), 573–584.
- (11) DEROCHETTE, S.; FRANCK, T.; MOUITHYS-MICKALAD, A.; DEBY-DUPONT, G.; NEVEN, P.; SERTEYN, D. Intra- and Extracellular Antioxidant Capacities of the New Water-Soluble Form of Curcumin (NDS27) on Stimulated Neutrophils and HL-60 Cells. *Chem. Biol. Interact.* 2013, 201 (1–3), 49–57.
- (12) FREZZA, M.; HINDO, S.; CHEN, D.; DAVENPORT, A.; SCHMITT, S.; TOMCO, D.; PING DOU, Q. Novel Metals and Metal Complexes as Platforms for Cancer Therapy. *Curr. Pharm. Des.* 2010, 16, 1813–1825.
- (13) BUGARČIĆ, Ž. D.; BOGOJESKI, J.; PETROVIĆ, B.; HOCHREUTHER, S.; VAN ELDIK, R. Mechanistic Studies on the Reactions of Platinum(II) Complexes with Nitrogen- and Sulfur-Donor Biomolecules. *Dalt. Trans.* 2012, 41, 12329–12345.
- (14) BARRA, C. V.; NETTO, A. V. G. Interações Entre Complexos Antitumorais e o DNA e Suas Ferramentas de Análise: Um Enfoque Nos Metalintercaladores. *Rev. Virtual Química* 2016, 7 (6), 1998–2016. <https://doi.org/10.5935/1984-6835.20150118>.
- (15) ZIANNA, A.; GEROMICHALOS, G. D.; HATZIDIMITRIOU, A. G.;

- COUTOULI-ARGYROPOULOU, E.; LALIA-KANTOURI, M.; PSOMAS, G. Palladium(II) Complexes with Salicylaldehyde Ligands: Synthesis, Characterization, Structure, in Vitro and in Silico Study of the Interaction with Calf-Thymus DNA and Albumins. *J. Inorg. Biochem.* 2019, 194, 85–96.
- (16) PRATVIEL, G. Porphyrins in Complex with DNA : Modes of Interaction and Oxidation Reactions. 2016, 308, 460–477.
- (17) MOMO, P. B. Metodologias de Síntese e Modificações Estruturais Em Meso-Tetraarilporfirinas, Univerisade Federal de São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química, São Carlos, 2016.
- (18) CHENG, F.; HE, X.; YIN, L.; XIE, B.; LI, Y. Design and Structural Modification of Narrow-Bandgap Small Molecules Based on Asymmetric Porphyrin-Diketopyrrolopyrrole Backbone for Solution-Processed Organic Solar Cells. *Dye. Pigment.* 2020, 176 (December 2019), 108211.
- (19) COUTO, G. K.; PACHECO, B. S.; BORBA, V. M.; JUNIOR, J. C. R.; OLIVEIRA, T. L.; SEGATTO, N. V.; SEIXAS, F. K.; ACUNHA, T. V.; IGLESIAS, B. A.; COLLARES, T. Tetra-Cationic Platinum(II) Porphyrins like a Candidate Photosensitizers to Bind, Selective and Drug Delivery for Metastatic Melanoma. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 2020, 202 (September 2019), 111725.
- (20) ZHANG, J.; CHEN, C. J.; ZHU, H. C. Porphyrin Dyes Bearing Heterocyclic Anchoring Groups for Dye-Sensitized Solar Cells with Enhanced Efficiency and Long-Term Stability: Further Optimization of Champion Porphyrin Dye SM315. *Appl. Surf. Sci.* 2020, 513 (December 2019), 145844.
- (21) ZHAO, L.; ZHAO, Y.; LI, R.; WU, D.; XU, R.; LI, S.; ZHANG, Y.; YE, H.; XIN, Q. A Porphyrin-Based Optical Sensor Membrane Prepared by Electrostatic Self-Assembled Technique for Online Detection of Cadmium(II). *Chemosphere* 2020, 238, 124552.
- (22) LIU, T.; CUI, L.; LI, D.; GAO, W.; WU, L.; ZHANG, X. An Enzyme-Free and Substrate-Free Electrochemical Biosensor with Robust Porphyrin-Based Covalent-Linked Nanomaterial as Nanoelectrocatalyst and Efficient Support for Sensitive Detection of Uracil-DNA Glycosylase. *Biosens. Bioelectron.* 2020, 154 (December 2019), 112014.
- (23) PERCÁSTEGUI, E. G.; JANCIK, V. Coordination-Driven Assemblies Based on Meso-Substituted Porphyrins: Metal-Organic Cages and a New Type of Meso-Metallaporphyrin Macrocycles. *Coord. Chem. Rev.* 2020, 407, 0–3.
- (24) MALLAH, R. R.; MOHBIYA, D. R.; SEKAR, N. Influence of Orthogonal Di- and Trimerization Leading to Meso Fused BODIPY on Linear and NLO Properties - TDDFT Study and Singlet-Triplet Energy Distribution. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* 2020, 389 (December 2019), 112284.
- (25) MOSS, G. P. Nomenclature of Tetrapyrroles. *Int. Union Pure Appl. Chem. Int. Union Biochem.* 1987, 59 (6), 779–832.
- (26) SILVA, M. M. da. Sensores Eletroquímicos Contendo Supramoléculas de Complexo Periféricos de Rutênio: Obtenção e Aplicações, Universidade

Federal de São Carlos, Departamento de Química, Programa de Pós-graduação em Química, São Carlos, 2013.

- (27) NELSON, D. L.; COX, M. M. *Princípios de Bioquímica de Lehninger*, 6ª edição.; Porto Alegre, 2014.
- (28) NELSON, D. L.; COX, M. M. *Princípios de Bioquímica de Lehninger*, 6ª edição.; Porto Alegre, 2014.
- (29) ARBA, M.; IHSAN, S.; TIAHJONO, D. H. Molecular Modeling of Cationic Porphyrin-Anthraquinone Hybrids as DNA Topoisomerase II β Inhibitors. *Comput. Biol. Chem.* 2017.
- (30) LEBEDEVA, N. S.; YURINA, E. S.; GUBAREV, Y. A.; SYRBU, S. A. Interactions of Tetracationic Porphyrins with DNA and Their Effects on DNA Cleavage. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 2018, 199, 235–241.
- (31) BARRAGÁN, E.; GORDILLO, B.; VARGAS, G.; CORTEZ, T. DNA Replication Inhibition and Fluorescence Microscopy of Non-Cationic Porphyrins in Malignant Cells. 2005, 2005 (vi), 436–448.
- (32) GUO, Y.; CHAO, J.; PAN, J. Study on the Interaction of with Cyclodextrins and DNA by Spectroscopy. *Spectrochim. Acta Part A* 2007, 68, 231–236.
- (33) FENG, X.; ZHANG, J.; WU, Y.; ZHANG, Q.; LIU, J. Detailed pro Fi Ling on DNA Binding Af Fi Nity , Cytotoxicity and Pathway of Induced Cell Death of Novel Water-Soluble Cu (II) -Based Acylhydrazone Porphyrin Derivatives. 2017, 136, 773–781.
- (34) SILVEIRA, C. H.; GAROFORO, E. N.; CHAVES, O. A.; GONÇALVES, P. F. B.; STREIT, L.; IGLESIAS, B. A. Synthesis , Spectroscopy , Electrochemistry and DNA Interactive Studies of Meso -Tetra (1-Naphthyl) Porphyrin and Its Metal Complexes. *Inorganica Chim. Acta* 2018, 482 (June), 542–553.
- (35) PATTANAYAK, R.; BARUA, A.; DAS, A.; CHATTERJEE, T.; PATHAK, A.; CHOUDHURY, P.; SEN, S.; SAHA, P.; BHATTACHARYYA, M. Porphyrins to Restrict Progression of Pancreatic Cancer by Stabilizing KRAS G-Quadruplex: In Silico, in Vitro and in Vivo Validation of Anticancer Strategy. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2018, 125 (August), 39–53.
- (36) BRÜCKNER, C.; FOSS, P. C. D.; SULLIVAN, J. O.; PELTO, R.; ZELLER, M.; BIRGE, R.; CRUNDWELL, G. Origin of the Bathochromically Shifted Optical Spectra of Meso -Tetrathien-. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2006, No. 8, 2402–2412.
- (37) ZHOU, Y.; LIU, F.; WU, H.; BOYANG, Q.; DUAN, L. Synthesis and Optical/Electrochemical Properties of Meso-5,10,15,20-Tetrathienyl Substituted Porphyrins and Their Metal Complexes. *Asian J. Chem.* 2015, 27 (2), 616–620.
- (38) BABU, B.; AMUHAYA, E.; OLUWOLE, D.; PRINSLOO, E.; MACK, J.; NYOKONG, T. Preparation of NIR Absorbing Axial Substituted Tin(IV) Porphyrins and Their Photocytotoxic Properties. *Med. Chem. Commun.* 2019, 10, 41–48.

- (39) No Title https://en.wikipedia.org/wiki/Composition_of_the_human_body (accessed May 4, 2020).
- (40) SEREDYUK, M.; GUMIENNA-KONTECKA, E.; BRZUSZKIEWICZ, A.; ISKENDEROV, T. S.; KALIBABCHUK, V. A. Crystal Structure of Meso-Tetrakis(4-Nitrophenyl)Porphyrin Nitrobenzene Disolvate. *Acta Crystallogr. Sect. E Struct. Reports Online* 2014, *70* (11), o1147–o1148.
- (41) Ionic radius https://en.wikipedia.org/wiki/Ionic_radius (accessed Mar 24, 2020).
- (42) BETONI MOMO, P.; PAVANI, C.; BAPTISTA, M. S.; BROCKSOM, T. J.; THIAGO DE OLIVEIRA, K. Chemical Transformations and Photophysical Properties of Meso-Tetrathienyl-Substituted Porphyrin Derivatives. *European J. Org. Chem.* 2014, *2014* (21), 4536–4547.
- (43) AL-SHEWIKI, R. K.; KORB, M.; HILDEBRANDT, A.; ZAHN, S.; NAUMOV, S.; BUSCHBECK, R.; RÜFFER, T.; LANG, H. Diaqua- β -Octaferrocenyltetraphenylporphyrin: A Multiredox-Active and Air-Stable 16π Non-Aromatic Species. *Dalt. Trans.* 2019, *48* (5), 1578–1585.
- (44) BICHAN, N. G.; OVCHENKOVA, E. N.; GRUZDEV, M. S.; LOMOVA, T. N. Formation Reaction and Chemical Structure of a Novel Supramolecular Triad Based on Cobalt(II) 5,10,15,20-(Tetra-4-Tert-Butylphenyl)-21H,23H-Porphyrin and 1-Methyl-2-(Pyridin-4'-Yl)-3,4-Fullero[60]Pyrrolidine. *J. Struct. Chem.* 2018, *59* (3), 711–719.
- (45) CHIZHOVA, N. V.; MALTCEVA, O. V.; ZVEZDINA, S. V.; MAMARDASHVILI, N. Z.; KOIFMAN, O. I. Bromo-Substituted Mn(II) and Mn(III)-Tetraarylporphyrins: Synthesis and Properties. *J. Coord. Chem.* 2018, *71* (19), 3222–3232.
- (46) REICHMANN, M. E.; RICE, S. A.; THOMAS, C. A.; DOTY, P. A Further Examination of the Molecular Weight and Size of Desoxyribose Nucleic Acid. *J. Am. Chem. Soc.* 1954, *76* (11), 3047–3053.
- (47) BARRA, C. V.; ROCHA, F. V.; MOREL, L.; GAUTIER, A.; GARRIDO, S. S.; MAURO, A. E.; FREM, R. C. G.; NETTO, A. V. G. DNA Binding , Topoisomerase Inhibition and Cytotoxicity of Palladium (II) Complexes with 1 , 10-Phenanthroline and Thioureas. *Inorganica Chim. Acta* 2016, *446*, 54–60.
- (48) COLINA-VEGAS, L.; DUTRA, J. L.; VILLARREAL, W.; JOÃO, J. H.; COMINETTI, M. R.; PAVAN, F.; NAVARRO, M.; BATISTA, A. A. Ru(II)/Clotrimazole/Diphenylphosphine/Bipyridine Complexes: Interaction with DNA, BSA and Biological Potential against Tumor Cell Lines and Mycobacterium Tuberculosis. *J. Inorg. Biochem.* 2016, *162*, 135–145.
- (49) POPOLIN, C. P.; REIS, J. P. B.; BECCENERI, A. B.; GRAMINHA, A. E.; ALMEIDA, M. A. P.; CORRÊA, R. S.; COLINA-VEGAS, L. A.; ELLENA, J.; BATISTA, A. A.; COMINETTI, M. R. Cytotoxicity and Anti-Tumor Effects of New Ruthenium Complexes on Triple Negative Breast Cancer Cells. *PLoS One* 2017, *12* (9), 1–22. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183275>.
- (50) HONG, S. H.; ISMAIL, I. A.; KANG, S. M.; HAN, D. C.; KWON, B. M. Cinnamaldehydes in Cancer Chemotherapy. *Phyther. Res.* 2016, *30* (5),

754–767.

- (51) FADDA, A. A.; EL-MEKAWY, R. E.; EL-SHAFEI, A. I.; FREEMAN, H. Full Paper Synthesis and Pharmacological Screening of Novel Meso - Substituted Porphyrin Analogs. 2013, 53–61.
- (52) GONSALVES, A. M. D. A. R.; VAREJÃO, J. M. T. B.; PEREIRA, M. M. Some New Aspects Related to the Synthesis of Meso-substituted Porphyrins. *J. Heterocycl. Chem.* 1991, 28 (3), 635–640.
- (53) SCHREIMAN, I. C.; HSU, H. C.; KEARNEY, P. C.; MARGUERETTAZ, A. M. Revisited: Synthesis of Tetraphenylporphyrins. 1987, 836, 827–836.
- (54) LINDSEY, J. S.; SCHREIMAN, I. C.; HSU, H. C.; KEARNEY, P. C.; MARGUERETTAZ, A. M. ROTHEMUND AND ADLER-LONGO Reactions Revisited: Synthesis of Tetraphenylporphyrins under Equilibrium Conditions. *J. Org. Chem.* 1987, 836, 827–836.
- (55) KONIEV, O.; WAGNER, A. Developments and Recent Advancements in the Field of Endogenous Amino Acid Selective Bond Forming Reactions for Bioconjugation. *Chem. Soc. Rev.* 2015, 44 (15), 5495–5551.
- (56) AL-SHEWIKI, R. K.; KORB, M.; HILDEBRANDT, A.; ZAHN, S.; NAUMOV, S.; RÜFFER, T.; LANG, H. [Supporting Information] Diaqua- β - Octaferrocenyltetraphenylporphyrin : A Multiredox- Active and Air-Stable 16 π Non-Aromat. *Dalt. Trans.* 2018, 48 (5), 1578–1585.
- (57) GARCIA VELHO, R. Medidas de Condutividade Na Caracterização de Complexos Inorgânicos: Um Levantamento Bibliográfico. *Programa Pós-Graduação em Química - UF* 2006, 170.
- (58) PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ JR, G. S.; VYVYAN, J. R. *Introdução a Espectroscopia*, 4ª edição.; 2008.
- (59) MIESSLER, G. L.; FICHER, P. J.; TARR, D. A. *Inorganic Chemistry*; 2014.
- (60) GOUTERMAN, M. Spectra Porphyrins. *J. Mol. Spectrosc.* 1961, No. 6, 138–163.
- (61) COSTA, L. D. DA S. Síntese e Caracterização de Porfirinas Como Potenciais Agentes Fotossensibilizadores Em Terapia Fotodinâmica. *Diss. apresentada no Dep. ciência da vida. Fac. Ciência e Tecnol. da Univ. Coimbra* 2013, 1–138.
- (62) GALINATO, M. G. I.; BROCIOSUS, E. P.; PAULAT, F.; MARTIN, S.; SKODACK, J.; HARLAND, J. B.; LEHNERT, N. Elucidating the Electronic Structure of High-Spin [MnIII(TPP)Cl] Using Magnetic Circular Dichroism Spectroscopy. *Inorg. Chem.* 2020, No. Iv.
- (63) GOUTERMAN, M. The Porphyrins V3; Dolphin, D., Ed.; Academic Press: New York, 1978; pp 1–156.
- (64) MCINDOE, J. S.; VIKSE, K. L. Assigning the ESI Mass Spectra of Organometallic and Coordination Compounds. *J. Mass Spectrom.* 2019, 54 (5), 466–479. <https://doi.org/10.1002/jms.4359>.
- (65) Author Guidelines https://publish.acs.org/publish/author_guidelines?coden=joceah (accessed Mar 27, 2020).

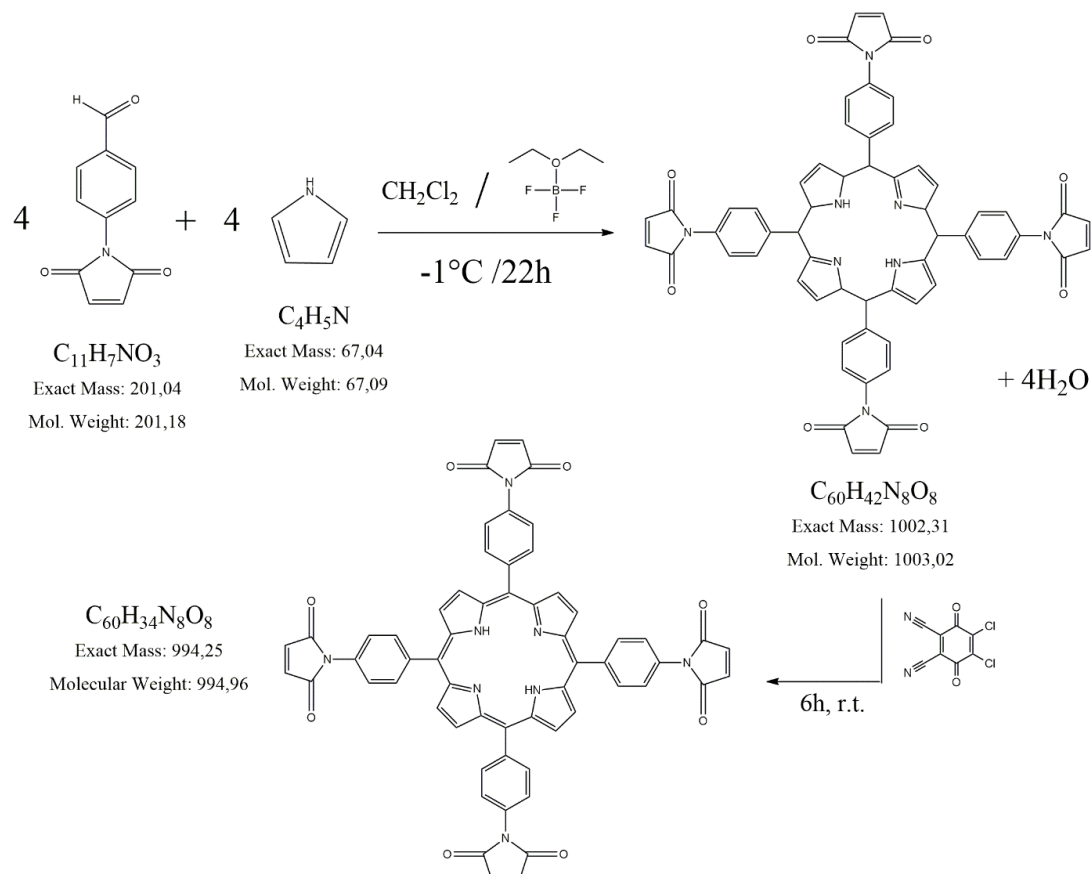
- (66) NAKAMOTO, K. *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds*, 4^a edition.; 2008.
- (67) SUJATA KUNDAN; BAJJU, G. D.; GUPTA, D.; ROY, T. K. Novel Axially Ligated Complexes of Zn(II)Porphyrin: Spectroscopic, Computational, and Antibiological Characterization. *Russ. J. Inorg. Chem.* 2019, 64 (11), 1379–1395.
- (68) OVCHENKOVA, E. N.; BICHAN, N. G.; SEMEIKIN, A. S.; LOMOVA, T. N. Synthesis, Physicochemical Characterization and Pyridine Binding to (2,3,7,8,12,18-Hexamethyl-13,17-Diethyl-5-(2-Pyridyl)-Porphinato)Cobalt(II). *Macroheterocycles* 2018, 11 (1), 79–84.
- (69) SUN, E. J.; SUN, G. J.; BAI, X. Y.; ZHAI, H. J.; YANG, X. Y.; LIN, S. W. Synthesis and Liquid Crystalline Properties of a Series of Meso-Tetra(3,4,5-Trialkylacyloxyphenyl)Porphyrins and Their Zinc Complexes. *Russ. J. Gen. Chem.* 2019, 89 (8), 1667–1672.
- (70) SHI, Y.; TANG, X.; SUN, E.; CHENG, X.; WANG, D.; YU, S.; SHI, T. Synthesis and Characterization of Novel Unsymmetrical Porphyrin and Its Complexes. *Synth. React. Inorganic, Met. Nano-Metal Chem.* 2008, 38 (5), 431–438.
- (71) SLOTA, R.; BRODA, M. A.; DYRDA, G.; EJSMONT, K.; MELE, G. Structural and Molecular Characterization of Meso-Substituted Zinc Porphyrins: A DFT Supported Study. *Molecules* 2011, 16 (12), 9957–9971.
- (72) SUN, Z. C.; SHE, Y. BIN; ZHOU, Y.; SONG, X. F.; LI, K. Synthesis, Characterization and Spectral Properties of Substituted Tetraphenylporphyrin Iron Chloride Complexes. *Molecules* 2011, 16 (4), 2960–2970.
- (73) BELL, C. F.; WATERS, D. N. The Vibrational Spectra of Some Manganese(III) Chloro Complexes. *J. Inorg. Nucl. Chem.* 1977, 39 (5), 773–775.
- (74) GROVA, I. R. Síntese e Caracterização Estrutural e Eletro-Óptica Do Poli(9,9'-n-Di-Hexil-2,7-Fluorenodilvinileno-Alt-2,5- Tiofeno). 2007, 85.
- (75) SILVA, L. G. da. Estudo Fotoquímico e Fotofísico de Tetraidrocurcuminóides, Universidade Federal de Uberlândia, Instituto de Química, Programa de Pós-Graduação em Química, 2008.
- (76) VALEUR, B. *Molecular Fluorescence Principles and Applications*; 2001.
- (77) PAN, J.; JIANG, L.; CHAN, C.; TSOI, T.; SHIU, K.; KWONG, D. W. J.; WONG, W.; WONG, W.; WONG, K. Excitation Energy Transfer in Ruthenium (II) -Porphyrin Conjugates Led to Enhanced Emission Quantum Yield and 1 O 2 Generation. *J. Lumin.* 2017, 184, 89–95.
- (78) MILITELLO, M. P.; HERNÁNDEZ RAMÍREZ, R. E.; LIJANOVA, I. V.; PREVITALI, C. M.; BERTOLOTTI, S. G.; ARBELOA, E. M. PAMAM Dendrimers with a Porphyrin Core as Highly Selective Binders of Li⁺ in an Alkaline Mixture. A Spectroscopic Study. *New J. Chem.* 2019, 43 (41), 16246–16254.
- (79) GHOSH, M.; MORA, A. K.; NATH, S.; CHANDRA, A. K.; HAJRA, A.; SINHA, S. Photophysics of Soret-Excited Free Base Tetraphenylporphyrin

- and Its Zinc Analog in Solution. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 2013, *116*, 466–472.
- (80) GU, X.; XIE, S.; CHEN, Q.; CHEN, S.; ZHAO, H.; BIAN, Z. Anti-Migration and Burning Rate Catalytic Performances of Novel Ferrocene-Based Porphyrins and Their Transition-Metal Complexes. *New J. Chem.* 2018, *42* (16), 13319–13328.
- (81) CENSI, V.; CABALLERO, A. B.; PÉREZ-HERNÁNDEZ, M.; SOTO-CERRATO, V.; KORRODI-GREGÓRIO, L.; PÉREZ-TOMÁS, R.; DELL'ANNA, M. M.; MASTRORILLI, P.; GAMEZ, P. DNA-Binding and in Vitro Cytotoxic Activity of Platinum(II) Complexes of Curcumin and Caffeine. *J. Inorg. Biochem.* 2019, *198* (June), 110749.
- (82) ALI, B. B.; BELKHIRIA, M. S.; GIORGI, M.; NASRI, H. Synthesis, Structural and Spectroscopic Characterization of the Bis(Nitrito-&I>N</I>) Octaethylporphyrin Cobalt(III) Complex. *Open J. Inorg. Chem.* 2011, *01* (03), 39–46.
- (83) MANSOUR, A.; ZAIED, M.; ALI, I.; SOLIMAN, S.; OTHMANI, M. Synthesis, Molecular Structure, Spectroscopic Characterization and Antibacterial Activity of the Co(III) (Chlorido)(Pyridine) and (Chlorido)(4,4'-Bipyridine) "Picket Fence" Porphyrin Complexes. *Polyhedron* 2017, *127*, 496–504.
- (84) RAMA, A. C. R.; VEIGA, F.; FIGUEIREDO, I. V.; SOUSA, A.; CARAMONA, M. Complexos de Inclusão de Indometacina Com Hidroxipropil-Biclodextrina. Estudos de Dissolução e Coeficiente de Partição. *Int. Trade Labor Mark. Welfare, Inequality, Unempl.* 2006, *42* (1), 59–68.
- (85) LEO, A.; HANSCH, C.; ELKINS, D. Partition Coefficients and Their Uses. *Chem. Rev.* 1971, *71* (6), 525–616. <https://doi.org/10.1021/cr60274a001>.
- (86) PANCHAGNULA, R.; THOMAS, N. S. Biopharmaceutics and Pharmacokinetics in Drug Research. *Int. J. Pharm. International Journal of Pharmaceutics*. Amsterdam 2000, pp 131–150.
- (87) BARRETO, M.; BICA, A.; FARINHA, A. Sistemas de Classificação Biofarmacêutica. *Bol. LEF*. Lisboa 2002, pp 2–10.
- (88) SIRAJUDDIN, M.; ALI, S.; BADSHAH, A. Drug-DNA Interactions and Their Study by UV-Visible, Fluorescence Spectroscopies and Cyclic Voltametry. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 2013, *124*, 1–19.
- (89) DIMIZA, F.; PERDIH, F.; TANGOULIS, V.; TUREL, I.; KESSISSOGLU, D. P.; PSOMAS, G. Interaction of Copper(II) with the Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs Naproxen and Diclofenac: Synthesis, Structure, DNA- and Albumin-Binding. *J. Inorg. Biochem.* 2011, *105* (3), 476–489.
- (90) RAMESH, J.; ARUNKUMAR, C.; SUJATHA, S. Dicationic Porphyrins Bearing Thienyl and Pyridinium Moieties: Synthesis, Characterization, DNA Interaction and Cancer Cell Toxicity. *Polyhedron* 2019, *170*, 151–159.
- (91) ZHAO, P.; XU, L.; HUANG, J.; ZHENG, K.; FU, B. Biophysical Chemistry Tricationic Pyridium Porphyrins Appending Different Peripheral Substituents: Experimental and DFT Studies on Their Interactions with DNA. *Biophys. Chem.* 2008, *135*, 102–109.
- (92) KANG, J.; WU, H.; LU, X.; WANG, Y.; ZHOU, L. Study on the Interaction

- of New Water-Soluble Porphyrin with DNA. *Spectrochim. Acta Part A* 2005, 61, 2041–2047.
- (93) RICHARDS, A. D.; RODGER, A. Synthetic Metallomolecules as Agents for the Control of DNA Structure. *Chem. Soc. Rev.* 2007, 36 (3), 471–483.
- (94) NTWENTYMAN, P. R.; LUSCOMBE, M. A. Study of Some Variables in a Tetrazolium Dye (MTT) Based Assay for Cell Growth and Chemosensitivity. *Br. J. Cancer* 1987, 56, 279.
- (95) STILGENBAUER, M.; JAYAWARDHANA, A. M. D. S.; DATTA, P.; YUE, Z.; GRAY, M.; NIELSEN, F.; BOWERS, D. J.; XIAO, H.; ZHENG, Y. R. A Spermine-Conjugated Lipophilic Pt(IV) Prodrug Designed to Eliminate Cancer Stem Cells in Ovarian Cancer. *Chem. Commun.* 2019, 55 (43), 6106–6109.
- (96) SPASOJEVIC, I.; BATINIC, I. Manganese (III) Complexes with Porphyrins and Related Compounds as Catalytic Scavengers of Superoxide. *Inorganica Chim. Acta* 2001, 317, 230–242.
- (97) AGOTEGARAY, M. A.; DENNEHY, M.; BOERIS, M. A.; GRELA, M. A.; BURROW, R. A.; QUINZANI, O. V. Therapeutic Properties , SOD and Catecholase Mimetic Activities of Novel Ternary Copper (II) Complexes of the Anti-Inflammatory Drug Fenoprofen with Imidazole and Caffeine. *Polyhedron* 2012, 34 (1), 74–83.
- (98) TABASSUM, S.; AMIR, S.; ARJMAND, F.; PETTINARI, C.; MARCHETTI, F.; MASCIOCCHI, N.; LUPIDI, G.; PETTINARI, R. European Journal of Medicinal Chemistry Mixed-Ligand Cu (II) e Vanillin Schiff Base Complexes ; Effect of Coligands on Their DNA Binding , DNA Cleavage , SOD Mimetic and Anticancer Activity. *Eur. J. Med. Chem.* 2013, 60, 216–232.

ANEXOS

Síntese da 5,10,15,20-tetra[4-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)fenil]-21*H*,23*H*-porfirina - H₂TMPP⁵⁴

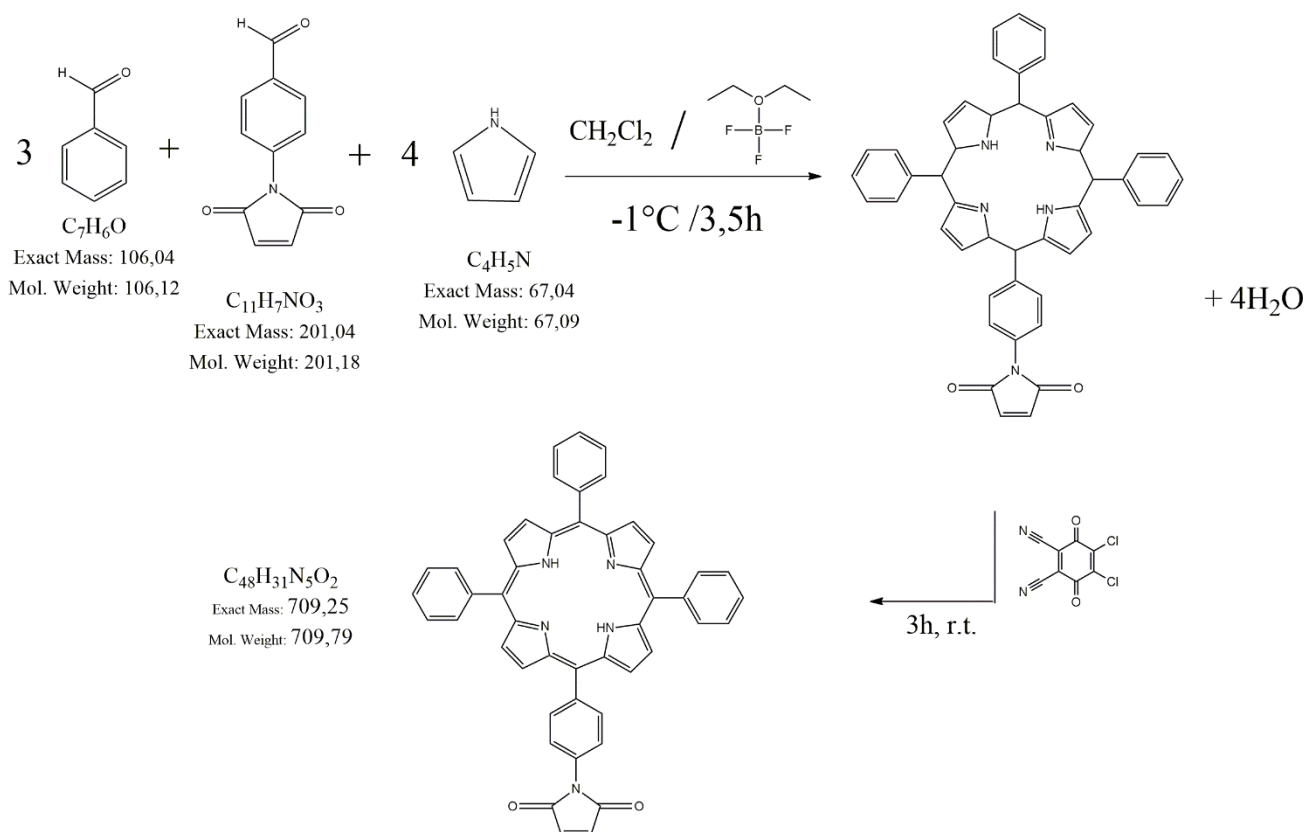


Em um balão de 100 mL com três bocas foi adicionado 50 mL de diclorometano 4-*N*-maleimidil-benzaldeído (99,98 mg, 0,50 mmol) e pirrol (34 μL , 0,50 mmol). Essa solução foi purgada com argônio e resfriada a -1°C durante 10 minutos. Após esse período, o meio reacional foi mantido sob atmosfera inerte e então adicionado eterato- BF_3 (20 μL , 0,154 mmol). Alíquotas foram retiradas da reação e acompanhadas por espectroscopia UV-visível e CCD, sendo a porfirina foi revelada com uma solução de DDQ (2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona) 10^{-2} mol L^{-1} , que é um agente oxidante capaz de oxidar porfirinogem em porfirina. A reação foi mantida por 4h e então foi percebida a baixa formação do produto, então foi adicionado um excesso de pirrol e de eterato- BF_3 nas mesmas proporções iniciais. A formação do porfirinogem foi

mantida por 22h e então foi adicionado DDQ (0,376 mmol, 85,1mg), esse meio reacional foi mantido sob agitação durante 6h a temperatura ambiente.

A purificação da reação foi realizada com extração líquido-líquido 10 x 50 mL de uma solução de NaHCO₃ 2% a frio, para remoção dos componentes quinona. Finalmente, o produto foi purificado por coluna flash com eluente tolueno:acetato de etila (6:4). Não foi possível calcular o rendimento.

Síntese da 5-[4-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)]-5,10,15,20-tetra-fenil-porfirina - H₂MMTPP⁵⁴



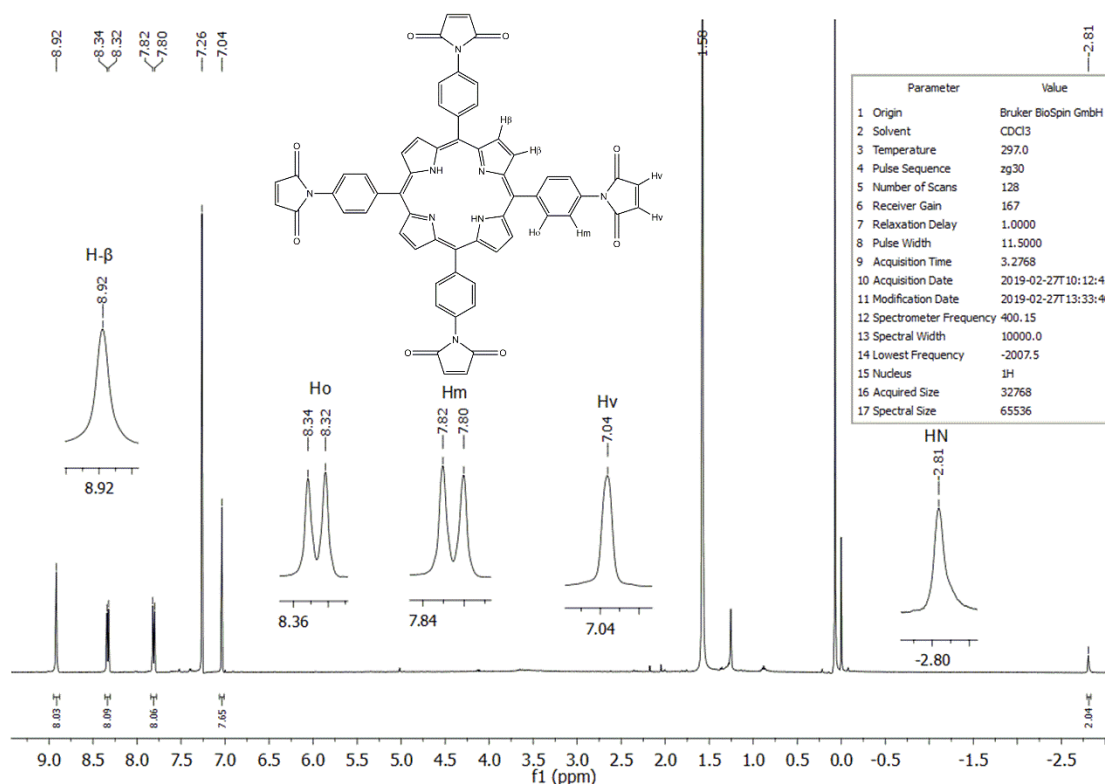
Em um balão de 250 mL com duas bocas foi adicionado 200 mL de diclorometano, 4-N-maleimidil-benzaldeído (100,04 mg, 0,50 mmol), benzaldeído (153,0 µL, 1,5 mmol) e pirrol (139,0 µL, 2,00 mmol). Essa solução foi purgada com argônio e resfriada a -1°C durante 10 minutos. Após esse período, o meio reacional foi mantido sob atmosfera inerte e então adicionado

eterato-BF₃ (70 μL, 0,539 mmol). Alíquotas foram retiradas da reação e acompanhadas por espectroscopia UV-visível e CCD, sendo a porfirina foi revelada com uma solução de DDQ (2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona). A reação foi mantida por 3,5h e então foi adicionado DDQ (1,50 mmol, 340,80 mg), esse meio reacional foi mantido sob agitação durante 3h a temperatura ambiente.

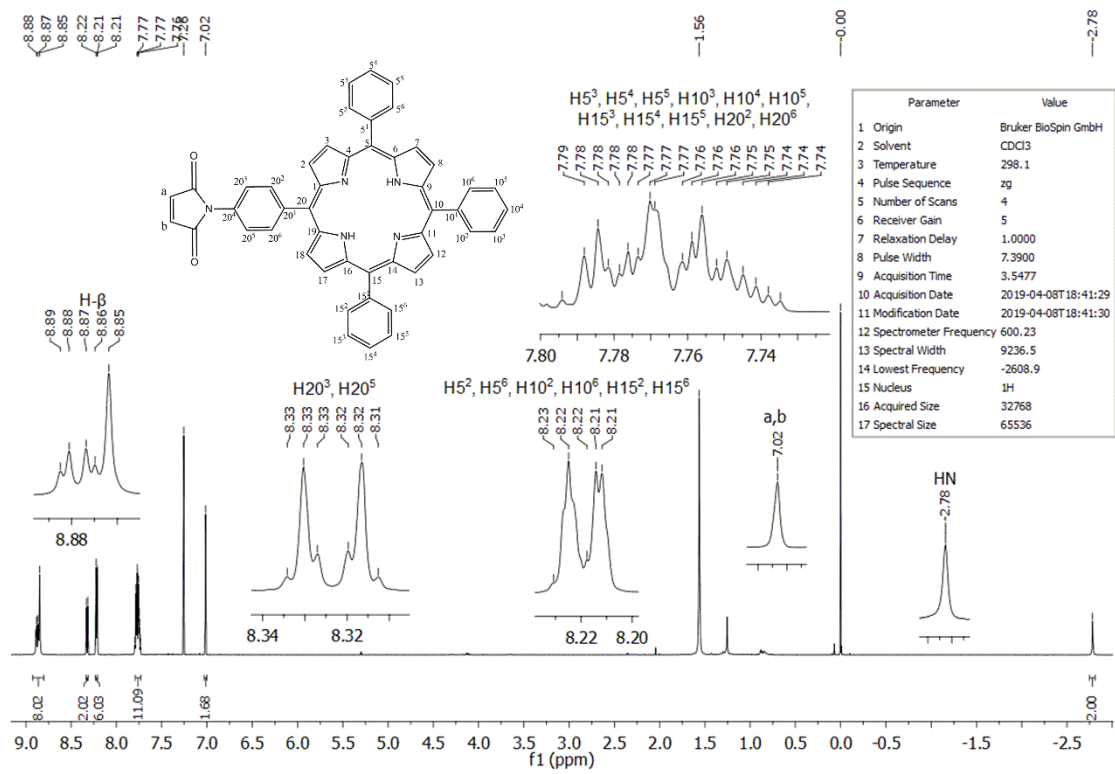
A purificação da reação foi realizada com extração líquido-líquido 10 x 50 mL de uma solução de NaHCO₃ 2% a frio, para remoção dos componentes quinona. Finalmente, o produto foi purificado por coluna flash com eluente tolueno:acetato de etila (9:1). Rendimento de 7,67%.

Espectros de RMN

Espectro de RMN ¹H de H₂TMPP em CDCl₃.



Espectro de RMN ¹H de H₂MTPP em CDCl₃.



Espectros

Espectros HRMS-ESI

Figura 6.1 - Espectro geral de H₂TTP obtidos por HRMS-ESI.

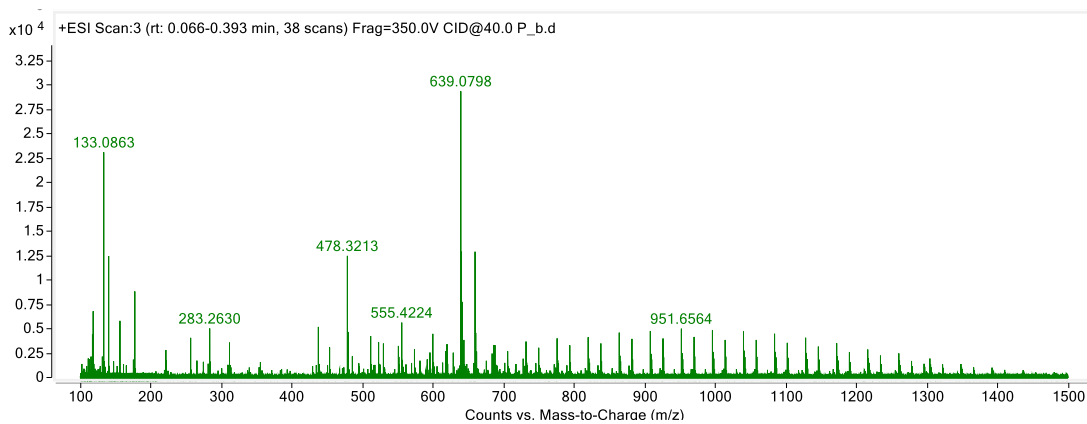


Figura 6.3 - Espectro geral de [Ni(TTP)] obtidos por HRMS-ESI.

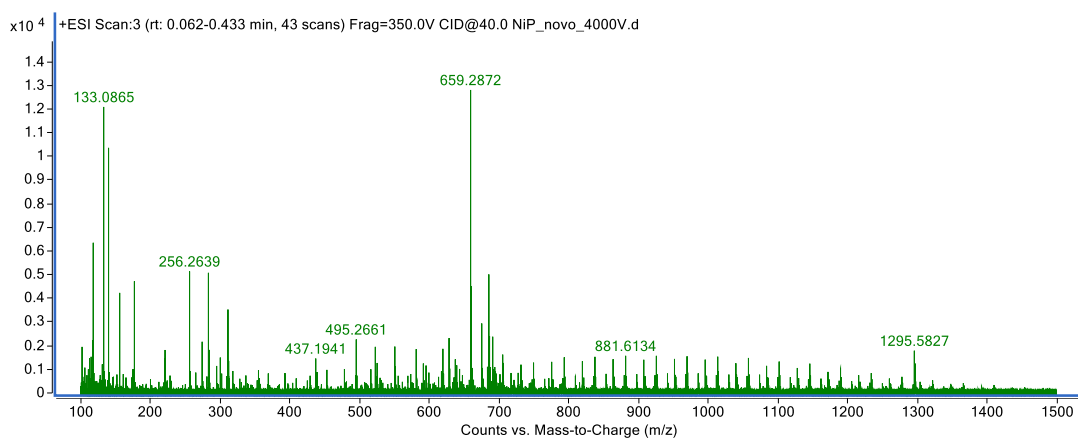


Figura 6.2 - Espectro geral de [Zn(TTP)] obtidos por HRMS-ESI.

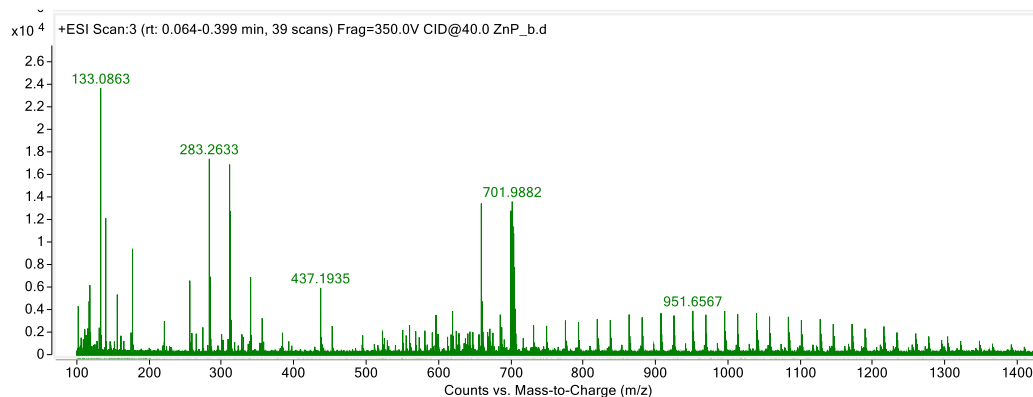


Figura 6.4 - Espectro geral de [Cu(TTP)] obtidos por HRMS-ESI.

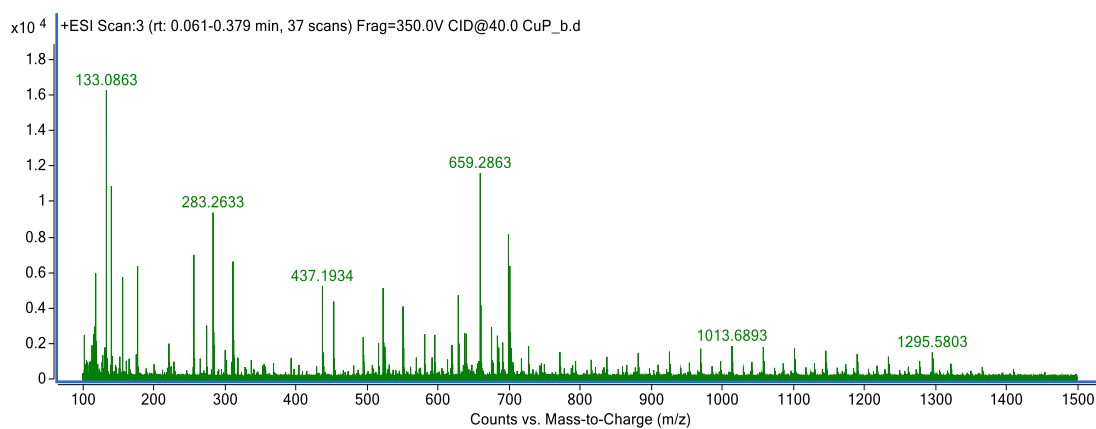


Figura 6.5 - Espectro geral de [Co(TTP)] obtidos por HRMS-ESI.

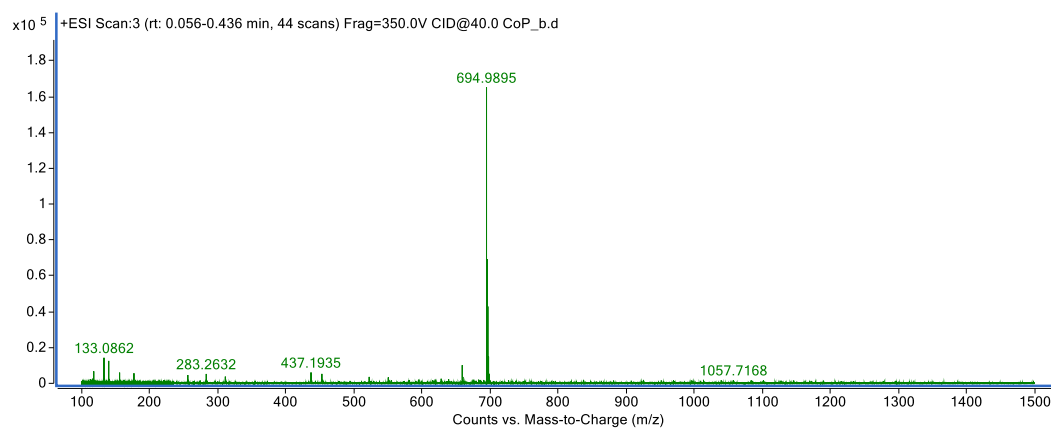


Figura 6.6 - Espectro do padrão isotópico de H₂TTP utilizando HRMS-ESI.

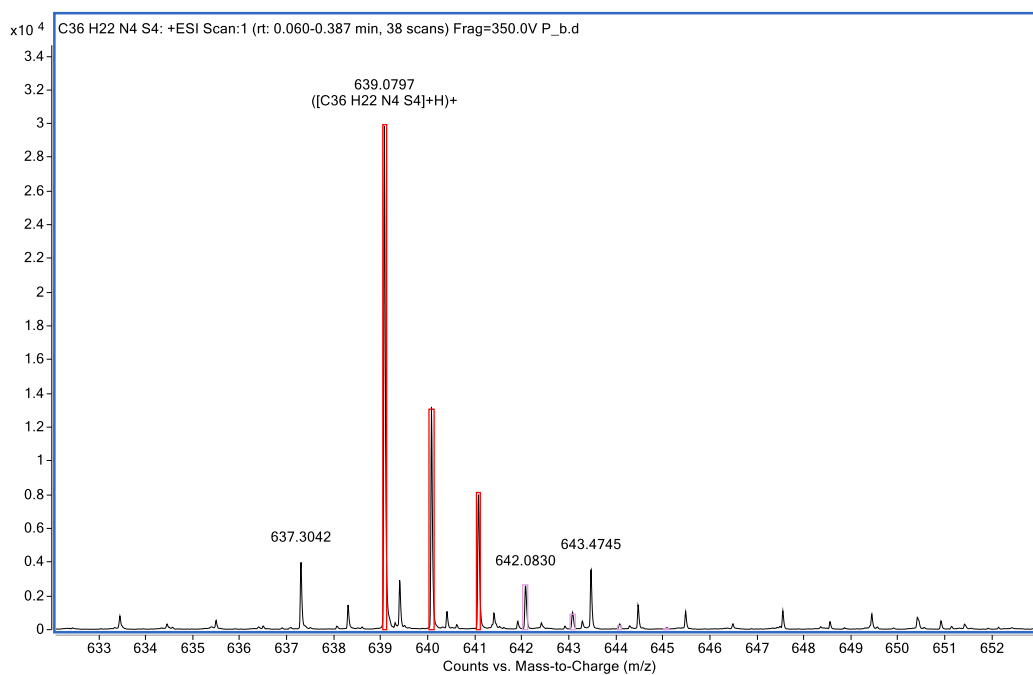


Figura 6.7 - Espectro do padrão isotópico de [Ni(TTP)] utilizando HRMS-ESI.

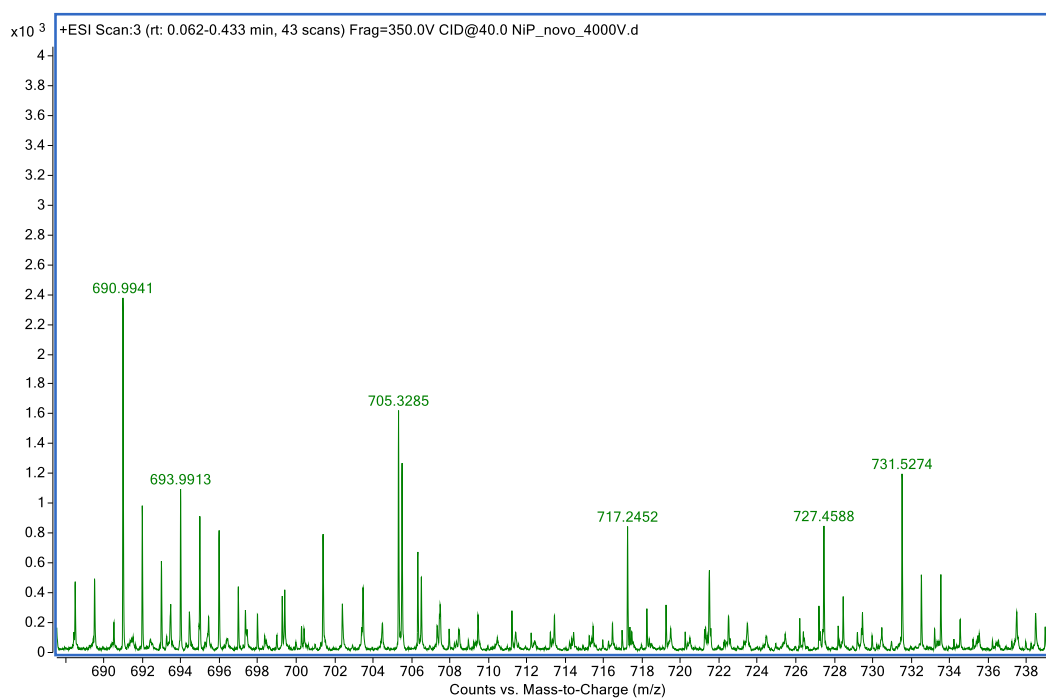


Figura 6.8 - Espectro do padrão isotópico de [Zn(TTP)] utilizando HRMS-ESI.

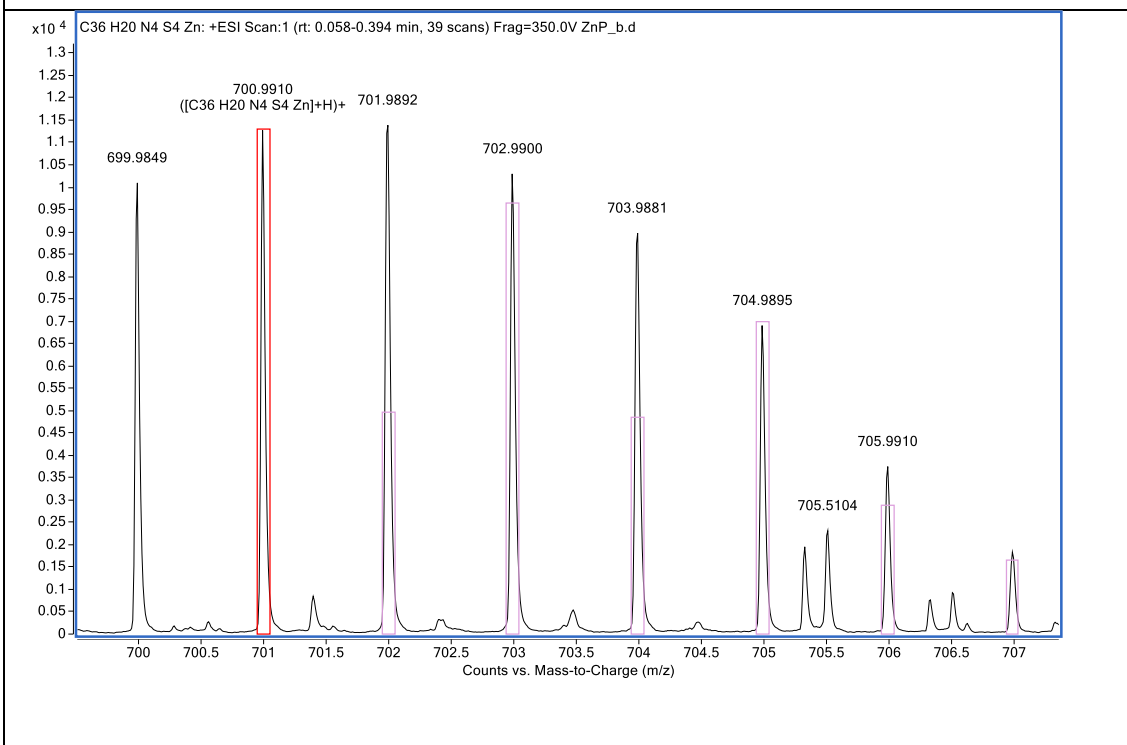


Figura 6.9 - Espectro do padrão isotópico de [Cu(TTP)] utilizando HRMS-ESI.

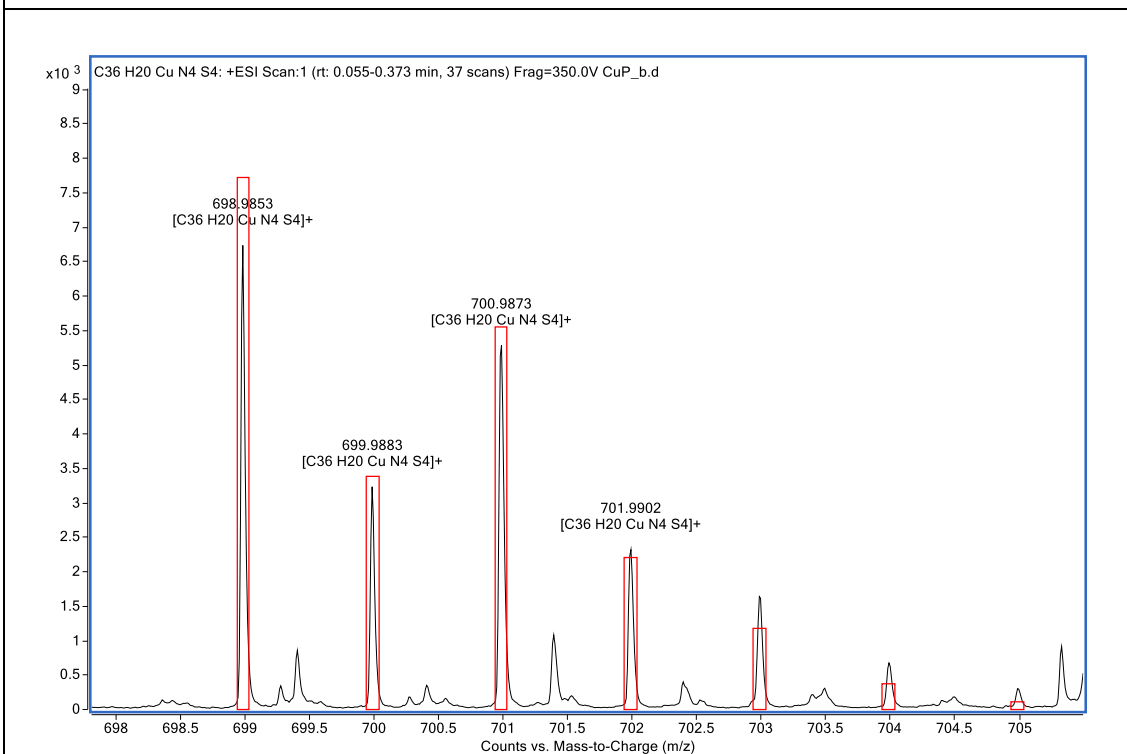
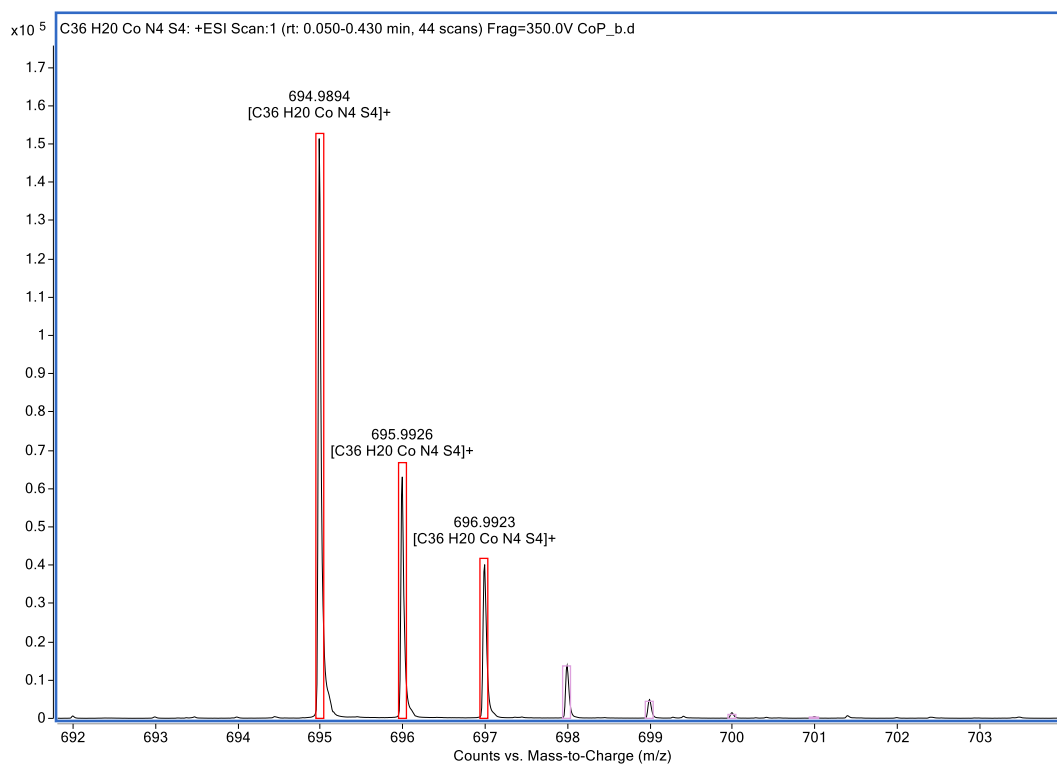


Figura 6.10 - Espectro do padrão isotópico de [Co(TTP)] utilizando HRMS-ESI.



Espectros na região do Infravermelho experimentais e teóricos

Figura 6.11 - Espectro na região do infravermelho de H₂TTP utilizando Csl.

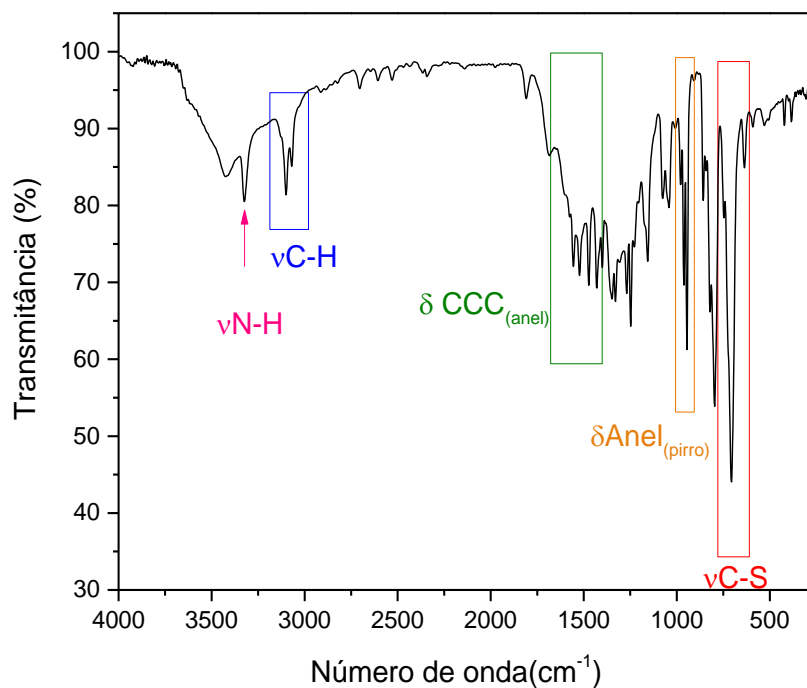


Figura 6.12 - Espectro na região do infravermelho de [Zn(TTP)] utilizando Csl como solvente.

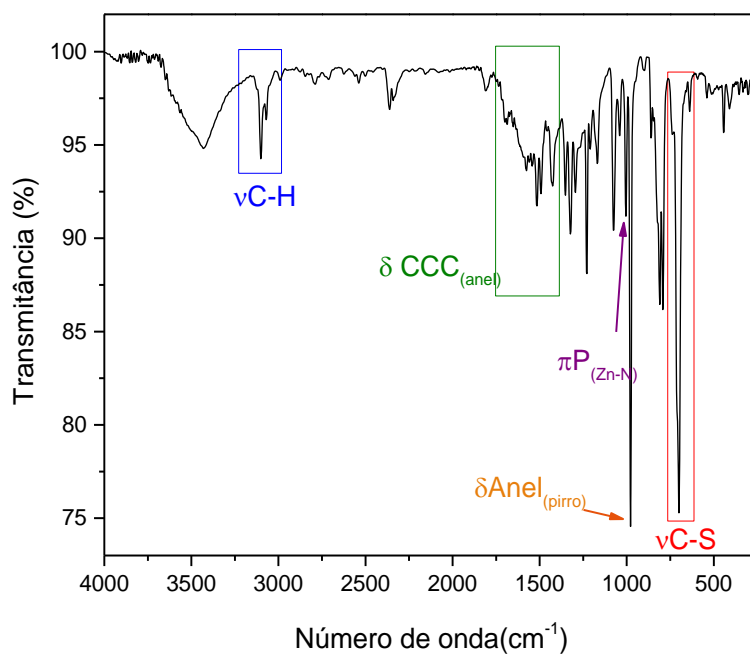


Figura 6.13 - Espectro na região do infravermelho de [Ni(TTP)] utilizando CsI como solvente.

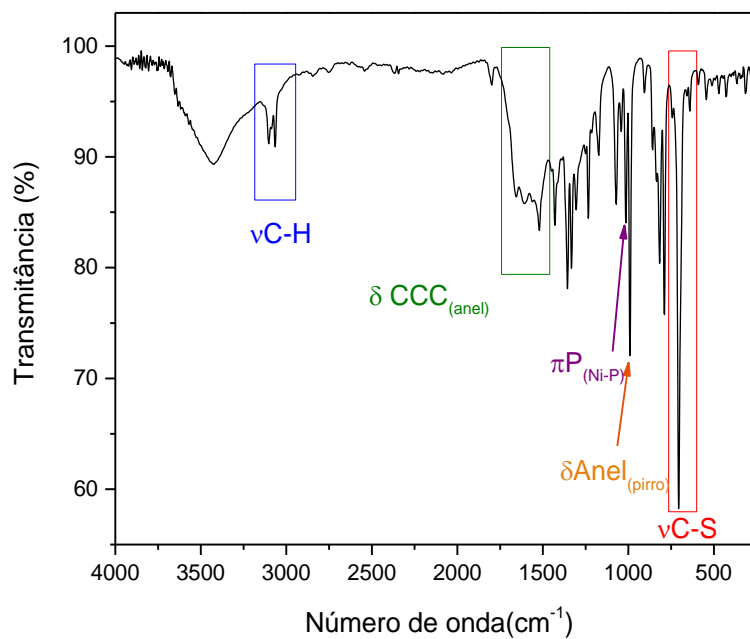


Figura 6.14 - Espectro na região do infravermelho de [Co(TTP)] utilizando CsI como solvente.

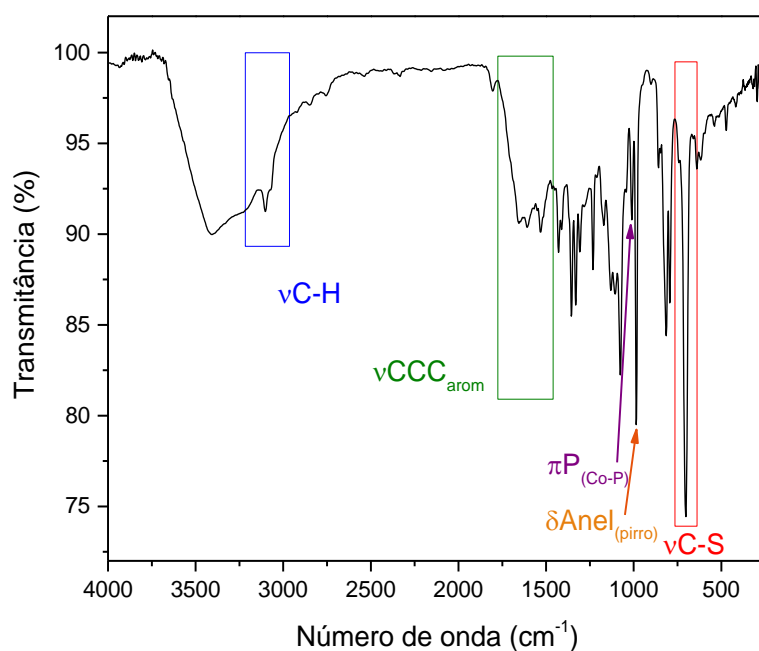


Figura 6.15 - Espectro na região do infravermelho de [Cu(TTP)] utilizando Csl como solvente.

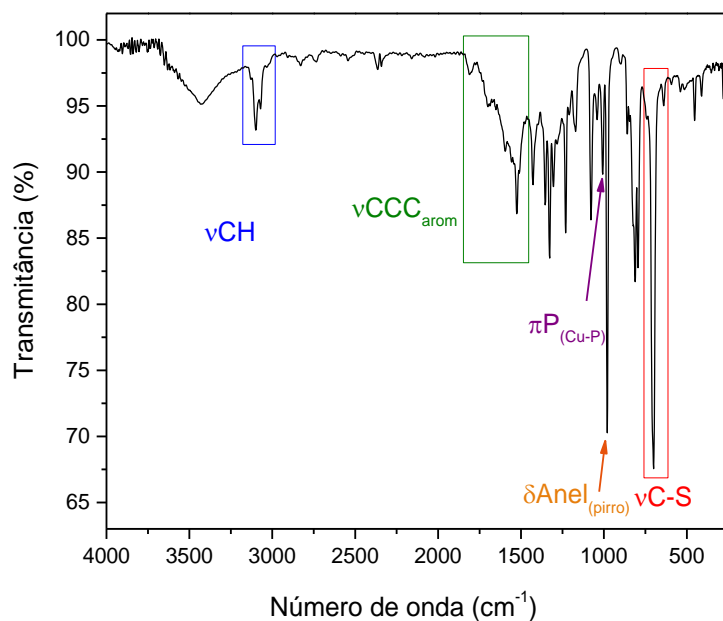
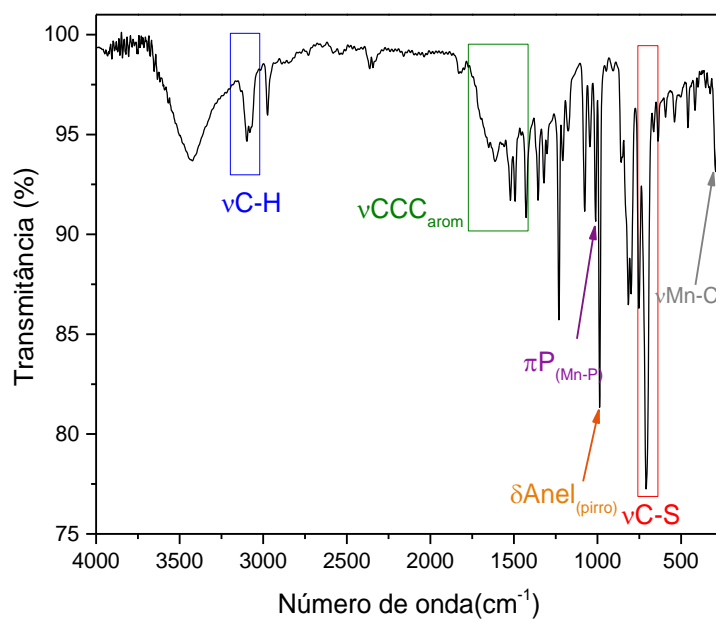


Figura 6.16 - Espectro na região do infravermelho de [Mn(TTP)Cl] utilizando Csl como solvente.



Interação com CT-DNA

Figura 6.17 - Espectros na região do UV-vis de [Co(TTP)] na presença de diferentes concentrações de ct-DNA e regressão linear para determinação de K_b .

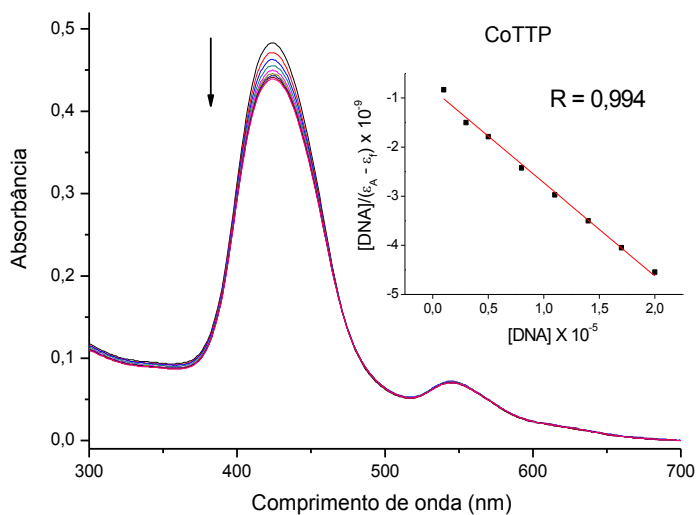


Figura 6.18 - Espectros na região do UV-vis de [Cu(TTP)] na presença de diferentes concentrações de ct-DNA e regressão linear para determinação de K_b .

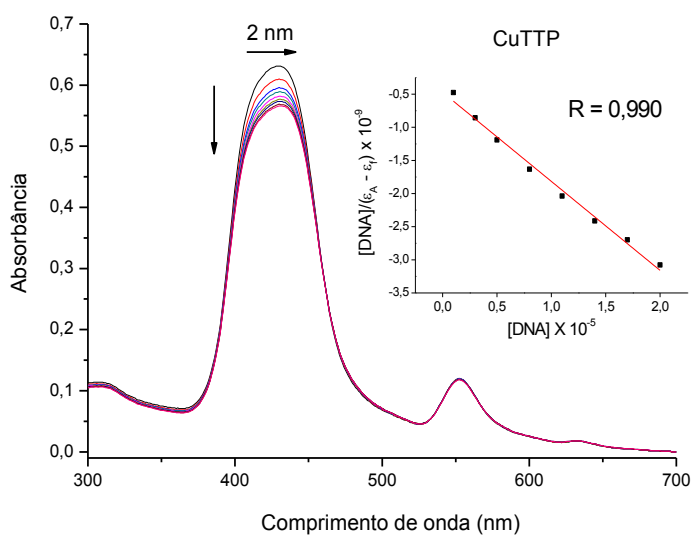


Figura 6.19 - Espectros na região do UV-vis de [Zn(TTP)] na presença de diferentes concentrações de ct-DNA e regressão linear para determinação de K_b .

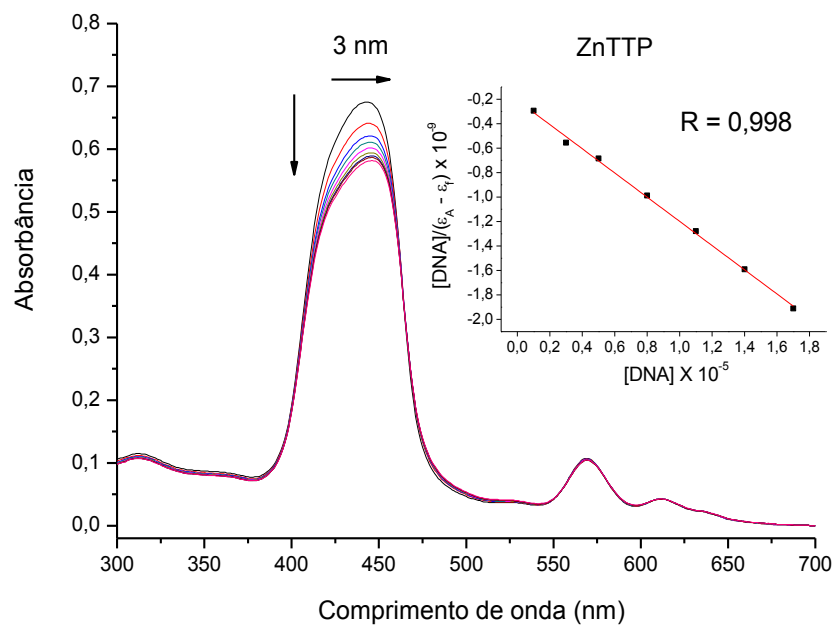


Figura 6.20 - Espectros na região do UV-vis de H_2TTP na presença de diferentes concentrações de ct-DNA e regressão linear para determinação de K_b .

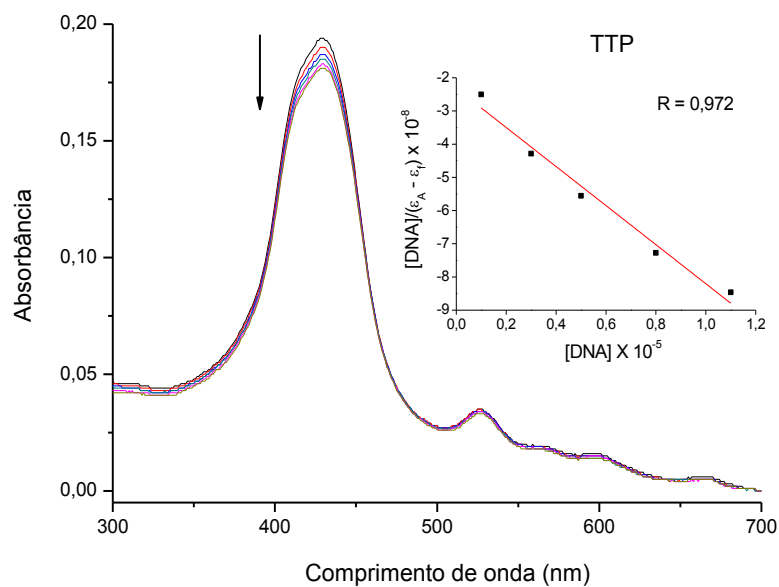


Figura 6.21 - Espectros na região do UV-vis de [Ni(TTP)] na presença de diferentes concentrações de ct-DNA e regressão linear para determinação de K_b .

