



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

## **DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**



**OTIMIZAÇÃO EXPERIMENTAL E ESTUDOS DA  
DISTORÇÃO NÃO-PLANAR DE N-  
PIRIDILPORFIRINAS PRECURSORAS DE  
MODULADORES REDOX DE ESTRESSE OXIDATIVO**

**ISABELLE NOGUEIRA PEIXOTO**

JOÃO PESSOA – PB –BRASIL  
MARÇO/2012



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

## **DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

# **OTIMIZAÇÃO EXPERIMENTAL E ESTUDOS DA DISTORÇÃO NÃO-PLANAR DE N- PIRIDILPORFIRINAS PRECURSORAS DE MODULADORES REDOX DE ESTRESSE OXIDATIVO**

**ISABELLE NOGUEIRA PEIXOTO\***

**Dissertação apresentada  
como requisito para  
obtenção do título de  
Mestre em Química pela  
Universidade Federal da  
Paraíba**

Orientador: Prof. Dr. Júlio Santos Rebouças

2º Orientador: Prof. Dr. Wallace Duarte Fragoso

\*Bolsista CNPq

JOÃO PESSOA – PB – BRASIL  
MARÇO/2012

*P379o Peixoto, Isabelle Nogueira.*

Otimização experimental e estudos da distorção não-planar de N-Piridilporfirinas precursoras de moduladores redox de estresse oxidativo / Isabelle Nogueira Peixoto. - - João Pessoa: [s.n.], 2012.

*125f. : il.*

*Orientador: Júlio Santos Rebouças e Wallace Duarte Fragoso.*

*Dissertação (Mestrado)-UFPB/CCEN.*

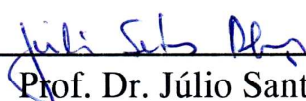
*1. Química. 2. Quimiometria. 3. Reguladores redox. 4. Porfirina. 5.DFT e distorção.*

*UFPB/BC*

*CDU: 54(043)*

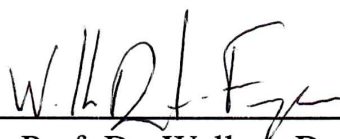
**Otimização Experimental e Estudos da Distorção Não-Planar de N-Piridilporfirinas Precursoras de Moduladores Redox de Estresse Oxidativo.**

Dissertação de Mestrado de Isabelle Nogueira Peixoto  
aprovada pela banca examinadora em 12 de março de 2012:



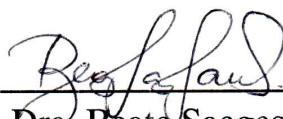
---

Prof. Dr. Júlio Santos Rebouças  
Orientador/Presidente



---

Prof. Dr. Wallace Duarte Fragoso  
2º. Orientador



---

Profa. Dra. Beate Saegesser Santos  
Examinadora



---

Profa. Dra. Karen Cacilda Weber  
Examinadora

À minha mãe Gorette, com amor.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a meus pais Marcos (in memoriam) e Gorette por todo amor, apoio, ensinamentos e oportunidades me dadas.

Ao meu irmão Marcos Jr. por me trazer calma nos momentos de desespero e pelas palavras de incentivo.

Ao Prof. Júlio Santos Rebouças, por ter aceitado o desafio de me orientar numa área totalmente nova para mim, pelos ensinamentos, dedicação e paciência.

À Profa. Cláudia Braga por ter me incentivado a “experimental” a química experimental.

Aos professores Wallace Fragoso, Silmar do Monte, Elizete Ventura e Otávio Santana pelas contribuições dadas a esta dissertação.

Agradeço aos professores Gargênnia da Fonseca, Ercules Teotônio, Juliana Alves, Jailton Ferrari, Silmar do Monte e Elizete Ventura pelo acesso a uma grande parte da infraestrutura que permitiu o desenvolvimento de meus estudos.

Agradeço também aos professores Karen Weber, Edvan Cirino e Rodrigo Cristiano pelos ensinamentos partilhados durante as disciplinas ministradas.

À Clarissa pela amizade, conhecimento experimental partilhado, pela companhia nos dias incansáveis de laboratório e por me apresentar a um dos melhores espetinhos da cidade, que foi palco de momentos preciosos e discussões profundas que foram enriquecidas pelos amigos Cláudia, Helivaldo, Ju Kelly e Danilo.

À Marília Gabriela e Juliana pelo amizade, carinho e pelas “Stelinhas” compartilhadas.

Aos meus amigos do grupo de Porfirinas Victor Hugo, Gabriela, Tâmara, Kathelynnne, Monte, Jonas, Ferreira, Rômulo, Rafael e Marthon.

Às minhas pequenas Mariana e Larissa por animarem meus dias mais difíceis.

À Márcia pela amizade, carinho e ensinamentos sobre as regras da ABNT.

À Raquel e Thaciana por estarem sempre ao meu lado.

À Flávia e Rafael por tornar o aprendizado de Inglês mais divertido e pelas risadas compartilhadas.

Aos amigos Márcia, Fernanda, Mirella, Michelle, Kaline, Francisco, Gessenildo, Railton, Juliana, Ítalo, Higo, Luci, Vanessa, Aline, Sidney, João Batista, Polianne, Jaqueline, Lucas, Francisco, Ana Flávia, Jandilson e Adriano que tive o prazer de conhecer e/ou reencontrar.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

## SUMÁRIO

|                                                               |            |
|---------------------------------------------------------------|------------|
| <b>A. RESUMO.....</b>                                         | <b>iv</b>  |
| <b>B. ABSTRACT.....</b>                                       | <b>v</b>   |
| <b>C. LISTA DE FIGURAS.....</b>                               | <b>vi</b>  |
| <b>D. LISTA DE TABELAS.....</b>                               | <b>xi</b>  |
| <b>E. LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....</b>                 | <b>xii</b> |
| <b>1 Introdução Geral .....</b>                               | <b>1</b>   |
| 1.1 Organização da Dissertação .....                          | 1          |
| 1.2 Porfirinas .....                                          | 2          |
| 1.2.1 Aplicações das Porfirinas.....                          | 6          |
| 1.2.1.1 Estresse Oxidativo.....                               | 7          |
| 1.2.1.2 Mn-porfirinas como Modelos Biomiméticos de SOD ..     | 9          |
| 1.2.1.3 H <sub>2</sub> T-3-PYP .....                          | 13         |
| 1.3 Quimiometria.....                                         | 13         |
| 1.3.1 Planejamento Fatorial.....                              | 13         |
| 1.3.2 Superfície de Resposta .....                            | 15         |
| 1.3.3 Análise de Regressão .....                              | 15         |
| 1.3.4 Análise de Componentes Principais .....                 | 16         |
| 1.4 Métodos Computacionais.....                               | 17         |
| 1.4.1 Teoria do Funcional da Densidade .....                  | 18         |
| 1.4.1.1 Teorema de Hohenberg-Kohn .....                       | 19         |
| 1.4.1.2 Equações de Kohn-Sham.....                            | 20         |
| 1.5 Objetivos Gerais.....                                     | 21         |
| 1.6 Referências Bibliográficas .....                          | 23         |
| <b>2 Otimização da Síntese de 3-N-piridilporfirinas .....</b> | <b>29</b>  |
| 2.1 Introdução .....                                          | 29         |
| 2.1.1 Métodos Clássicos da Síntese de Porfirinas.....         | 31         |
| 2.2 Objetivos .....                                           | 33         |
| 2.3 Metodologia Experimental .....                            | 34         |
| 2.3.1 Equipamentos .....                                      | 34         |

|          |                                                                                                                                     |           |
|----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 2.3.2    | Reagentes .....                                                                                                                     | 35        |
| 2.3.3    | Síntese da H <sub>2</sub> T-3-PyP .....                                                                                             | 35        |
| 2.3.4    | Análise UV-vis e Rendimento .....                                                                                                   | 36        |
| 2.3.4.1  | Preparação de Padrões .....                                                                                                         | 36        |
| 2.3.4.2  | Análise de Rendimento .....                                                                                                         | 37        |
| 2.3.5    | Acompanhamento da Reação por CCD .....                                                                                              | 37        |
| 2.3.6    | Planejamento e Análise dos Experimentos .....                                                                                       | 37        |
| 2.4      | Resultados e discussão .....                                                                                                        | 38        |
| 2.4.1    | Rota de Síntese .....                                                                                                               | 38        |
| 2.4.2    | Rendimentos das Reações .....                                                                                                       | 38        |
| 2.4.3    | Planejamentos Fatoriais .....                                                                                                       | 40        |
| 2.4.3.1  | 1º Planejamento Fatorial 2 <sup>2</sup> .....                                                                                       | 41        |
| 2.4.3.2  | 2º Planejamento Fatorial 2 <sup>2</sup> .....                                                                                       | 45        |
| 2.4.3.3  | 3º Planejamento Fatorial 2 <sup>2</sup> .....                                                                                       | 49        |
| 2.4.3.4  | 1º Planejamento Fatorial Fracionário 2 <sup>7-3</sup> .....                                                                         | 52        |
| 2.4.3.5  | 2º Planejamento Fatorial Fracionário 2 <sup>7-3</sup> .....                                                                         | 56        |
| 2.5      | Conclusões .....                                                                                                                    | 58        |
| 2.6      | Referências Bibliográficas .....                                                                                                    | 60        |
| <b>3</b> | <b>Estudo Computacional da Influência do Rearranjo de Cadeias Laterais Oxigenadas na Síntese de N-alquilpiridilporfirinas .....</b> | <b>63</b> |
| 3.1      | Introdução .....                                                                                                                    | 63        |
| 3.2      | Objetivos .....                                                                                                                     | 70        |
| 3.3      | Metodologia Computacional .....                                                                                                     | 71        |
| 3.4      | Resultados e Discussão .....                                                                                                        | 72        |
| 3.4.1    | Sistemas MeOC <sub>2</sub> OTs <i>versus</i> BuOC <sub>2</sub> OTs .....                                                            | 83        |
| 3.5      | Conclusões .....                                                                                                                    | 89        |
| 3.6      | Referências bibliográficas .....                                                                                                    | 90        |
| <b>4</b> | <b>Estudo Computacional da Distorção do Anel Porfirínico e da Rotação Aril-porfirina em Porfirinas meso-substituídas .....</b>      | <b>94</b> |
| 4.1      | Introdução .....                                                                                                                    | 94        |

|          |                                                     |            |
|----------|-----------------------------------------------------|------------|
| 4.1.1    | Classificação da Distorção e Método de Análise..... | 97         |
| 4.2      | Objetivos .....                                     | 99         |
| 4.3      | Metodologia computacional.....                      | 99         |
| 4.3.1    | Otimização das Estruturas .....                     | 99         |
| 4.3.2    | Análise das Deformações Estruturais.....            | 101        |
| 4.3.3    | PCA.....                                            | 101        |
| 4.4      | Resultados e Discussão .....                        | 101        |
| 4.5      | Conclusões .....                                    | 112        |
| 4.6      | Referências Bibliográficas .....                    | 114        |
| <b>5</b> | <b>Considerações Finais e Perspectivas.....</b>     | <b>117</b> |

## A. RESUMO

As *N*-piridilporfirinas e seus derivados pertencem a uma classe de *meso*-porfirinas de interesse químico e biológico que podem ser empregadas em diversos campos da ciência. Neste estudo, a síntese da 3-*N*-piridilporfirina foi otimizada empregando técnicas quimiométricas como planejamento fatorial fracionário e superfície de resposta. Sete fatores foram investigados simultaneamente e rendimentos de 24% foram alcançados. Investigou-se, por cálculos computacionais em nível DFT, a influência da escolha das cadeias laterais oxigenadas para o sucesso da síntese de *N*-metoxialquilpiridilporfirinas como uma estratégia de modular a atividade SOD, lipofilicidade e toxicidade dos complexos de Mn(III) resultantes. A formação de compostos metilados em detrimento aos metoxialquilados desejados depende do tamanho da cadeia carbônica do grupo alquila. A reação de metilação é resultado de uma ciclização intramolecular do tosilato de metoxialquila de partida, cujo mecanismo de rearranjo foi investigado computacionalmente. Os resultados teóricos estão em consonância com os dados experimentais e auxiliaram no desenvolvimento de uma Mn-porfirina com propriedades químicas e biológicas excepcionais. Investigou-se também o efeito de substituintes periféricos na deformação do anel porfirínico em *meso*-arilporfirinas e na energia de rotação do grupo arila. Foi possível observar que para todas as porfirinas investigadas, a deformação fora do plano do tipo "ruffle" (franzida,  $B_{1u}$ ) é a que mais contribui para a distorção não-planar dos estados de transição associados à rotação aril-porfirina. Adicionalmente, tanto o padrão de substituição quanto o caráter eletrônico do grupo arila influenciam sobremaneira essa barreira rotacional, impactando, possivelmente, as propriedades eletrônicas e na reatividade desses sistemas.

## B. ABSTRACT

*N*-pyridylporphyrins and their derivatives are *meso*-arylporphyrins of chemical and biological interest that have been widely employed in various fields of science. In this work, experimental conditions for the optimum synthesis of 3-*N*-pyridylporphyrins were investigated using chemometric tools, such as fractional factorial design and response surface methods. Seven factors were simultaneously optimized and a 24% yield has been achieved. The influence of oxygenated side-chain selection on the success of *N*-methoxyalkylpyridylporphyrin synthesis as a strategy for modulating SOD activity, lipophilicity, and toxicity of the resulting Mn (III) complexes was investigated by DFT level of computational calculation. The formation of methyl-containing compounds over the methoxyalkyl derivatives of interest was found to depend on the number of carbon atoms between the oxygen and the *N*-pyridyl moiety. The methylation reaction results from an intramolecular cyclization of the initial methoxyalkyl tosylate *via* rearrangement mechanisms that were investigated computationally. The theoretical results agree with the experimental data and assisted in the design of an Mn-porphyrin with exceptional chemical and biological properties. The effects of peripheral substituents on the porphyrin ring deformation and the energy barrier associated with the aryl group rotational in *meso*-arylporphyrins were also investigated. Studies on a total of 20 systems revealed that the *ruffle* ( $B_{1u}$ ) out-of-plane deformation mode contributes the most to the non-planar distortion of the transition state associated with the aryl-porphyrin rotation. Additionally, both the substitution pattern and the electronic character of the aryl group influence significantly the rotational barriers, which is likely to impact the electronic properties and the reactivity of these systems.

## C. LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                                                                                                 |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1.1 - Estrutura da porfina, núcleo característico das porfirinas. A numeração indicada segue as recomendações da União Internacional de Química Pura e Aplicada ("International Union of Pure and Applied Chemistry", IUPAC). ....                                       | 3  |
| Figura 1.2 – Estruturas das porfirinas de (a) primeira ( $H_2T-2-PyP$ ), (b) segunda ( $H_2TM-2-PyP$ ) e (c) terceira geração ( $H_2Br_8T-2-PyP$ ). ..                                                                                                                          | 4  |
| Figura 1.3 - Representação esquemática (a) do impedimento estéreo entre os grupos <i>orto</i> e os hidrogênio/substituintes $\beta$ -pirrólicos das <i>meso</i> -arilporfirinas, que levam a formação de (b) atropoisômeros. ....                                               | 5  |
| Figura 1.4 - Espectro eletrônico de absorção genérico de (a) porfirina base-livre e (b) metaloporfirina. ....                                                                                                                                                                   | 6  |
| Figura 1.5 – Dismutação do superóxido pela SOD.....                                                                                                                                                                                                                             | 8  |
| Figura 1.6 – Estrutura cristalográfica em baixa resolução da MnSOD humana. Código PDB: 1MSD, retirado de <a href="http://www.pdb.org">http://www.pdb.org</a> (WAGNER et al., 1993). As esferas cinza representam os íons Mn do centro ativo. ....                               | 9  |
| Figura 1.7 - Estrutura de alguns compostos mímicos de SOD.....                                                                                                                                                                                                                  | 10 |
| Figura 1.8 – Esquema da evolução dos estudos de Mn-porfirinas em microorganismos eucariontes, procariontes e modelos animais. Adaptado de Batinić-Harbele et al. (2011). ....                                                                                                   | 11 |
| Figura 1.9 - Modulação dos potenciais de redução $Mn^{III}/Mn^{II}$ de algumas Mn-porfirinas. Os potenciais de redução das enzimas SOD e das espécies envolvidas nas semi-reações de dismutação do superóxido são também apresentados. Adaptado de Rebouças et al. (2008c)..... | 12 |
| Figura 2.1 - Isômeros das <i>N</i> -piridilporfirinas. ....                                                                                                                                                                                                                     | 30 |

|                                                                                                                                                                                                               |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 2.2 - Condensação de pirrol e benzaldeído resultando em <i>meso</i> -tetrafenilporfirina (H <sub>2</sub> TPP) e a correspondente <i>meso</i> -tetrafenilclorina (H <sub>2</sub> TPC).....              | 31 |
| Figura 2.3 - Esquema proposto por Lindsey para a síntese de porfirinas <i>meso</i> -substituídas em duas etapas em um único sistema reacional (LINDSEY; WAGNER, 1989). ....                                   | 33 |
| Figura 2.4 - Esquema simplificado da obtenção da H <sub>2</sub> T-3-PyP. ....                                                                                                                                 | 34 |
| Figura 2.5 - Espectro eletrônico de absorção na região do UV-vis da alíquota de um ensaio da síntese da H <sub>2</sub> T-3-PyP e da amostra autêntica (padrão). Espectros registrados em HCl (1,0 mol/L)..... | 39 |
| Figura 2.6 - Comportamento ácido-base da H <sub>2</sub> T-3-PyP. ....                                                                                                                                         | 40 |
| Figura 2.7 - Diagrama do 1º planejamento fatorial 2 <sup>2</sup> com os rendimentos e contrastes. ....                                                                                                        | 42 |
| Figura 2.8 - Gráfico Normal dos Efeitos do 1º Planejamento Fatorial 2 <sup>2</sup> para a síntese da H <sub>2</sub> T-3-PyP. ....                                                                             | 44 |
| Figura 2.9 - Superfície de resposta do 1º Planejamento Fatorial 2 <sup>2</sup> . ....                                                                                                                         | 44 |
| Figura 2.10 – Diagrama do 1º e do 2º planejamentos. ....                                                                                                                                                      | 45 |
| Figura 2.11 - Diagrama do 2º planejamento fatorial 2 <sup>2</sup> com os rendimentos e contrastes. ....                                                                                                       | 46 |
| Figura 2.12 - Gráfico Normal dos Efeitos do 2º Planejamento Fatorial 2 <sup>2</sup> para a síntese da H <sub>2</sub> T-3-PyP. ....                                                                            | 47 |
| Figura 2.13 - Superfície de resposta do 2º Planejamento Fatorial 2 <sup>2</sup> . ....                                                                                                                        | 48 |
| Figura 2.14 – Diagrama com o 1º, 2º e 3º planejamento.....                                                                                                                                                    | 49 |
| Figura 2.15 - Diagrama do 3º planejamento fatorial 2 <sup>2</sup> com os rendimentos e contrastes. ....                                                                                                       | 50 |
| Figura 2.16 - Gráfico Normal dos Efeitos do 3º Planejamento Fatorial 2 <sup>2</sup> para a síntese da H <sub>2</sub> T-3-PyP. ....                                                                            | 51 |
| Figura 2.17 - Superfície de resposta do 3º Planejamento Fatorial 2 <sup>2</sup> . ....                                                                                                                        | 52 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 2.18 - Gráfico normal dos efeitos para o 1º planejamento fatorial fracionário $2^{7-3}$ . .....                                                                                                                                                                         | 55 |
| Figura 2.19 - Gráfico normal dos efeitos para o 2º planejamento fatorial fracionário $2^{7-3}$ . .....                                                                                                                                                                         | 57 |
| Figura 3.1 - Estrutura da MnTE-2-PyP <sup>5+</sup> e da MnTnHex-2-PyP <sup>5+</sup> . ..                                                                                                                                                                                       | 64 |
| Figura 3.2 - Estruturas da MnTPEG-2-PyP <sup>5+</sup> e MnTMOC <sub>2</sub> -2-PyP <sup>5+</sup> . ..                                                                                                                                                                          | 65 |
| Figura 3.3 - Tosilatos de metoxialquila e butoxietila investigados nesta dissertação. ....                                                                                                                                                                                     | 66 |
| Figura 3.4 - Derivatização de <i>N</i> -piridilporfirina com MeOC <sub>n</sub> OTs em DMF. ....                                                                                                                                                                                | 66 |
| Figura 3.5 - Gráfico da distribuição de espécies contendo os grupos MeOC <sub>n</sub> e metilas nas Mn-porfirinas resultantes dos sistemas H <sub>2</sub> T-X-PyP/MeOC <sub>n</sub> OTs (onde X = 2, 3, 4; n = 2, 4, 5, 6) (Rebouças et al., 2011, dados não publicados). .... | 68 |
| Figura 3.6 - Gráfico da metilação total vs metoxialquilação (Rebouças et al., 2011, dados não publicados). ....                                                                                                                                                                | 69 |
| Figura 3.7 - Derivatização da <i>N</i> -piridilporfirina com tosilato de metoxialquila em DMF deuterada. ....                                                                                                                                                                  | 70 |
| Figura 3.8 - Rotas de reação propostas para a ciclização intramolecular do MeOC <sub>4</sub> OTs, usando o grupo piridil como modelo das H <sub>2</sub> TPyP. ....                                                                                                             | 72 |
| Figura 3.9 - Coordenada de reação da ciclização intramolecular do MeOC <sub>n</sub> OTs (a) via rota A e (b) via rota B. ....                                                                                                                                                  | 74 |
| Figura 3.10 - Gráfico da coordenada de reação <i>versus</i> energia relativa (kJ/mol) para sistema MeOC <sub>2</sub> OTs/Py na ausência (azul) e presença (vermelho) de solvente (a) via rota A e (b) via rota B, calculadas com o método DFT/B3LYP/6-31G*. ....               | 76 |
| Figura 3.11 - Gráfico da coordenada de reação <i>versus</i> energia relativa (kJ/mol) para o sistema MeOC <sub>4</sub> OTs/Py na ausência (azul) e presença (vermelho) de solvente (a) via rota A e (b) via rota B, calculadas com o método DFT/B3LYP/6-31G*. ....             | 77 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                    |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 3.12 - Gráfico da coordenada de reação <i>versus</i> energia relativa (kJ/mol) para o sistema MeOC <sub>5</sub> OTs/Py na ausência (azul) e presença (vermelho) de solvente (a) via rota A e (b) via rota B, calculadas com o método DFT/B3LYP/6-31G*. .... | 78 |
| Figura 3.13 - Gráfico da coordenada de reação <i>versus</i> energia relativa (kJ/mol) para o sistema MeOC <sub>6</sub> OTs/Py na ausência (azul) e presença (vermelho) de solvente (a) via rota A e (b) via rota B, calculadas com o método DFT/B3LYP/6-31G*. .... | 79 |
| Figura 3.14 - Gráfico das energias relativas (kJ/mol) dos sistemas MeOC <sub>n</sub> OTs/Py investigados em fase gasosa (a) via rota A e (b) via rota B. ....                                                                                                      | 81 |
| Figura 3.15 - Gráfico das energias relativas (kJ/mol) dos sistemas MeOC <sub>n</sub> OTs/Py investigados em DMF (a) via rota A e (b) via rota B (Notar mudança de escala com relação a Figura 3.14). ....                                                          | 82 |
| Figura 3.16 - Estrutura da MnTnBuOC <sub>2</sub> -2-PyP <sup>5+</sup> .....                                                                                                                                                                                        | 84 |
| Figura 3.17 - Coordenada de reação <i>versus</i> energia relativa via rota A para os sistemas (a) MeOC <sub>2</sub> OTs/Py e (a) BuOC <sub>2</sub> OTs/Py na ausência (azul ) e presença (vermelho) de solvente, calculadas com o método DFT/B3LYP/6-31G*. ....    | 85 |
| Figura 3.18 - Coordenada de reação <i>versus</i> energia relativa via rota B para os sistemas (a) MeOC <sub>2</sub> OTs/Py e (a) BuOC <sub>2</sub> OTs/Py na ausência (azul ) e presença (vermelho) de solvente, calculadas com o método DFT/B3LYP/6-31G*. ....    | 86 |
| Figura 3.19 - Gráfico das energias relativas (kJ/mol) do MeOC <sub>2</sub> e BuOC <sub>2</sub> investigados em fase gasosa (a) via rota A e (b) via rota B. ....                                                                                                   | 87 |
| Figura 3.20 - Gráfico das energias relativas (kJ/mol) do MeOC <sub>2</sub> e BuOC <sub>2</sub> investigados em DMF (a) via rota A e (b) via rota B (Notar mudança de escala com relação a Figura 3.19). ....                                                       | 88 |
| Figura 4.1 - Conformação do grupo <i>heme</i> em estruturas cristalinas da (a) desoxi-hemoglobina e do (b) citocromo <i>c</i> , respectivamente. A                                                                                                                 |    |

|                                                                                                                                                                                                      |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| parte protéica foi removida para enfatizar melhor as distorções do<br>anel porfirínico nestes sistemas. Retirado de SHELNUTT et al.<br>(1998). .....                                                 | 95  |
| Figura 4.2 - Mecanismo de rotação aril-porfirina, com vista superior<br>e lateral do anel porfirínico. ....                                                                                          | 97  |
| Figura 4.3 - Conformações típicas das Doop. ....                                                                                                                                                     | 98  |
| Figura 4.4 - Padrão de substituição das porfirinas investigadas com<br>os grupos arilas investigados. ....                                                                                           | 100 |
| Figura 4.5 – Gráfico das distorções no plano (Dip) e fora do plano<br>(Doop) do anel porfirínico para todos os sistemas investigados. .                                                              | 103 |
| Figura 4.6 – Distribuição das conformações típicas da Doop para (a)<br>3-metilfenil e (b) 4-metilfenilporfirinas. ....                                                                               | 104 |
| Figura 4.7 - Distribuição das conformações típicas da Doop para (a)<br><i>N</i> -metilpiridínio-3-il e (b) <i>N</i> -metilpiridínio-4-il porfirinas. ....                                            | 105 |
| Figura 4.8 - Gráfico da barreira de energia (kcal/mol) dos sistemas<br>investigados. ....                                                                                                            | 107 |
| Figura 4.9 – Gráfico de (a) escores e (b) pesos da componente<br>principal das porfirinas substituídas em função do padrão de<br>substituição e da barreira de energia. ....                         | 108 |
| Figura 4.10 - Gráficos das deformações do tipo (a) "saddle" (sela,<br>$B_{2u}$ ), (b) "propeller" (ventoinha, $A_{1u}$ ) e (c) "dome" (domo, $A_{2u}$ ) para<br>todos os sistemas investigados. .... | 110 |
| Figura 4.11 – Representação esquemática do comportamento do<br>padrão de substituição. ....                                                                                                          | 112 |

## D. LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                                                         |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1 - Rendimentos do 1º Planejamento Fatorial $2^2$ da síntese da H <sub>2</sub> T-3-PyP. ....                                                     | 42 |
| Tabela 2 - Efeitos principais e da interação dos fatores A e B para o 1º Planejamento Fatorial $2^2$ para a síntese da H <sub>2</sub> T-3-PyP. ....     | 43 |
| Tabela 3 - Rendimentos do 2º Planejamento Fatorial $2^2$ da síntese da H <sub>2</sub> T-3-PyP. ....                                                     | 45 |
| Tabela 4 - Efeitos principais e da interação dos fatores A e B para o 2º Planejamento Fatorial $2^2$ para a síntese da H <sub>2</sub> T-3-PyP. ....     | 47 |
| Tabela 5 - Rendimentos do 3º Planejamento Fatorial $2^2$ da síntese da H <sub>2</sub> T-3-PyP. ....                                                     | 49 |
| Tabela 6 - Efeitos principais e da interação dos fatores A e B para o 3º Planejamento Fatorial $2^2$ para a síntese da H <sub>2</sub> T-3-PyP. ....     | 50 |
| Tabela 7 - Planejamento fatorial fracionário $2^{7-3}$ . ....                                                                                           | 53 |
| Tabela 8 - Estrutura de confundimento do planejamento fatorial fracionário $2^{7-3}$ . ....                                                             | 53 |
| Tabela 9 - Rendimentos do 1º Planejamento Fatorial Fracionário $2^{7-3}$ da síntese da H <sub>2</sub> T-3-PyP. ....                                     | 54 |
| Tabela 10 - Efeitos principais e da interação entre os fatores para o 1º Planejamento Fatorial $2^{7-3}$ para a síntese da H <sub>2</sub> T-3-PyP. .... | 54 |
| Tabela 11 - Rendimentos do 2º Planejamento Fatorial Fracionário $2^{7-3}$ da síntese da H <sub>2</sub> T-3-PyP. ....                                    | 56 |
| Tabela 12 - Efeitos principais e da interação entre os fatores para o 2º Planejamento Fatorial $2^{7-3}$ para a síntese da H <sub>2</sub> T-3-PyP. .... | 57 |

## E. LISTA DE ABREVIações E SIGLA

|                                        |                                                                            |
|----------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|
| BuOC <sub>2</sub> OTs                  | Tosilato de butoxietila                                                    |
| DFT                                    | Teoria do Funcional da Densidade                                           |
| Dip                                    | Distorção no plano                                                         |
| dom                                    | Deformação na forma "dome" (domo)                                          |
| Doop                                   | Distorção fora do plano                                                    |
| ERO                                    | Espécies reativas de oxigênio                                              |
| ERN                                    | Espécies reativas de nitrogênio                                            |
| GGA                                    | Do inglês, Generalized Gradient Approximation                              |
| H <sub>2</sub> TPP                     | <i>meso</i> -Tetrafenilporfirina                                           |
| H <sub>2</sub> Br <sub>8</sub> T-2-PyP | <i>meso</i> -Tetraquis(2-piridil)-β-octobromoporfirina                     |
| H <sub>2</sub> T-2-PyP                 | <i>meso</i> -Tetraquis(2-piridil)porfirina                                 |
| H <sub>2</sub> TM-2-PyP <sup>4+</sup>  | <i>meso</i> -Tetraquis( <i>N</i> -metilpiridínio-2-il)porfirina            |
| H <sub>2</sub> T-3-PyP                 | <i>meso</i> -Tetraquis(3-piridil)porfirina                                 |
| H <sub>2</sub> T-4-CPP                 | <i>meso</i> -Tetraquis(4-carboxifenil)porfirina                            |
| Inter.                                 | Intermediário                                                              |
| IRC                                    | Do inglês, Intrinsic Reaction Coordinate (Coordenada de reação intrínseca) |
| k <sub>cat</sub>                       | Constante de velocidade catalítica para dismutação do superóxido           |
| LDA                                    | Do inglês, Linear Density Approximation                                    |

|                                            |                                                                                               |
|--------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|
| MeOC <sub>n</sub>                          | Metoxialquil                                                                                  |
| MeOC <sub>n</sub> PyP                      | Metoxialquilpiridilporfirina                                                                  |
| MeOC <sub>n</sub> OTs                      | Tosilato de metoxialquila                                                                     |
| MeOTs                                      | Tosilato de metoxila                                                                          |
| <i>meso</i>                                | Posições 5, 10, 15 e 20 do anel porfirínico                                                   |
| MnTDE-2-ImP <sup>5+</sup>                  | <i>meso</i> -Tetraquis( <i>N</i> -dietilimidazolium-2-il)porfinatomanganês(III)               |
| MnTE-2-PyP <sup>5+</sup>                   | <i>meso</i> -Tetraquis( <i>N</i> -etilpiridínio-2-il)porfinatomanganês(III)                   |
| MnTnBuOC <sub>2</sub> -2-PyP <sup>5+</sup> | <i>meso</i> -Tetraquis( <i>N</i> -n-butoxietilpiridínio-2-il)porfinatomanganês(III)           |
| MnTnHex-2-PyP <sup>5+</sup>                | <i>meso</i> -Tetraquis( <i>N</i> -n-hexilpiridínio-2-il)porfinatomanganês(III)                |
| MnTMeOC <sub>2</sub> -2-PyP <sup>5+</sup>  | <i>meso</i> -Tetraquis( <i>N</i> -metoxietilpiridínio-2-il)porfinatomanganês(III)             |
| MnTPEG-2-PyP <sup>5+</sup>                 | <i>meso</i> -Tetraquis( <i>N</i> -(1-(2-(2-(2-metoxietoxi)etoxi)etil)piridínio-2-il)porfirina |
| NSD                                        | Do inglês, Normal-coordinate Structural Decomposition                                         |
| OTs <sup>-</sup>                           | Íon tosilato                                                                                  |
| PCA                                        | Do inglês, Principal Component Analysis (Análise de Componentes Principais)                   |
| PC                                         | Do inglês, Principal Components (Componentes Principais)                                      |
| pro                                        | Distorção na forma "propeller" (ventoinha)                                                    |

|       |                                                        |
|-------|--------------------------------------------------------|
| Prod. | Produto                                                |
| Reag. | Reagente                                               |
| ruf   | Distorção na forma "ruffle" (franzida)                 |
| sad   | Distorção na forma "saddle" (sela)                     |
| SOD   | Superóxido dismutase                                   |
| TPC   | <i>meso</i> -Tetrafenilclorina                         |
| TPyP  | <i>N</i> -piridilporfirina genérica (qualquer isômero) |
| TS    | Estado de transição                                    |
| wav   | Distorção na forma "wave" (onda)                       |
| UV    | Ultravioleta                                           |
| ZPE   | Energia do ponto zero                                  |

# 1 INTRODUÇÃO GERAL

---

## 1.1 ORGANIZAÇÃO DA DISSERTAÇÃO

Esta dissertação tem como tema principal as porfirinas, com ênfase nas *meso*-arilporfirinas. Estudos experimentais foram realizados de maneira a contribuir para a solução de alguns problemas críticos na preparação de precursores de moduladores redox baseados em metaloporfirinas sintéticas. Adicionalmente, estudos computacionais, motivados por uma demanda experimental específica, foram empregados em alguns sistemas relacionados ao design de mímicos de SOD.

Para melhor distribuição e entendimento do conteúdo, esta dissertação foi dividida em cinco capítulos, conforme descrito a seguir.

Neste capítulo 1, intitulado "Introdução Geral", será apresentada uma breve introdução acerca dos tópicos abordados nesta dissertação.

No Capítulo 2, intitulado "Otimização da Síntese de 3-*N*-piridilporfirinas", está descrita a investigação das condições experimentais para otimização da síntese da *meso*-tetraquis(3-piridil)porfirina (H<sub>2</sub>T-3-PyP) utilizando ferramentas quimiométricas. Esta porfirina é precursora importante e gargalo sintético na rota de obtenção de porfirinas hidrossolúveis, catalisadores biomiméticos de enzimas (como os citocromos P450, peroxidases e superóxido dismutases) e moduladores redox de estresse oxidativo.

O Capítulo 3, intitulado "Estudo Computacional da Influência do Rearranjo de Cadeias Laterais Oxigenadas na Síntese de *N*-alquilpiridilporfirinas", descreve a investigação teórica do rearranjo de tosilatos de metoxialquila e o impacto desta reação para a síntese de *N*-alquilpiridilporfirinas contendo cadeias alquílicas oxigenadas.

No Capítulo 4, intitulado "Estudo Computacional da Distorção do Anel Porfirínico e da Rotação Aril-porfirina em Porfirinas *meso*-substituídas", investigou-se a influência do número de substituintes, do padrão de substituição *meso* e das características eletrônicas dos substituintes sobre a rotação aril-porfirina e sobre a distorção do anel porfirínico associado a esta rotação.

Por fim, as conclusões gerais e perspectivas de trabalhos futuros são apresentadas no Capítulo 5 ("Conclusões Gerais e Trabalhos Futuros").

As referências bibliográficas pertinentes a cada capítulo são apresentadas no final dos mesmos. Para facilitar a leitura, a página inicial das referências de cada Capítulo é apresentada no rodapé de cada página.

## **1.2 PORFIRINAS**

As porfirinas pertencem a uma classe de compostos encontrados em todos domínios taxonômicos em diversos componentes vitais, sendo apropriadamente conhecidas como "pigmento da vida" (MILGROM, 1997). Estão envolvidas no transporte e armazenamento de oxigênio, que é feito pela hemoglobina e mioglobina respectivamente, no transporte de

elétrons (citocromo c) e na ativação de pró-fármacos e oxidação de xenobióticos (citocromos P450) (MILGROM, 1997; SHELNUTT et al.,1998).

As porfirinas, tal como ilustra a Figura 1.1, apresentam como estrutura básica um macrociclo tetrapirrólico denominado porfina, que permite alterações em sua estrutura como introdução de íons metálicos ou prótons em seu centro, além da substituição dos hidrogênios periféricos por uma variedade de grupos dando origem às porfirinas sem comprometimento da estabilidade.

As porfirinas que apresentam dois átomos de hidrogênio ligados aos nitrogênios centrais, como apresentado na Figura 1.1, são denominadas "porfirinas base-livre", enquanto que as porfirinas com íons metálicos em seu centro são conhecidas como metaloporfirinas. Dentre as porfirinas mais estudadas se encontram as *meso*-arilporfirinas, que são aquelas com substituintes arilas nas posições *meso* (5, 10, 15 e 20) do macrociclo.

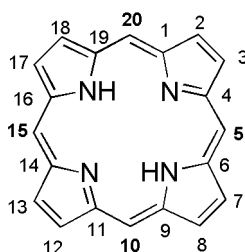


Figura 1.1 - Estrutura da porfina, núcleo característico das porfirinas. A numeração indicada segue as recomendações da União Internacional de Química Pura e Aplicada ("International Union of Pure and Applied Chemistry", IUPAC).

A depender do tipo de substituinte periférico das porfirinas, estas podem ser classificadas como de primeira, segunda e terceira geração. As porfirinas de primeira geração foram as primeiras a serem estudadas com fins catalíticos, essas porfirinas são comumente derivadas de *meso*-arilporfirinas simples e contém

grupos arilas não-substituídos. Um exemplo típico de porfirina de primeira geração é a *meso*-tetraquis(2-piridil)porfirina ( $H_2T-2-PyP$ ) (Fig. 1.2a). As porfirinas de segunda geração apresentam grupos arilas contendo substituintes (usualmente, alquila ou halogênios) nas posições *orto*, *meta* e/ou *para* do anel, como por exemplo a *meso*-tetraquis(*N*-metilpiridínio-2-il)porfirina ( $H_2TM-2-PyP^{4+}$ ) ilustrada na Figura 1.2b. As porfirinas de terceira geração apresentam substituintes volumosos e/ou retiradores de elétrons, sendo átomos de halogênios os mais comuns, nas posições  $\beta$ -pirrólicas. A *meso*-tetraquis(2-piridil)- $\beta$ -octobromoporfirina ( $H_2Br_8T-2-PyP$ , Fig. 1.2c), é um exemplo de porfirina de terceira geração.

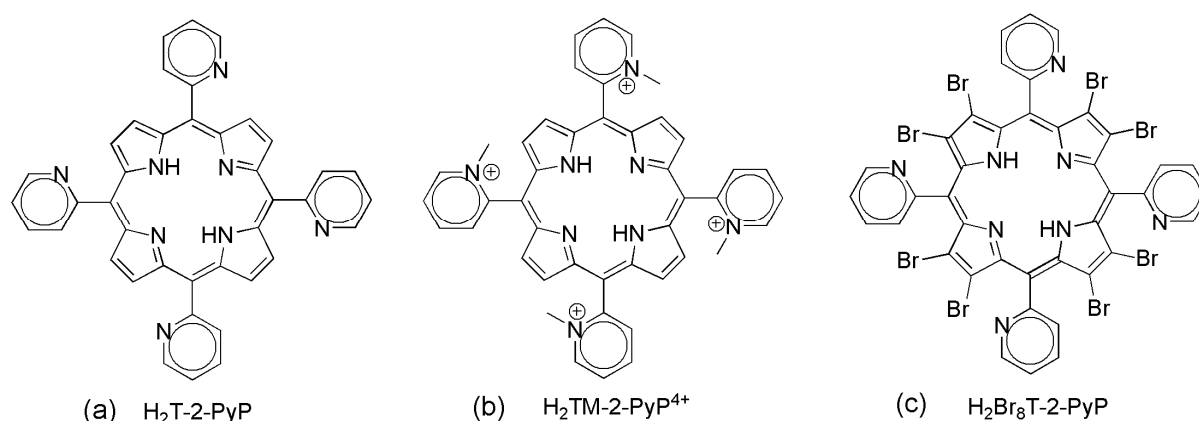


Figura 1.2 – Estruturas das porfirinas de (a) primeira ( $H_2T-2-PyP$ ), (b) segunda ( $H_2TM-2-PyP$ ) e (c) terceira geração ( $H_2Br_8T-2-PyP$ ).

Nas *meso*-arilporfirinas, embora haja a possibilidade de livre rotação em torno da ligação simples C-C entre os grupos arilas e o anel porfirínico, a conformação mais estável, em solução ou no estado sólido, apresenta o plano do anel arila posicionado perpendicularmente em relação ao plano da porfirina (Fig. 1.3a). As *meso*-arilporfirinas de segunda e terceira geração contendo grupos arilas *orto*-substituídos, podem, contudo, experimentar restrição na rotação em torno da ligação simples  $C_{(aril)}-C_{(meso)}$  em função de impedimentos estéreos significativos entre os grupos *orto* e os hidrogênios/substituintes  $\beta$ -pirrólicos (Fig. 1.3a). Porfirinas “*orto*-

aril substituídas” (como são comumente tratadas) dão origem, portanto, a quatro isômeros rotacionais,  $\alpha\alpha\alpha$ ,  $\alpha\alpha\beta$ ,  $\alpha\alpha\beta\beta$ ,  $\alpha\beta\alpha\beta$ , também conhecidos como atropoisômeros (Fig. 1.3b), dependendo da distribuição relativa dos grupos *orto* acima ( $\alpha$ ) ou abaixo ( $\beta$ ) do plano porfirínico (SPASOJEVIĆ et al., 2002).

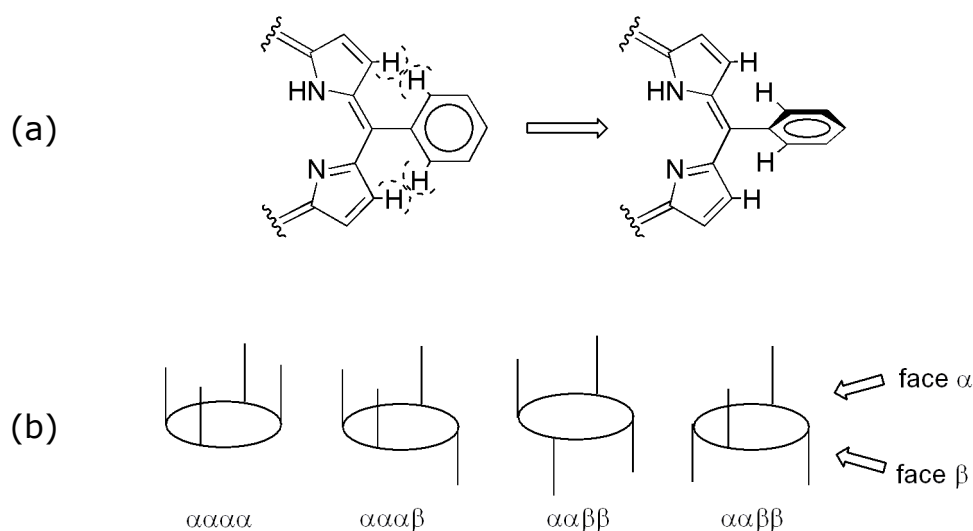


Figura 1.3 - Representação esquemática (a) do impedimento estérico entre os grupos *orto* e os hidrogênio/substituintes  $\beta$ -pirrólicos das *meso*-arilporfirinas, que levam a formação de (b) atropoisômeros.

Uma característica importante das porfirinas é que, apesar de apresentarem um sistema eletrônico altamente conjugado, formado por um total de 22 elétrons  $\pi$ , formalmente apenas 18 elétrons  $\pi$  são considerados na deslocalização (KORZEKWA et al., 1985). Este sistema  $\pi$  altamente conjugado é responsável pela intensa absorção das porfirinas na região espectral do visível. O espectro eletrônico típico das porfirinas base-livre apresenta usualmente cinco bandas características (Fig. 1.4): uma banda muito intensa ( $\epsilon \sim 10^5 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) entre 410 e 450 nm, conhecida como banda Soret, e outras quatro bandas menos intensas, conhecidas como bandas Q, na região entre 500 e 650 nm (WIJESEKERA; DOLPHIN, 1994). Modificações na estrutura do anel porfirínico podem causar alterações no número, na intensidade e na posição das bandas de

absorção (Fig. 1.4a). Os espectros das metaloporfirinas (Fig. 1.4b) usualmente só apresentam três bandas, a banda Soret e outras duas menos intensas, denominadas  $\alpha$  e  $\beta$ , na região entre 500 e 800 nm. Essa redução no número de bandas é resultante do aumento de simetria da molécula ( $D_{2h} \rightarrow D_{4h}$ ). As formas dicátion e diânion das porfirinas apresentam espectro semelhante ao das metaloporfirinas (Fig. 1.4b).

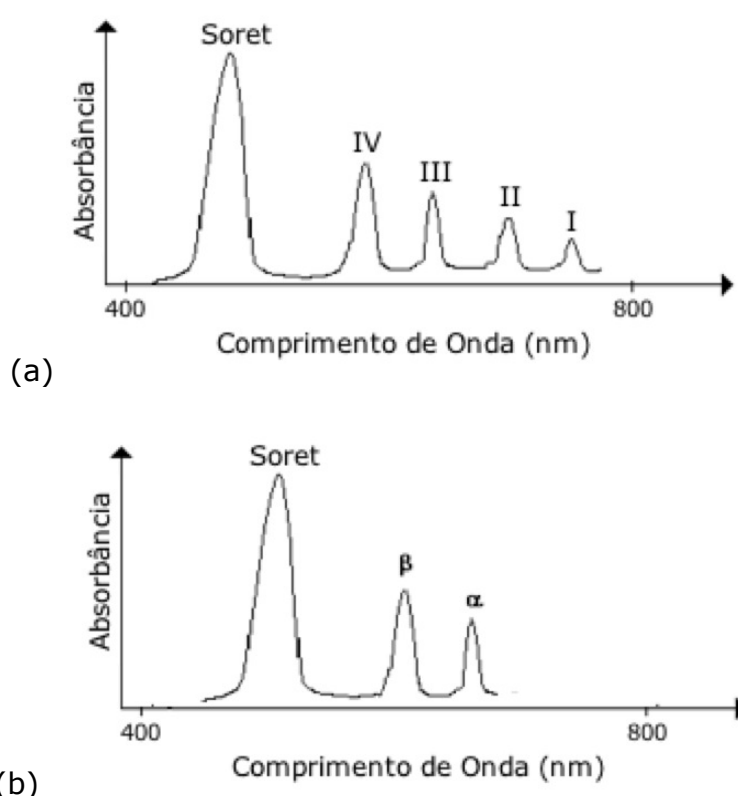


Figura 1.4 - Espectro eletrônico de absorção genérico de (a) porfirina base-livre e (b) metaloporfirina.

### 1.2.1 Aplicações das Porfirinas

As porfirinas sintéticas têm sido largamente empregadas em diversos campos. Dentre as inúmeras aplicações pode-se citar catálise química e biomimética (MEUNIER, 1992; WIJESEKERA; DOLPHIN, 1994; MILGROM, 1997; LEE; HUPP, 2006; MURAKAMI et al., 1996; DE VISSER; SHAIK, 2003; SHI, 2006), sensores químicos (PURRELLO et al., 1999; ZHANG et al., 2002; PAOLESSE et al.,

2008), fotossensibilizadores em terapia fotodinâmica (MILGROM, 1997; BATINIĆ-HARBELE et al., 1999; AL-MUTAIRI et al., 2006; 2007). Os complexos de manganês(III) derivados das *N*-piridilporfirinas, em particular, têm sido utilizados como modelos biomiméticos de diversas hemoproteínas e metaloproteínas que desempenham papéis biológicos importantes e se destacado como moduladores redox de estresse oxidativo (IAMAMOTO et al., 1994; 1995; REBOUÇAS et al., 2002; BATINIĆ-HARBELE et al., 1999; 2010; 2011).

### **1.2.1.1 Estresse Oxidativo**

O estresse oxidativo é caracterizado pelo desequilíbrio celular entre os níveis de oxidante e antioxidantes. Esta condição ocasiona dano oxidativo e tem sido implicada em uma série de patologias como câncer, acidente vascular cerebral, isquemia/reperfusão, Doença de Parkinson, Doença de Alzheimer, Doença de Huntington, envelhecimento, diabetes, catarata, lesões pulmonares, hipertensão, problemas cardíacos, osteoartrites, dentre outras (BATINIĆ-HARBELE et al., 2010; 2011).

Em grande parte dos processos que envolvem estresse oxidativo, estão presentes as espécies reativas de oxigênio e/ou nitrogênio (ERO/ERN), tais como peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), radical hidroxila ( $\cdot OH$ ), óxido nítrico ( $\cdot NO$ ), dióxido de nitrogênio ( $\cdot NO_2$ ) e peroxinitrito ( $ONOO^-$ ). Essas espécies afetam diretamente o equilíbrio redox celular e, apesar de participarem de processos fisiológicos importantes, sua produção descontrolada e em excesso altera a integridade física da célula, seus processos metabólicos e as vias de transdução do sinal celular (BATINIĆ-HARBELE et al., 2010; 2011).

Dentre as ERO citadas pode-se destacar o superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ),

que pode ser produzido a partir de processos bioquímicos durante a respiração celular. Essa espécie desempenha papel importante na sinalização celular, proliferação, sobrevivência e morte celular (BATINIĆ-HARBELE et al., 2011). Em excesso, pode ser prejudicial para o DNA e pode promover a autooxidação da membrana dos lipídios, sendo portanto bastante nociva aos tecidos (VALDIVIA et al., 2009). Além disso, essa espécie pode reagir com o NO produzindo o aduto ONOO<sup>-</sup>, que, antes de isomerizar para o íon nitrato, é bastante reativo e também bastante nocivo aos tecidos.

O controle *in vivo* do O<sub>2</sub><sup>•-</sup> é realizado por meio de uma rápida conversão (dismutação) do O<sub>2</sub><sup>•-</sup> em O<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (PASTERNAK; HALLIWELL, 1979; WAGNER et al., 1993) catalisada pelas enzimas superóxido dismutases (SOD). A reação global e as semi-reações da dismutação estão apresentadas na Figura 1.5. Sob condições fisiológicas, esse controle é realizado por uma série de enzimas, dentre as quais podemos destacar a enzima superóxido dismutase (SOD), que é uma metaloenzima que apresenta diferentes grupos prostéticos em sua composição (McCORD; FRIDOVICH, 1969; WAGNER et al., 1993).

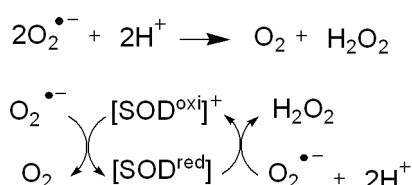


Figura 1.5 – Dismutação do superóxido pela SOD.

Há quatro isoenzimas da SOD que diferem entre si pelo cofator metálico que compõe o sítio ativo: cobre e zinco (CuZnSOD), manganês (MnSOD), níquel (NiSOD) ou ferro (FeSOD). Nos humanos, há apenas duas das isoformas que se distribuem em diferentes compartimentos celulares: no espaço extracelular (CuZnSOD), citosol (CuZnSOD) e mitocôndria (MnSOD) (VALKO et

al., 2006; VALDIVIA et al., 2009). Esta última isoforma mitocondrial, MnSOD, está ilustrada na Figura 1.6.

Quando da inativação ou baixa expressão dessas enzimas, o uso de miméticos sintéticos de SOD com baixo peso molecular se torna uma alternativa atraente para reestabelecer o nível celular normal de ERO/ERN e, conseqüentemente, para que o estresse oxidativo de células, órgãos e tecidos seja regulado.

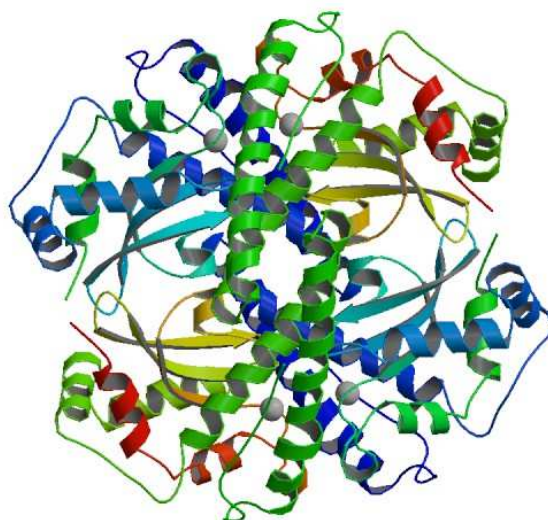


Figura 1.6 – Estrutura cristalográfica em baixa resolução da MnSOD humana. Código PDB: 1MSD, retirado de <http://www.pdb.org> (WAGNER et al., 1993). As esferas cinza representam os íons Mn do centro ativo.

#### **1.2.1.2 Mn-porfirinas como Modelos Biomiméticos de SOD**

A remoção ERO/ERN é baseada em reações redox, por isso é natural a busca por modelos biomiméticos de SOD que apresentem sítios metálicos para promover a oxidação/redução catalítica dessas espécies.

Muitos compostos, tais como fulerenos, nitróxidos, complexos de salen, corrol, poliaminas cíclicas e porfirinas, entre outros, foram investigados como mímicos de SOD. Alguns deste compostos estão apresentados na Figura 1.7.

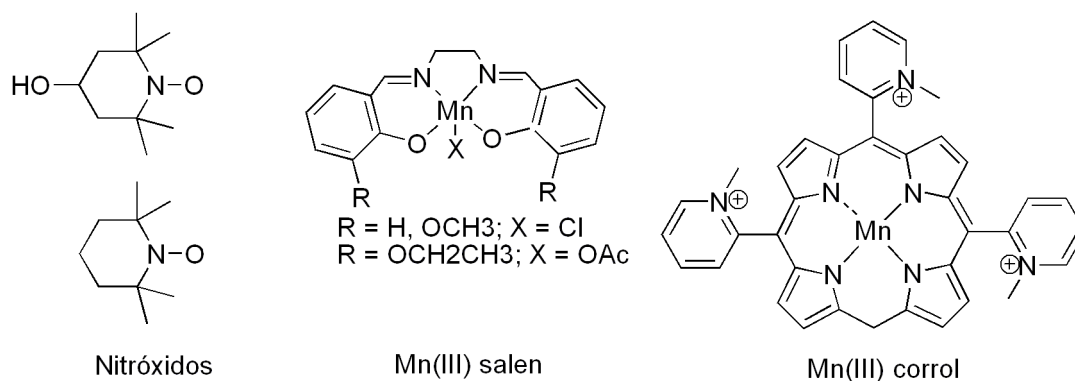


Figura 1.7 - Estrutura de alguns compostos mímicos de SOD.

As metaloporfirinas têm se destacado como mímicos de SOD em diversos modelos celulares e animais por apresentarem características como alta estabilidade metal-ligante, baixo peso molecular (que possibilita penetração nas membranas celulares e subcelulares), constante de velocidade para dismutação do superóxido ( $k_{\text{cat}}$ ) próximas à da SOD natural e versatilidade estrutural (que modula propriedades como lipofilicidade, carga e potencial de redução) (BATINIĆ-HARBELE et al., 2002; 2010; 2011).

As Mn-porfirinas catiônicas têm sido investigadas intensamente em diversos estudos pré-clínicos, como ilustrado na Figura 1.8. Os resultados apontam esta classe de compostos como os reguladores redox catalíticos mais versáteis e abrangentes (BATINIĆ-HARBELE et al., 2010; 2011). A diminuição dos danos causados por radiação (efeito radioprotetor), a inibição do crescimento de tumores (efeito antiangiogênico) e proteção dos órgãos e tecidos em transplantes e/ou processos de isquemia/reperfusão (efeito antioxidante) figuram entre alguns dos resultados obtidos com as Mn-porfirinas derivadas das 2-*N*-alquilpiridilporfirinas catiônicas (BATINIĆ-HARBELE et al., 2010; 2011).

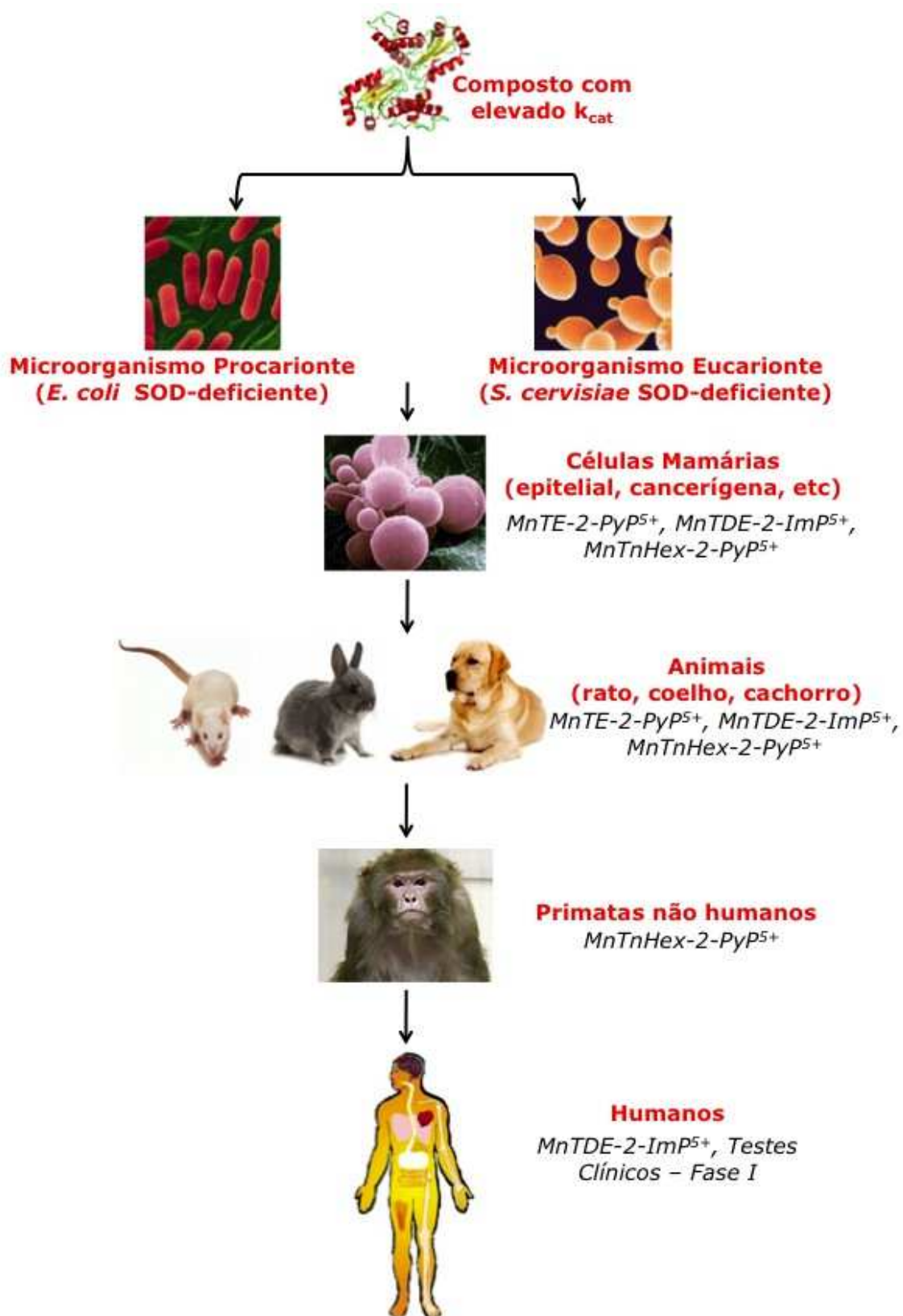


Figura 1.8 – Esquema da evolução dos estudos de Mn-porfirinas em microorganismos eucariontes, procariontes e modelos animais. Adaptado de Batinić-Harbele et al. (2011).

A rápida transição dos estudos das propriedades físico-químicas das Mn-porfirinas na década de 90 para estudos biológicos em uma variedade de animais superiores (incluindo primatas) a partir de metade dos anos 2000, deveu-se, sobretudo, ao desenvolvimento de relações estrutura-atividade robustas que incluíam porfirinas neutras, aniônicas e catiônicas e contemplavam aspectos termodinâmicos, cinéticos e eletrostáticos (BATINIĆ-HARBELE et al., 1999; SPASOJEVIĆ et al., 2003; REBOUÇAS et al., 2008a; 2008b). A partir destas relações, tornou-se possível modular a atividade SOD da porfirina pela escolha de substituintes apropriados para regulação do potencial redox do sistema para valores biologicamente relevantes, como apresentado na Figura 1.9. Para essas Mn-porfirinas, o aumento do potencial de redução  $Mn^{III}/Mn^{II}$  pode ser conseguido pela diminuição da densidade eletrônica do anel porfirínico através da inclusão de grupos deficientes de elétrons nas posições *meso* ou  $\beta$ -pirrólicas da porfirina.

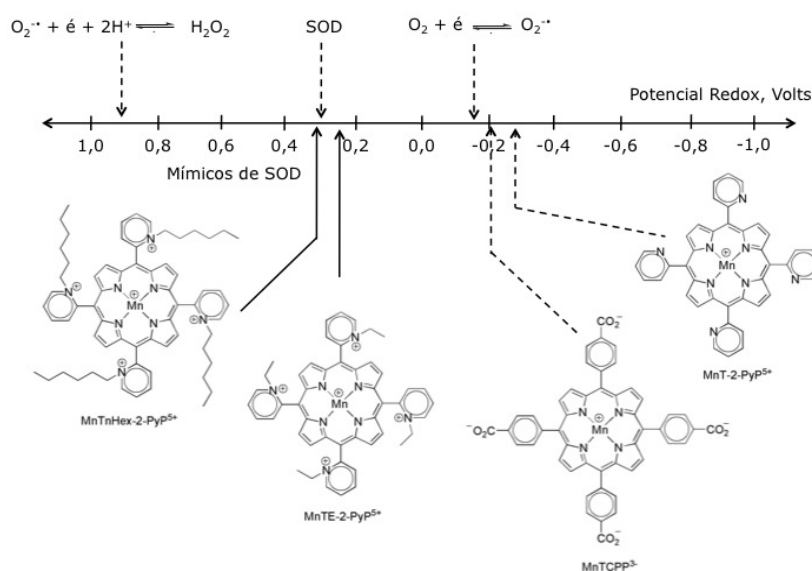


Figura 1.9 - Modulação dos potenciais de redução  $Mn^{III}/Mn^{II}$  de algumas Mn-porfirinas. Os potenciais de redução das enzimas SOD e das espécies envolvidas nas semi-reações de dismutação do superóxido são também apresentados. Adaptado de Rebouças et al. (2008c).

### 1.2.1.3 H<sub>2</sub>T-3-PYP

Apesar dos isômeros *orto* das Mn(III)-*N*-alquilporfirinas serem os mais eficientes mímicos de SOD em termos de atividade catalítica, os isômeros *meta* têm recebido atenção recentemente e têm sido testados *in vivo* em modelo celular (*E. coli* SOD-deficiente) de estresse oxidativo e modelo animal (camundongo) de câncer de mama (KOS et al., 2009a; 2009b; SPASOJEVIĆ et al., 2011; TOVMASYAN et al., 2011).

Embora a série *meta* apresente menor potencial de redução Mn<sup>III</sup>/Mn<sup>II</sup> e atividade SOD cerca de uma ordem de magnitude menor que os compostos análogos *orto*, os isômeros *meta* apresentam lipofilicidade aproximadamente 10 vezes maior que os respectivos *orto*. A melhor lipofilicidade dos isômeros *meta* resulta em maior acúmulo celular, melhor biodisponibilidade e menor toxicidade, o que compensa a menor atividade intrínseca comparada aos *orto*. De fato, a eficiência *in vivo* dos isômeros *meta* se assemelha àquela dos isômeros *orto*, por balancearem atividade catalítica *versus* acúmulo (KOS et al., 2009a; 2009b).

## 1.3 QUIMIOMETRIA

O uso de técnicas quimiométricas no planejamento e otimização de experimentos já é bem difundido. Dentre essas técnicas podem-se destacar planejamentos fatoriais e análises por superfície de resposta, os quais foram empregados neste trabalho (Cap. 2).

### 1.3.1 Planejamento Fatorial

Planejamento de experimentos é a especificação detalhada de todas as operações experimentais que devem ser realizadas para a obtenção da resposta desejada.

Dentre as técnicas utilizadas para planejar um experimento se encontra o planejamento fatorial, que é largamente utilizado por ser uma das técnicas mais simples. É comumente utilizado para triagem ou quando há um grande número de fatores (variáveis) possíveis a serem analisados. Nesta última abordagem, os efeitos dos fatores isolados (e das interações entre eles) sobre a resposta podem ser analisados de forma simultânea, tornando esta técnica bastante recomendada para a otimização de experimentos.

Para realizar o planejamento fatorial, o primeiro passo é a escolha dos fatores e valores (níveis) desses fatores a serem investigados. O planejamento fatorial mais simples é o de fatores a dois níveis. Ele possibilita uma investigação preliminar de quais fatores têm influência sobre a resposta e pode ser completo ou fracionário.

No planejamento fatorial completo, ensaios com todas as combinações possíveis dos níveis (geralmente codificados ou normalizados para +1 e -1) dos fatores são realizados. Para uma grande quantidade de fatores, o número de experimentos aumentaria de forma experimentalmente proibitiva. Por exemplo, para um experimento com 5 fatores a dois níveis cada, seriam necessários apenas 32 ( $2^5$ ) ensaios, mas quando se passa para 10 fatores, a quantidade de ensaios aumenta para 1024 ( $2^{10}$ ).

Quando o número de fatores é grande, o uso do planejamento fatorial fracionário se torna mais vantajoso. Nesta técnica, se utiliza um fator de redução que limita o número de ensaios a um valor mais baixo do que no planejamento completo, mas conduz, possivelmente, às mesmas conclusões que seriam obtidas com o número total de ensaios (MONTGOMERY, 2001; BRERETON, 2003; CALADO; MONTGOMERY, 2003; BARROS NETO; SCARMINIO;

BRUNS, 2010).

### **1.3.2 Superfície de Resposta**

A superfície de resposta é uma técnica baseada no planejamento de experimentos que utiliza duas etapas para a otimização de experimentos (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010). As etapas são modelagem e deslocamento e são realizadas tantas vezes quantas forem necessárias até se atingir a região ótima da superfície investigada.

Na etapa de modelagem, modelos simples, geralmente lineares ou quadráticos, são ajustados às respostas obtidas com o planejamento fatorial. A etapa seguinte, de deslocamento, consiste em “caminhar” em direção à região de máxima inclinação de determinado modelo.

### **1.3.3 Análise de Regressão**

A análise de regressão é usada para investigar e modelar a relação da variável dependente com as variáveis independentes (MONTGOMERY, 2001; BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010).

Existem dois modelos de regressão, o simples, quando se tem apenas uma variável independente e o múltiplo, quando se tem duas ou mais variáveis independentes. Esses modelos podem ser ainda classificados em linear ou não linear.

O modelo utilizado nesta dissertação foi o de regressão linear múltipla que pode ser representado por meio da equação (1).

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + \dots + b_kx_k + \varepsilon \quad (1)$$

Onde:

- $y$  é a variável dependente;

- $x_1, x_2, \dots, x_k$  são as variáveis independentes;
- $b_0, b_1, b_2, \dots, b_k$  são os coeficientes de regressão, ajustados a partir dos dados experimentais, e
- $\varepsilon$  é o erro aleatório associado à determinação experimental de  $y$ .

Os resultados da regressão indicam a direção, a magnitude e a significância estatística da relação entre as variáveis independentes e a variável dependente:

- o sinal de cada coeficiente indica a direção da relação;
- os coeficientes representam a variação média na resposta para uma unidade de mudança da variável independente, mantendo as outras variáveis constantes;
- o *p-valor* de cada coeficiente testa a hipótese nula de que o coeficiente é igual a zero, ou seja, é sem efeito. Portanto, valores pequenos de  $p$ , neste estudo menor do que 0,05 (análise a 95% de confiança) sugerem que a variável independente é significativa para a variável dependente.

#### **1.3.4 Análise de Componentes Principais**

A análise de dados químicos foi facilitada com os avanços computacionais alcançados recentemente. Muitas vezes a quantidade de informação obtida é bastante elevada, tornando sua análise complexa e muitas vezes impossível sem o uso de técnicas apropriadas.

Dentre as ferramentas de análise multivariada, pode-se destacar a análise de componentes principais (PCA), que objetiva a redução dos dados obtidos para assim identificar a relação entre as

características extraídas dos dados (FERREIRA et al., 1999; BRERETON, 2003; SILVA et al., 2005; RINGNÉR, 2008).

Para que a natureza multivariada dos dados seja visualizada em poucas dimensões, um novo sistema de eixos, chamado de componentes principais (PC, do inglês "principal components") é construído através da combinação linear das variáveis originais. As coordenadas das amostras nesse novo sistema de eixos são chamadas de escores e a contribuição que cada variável original exerce sobre uma determinada PC é denominada peso (FERREIRA et al., 1999).

Para se realizar esta análise é preciso inicialmente construir uma matriz de dados para as amostras. Em seguida esses dados devem ser autoescalados, ou seja, centrados na média e tornados adimensionais, para assim determinar a matriz de correlação. Deve-se também determinar os autovalores e autovetores dessa matriz de correlação para, por fim, se realizar a projeção geométrica dos autovalores.

## 1.4 MÉTODOS COMPUTACIONAIS

O uso de cálculos de Química Teórica apresenta-se como uma ferramenta confiável para a análise de propriedades físico-químicas de sistemas moleculares. O nível de teoria aplicado para o tratamento do sistema químico gera os diferentes níveis de cálculos utilizados em Química Computacional, sendo estes separados em três classes distintas: *ab initio*, semi-empíricos e os métodos baseados na teoria do funcional da densidade (DFT, do inglês "Density Functional Theory").

Os métodos *ab initio* (do latim "do princípio") utilizam apenas as constantes fundamentais como a velocidade da luz, as massas e

cargas dos elétrons e a constante de Planck. Assim, através da aplicação de vários procedimentos matemáticos, torna-se possível a obtenção das propriedades desejadas para o sistema em estudo. A aplicabilidade destes métodos a sistemas com muitos átomos contudo é limitada devido a sua alta demanda computacional.

Os métodos semi-empíricos incluem em seu formalismo ajustes vindos de parâmetros experimentais, de maneira que algumas etapas não são calculadas e o procedimento computacional é simplificado. Assim os cálculos semi-empíricos são extremamente rápidos e aplicáveis a sistemas com muitos átomos. A formação dos diferentes métodos semi-empíricos existentes (AM1, RM1, PM3, PM6 etc.) vem da junção de dois fatores: o procedimento adotado para inclusão dos valores experimentais e o banco de dados utilizado.

Já os métodos DFT, que foram utilizados nos Cap. 3 e 4 desta dissertação, têm uma proposta de formalismo matemático diferente dos métodos *ab initio* e semi-empíricos. Eles se fundamentam na proposição de que as propriedades do estado fundamental das moléculas podem ser previstas pela densidade eletrônica ( $\rho$ ). O formalismo DFT pode ser considerado *ab initio*, mas sua implementação inclui ajustes e parâmetros semi-empíricos tornando-o assim, uma nova classe de métodos. O formalismo e a forma de parametrização utilizada geram os diferentes funcionais híbridos de DFT como B3LYP, PBE0, dentre outros.

Apresenta-se a seguir uma descrição do formalismo DFT, método utilizado no desenvolvimento deste trabalho.

#### **1.4.1 Teoria do Funcional da Densidade**

A Teoria do Funcional da Densidade (DFT) não utiliza a função de onda como observável químico-quântico, mas é fundamentada

na existência de funcionais que descrevem a densidade eletrônica ( $\rho$ ) e assim determinam a energia eletrônica do estado fundamental (JENSEN, 1998; CRAMER, 2002).

A densidade eletrônica ( $\rho$ ) é o quadrado da função de onda integrada sobre as coordenadas de  $n - 1$  elétrons e sobre suas partes de spins (equação (2)) e fornece a probabilidade acumulada de se encontrar qualquer elétron em um volume infinitesimal.

$$\rho(r) = N \int d\tau \psi^*(q) \psi(q) \quad (2)$$

Onde  $\int d\tau$  representa a integração sobre as coordenadas de spin.

Dessa maneira, a densidade eletrônica ( $\rho$ ) depende apenas de três coordenadas, que são as coordenadas espaciais e independe do número de elétrons.

#### 1.4.1.1 Teorema de Hohenberg-Kohn

Hohenberg e Kohn (HOHENBERG et al., 1964), em 1964, provaram dois teoremas que legitimaram o método DFT.

O primeiro teorema, conhecido como teorema da existência, estabelece que o estado fundamental de um sistema pode ser determinado pela densidade eletrônica ( $\rho$ ), ou seja, a energia do estado fundamental é um funcional de densidade eletrônica no estado fundamental ( $\rho_0$ ) (equação (3)).

$$E_0 = E_0[\rho_0] = \langle \Psi[\rho_0] | \hat{H} | \Psi[\rho_0] \rangle \quad (3)$$

Como o funcional de energia é formado pelas contribuições das energias cinética e potencial (atração núcleo-eletron e repulsão elétron-elétron), a energia do estado fundamental pode ser determinada pela equação (4).

$$E_0[\rho_0] = T[\rho_0] + V_{Ne}[\rho_0] + V_{ee}[\rho_0] \quad (4)$$

Onde  $T$  é a energia cinética e  $V$  é a energia potencial, sendo  $V_{Ne}$  referente a atração núcleo-eletron e  $V_{ee}$  referente a repulsão elétron-elétron.

A energia do estado fundamental pode ser reescrita como na equação (5).

$$E_0[\rho_0] = F[\rho_0] + \int \rho_0(r) v(r) dr \quad (5)$$

Onde  $F[\rho_0]$  é o funcional universal da densidade eletrônica ( $\rho$ ) e como seu valor não é conhecido, não é prático determinar  $E_0$  a partir da densidade eletrônica ( $\rho$ ).

O segundo teorema, conhecido como teorema variacional, estabelece que a energia obtida para uma densidade eletrônica ( $\rho$ ) seja maior ou igual a energia do estado fundamental, como apresentado na equação (6).

$$E[\rho'(r)] \geq E[\rho(r)] \quad (6)$$

#### 1.4.1.2 Equações de Kohn-Sham

Com os teoremas de Hohenberg-Kohn é possível determinar as propriedades moleculares do estado fundamental a partir da densidade eletrônica ( $\rho$ ) sem a necessidade de conhecer a função de onda. No entanto, como a forma do funcional ( $F[\rho_0]$ ) é desconhecida, não se pode calcular a energia do estado fundamental ( $E_0$ ) a partir da densidade eletrônica ( $\rho$ ).

Kohn e Sham (KOHN et al., 1965), com o objetivo de solucionar este problema, propuseram uma metodologia para determinar a densidade eletrônica ( $\rho$ ) e assim determinar a energia do estado fundamental ( $E_0$ ). Como a forma do funcional ( $F[\rho_0]$ ) ainda é desconhecida, o uso de aproximações é necessário e a

energia do sistema pode ser determinado pela equação (7).

$$E[\rho] = T_s[\rho] - \frac{1}{2} \iint \frac{\rho(r_1)\rho(r_2)}{r_{12}} dr_1 dr_2 + \int \rho(r)v(r)dr + E_{xc}[\rho] \quad (7)$$

Onde o segundo termo da equação (7) corresponde à expressão clássica da energia de repulsão eletrostática e  $E_{xc}$  corresponde à energia de troca e correlação,

Como na equação (7), apenas a energia de troca e correlação ( $E_{xc}$ ), não possui forma analítica conhecida, os métodos DFT estimam essa parcela da energia total de forma aproximada.

Existem três abordagens principais utilizadas nos funcionais de troca e correlação: LDA (do inglês "Linear Density Approximation"), GGA (do inglês "Generalized Gradient Approximation") e meta-GGA. Existem ainda os métodos híbridos que são formados por qualquer combinação de um funcional de troca com um de correlação.

O funcional B3LYP, utilizado nos estudos de simulação computacional (STEPHENS et al., 1994), possui parcelas dos funcionais de troca B88 (BECKE, 1988) e da aproximação LDA, além da energia de troca calculada pelo método Hartree-Fock. Para o funcional de correlação, há uma parcela oriunda do funcional de VWN (VOSKO et al., 1980) e outra do funcional LYP (LEE et al., 1988).

## 1.5 OBJETIVOS GERAIS

Na busca contínua pelo entendimento e aprimoramento de metaloporfirinas como modelos biomiméticos das enzimas superóxido dismutase (SOD), esta dissertação tem como objetivos gerais:

- a otimização experimental do rendimento da síntese da H<sub>2</sub>T-3-PyP utilizando técnicas quimiométricas;
- a investigação do mecanismo de rearranjo do agente metoxialquilante MeO(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>OTs (n= 2, 4, 5 e 6) através de simulação computacional de modo a explicar a origem de produtos metilados indesejáveis obtidos durante a síntese de *N*-metoxialquilpiridilporfirinas;
- a investigação, através de simulação computacional, da influência do número de substituintes arila, padrão de substituição na posição *meso* e do caráter eletrônico do substituinte na deformação estrutural e na barreira de rotação aril-porfirina de *meso*-arilporfirinas.

## 1.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-MUTAIRI, D.A.; CRAIK, J.D.; BATINIĆ-HARBELE, I.; BENOVA, L.T. Photosensitizing action of isomeric zinc *N*-methylpyridylporphyrins on human carcinoma cells. *Free Radic. Res.*, v. 40, p. 477-483, 2006.

AL-MUTAIRI, D.A.; CRAIK, J.D.; BATINIĆ-HARBELE, I.; BENOVA, L.T. Inactivation of metabolic enzymes by photo-treatment with zinc meta *N*-methylpyridylporphyrin. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 1770, p.1520-1527, 2007.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. *Como fazer experimentos: Pesquisa e Desenvolvimento na Ciência e na Indústria*. 4ª ed. Porto Alegre: Bookman, 2010. 414 p. ISBN 9788577806522.

BATINIĆ-HARBELE, I.; SPASOJEVIĆ, I.; HAMBRIGHT, P.; BENOVA, L.; CRUMBLISS, A.L.; FRIDOVICH, I. Relationship among Redox Potentials, Proton Dissociation Constants of Pyrrolic Nitrogens, and in Vivo and in Vitro Superoxide Dismutating Activities of Manganese(III) and Iron(III) Water-Soluble Porphyrins. *Inorg. Chem.*, v. 38, p. 4011-4022, 1999.

BATINIĆ-HARBELE, I.; SPASOJEVIĆ, I.; STEVENS, R.D.; HAMBRIGHT, P.; FRIDOVICH, I. Manganese(III) *meso*-tetrakis(*ortho-N*-alkylpyridyl)porphyrins. Synthesis, characterization, and catalysis of O<sub>2</sub><sup>•-</sup> dismutation. *J. Chem. Soc., Dalton Trans*, p. 2689-2696, 2002.

BATINIĆ-HARBELE, I.; REBOUÇAS, J.S.; SPASOJEVIĆ, I. Superoxide Dismutase Mimics: Chemistry, Pharmacology and Therapeutic Potential. *Antioxidants and Redox Signalling*, v.13, p. 877-918, 2010.

BATINIĆ-HARBELE, I.; REBOUÇAS, J.S.; BENOVA, L.; SPASOJEVIĆ, I. *Chemistry, biology and medical effects of water-soluble metalloporphyrins*. Handbook of Porphyrin Science. Singapura: World Scientific, 2011. V. 11, cap. 52, p. 291-393.

BATINIĆ-HARBELE, I.; RAJIC, Z.; TOVMASYAN, A.; REBOUÇAS, J.S.; YE, X.; LEONG, K.W.; DEWHIRST, M.W.; VUJASKOVIC, Z.; BENOVA, L.; SPASOJEVIĆ, I. Diverse functions of cationic Mn(III) *N*-substituted pyridylporphyrins, recognized as SOD mimics. *Free Rad. Bio. Med.*, v. 51, p. 1035-1053, 2011.

BECKE, A.D. Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic-behavior. *Phys Rev. A*, v. 38, p. 3098-

3100, 1988.

BRERETON, R.G. *Chemometrics: Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant*. New York: John Wiley & Sons, 2003. 489 p. ISBN 0471489778.

CALADO, V.; MONTGOMERY, D.C. *Planejamento de Experimentos usando Statistica*, Rio de Janeiro: E-Papers Serviços Editoriais, 2003. 260 p. ISBN 8587922831.

CRAMER, C.J. *Essentials of Computational Chemistry: Theories and Models*. 2<sup>nd</sup> ed. New York: John Wiley & Sons, 2002. 596 p. ISBN 0470091819.

DE VISSER, S.P.; SHAIK, S. A Proton-Shuttle Mechanism Mediated by the Porphyrin in Benzene Hydroxylation by Cytochrome P450 Enzymes. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 125, p. 7413-7424, 2003.

EYRING, H.; WALTER, J.; KIMBALL, G. *Quantum Chemistry*. New York: John Wiley & Sons, 1958.

FERREIRA, M.M.C.; ANTUNES, A.M.; MELGO, M.S.; VOLPE, P.L.O. Quimiometria I: Calibração Multivariada, um Tutorial. *Quím. Nova*, v. 22, p. 724-731, 1999.

HAMBRIGHT, P.; FLEISHER, E.B. Acid-Base Equilibriums, Kinetics of Copper Ion Incorporation, and Acid-Catalyzed Zinc Ion Displacement from the Water-Soluble Porphyrin  $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -Tetrakis(1-methyl-4-pyridil)porphine. *Inorg. Chem.*, v. 9, p. 1757-1761, 1970.

HOHENBERG, P.; KOHN, W. Inhomogeneous Electron Gas. *Phys. Rev.*, v. 136, p. B864-B-871, 1964.

IAMAMOTO, Y.; SERRA, O.A.; IDEMORI, Y.M. Iron(III) porphyrins atropisomers as catalysts for cyclohexane hydroxylations. A biomimetical system. *J. Inorg. Biochem.*, v. 54, p.55-56, 1994.

IAMAMOTO, Y.; IDEMORI, Y.M.; NAKAGAKI, S. Cationic Ironporphyrins As Catalyst In Comparative Oxidation Of Hydrocarbons: Homogeneous And Supported On Inorganic Matrices Systems. *J. Mol. Catal. A: Chem.*, v. 99, p. 187-193, 1995.

JENSEN, F. *Introduction to Computational Chemistry*. 1<sup>st</sup> ed. Chinchester: John Wiley & Sons, 1998. 429 p. ISBN 0471984256.

KORZEKWA, K.; TRAGER, W.; GOUTERMAN, M.; SPANGLER, D.; LOEW, G. Cytochrome P450 mediated aromatic oxidation: a theoretical study. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 107, p. 4273-4279, 1985.

KOS, I.; REBOUÇAS, J.S.; DEFREITAS-SILVA, G.; SALVEMINI, D.;

VUJASKOVIC, Z.; DEWHIRST, M.W.; SPASOJEVIĆ, I.; BATINIĆ-HARBELE, I. Lipophilicity of potent porphyrin-based antioxidants: Comparison of *ortho* and *meta* isomers of Mn(III) *N*-alkylpyridylporphyrins. *Free Rad. Biol. Med.*, v. 47, p. 72-78, 2009a.

KOS, I.; BENOVIĆ, L.; SPASOJEVIĆ, I.; REBOUÇAS, J.S.; BATINIĆ-HARBELE, I. High Lipophilicity of *meta* Mn(III) *N*-Alkylpyridylporphyrin-Based Superoxide Dismutase Mimics Compensates for Their Lower Antioxidant Potency and Makes Them as Effective as *Ortho* Analogues in Protecting Superoxide Dismutase-Deficient *Escherichia coli*. *J. Med. Chem.*, v. 52, p. 7868-7872, 2009b.

LEE, C.; YANG, W.; PARR, R.G. Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. *Phys. Rev. B*, v. 37, p. 785-789, 1988.

LEE, S.K.; HUPP, J.T. Porphyrin-containing molecular squares: Design and applications. *Coord. Chem. Rev.*, v. 250, p. 1710-1723, 2006.

LEVINE, I.N. *Quantum Chemistry*. New York: Prentice Hall, 2000. 739 p. ISBN 0136855121.

MCCORD, J.M.; FRIDOVICH, I. The Utility of Superoxide Dismutase in Studying Free Radical Reactions. *J. Bio. Chem.*, v. 244, p. 6056-6063, 1969.

MEUNIER, B. Metalloporphyrins as Versatile Catalysts for Oxidation Reactions and Oxidative DNA Cleavage. *Chem. Rev.*, v. 92, p. 1411-1456, 1992.

MILGROM, L.R. *The Colours of Life: An Introduction to the Chemistry of Porphyrins and Related Compounds*. Oxford: Oxford University Press, 1997. 249 p. ISBN 0198553803.

MONTGOMERY, D.C. *Design and Analysis of Experiments*. 5<sup>th</sup> ed. New York: John Wiley & Sons, 2001. 684 p. ISBN 0471316490.

MURAKAMI, Y.; KIKUCHI, J.; HISAEDA, Y.; HAYASHIDA, O. Artificial Enzymes. *Chem. Rev.*, v. 96, p. 721-756, 1996.

PAOLESSE, R.; LVOVA, L.; NARDIS, S.; NATALE, N.D.; D'AMICO, A.; CASTRO, F.L. Chemical images by porphyrin arrays of sensors. *Microchim. Acta*, v. 163, p. 103-112, 1998.

PASTERNAK, R.F.; HALLIWELL, B. Superoxide Dismutase Activities of an Iron Porphyrin and Other Iron Complexes. *J. Am. Chem. Soc.*,

v. 101, p. 1026-1031, 1979.

POPLE, J.A.; BEVERIDGE, D.L. *Approximate Molecular Orbital Theory*. Texas: McGraw-Hill Book Company, 1970. 224p. ISBN 9780070505124.

PURRELLO, R.; GURRIERI, S.; LAUCERI, R. Porphyrin assemblies as chemical sensors. *Coord. Chem. Rev.*, v. 190-192, p. 683-706, 1999.

REBOUÇAS, J.S.; SPASOJEVIĆ, I.; TIAHJONO, D.H.; RICHAUD, A.; MÉNDEZ, F.; BENOVA, L.; BATINIĆ-HARBELE, I. Redox modulation of oxidative stress by Mn porphyrin-based therapeutics: The effect of charge distribution. *Dalton Trans.*, p. 1233-1242, 2008a.

REBOUÇAS, J.S.; SPASOJEVIĆ, I.; BATINIĆ-HARBELE, I. Quality of potent Mn porphyrin-based SOD mimics and peroxynitrite scavengers for pre-clinical mechanistic/therapeutic purposes. *J. Pharmac. Biomed. Anal.*, v. 48, p. 1046-1049, 2008b.

REBOUÇAS, J.S.; SPASOJEVIĆ, I.; BATINIĆ-HARBELE, I. Pure manganese(III) 5,10,15,20-tetrakis(4-benzoic acid)porphyrin (MnTBAP) is not a superoxide dismutase mimic in aqueous systems: A case of structure-activity relationship as a watchdog mechanism in experimental therapeutics and biology. *J. Bio. Inorg. Chem.*, v. 13, p. 289-302, 2008c.

ROOTHAAN, C.C.J. New Developments in Molecular Orbital Theory. *Rev. Mod. Phys.*, v. 23, p. 69-89, 1951.

SLATER, J.C. *Quantum Theory of Atomic Structure*. New York: McGraw-Hill Book Company, 1960.

SHELNUTT, J.A.; SONG, X.; MA, J.; JIA, S.; JENTZEN, W.; MEDFORTH, C.J. Nonplanar porphyrins and their significance in proteins. *Chem. Soc. Rev.*, v. 27, p. 31-41, 1998.

SHI, Z.; FRANCO, R.; HADDAD, R.; SHELNUTT, J.A.; FERREIRA, G.C. The Conserved Active-Site Loop Residues of Ferrochelatase Induce Porphyrin Conformational Changes Necessary for Catalysis. *Biochem.*, v. 45, p. 2904-2912, 2006.

SPASOJEVIĆ, I.; BATINIĆ-HARBELE, I. Manganese(III) complexes with porphyrins and related compounds as catalytic scavengers of superoxide. *Inorg. Chem. Acta*, v. 317, p. 230-242, 2001.

SPASOJEVIĆ, I.; MENZELEEVA, R.; WHITE, P.S.; FRIDOVICH, I. Rotational Isomers of *N*-Alkylpyridylporphyrins and Their Metal Complexes. HPLC Separation, <sup>1</sup>H NMR and X-ray Structural

Characterization, Electrochemistry, and Catalysis of  $O_2^{\cdot-}$  Disproportionation. *Inorg. Chem.*, v. 41, p. 5874-5881, 2002.

SPASOJEVIĆ, I.; BATINIĆ-HARBELE, I.; REBOUÇAS, J.S.; IDEMORI, Y.M.; FRIDOVICH, I. Electrostatic Contribution in the Catalysis of  $O_2^{\cdot-}$  Dismutation by Superoxide Dismutase Mimics. *J. Bio. Chem.*, v. 278, p. 6831-6837, 2003.

SPASOJEVIĆ, I.; KOS, I.; BENOVIĆ, L.T.; RAJIC, Z.; FELS, D.; DEDEUGD, C.; YE, X.; VUJASKOVIĆ, Z.; REBOUÇAS, J.S.; LEONG, K.W.; DEWHIRST, M.W.; BATINIĆ-HARBELE, I. Bioavailability of metalloporphyrin-based SOD mimics is greatly influenced by a single charge residing on a Mn site. *Free Rad. Research*, v. 45, p. 188-200, 2011.

STEPHENS, P.J.; DEVLIN, F.J.; CHABALOWSKI, C.F.; FRISCH, M.J. Ab initio calculation of vibrational absorption and circular dichroism spectra using density functional force fields. *J. Phys. Chem.*, v. 98, p. 11623-11627, 1994.

SZABO, A.; OSTLUND, N.S. *Modern Quantum Chemistry: Introduction to Advanced Electronic Structure Theory*. New York: McGraw-Hill Book Company, 1989. 461 p. ISBN 0486691861.

TOVMASYAN, A.G.; RAJIC, Z.; SPASOJEVIĆ, I.; REBOUÇAS, J.S.; CHEN, X.; SALVEMINI, D.; SHENG, H.; WARNER, D.S.; BENOVIĆ, L.; BATINIĆ-HARBELE, I. Methoxy-derivatization of alkyl chains increases the *in vivo* efficacy of cationic Mn porphyrins. Synthesis, characterization, SOD-like activity, and SOD-deficient *E. coli* study of *meta* Mn(III) *N*-methoxyalkylpyridylporphyrins. *Dalton Trans.*, v. 40, p. 4111-4121, 2011.

VALDIVIA, A.; PÉREZ-ÁLVAREZ, S.; AROCA-AGUILAR, J.D.; IKUTA, I.; JORDAN, J. Superoxide dismutases: a physiopharmacological update. *J. Physiol. Biochem.*, v. 65, p. 195-208, 2009.

VALKO, M.; RHODES, C.J.; MONCOL, J.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.*, v. 160, p. 1-40, 2006.

VOSKO, S.H.; WILK, L.; NUSAIR, M. Accurate spin-dependent electron liquid correlation energies for local spin density calculations: A critical analysis. *Can. J. Phys.*, v. 58, p. 1200-1211, 1980.

WAGNER, U.G.; PATTRIDGE, K.A.; LUDWIG, M.L.; STALLINGS, W.C.; WERBER, M.M.; OEFNER, C.; FROLOW, F.; SUSSMAN, J.L. Comparison of the crystal structure of genetically engineered human manganese superoxide dismutase and manganese

superoxide dismutase from *Thermus thermophilus*: Differences in dimer-dimer interactions *Prot. Sci.*, v. 2, p. 814-825, 1993. Disponível em <http://www.pdb.org>. Acessado em 15 de Novembro de 2011.

WIJESEKERA, T.P.; DOLPHIN, D. Synthetic Aspects of Porphyrin and Metalloporphyrin Chemistry. *Metalloporphyrins in Catalytic Oxidation*, Ed. R.A. Sheldon, Marcel Denker: New York, Cap. 7, p. 193-239, 1994.

ZHANG, X.B.; GUO, C.C.; LI, Z.Z.; SHEN, G.L.; YU, R.Q. An Optical Fiber Chemical Sensor for Mercury Ions Based on a Porphyrin Dimer. *Anal. Chem.*, v. 74, p. 821-825, 2002.

## 2 OTIMIZAÇÃO DA SÍNTESE DE 3-N-PIRIDILPORFIRINAS

---

### **Observação:**

*O objeto de estudo deste capítulo encontra-se em processo de patenteamento, o que proíbe a inclusão, nesta dissertação de domínio público, de alguns detalhes específicos das condições experimentais; todos os aspectos de caráter conceituais gerais são, contudo, apresentados.*

### **2.1 INTRODUÇÃO**

As *N*-piridilporfirinas ( $H_2TPyP$ ) (Fig. 2.1) pertencem a uma classe de *meso*-porfirinas sintéticas de interesse químico, biológico e fotoquímico (KALYANASUNDARAM, 1984; Rebouças et al.; 2002; BATINIĆ-HARBELE et al., 2010; 2011). A depender da posição relativa do nitrogênio do grupo piridil, essas porfirinas podem existir na forma de três isômeros: *orto* ( $H_2T-2-PyP$ ), *meta* ( $H_2T-3-PyP$ ) e *para* ( $H_2T-4-PyP$ ), como apresentados na Figura 2.1. Essas porfirinas neutras são lipofílicas, solúveis em meio orgânico e insolúveis em água, mas a protonação dos nitrogênios piridínicos em meio ácido ( $pH < 4$ ) resulta em um sal hidrofílico solúvel em meio aquoso (HAMBRIGHT et al., 1985; REBOUÇAS et al., 2002). Esse comportamento anfipático pode ser alterado pela alquilação dos nitrogênios piridínicos, o que representa uma rota sintética simples para a preparação de porfirinas catiônicas hidrossolúveis (HAMBRIGHT et al., 1985; KALYANASUNDARAM, 1984; BATINIĆ-HARBELE et al., 1999). A lipofilicidade desses derivados catiônicos pode ser modulada pela adição de cadeias orgânicas curtas ou

longas, originando compostos menos ou mais lipofílicos, respectivamente (KOS et al., 2009a; 2009b).

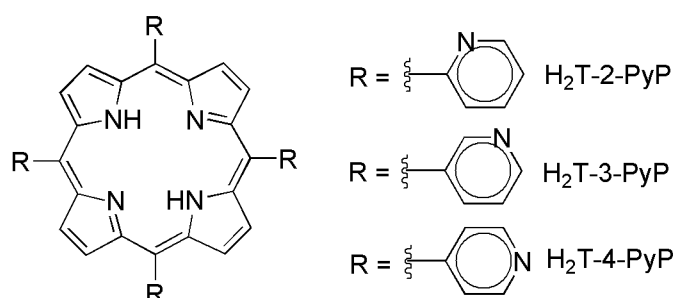


Figura 2.1 - Isômeros das *N*-piridilporfirinas.

As Mn-porfirinas catiônicas derivadas das *N*-piridilporfirinas têm sido amplamente empregadas como agente terapêutico em uma variedade de doenças relacionadas ao estresse oxidativo (BATINIĆ-HARBELE et al., 1998; 2011).

Em um procedimento típico, a síntese dessas porfirinas de manganês envolve a alquilação da  $\text{H}_2\text{T-2-PyP}$  ou  $\text{H}_2\text{T-3-PyP}$  por um agente alquilante (tosilato ou brometo de alquila), seguido por purificação, metalação com um sal de  $\text{Mn}^{2+}$  e subsequente purificação. Este procedimento leva a rendimentos superiores a 90%, baseados na porfirina de partida (BATINIĆ-HARBELE et al., 1999) e as técnicas de caracterização da identidade e pureza desses complexos de Mn estão bem estabelecidas (REBOUÇAS et al., 2008b; 2009; PINTO et al., 2012).

No entanto, a síntese das porfirinas precursoras  $\text{H}_2\text{T-2-PyP}$  e  $\text{H}_2\text{T-3-PyP}$ , obtidas da condensação de pirrol e do isômero apropriado do piridilcarboxaldeído em um ácido carboxílico (que age como solvente e catalisador), tem levado a rendimentos muito baixos (HAMBRIGHT et al., 1985; IAMAMOTO et al., 1994). Dessa maneira, a obtenção da  $\text{H}_2\text{T-2-PyP}$  e da  $\text{H}_2\text{T-3-PyP}$  permanece como o gargalo sintético da rota de síntese dos moduladores redox.

Enquanto a otimização da síntese da H<sub>2</sub>T-2-PyP está sendo realizada por outra integrante do Grupo de Porfirinas Aplicadas a Problemas Químicos, Medicinais e Tecnológicos (UFPB), a otimização da síntese da H<sub>2</sub>T-3-PyP é o objeto de estudo deste capítulo.

### 2.1.1 Métodos Clássicos da Síntese de Porfirinas

A síntese de *meso*-arilporfirinas a partir de pirrol e aldeído teve início em 1936, quando Rothemund preparou com sucesso mais de trinta porfirinas partindo desses reagentes (ROTHERMUND, 1936).

Dentre as porfirinas preparadas se encontrava a *meso*-tetrafenilporfirina (H<sub>2</sub>TPP, Fig. 2.2) que foi preparada pelo aquecimento de pirrol e benzaldeído em piridina por 48 horas em autoclave. O rendimento obtido não ultrapassou 5% e o produto isolado mostrou estar contaminado com a respectiva clorina (porfirina reduzida) (ROTHERMUND, 1939).

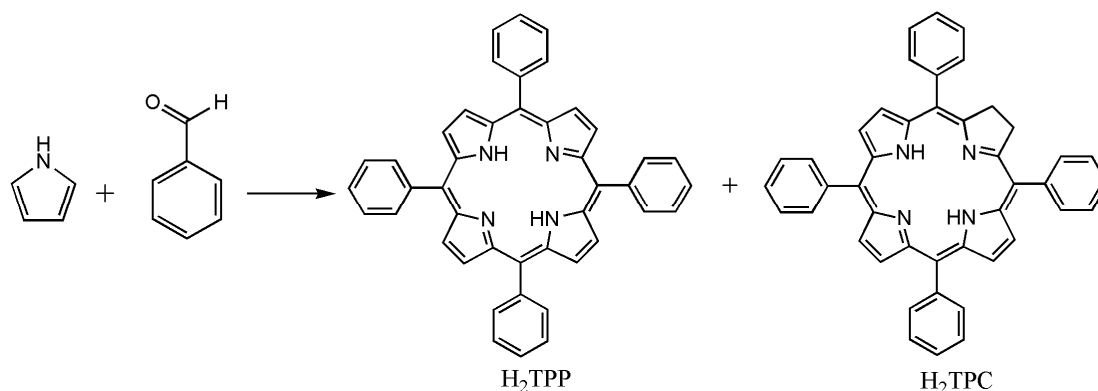


Figura 2.2 - Condensação de pirrol e benzaldeído resultando em *meso*-tetrafenilporfirina (H<sub>2</sub>TPP) e a correspondente *meso*-tetrafenilclorina (H<sub>2</sub>TPC).

Adler, Longo e colaboradores, após um estudo mecanístico da síntese de porfirinas (ADLER et al., 1964), propuseram alterações no método descrito por Rothemund e elevaram o rendimento da

síntese da H<sub>2</sub>TPP de ~5% para ~20%. As modificações incluíram uso de sistema aberto ao ar, mudança do solvente (de piridina para ácido propiônico, que também atua como catalisador), redução do tempo de reação, que passou de 48 horas para 30 minutos, e redução da temperatura (141 °C, ponto de ebulição do ácido propiônico) (ADLER et al., 1967).

Juntamente com a presença de traços de clorina como contaminante, outros problemas, como baixa reprodutibilidade e produção de vários subprodutos comumente denominados “polipirróis”, são encontrados nesta metodologia e fizeram com que Lindsey e colaboradores introduzissem novas modificações que resultaram em rendimentos próximos a 40% (LINDSEY et al., 1987).

A proposta de síntese apresentada por Lindsey e colaboradores consiste em separar a síntese em duas etapas e está ilustrada na Figura 2.3. Na primeira etapa um produto termodinamicamente estável conhecido como porfirinogênio é formado a partir da condensação de pirrol e aldeído em condições apropriadas, tais como quantidade equimolar de reagentes, condição de reação mais branda (temperatura ambiente) em solvente apolar e adição de catalisador ácido (BF<sub>3</sub> ou ácido trifluoroacético). Na etapa seguinte, o porfirinogênio é diretamente convertido à porfirina através da adição de um agente oxidante ao sistema, usualmente uma quinona. O método de Lindsey busca minimizar reações paralelas competitivas que levam à formação de polímeros de pirrol ou polipirróis, como mostra a Figura 2.3 (LINDSEY; WAGNER, 1989).

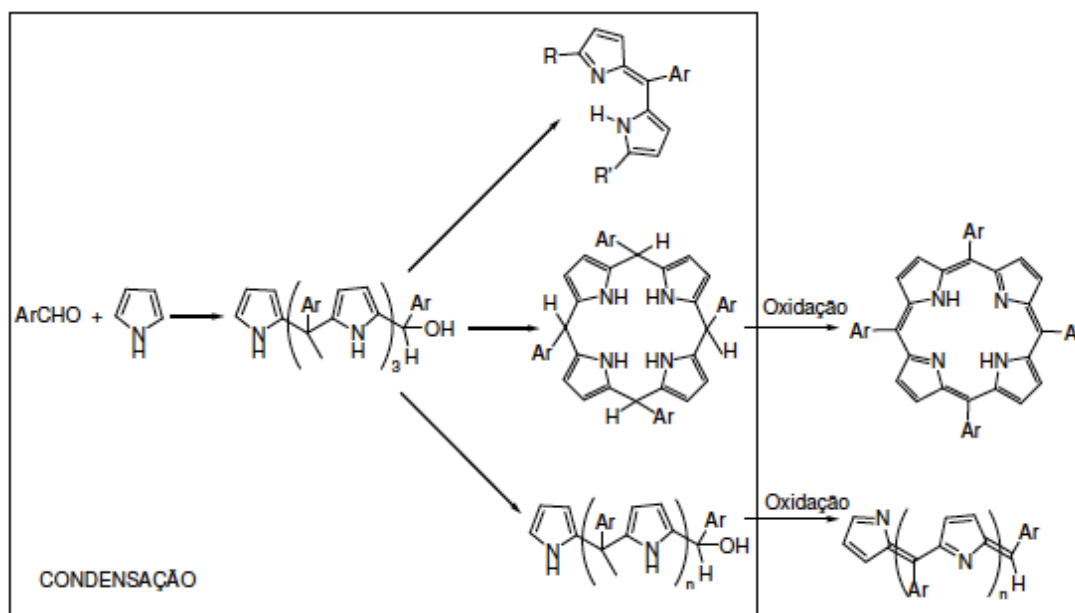


Figura 2.3 - Esquema proposto por Lindsey para a síntese de porfirinas *meso*-substituídas em duas etapas em um único sistema reacional (LINDSEY; WAGNER, 1989).

Enquanto a metodologia proposta por Lindsey não permite a formação de *N*-piridilporfirinas, o método de Adler e Longo resulta em rendimentos baixos da ordem de 6 % e com baixa reprodutibilidade (IAMAMOTO et al., 1994). Nesse contexto, a otimização de uma metodologia de síntese para as *N*-piridilporfirinas importantes como precursoras de modelos biomiméticos de SOD se mostra uma necessidade atual.

## 2.2 OBJETIVOS

O objetivo deste capítulo é a otimização da síntese da  $\text{H}_2\text{T-3-PyP}$  a partir da condensação de pirrol e 3-carboxipiridinaldeído, como apresentado na Figura 2.4, utilizando as ferramentas quimiométricas de planejamento fatorial completo, planejamento fatorial fracionário e superfície de resposta.

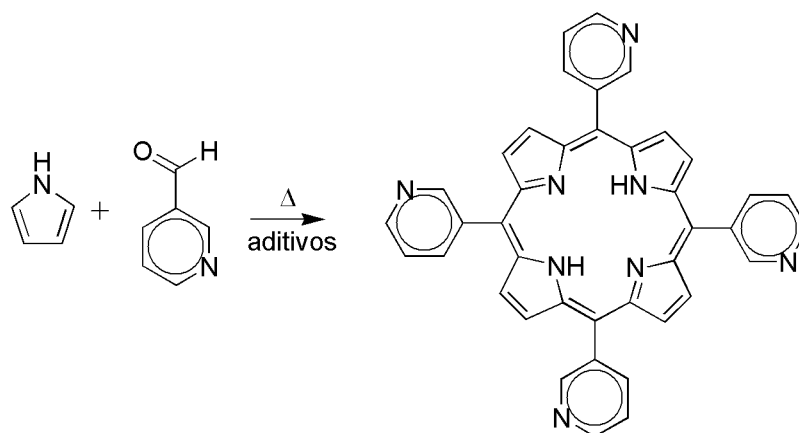


Figura 2.4 - Esquema simplificado da obtenção da H<sub>2</sub>T-3-PyP.

## 2.3 METODOLOGIA EXPERIMENTAL

### 2.3.1 Equipamentos

#### A. Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

A análise de CCD foi realizada em lâminas de microscópio recobertas com SiO<sub>2</sub> de acordo com seguinte procedimento: a sílica para CCD (CAS 112926-00-8, sem indicador fluorescente) foi suspensa em uma mistura de solventes (clorofórmio/metanol 9:1) e a suspensão foi mantida sob agitação magnética. Lâminas microscópicas previamente lavadas e secas foram introduzidas verticalmente, duas a duas, na suspensão e, removidas rapidamente. Após separadas, estas foram colocadas em estufa a 100 °C durante 1 hora para ativação. Após o resfriamento foram armazenadas em recipientes hermeticamente fechados.

#### B. Câmara com Luz Ultravioleta

A revelação da CCD para verificação qualitativa da formação da porfirina, que apresenta fluorescência vermelha característica, foi realizada em uma câmara escura munida de luz ultravioleta.

## C. Espectrofotômetro UV-vis

Os espectros eletrônicos de absorção na região do UV-visível foram registrados no espectrofotômetro Shimadzu, modelo UV-1800, ou Hewlett-Packard, modelo HP 8453 diode-array, ambos com resolução de 1 nm, utilizando cubetas de quartzo com 10 mm de caminho óptico.

### 2.3.2 Reagentes

Os reagentes utilizados neste capítulo foram todos de grau P.A. ou melhor, das marcas Aldrich, Reagen ou Carlo Erba, e usados sem purificação prévia. H<sub>2</sub>T-3-PyP ( $\geq 97\%$ ) utilizada para a produção das soluções-padrão foi obtida da Frontier Scientific Inc. (Logan, UT, EUA).

### 2.3.3 Síntese da H<sub>2</sub>T-3-PyP

Devido à quantidade elevada de experimentos, decidiu-se realizar as reações de otimização em micro escala.

A síntese da H<sub>2</sub>T-3-PyP consistiu na adição do pirrol, 3-carboxipiridinaldeído, um ácido carboxílico e alguns aditivos a um tubo de ensaio de 10 mL, perfazendo um volume total de 3 mL. O tubo foi então fechado com tampa de borracha tipo “batoque”, agitado manualmente por 1 minuto e submerso em banho de óleo previamente aquecido a uma temperatura pré-estabelecida.

Após um determinado tempo de reação, o tubo de ensaio foi removido do banho de óleo e resfriado até a temperatura ambiente. Em seguida, quando necessário, outros aditivos foram adicionados ao meio de reação, o tubo foi novamente fechado, agitado por 1 minuto e deixado em repouso por um período de tempo pré-estabelecido.

Um ácido inorgânico previamente padronizado foi adicionado ao sistema para auxiliar na análise dos produtos. O tubo de ensaio foi então levado à centrífuga e a fase aquosa foi então transferida para um balão volumétrico de 100 mL. Uma certa quantidade do mesmo ácido inorgânico foi adicionada ao balão volumétrico para ajustar a acidez do sistema e o volume foi completado com água destilada. Por último, alíquotas da solução do balão volumétrico de 100 mL foram transferidas com uma micropipeta para outro balão volumétrico de 10 mL. O volume deste foi completado com o ácido inorgânico a uma concentração de 1,00 mol/L.

Esta última solução foi denominada “solução estoque-amostra” e utilizada para a quantificação do rendimento.

### **2.3.4 Análise UV-vis e Rendimento**

A quantidade da H<sub>2</sub>T-3-PyP obtida nos ensaios de otimização foi determinada pelo “Método de Adição de Padrão”. Para isso foi necessário a preparação dos padrões.

#### **2.3.4.1 Preparação de Padrões**

Padrões com diferentes concentrações foram preparados a partir da diluição de uma “solução estoque-padrão” contendo ~2 mg da porfirina comercial em ~1 mL de HCl 1,00 mol/L. A concentração analítica da “solução estoque-padrão” foi determinada espectrofotometricamente utilizando a absorvidade molar da banda Soret da H<sub>2</sub>T-3-PyP na forma dicátion ( $\lambda_{\text{max}} = 434 \text{ nm}$ ,  $\epsilon_{434} = 306.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) (NERI; WILSON, 1973; KALYANASUNDARAM, 1983). Em seguida, quatro padrões com concentrações que aumentam proporcionalmente foram preparados a partir da diluição do estoque em 100 mL de HCl 1,00 mol/L. A concentração analítica de cada solução padrão foi calculada por diluição e confirmada

espectrofotometricamente.

#### **2.3.4.2 Análise de Rendimento**

Inicialmente, uma alíquota da “solução estoque-amostra” foi diluída em HCl (previamente padronizado a 1,00 mol/L) em uma cubeta de quartzo e o espectro UV-vis da solução resultante foi registrado. Em seguida, esse mesmo procedimento foi repetido utilizando soluções padrão da H<sub>2</sub>T-3-PyP como solvente. A concentração da H<sub>2</sub>T-3-PyP na “solução estoque” foi determinada a partir da curva de calibração resultante e o rendimento das reações foram calculados considerando-se todas as diluições realizadas durante o processo de isolamento e quantificação.

#### **2.3.5 Acompanhamento da Reação por CCD**

Ao final de cada reação, amostras foram retiradas com auxílio de um capilar e aplicadas a uma placa de CCD-SiO<sub>2</sub> previamente preparada e ativada. A placa foi então colocada em um recipiente fechado contendo o eluente. Após a separação dos componentes da reação e secagem do eluente, a placa foi levada para revelação em luz negra. Como a porfirina é fluorescente, a presença de uma mancha vermelha/rosa na placa de sílica sob radiação da luz negra revela a formação de porfirina.

#### **2.3.6 Planejamento e Análise dos Experimentos**

Os modelos de otimização escolhidos foram o planejamento fatorial completo e fracionário e a modelagem de superfície de resposta. Todos os planejamentos foram simulados com o auxílio do programa estatístico MINITAB.

## **2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **2.4.1 Rota de Síntese**

A rota escolhida para a otimização da síntese da H<sub>2</sub>T-3-PyP foi derivada do método proposto por Adler e Longo (ADLER et al., 1967) em que pirrol e 3-carboxipiridinaldeído são condensados em ácido carboxílico. Para a otimização do rendimento da H<sub>2</sub>T-3-PyP 94 ensaios foram realizados utilizando técnicas quimiométricas como planejamento fatorial completo, planejamento fatorial fracionário e superfície de resposta.

Foi necessário o desenvolvimento de uma metodologia para a quantificação do rendimento adaptada às condições de reações em microescala, de maneira que o isolamento do produto seja evitado já que iria requerer etapas cromatográficas.

### **2.4.2 Rendimentos das Reações**

A rápida quantificação do rendimento foi realizada utilizando espectroscopia eletrônica de absorção na região do UV-vis através do “Método de Adição de Padrão”. A absorção característica e intensa das porfirinas na região do visível possibilita o uso da espectroscopia eletrônica de absorção UV-vis para verificação de sua formação e, se corrigidos os efeitos de matriz, quantificação da concentração.

Um espectro eletrônico de absorção típico registrado em HCl é apresentado na Figura 2.5 e comprova a formação da porfirina de interesse (H<sub>2</sub>T-3-PyP) pela presença das bandas características: a banda Soret em 433 nm e 2 bandas Q em 583 e 632 nm (KALYANASUNDARAM, 1984). Um dos problemas enfrentados na síntese de porfirinas é a obtenção de polipirróis, cujas naturezas e quantidades variam de um ensaio para outro. Esses polipirróis, por

serem coloridos, alteram a linha de base na análise de cada ensaio (efeito de matriz), e embora as condições de reações de síntese de porfirina com quantificação de rendimento por análise espectrofotométrica, sem isolamento do material, sejam descritas na literatura (LINDSEY et al., 1987), estes têm sido efetuados utilizando a lei de Lambert-Beer diretamente em algum comprimento de onda específico (usualmente o máximo da Soret), sem qualquer estratégia para se eliminar ou minimizar o efeito de matriz.

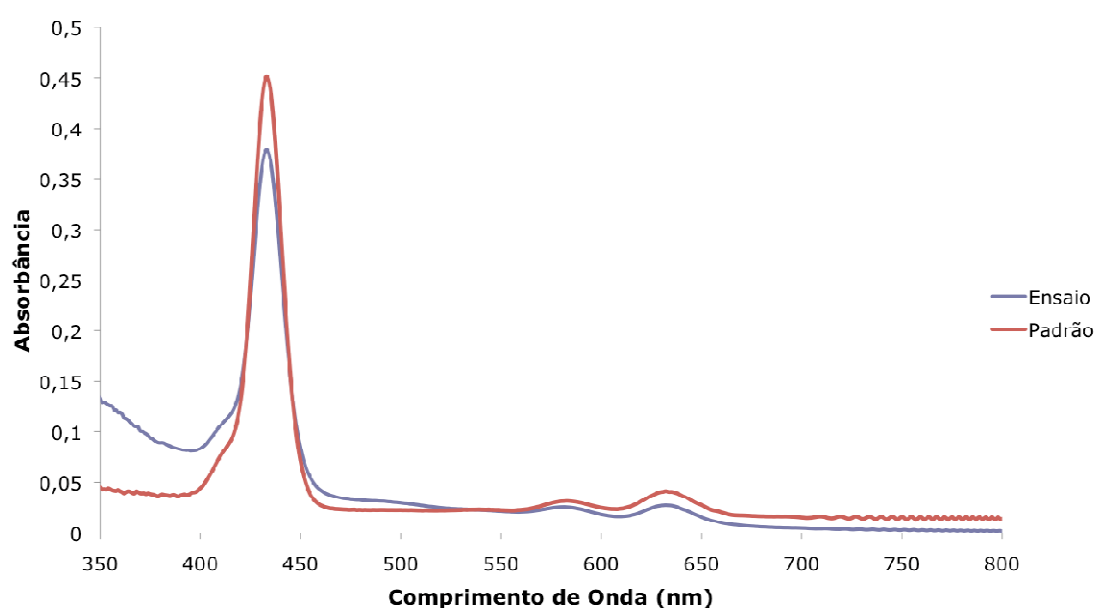


Figura 2.5 - Espectro eletrônico de absorção na região do UV-vis da alíquota de um ensaio da síntese da  $H_2T-3-PyP$  e da amostra autêntica (padrão). Espectros registrados em  $HCl$  (1,0 mol/L).

O procedimento utilizado neste trabalho para quantificação da  $H_2T-3-PyP$  formada fez uso do Método de Adição de Padrão para correção da linha de base, minimizando o efeito de matriz. Especificamente, utilizou-se Método de Adição de Padrão por partição da amostra que consiste em adicionar diferentes soluções padrões com concentrações que aumentam proporcionalmente às alíquotas de uma amostra desconhecida.

Em uma cubeta de quartzo, uma alíquota da amostra foi

diluída em HCl previamente padronizado; as medidas seguintes foram realizadas de maneira semelhante, porém utilizando as soluções padrão de H<sub>2</sub>T-3-PyP como solvente. A concentração de H<sub>2</sub>T-3-PyP foi determinada a partir da curva de calibração resultante e o rendimento da reação foi calculado considerando todas as diluições do processo de isolamento e quantificação. Naturalmente, uma curva de calibração foi construída para cada reação.

O uso do HCl como solvente para a quantificação do rendimento foi escolhido com base nas propriedades ácido-base do macrociclo e na solubilidade limitada das *N*-piridilporfirinas. Esse comportamento ácido-base pode ser descrito em função dos nitrogênios piridínicos e pirrólicos, que a pK<sub>a</sub> ~ 3, origina as espécies *N*-piridil protonadas e a pK<sub>a</sub> ~ 2 origina as espécies dications (Fig. 2.6), que, ao contrário das *N*-piridilporfirinas neutras, são solúveis em água.

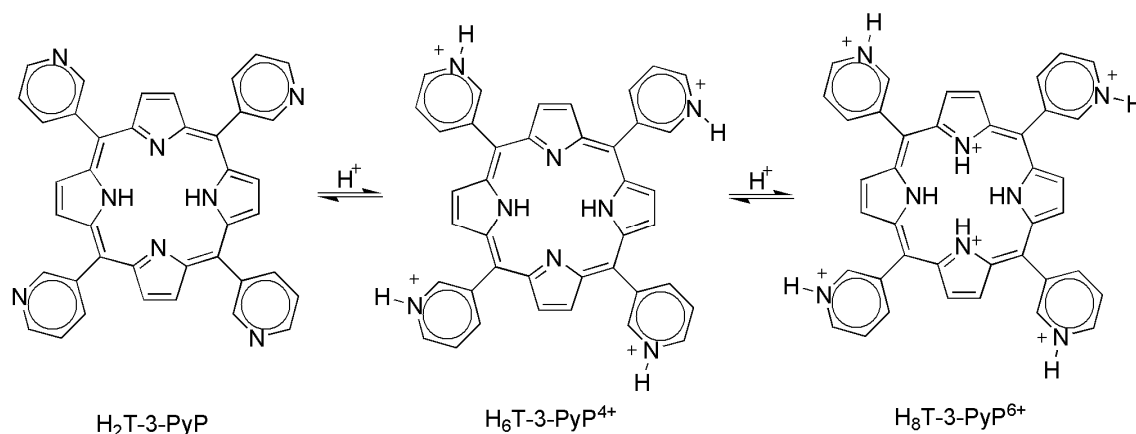


Figura 2.6 - Comportamento ácido-base da H<sub>2</sub>T-3-PyP.

### 2.4.3 Planejamentos Fatoriais

O uso de técnicas quimiométricas na síntese de porfirinas ainda é pouco difundido. Os trabalhos que utilizam essas técnicas se limitam ao estudo de uma variável por vez, como foi o caso das porfirinas otimizadas por Lindsey (LINDSEY et al., 1987; 1989).

Uma exceção notável é o caso do grupo de Gonsalves (JOHNSTONE et al., 1996) que otimizou a síntese de uma variedade de porfirinas derivadas da  $H_2TPP$  utilizando o Método de Otimização Simplex; algumas das condições determinadas por Gonsalves e colaboradores representavam regiões experimentais consideravelmente distantes daquelas adotadas comumente prescritas nos procedimentos clássicos.

O planejamento dos experimentos iniciou com a escolha de 7 fatores, codificados de A a G, a 2 níveis cada. Apesar de não ser possível revelar quais são exatamente os fatores e níveis investigados devido ao processo de patenteamento, utilizaram-se fatores comuns em sínteses orgânicas, como temperatura, concentração de reagentes e catalisadores.

#### **2.4.3.1 1º Planejamento Fatorial $2^2$**

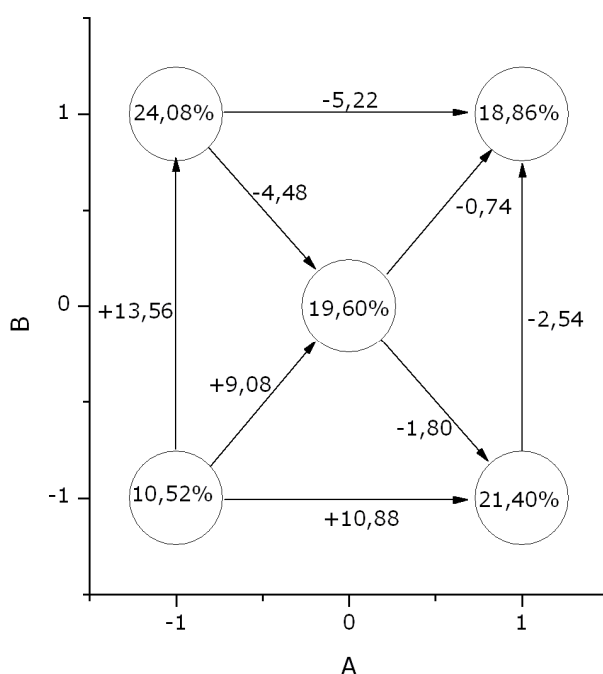
Um primeiro planejamento fatorial completo exploratório com apenas 2 fatores (A e B), a 2 níveis cada, foi efetuado com o objetivo de verificar as tendências de rendimento dentro da região limitada pelos níveis destes dois fatores em torno de um ponto central (0,0). Os níveis inicialmente escolhidos para A e B foram derivados das condições clássicas de síntese de porfirinas no método de Adler e Longo (ADLER et al., 1964) e daqueles determinados previamente no Grupo de Porfirinas Aplicadas a Problemas Químicos, Medicinais e Tecnológicos (UFPB) para a otimização do isômero *orto*,  $H_2T-2-PyP$ . Uma descrição mais pormenorizada deste planejamento será incluída como um exemplo típico do tipo de análise que guiou a interpretação e motivou os demais planejamentos.

A matriz deste planejamento fatorial está apresentada na Tabela 1, juntamente com os rendimentos obtidos nos ensaios.

Tabela 1 - Rendimentos do 1º Planejamento Fatorial 2<sup>2</sup> da síntese da H<sub>2</sub>T-3-PyP.

| Ensaio | Fatores |    | Rendimento |
|--------|---------|----|------------|
|        | A       | B  |            |
| 1      | -1      | -1 | 10,52%     |
| 2      | -1      | +1 | 24,08%     |
| 3      | +1      | -1 | 21,40%     |
| 4      | +1      | +1 | 18,86%     |
| 5      | 0       | 0  | 19,60%     |

De acordo com a Tabela 1, quando se usa o nível -1 do fator A e se passa do nível -1 para +1 do fator B o rendimento da síntese da H<sub>2</sub>T-3-PyP passa de 10,52% para 24,08%. Ocorre portanto um aumento de 13,56%. Quando se utiliza o nível +1 do fator A e se passa do nível -1 para +1 do fator B, o rendimento diminui 2,54%. Isso mostra que há efeito de interação AB entre estes fatores, uma vez que o efeito do fator B depende do nível em que se encontra o fator A. Naturalmente, o efeito do fator A também depende do fator B. A Figura 2.7 ilustra as respostas em função dos níveis iniciais dos fatores A e B, incluindo o ponto central.

Figura 2.7 - Diagrama do 1º planejamento fatorial 2<sup>2</sup> com os rendimentos e contrastes.

Examinando o diagrama pode-se concluir que os melhores rendimentos acontecem quando os fatores A e B estão em níveis opostos um ao outro, (+1,-1) ou (-1,+1). Além disso, o planejamento indica que o uso dos níveis mais baixos (-1,-1) é prejudicial ao rendimento da H<sub>2</sub>T-3-PyP.

Como o efeito de um fator depende do nível do outro fator, ocorre interação entre os fatores A e B, sendo necessário calcular e analisar os efeitos de cada fator isolado como também suas interações. Na Tabela 2 estão apresentados os valores desses efeitos.

Tabela 2 - Efeitos principais e da interação dos fatores A e B para o 1º Planejamento Fatorial 2<sup>2</sup> para a síntese da H<sub>2</sub>T-3-PyP.

| Termos | Efeitos |
|--------|---------|
| A      | 2,83    |
| B      | 5,51    |
| AB     | -8,05   |

Os fatores A e B e a interação AB apresentam efeitos elevados indicando que todos são significativos. Os efeitos de A e B são positivos, indicando que se deve aumentar o nível desses fatores, enquanto que a interação, por ser negativa, indica que os melhores rendimentos se encontram quando os fatores apresentam níveis opostos. Como em termos absolutos o efeito das interações é maior que os efeitos principais, a interação entre A e B é bastante significativa.

Para completar a análise dos efeitos feita acima, traçou-se o gráfico normal dos efeitos, que está apresentado na Figura 2.8. De acordo com este gráfico, os fatores A e B e a interação entre eles são significativos, já que estes não se ajustam à reta que cruza a probabilidade acumulada de 50% quase sobre o ponto zero do eixo das abscissas.

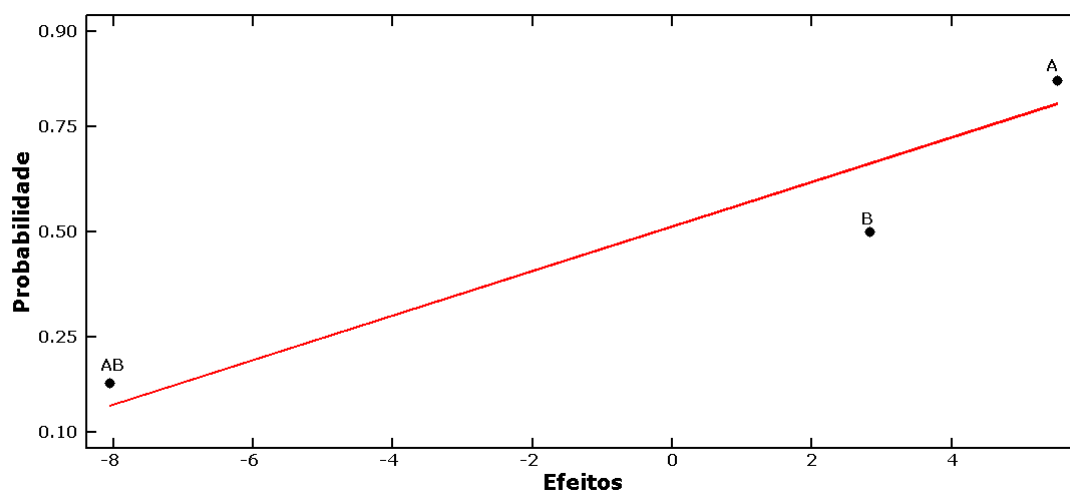


Figura 2.8 - Gráfico Normal dos Efeitos do 1º Planejamento Fatorial  $2^2$  para a síntese da  $H_2T-3-PyP$ .

Por fim fez-se uma modelagem da superfície de resposta, que está ilustrada na Figura 2.9.

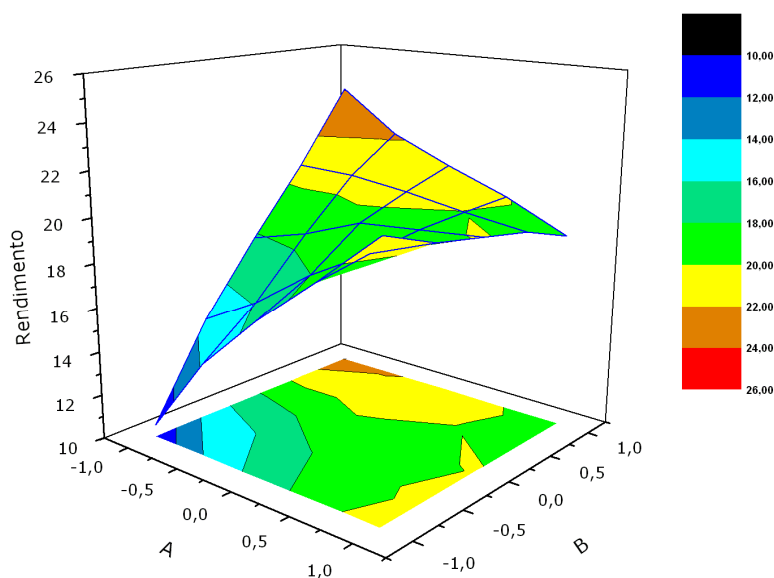


Figura 2.9 - Superfície de resposta do 1º Planejamento Fatorial  $2^2$ .

A região de maior rendimento, como foi indicada pelas análises anteriores, se encontra com níveis menores de A e níveis maiores de B. Com isso um segundo planejamento fatorial  $2^2$ , destacado em vermelho na Figura 2.10, foi idealizado.

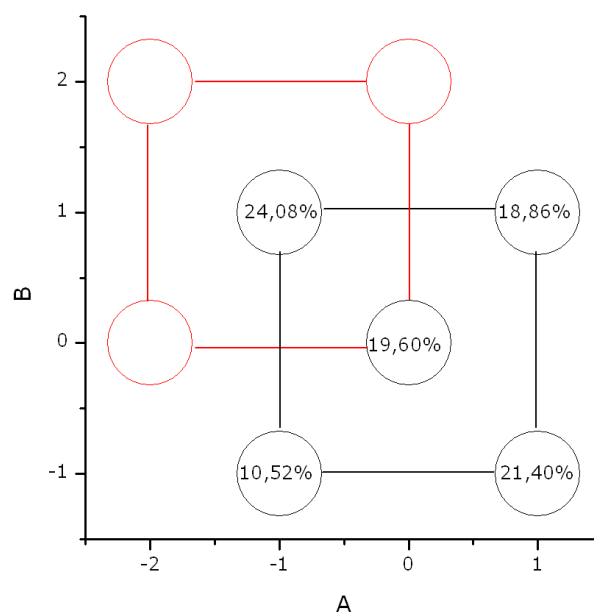


Figura 2.10 – Diagrama do 1º e do 2º planejamentos.

#### 2.4.3.2 2º Planejamento Fatorial 2<sup>2</sup>

A matriz de planejamento do segundo planejamento, assim como os rendimentos obtidos nos ensaios, está apresentada na Tabela 3. Os resultados são mostrados na Figura 2.11.

Tabela 3 - Rendimentos do 2º Planejamento Fatorial 2<sup>2</sup> da síntese da H<sub>2</sub>T-3-PyP.

| Ensaio | Fatores |    | Rendimento |
|--------|---------|----|------------|
|        | A       | B  |            |
| 1      | -2      | 0  | 16,80%     |
| 2      | -2      | +2 | 4,24%      |
| 3      | 0       | 0  | 19,60%     |
| 4      | 0       | +2 | 12,08%     |
| 5      | -1      | +1 | 24,08%     |

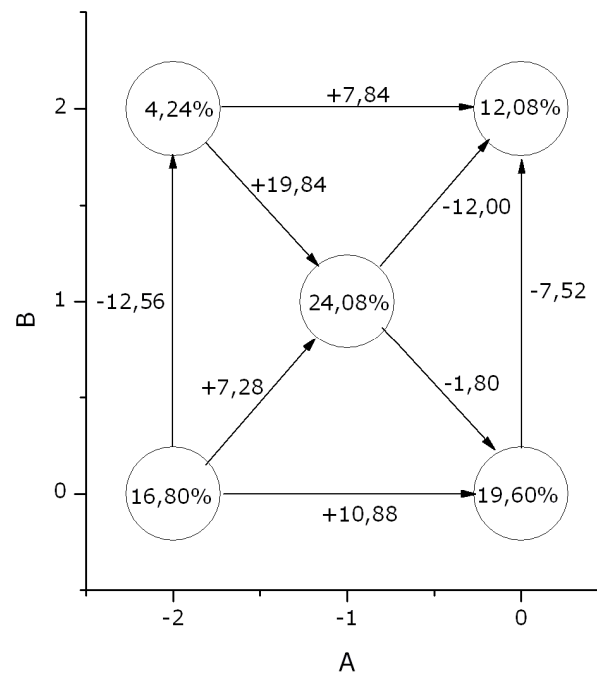


Figura 2.11 - Diagrama do 2º planejamento fatorial  $2^2$  com os rendimentos e contrastes.

Nesta região experimental, observa-se que novamente o efeito do fator B depende do nível em que se encontra o fator A e vice-versa, indicando a que a interação AB é importante. Por exemplo, quando se usa o nível -2 do fator A e se passa do nível 0 para o nível +2 do fator B, o rendimento diminui 12,56%, mas quando se usa o nível 0 do fator A e se passa do nível 0 para o nível +2 do fator B, o rendimento também diminui, mas a perda de rendimento é de 7,52%.

Examinando o diagrama da Figura 2.11, pode-se concluir que os melhores rendimentos se encontram no nível central deste planejamento e deve-se evitar níveis elevados de B.

Na Tabela 4 estão apresentados os valores dos efeitos principais e da interação dos fatores.

Tabela 4 - Efeitos principais e da interação dos fatores A e B para o 2º Planejamento Fatorial 2<sup>2</sup> para a síntese da H<sub>2</sub>T-3-PyP.

| Termos | Efeitos |
|--------|---------|
| A      | 5,32    |
| B      | -10,04  |
| AB     | 2,52    |

Os valores indicam que todos os efeitos são significativos. O valor positivo do efeito do fator A indica que experimentos utilizando níveis mais altos desse fator devem ser realizados. Já o valor negativo do efeito do fator B indica que aumentar os níveis desse fator, como foi proposto pelo 1º planejamento, não leva a uma região de máximo rendimento.

O gráfico normal dos efeitos está ilustrado na Figura 2.12 e de acordo com eles, todos os efeitos são significativos, sendo a interação entre os fatores A e B a mais significativa.

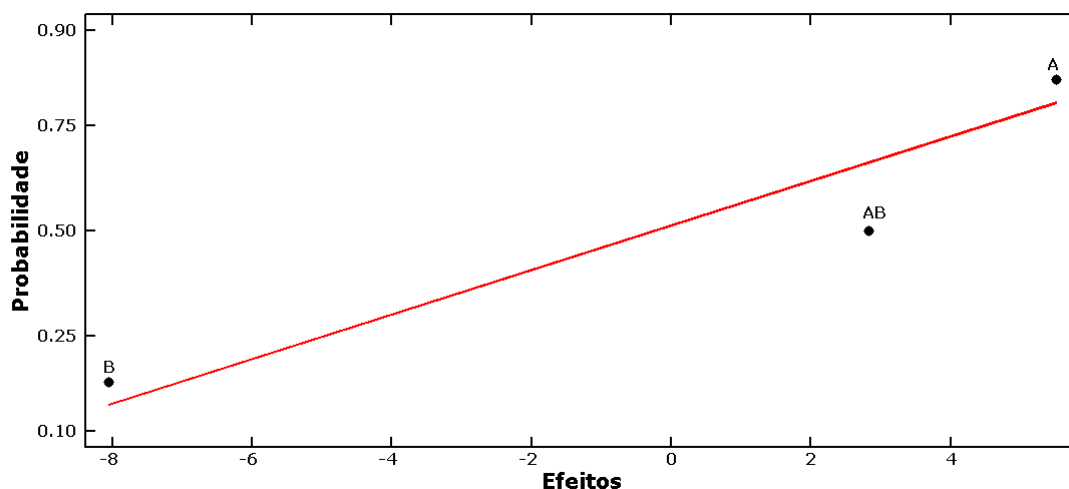


Figura 2.12 - Gráfico Normal dos Efeitos do 2º Planejamento Fatorial 2<sup>2</sup> para a síntese da H<sub>2</sub>T-3-PyP.

Como os fatores A e B são significativos, construiu-se o gráfico da superfície de resposta, que está apresentado na Figura 2.13. De acordo com o gráfico a região de maior rendimento se encontra no centro da superfície, no nível -1 do fator A e +1 do fator B.

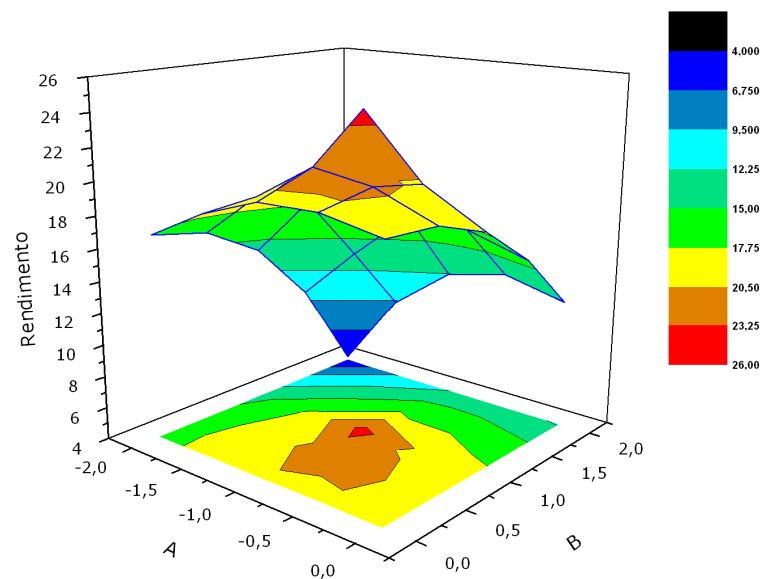


Figura 2.13 - Superfície de resposta do 2º Planejamento Fatorial  $2^2$ .

A proposta de diminuir os níveis do fator A e aumentar o fator B não levou a melhores rendimentos. Como no 1º planejamento o rendimento obtido para o nível +1 do fator A e -1 do fator B foi elevado ( $\sim 24\%$ ), resolveu-se investigar a região de nível maior de A, mantendo os mesmos níveis de B. Com isso um terceiro planejamento fatorial  $2^2$ , destacado em azul na Figura 2.14, foi proposto.

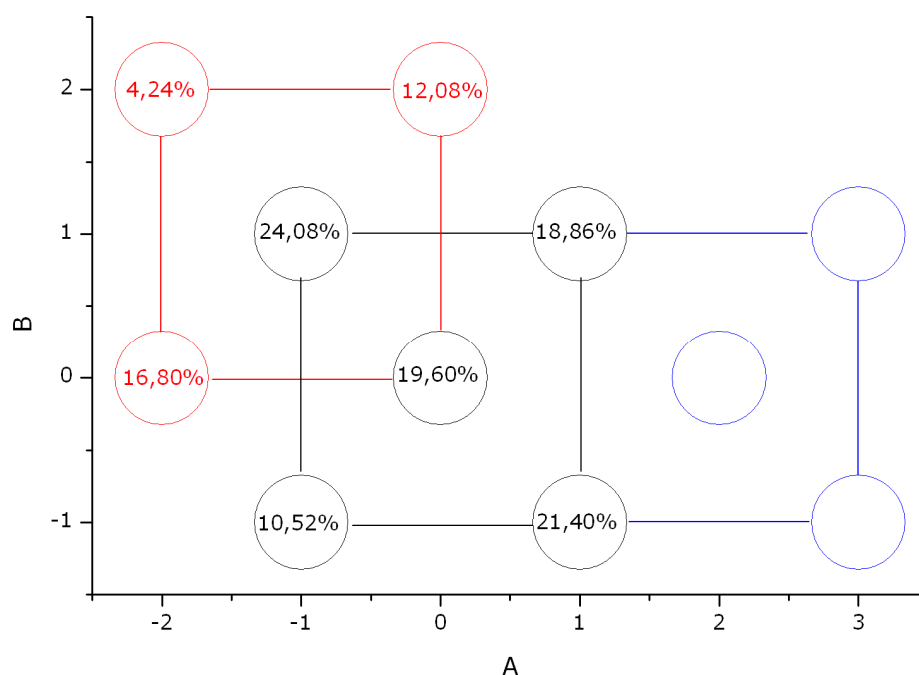


Figura 2.14 – Diagrama com o 1º, 2º e 3º planejamento.

### 2.4.3.3 3º Planejamento Fatorial $2^2$

A matriz de planejamento do terceiro planejamento, que foi realizado com níveis maiores do fator A e mesmos níveis do fator B que o primeiro planejamento, está descrito na Tabela 5, que lista também os rendimentos obtidos nos ensaios. A apresentação dos rendimentos é também efetuada de modo gráfico na Figura 2.15.

Tabela 5 - Rendimentos do 3º Planejamento Fatorial  $2^2$  da síntese da  $H_2T$ -3-PyP.

| Ensaio | Fatores |    | Rendimento |
|--------|---------|----|------------|
|        | A       | B  |            |
| 1      | +1      | -1 | 21,40%     |
| 2      | +1      | +1 | 18,86%     |
| 3      | +3      | -1 | 15,72%     |
| 4      | +3      | +1 | 9,73%      |
| 5      | +2      | 0  | 12,82%     |

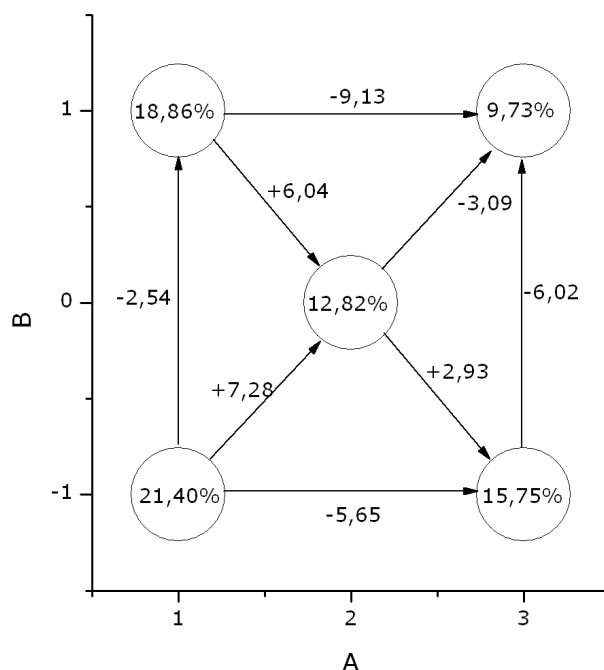


Figura 2.15 - Diagrama do 3º planejamento fatorial  $2^2$  com os rendimentos e contrastes.

Examinando o diagrama da Figura 2.15 pode-se concluir que os melhores rendimentos se encontram no nível menor de A. Na Tabela 6 estão apresentados os valores dos efeitos principais e da interação dos fatores, de onde se infere que apenas os efeitos principais são significativos. Como o valor do efeito A é quase o dobro do valor do efeito B, a influência do fator A na resposta dos ensaios deve ser mais significativa do que o fator B. O valor negativo desses efeitos indica que aumentar os níveis desses fatores afasta da região de máximo rendimento.

Tabela 6 - Efeitos principais e da interação dos fatores A e B para o 3º Planejamento Fatorial  $2^2$  para a síntese da  $H_2T$ -3-PyP.

| Termos | Efeitos |
|--------|---------|
| A      | -7,39   |
| B      | -4,28   |
| AB     | -1,74   |

O gráfico normal dos efeitos, apresentado na Figura 2.16, mostra que nenhum dos efeitos são significativos como apontado pelo valor numérico dos efeitos.

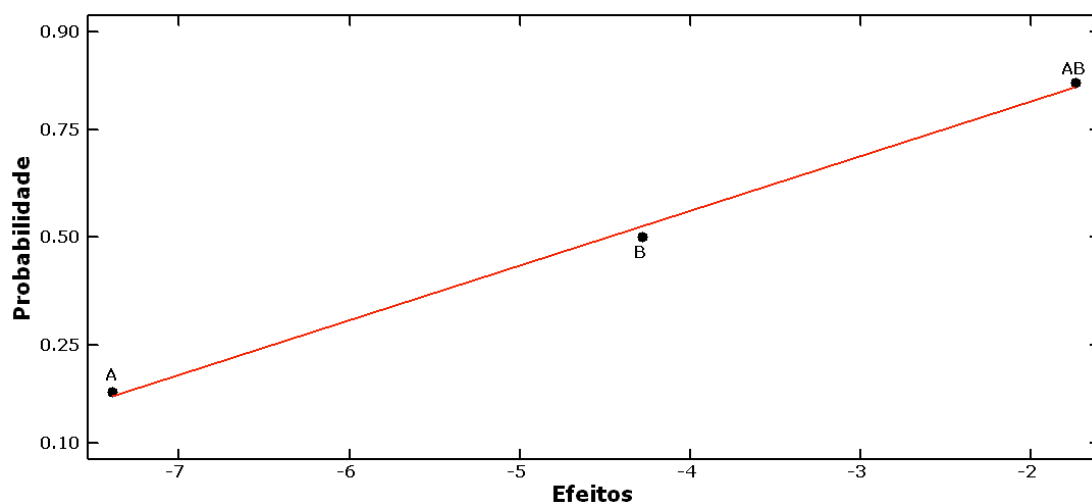


Figura 2.16 - Gráfico Normal dos Efeitos do 3º Planejamento Fatorial  $2^2$  para a síntese da  $H_2T-3-PyP$ .

A consideração de que se deve investigar níveis inferiores dos fatores A e B pode ser observada no gráfico da superfície de resposta apresentando na Figura 2.17, onde é evidente que a região de maior rendimento se encontra nos níveis inferiores de ambos os fatores.

Os planejamentos fatoriais completos exploratórios mostraram que os níveis  $-1$  e  $+1$  de ambos os fatores são os que originam ensaios com rendimentos promissores. Dessa maneira planejamentos fatoriais fracionários incluindo 5 novos fatores (C a G) foram efetuados a fim de melhorar o rendimento nesta região.

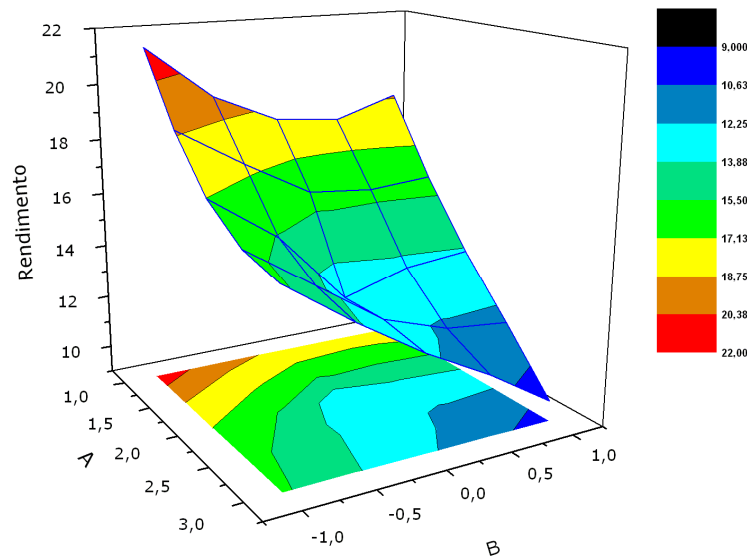


Figura 2.17 - Superfície de resposta do 3º Planejamento Fatorial  $2^2$ .

#### 2.4.3.4 1º Planejamento Fatorial Fracionário $2^{7-3}$

Com a região dos fatores A e B estabelecida a partir dos planejamentos fatoriais completos  $2^2$  exploratórios e a adição de 5 novos fatores, totalizando 7 fatores, um quarto planejamento fatorial completo seria inviável, mesmo que de 2 níveis apenas, pois seriam requeridos 128 experimentos. Embora 128 ensaios fossem possíveis de serem realizados, se necessário, nesta etapa exploratória onde alguns dos fatores podem não ser importantes ou estarem em níveis longe da região de ótimo rendimento, um planejamento fatorial fracionário é mais indicado.

Planejamentos fracionados utilizando 7 variáveis podem originar quatro tipos de planejamentos, com 8, 16, 32 e 64 ensaios. Fez-se uso do planejamento  $2^{7-3}$  com 16 ensaios e resolução IV. A matriz de planejamento do fatorial fracionário  $2^{7-3}$  está ilustrado na Tabela 7, considerando os níveis +1 e -1 para cada fator a ser investigado nos ensaios.

Em um planejamento fatorial com esta resolução, os efeitos

principais não se misturam entre si e nem com as interações de dois fatores, mas sim com as interações de três fatores, (Tabela 8), que em princípio são menos significativas, fornecendo assim ótimas aproximações dos efeitos principais na resposta.

Tabela 7 - Planejamento fatorial fracionário  $2^{7-3}$ .

| Ensaio \ Fatores | A  | B  | C  | D  | E  | F  | G  |
|------------------|----|----|----|----|----|----|----|
| 1                | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 |
| 2                | +1 | -1 | -1 | -1 | +1 | -1 | +1 |
| 3                | -1 | +1 | -1 | -1 | +1 | +1 | -1 |
| 4                | +1 | +1 | -1 | -1 | -1 | +1 | +1 |
| 5                | -1 | -1 | +1 | -1 | +1 | +1 | +1 |
| 6                | +1 | -1 | +1 | -1 | -1 | +1 | -1 |
| 7                | -1 | +1 | +1 | -1 | -1 | -1 | +1 |
| 8                | +1 | +1 | +1 | -1 | +1 | -1 | -1 |
| 9                | -1 | -1 | -1 | +1 | -1 | +1 | +1 |
| 10               | +1 | -1 | -1 | +1 | +1 | +1 | -1 |
| 11               | -1 | +1 | -1 | +1 | +1 | -1 | +1 |
| 12               | +1 | +1 | -1 | +1 | -1 | -1 | -1 |
| 13               | -1 | -1 | +1 | +1 | +1 | -1 | -1 |
| 14               | +1 | -1 | +1 | +1 | -1 | -1 | +1 |
| 15               | -1 | +1 | +1 | +1 | -1 | +1 | -1 |
| 16               | +1 | +1 | +1 | +1 | +1 | +1 | +1 |

Tabela 8 - Padrão de confundimento do planejamento fatorial fracionário  $2^{7-3}$ .

I + ABCE + ABFG + ACDG + ADEF + BCDF + BDEG + CEFG  
 A + BCE + BFG + CDG + DEF + ABCDF + ABDEG + ACEFG  
 B + ACE + AFG + CDF + DEG + ABCDG + ABDEF + BCEFG  
 C + ABE + ADG + BDF + EFG + ABCFG + ACDEF + BCDEG  
 D + ACG + AEF + BCF + BEG + ABCDE + ABDFG + CDEFG  
 E + ABC + ADF + BDG + CFG + ABDEG + ACDEG + BCDEF  
 F + ABG + ADE + BCD + CEG + ABCEF + ACDFG + BDEFG  
 G + ABF + ACD + BDE + CEF + ABCEG + ADEFG + BCDFG  
 AB + CE + FG + ACDF + ADEG + BCDG + BDEF + ABCEFG  
 AC + BE + DG + ABDF + ABFG + BCFG + CDEF + ABCDEG  
 AD + CG + EF + ABCF + ABEG + BCDE + BDFG + ACDEFG  
 AE + BC + DF + ABDG + ACFG + BEFG + CDEG + ABCDEF  
 AF + BG + DE + ABCD + ACEG + BCEF + CDFG + ABDEFG  
 AG + BF + CD + ABDE + ACEF + BCEG + DEFG + ABCDFG  
 BD + CF + EG + ABCG + ABEF + ACDE + ADFG + BCDEFG  
 ABD + ACF + AEG + BCG + BEF + CDE + DFG + ABCDEFG

A matriz de planejamento, juntamente com os rendimentos, que variaram entre 4 e 19%, está apresentada na Tabela 9.

Tabela 9 - Rendimentos do 1º Planejamento Fatorial Fracionário  $2^{7-3}$  da síntese da H<sub>2</sub>T-3-PyP.

| Ensaio | Fatores |    |    |    |    |    |    | Rendimento |
|--------|---------|----|----|----|----|----|----|------------|
|        | A       | B  | C  | D  | E  | F  | G  |            |
| 1      | -1      | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | 17,75%     |
| 2      | +1      | -1 | -1 | -1 | +1 | -1 | +1 | 8,49%      |
| 3      | -1      | +1 | -1 | -1 | +1 | +1 | -1 | 12,04%     |
| 4      | +1      | +1 | -1 | -1 | -1 | +1 | +1 | 7,58%      |
| 5      | -1      | -1 | +1 | -1 | +1 | +1 | +1 | 12,64%     |
| 6      | +1      | -1 | +1 | -1 | -1 | +1 | -1 | 14,96%     |
| 7      | -1      | +1 | +1 | -1 | -1 | -1 | +1 | 13,86%     |
| 8      | +1      | +1 | +1 | -1 | +1 | -1 | -1 | 4,07%      |
| 9      | -1      | -1 | -1 | +1 | -1 | +1 | +1 | 16,24%     |
| 10     | +1      | -1 | -1 | +1 | +1 | +1 | -1 | 9,27%      |
| 11     | -1      | +1 | -1 | +1 | +1 | -1 | +1 | 14,63%     |
| 12     | +1      | +1 | -1 | +1 | -1 | -1 | -1 | 8,80%      |
| 13     | -1      | -1 | +1 | +1 | +1 | -1 | -1 | 16,50%     |
| 14     | +1      | -1 | +1 | +1 | -1 | -1 | +1 | 16,57%     |
| 15     | -1      | +1 | +1 | +1 | -1 | +1 | -1 | 15,04%     |
| 16     | +1      | +1 | +1 | +1 | +1 | +1 | +1 | 11,16%     |
| 17     | 0       | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 19,08%     |

Efetuuou-se também para este planejamento a análise dos efeitos. Seus valores são apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 - Efeitos principais e da interação entre os fatores para o 1º Planejamento Fatorial  $2^{7-3}$  para a síntese da H<sub>2</sub>T-3-PyP.

| Termos | Efeitos |
|--------|---------|
| A      | -4,72   |
| B      | -3,15   |
| C      | 1,25    |
| D      | 2,10    |
| E      | 2,75    |
| F      | -0,21   |
| G      | 0,34    |
| AB     | -1,26   |
| AC     | 1,90    |
| AD     | 0,57    |
| AE     | -0,98   |
| AF     | 1,47    |
| AG     | 1,33    |
| BD     | 0,91    |
| ABD    | 0,56    |

De acordo com a tabela acima, os fatores A, B, D e E podem ser significativos para a resposta. Construiu-se o gráfico normal dos efeitos (Fig. 2.18), para validar a análise feita a partir dos valores dos efeitos.

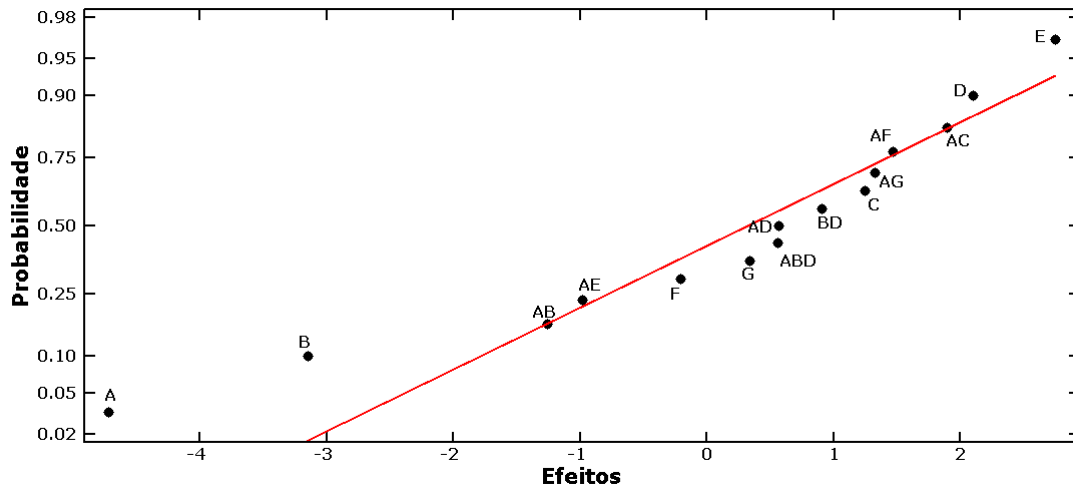


Figura 2.18 - Gráfico normal dos efeitos para o 1º planejamento fatorial fracionário  $2^{7-3}$ .

De acordo com o gráfico normal, todos os fatores investigados e as interações AD, BD E ABD são significativas.

Para completar a análise deste planejamento fez-se uma análise de regressão, a qual indicou, de modo bastante conservador com base no  $p$ -valor dos efeitos, que apenas o fator A ( $p$ -valor = 0,01) seria significativo.

$$y = 12,90 - 2,36A \quad (8)$$

A equação do modelo (Eq. 8) mostra que para melhorar o rendimento devem-se investigar níveis menores do fator A.

De um modo geral, as análises feitas neste planejamento indicam que para aumentar o rendimento deve-se diminuir os níveis do fator A e B e aumentar os níveis do fator E.

### 2.4.3.5 2º Planejamento Fatorial Fracionário $2^{7-3}$

Com esse resultados um segundo planejamento fatorial fracionário  $2^{7-3}$  com novos níveis dos fatores que foram significativos foi realizado.

O 2º planejamento fatorial  $2^{7-3}$  foi realizado com os 7 fatores utilizados no 1º Planejamento Fatorial Fracionário  $2^{7-3}$ . Os níveis de todos os fatores foram mantidos, com exceção do fator A, que foi significativo no 1º Planejamento Fatorial Fracionário  $2^{7-3}$ . Para este fator, foram investigados níveis menores do que aqueles investigados no planejamento anterior.

Na Tabela 11 é apresentada a matriz de planejamento, juntamente com os rendimentos de cada ensaio, que variaram de 6 a 20%.

Tabela 11 - Rendimentos do 2º Planejamento Fatorial Fracionário  $2^{7-3}$  da síntese da  $H_2T-3-PyP$ .

| Ensaio | Fatores |    |    |    |    |    |    | Rendimento |
|--------|---------|----|----|----|----|----|----|------------|
|        | A       | B  | C  | D  | H  | I  | G  |            |
| 1      | -1      | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | 9,06%      |
| 2      | +1      | -1 | -1 | -1 | +1 | -1 | +1 | 8,48%      |
| 3      | -1      | +1 | -1 | -1 | +1 | +1 | -1 | 7,18%      |
| 4      | +1      | +1 | -1 | -1 | -1 | +1 | +1 | 8,22%      |
| 5      | -1      | -1 | +1 | -1 | +1 | +1 | +1 | 6,44%      |
| 6      | +1      | -1 | +1 | -1 | -1 | +1 | -1 | 15,00%     |
| 7      | -1      | +1 | +1 | -1 | -1 | -1 | +1 | 11,92%     |
| 8      | +1      | +1 | +1 | -1 | +1 | -1 | -1 | 12,07%     |
| 9      | -1      | -1 | -1 | +1 | -1 | +1 | +1 | 9,83%      |
| 10     | +1      | -1 | -1 | +1 | +1 | +1 | -1 | 9,00%      |
| 11     | -1      | +1 | -1 | +1 | +1 | -1 | +1 | 18,65%     |
| 12     | +1      | +1 | -1 | +1 | -1 | -1 | -1 | 12,68%     |
| 13     | -1      | -1 | +1 | +1 | +1 | -1 | -1 | 14,37%     |
| 14     | +1      | -1 | +1 | +1 | -1 | -1 | +1 | 17,94%     |
| 15     | -1      | +1 | +1 | +1 | -1 | +1 | -1 | 19,99%     |
| 16     | +1      | +1 | +1 | +1 | +1 | +1 | +1 | 14,58%     |
| 17     | 0       | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 12,10%     |

Os efeitos principais e as interações entre os fatores foram calculados e os seus valores são apresentados na Tabela 12.

Tabela 12 - Efeitos principais e da interação entre os fatores para o 2º Planejamento Fatorial  $2^{7-3}$  para a síntese da  $H_2T-3-PyP$ .

| Termos | Efeitos |
|--------|---------|
| A      | 0,06    |
| B      | 4,83    |
| C      | 3,65    |
| D      | 1,89    |
| E      | -1,73   |
| F      | -1,86   |
| G      | -0,41   |
| AB     | -2,22   |
| AC     | 1,65    |
| AD     | -2,61   |
| AE     | -0,69   |
| AF     | 0,77    |
| AG     | 0,53    |
| BD     | 1,79    |
| ABD    | -0,91   |

Os valores dos efeitos sugerem que os fatores B, C, D, E, F e as interações AB, AC, AD e BD seriam significativos, mas o gráfico normal dos efeitos, que está apresentado na Figura 2.19, indica que apenas as interações AB e AD são significativas.

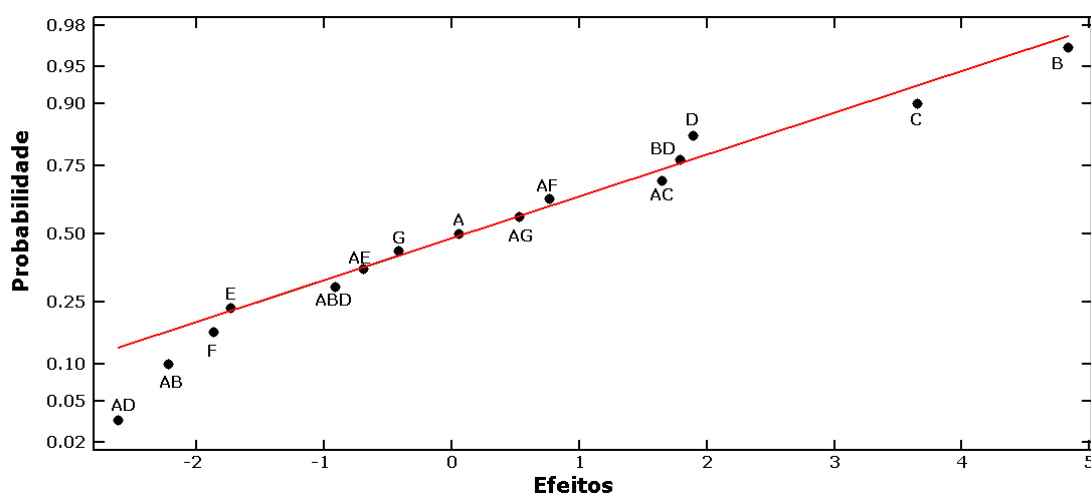


Figura 2.19 - Gráfico normal dos efeitos para o 2º planejamento fatorial fracionário  $2^{7-3}$ .

A análise de regressão não confirma o resultado apresentado pelo gráfico normal dos efeitos. De acordo com esta análise o  $p$ -valor do coeficiente estimado do fator B é 0,01, dos fatores C e D é 0,00, do fator E é 0,02, do fator F é 0,01, da interação AB é 0,00, da interação AC é 0,02, da interação AD é 0,00 e da interação BD é 0,01. Esses valores indicam que, no nível de significância ( $\alpha$ ) de 5% (95% de confiança), esses fatores e interações são significativamente relacionados ao rendimento da reação.

$$y = 12,20 + 0,95B + 1,83C + 2,42D - 0,86E - 0,93F - 1,31AB + 0,82AC - 1,11AD + 0,89BD \quad (9)$$

A equação do modelo (Eq. 9) mostra que para melhorar o rendimento deve-se investigar níveis maiores dos fatores B, C e D e níveis menores dos fatores E e F.

Os rendimentos obtidos nos planejamentos fatoriais completos realizados não superaram o rendimento de 24% obtido no 1º planejamento fatorial fracionário. Este resultado indica que a adição de novos fatores (C, D, E, F e G), com os níveis investigados, não devem ser significante para a síntese da H<sub>2</sub>T-3-PyP, sendo apenas os fatores A e B significantes.

## 2.5 CONCLUSÕES

Utilizando técnicas quimiométricas, 2 fatores a 2 níveis foram inicialmente investigados na otimização da síntese da H<sub>2</sub>T-3-PyP. Nesta etapa, rendimentos que variaram de 7 a 24% foram obtidos e os resultados indicaram que esses 2 fatores seriam significativos. Novos níveis foram investigados, no entanto, os rendimentos não ultrapassaram os 24% obtidos numa primeira investigação, em condições sugeridas pelo estudo anterior do isômero *orto*, H<sub>2</sub>T-2-

PyP.

Na tentativa de melhorar este rendimento, fatores adicionais foram investigados. Os rendimentos novamente não ultrapassaram os 24% obtidos, indicando que a inclusão dos novos fatores, nos níveis investigados, até então, não é relevante para a otimização da síntese da H<sub>2</sub>T-3-PyP.

Vale destacar que rendimentos de ~20% são suficientes para tornar o desenvolvimento de moduladores redox baseado em *N*-piridilporfirinas economicamente viáveis.

## 2.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLER, A.D.; LONGO, F.R.; SHERGALIS, W. Mechanistic Investigations of Porphyrin Syntheses. I. Preliminary Studies on *ms*-Tetraphenylporphini. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 86, p. 3145-3149, 1964.

ADLER, A.D.; LONGO, F.R.; FINARELLI, J.D.; GOLDMACHER, J.; ASSOUR, J.; KORSKOFF, L. A Simplified Synthesis for *meso*-Tetraphenylporphini. *J. Org. Chem.*, v. 32, p. 476, 1967.

BATINIĆ-HARBELE, I.; BENOVIĆ, L.; SPASOJEVIĆ, I.; FRIDOVICH, I. The *Ortho* Effect Makes Manganese(III)*Meso*-Tetrakis(*N*-Methylpyridinium-2-yl)Porphyrin a Powerful and Potentially. *J. Bio. Chem.*, v. 273, p. 24521-24528, 1998.

BATINIĆ-HARBELE, I.; SPASOJEVIĆ, I.; HAMBRIGHT, P.; BENOVIĆ, L.; CRUMBLISS, A.L.; FRIDOVICH, I. Relationship among Redox Potentials, Proton Dissociation Constants of Pyrrolic Nitrogens, and in Vivo and in Vitro Superoxide Dismutating Activities of Manganese(III) and Iron(III) Water-Soluble Porphyrins. *Inorg. Chem.*, v. 38, p. 4011-4022, 1999.

BATINIĆ-HARBELE, I.; REBOUÇAS, J.S.; BENOVIĆ, L.; SPASOJEVIĆ, I. *Chemistry, biology and medical effects of water-soluble metalloporphyrins*. Handbook of Porphyrin Science. Singapura: World Scientific, 2011. V. 11, cap. 52, p. 291-393.

BATINIĆ-HARBELE, I.; RAJIC, Z.; TOVMASYAN, A.; REBOUÇAS, J.S.; YE, X.; LEONG, K.W.; DEWHIRST, M.W.; VUJASKOVIC, Z.; BENOVIĆ, L.; SPASOJEVIĆ, I. Diverse functions of cationic Mn(III) *N*-substituted pyridylporphyrins, recognized as SOD mimics. *Free Rad. Bio. Med.*, v. 51, p. 1035-1053, 2011.

JOHNSTONE, R.A.W.; NUNES, M.L.P.G.; PEREIRA, M.M.; GONSALVES, A.M.D.R.; SERRA, A.C. Improved Synthesis of 5,10,15,20-Tetrakisaryl- and Tetrakisalkylporphyrin. *Heterocycles*, v. 43, p. 1423-1437, 1996.

HAMBRIGHT, P.; ADEYEME, A.; SHAMIM, A.; LEMELLE, S. [[4,4',4'',4'''-Porphyrin-5,10,15,20-Tetra-yltetrakis(1-methylpyridiniumato)(2-)]-indium(III) Pentaperchlorate. *Inorg. Synth.*, v. 23, p. 55-59, 1985.

IAMAMOTO, Y.; SERRA, O.A.; IDEMORI, Y.M. Iron(III) porphyrins atropisomers as catalysts for cyclohexane hydroxylations. A biomimetical system. *J. Inorg. Biochem.*, v. 54, p.55-56, 1994.

KALYANASUNDARAM, K. Photochemistry of Water-Soluble

Porphyrins: Comparative Study of Isomeric Tetrapyrrolyl- and Tetrakis(*N*-Methylpyridiniumyl)porphyrins. *Inorg. Chem.*, v. 23, p. 2453-2459, 1984.

KOS, I.; REBOUÇAS, J.S.; DEFREITAS-SILVA, G.; SALVEMINI, D.; VUJASKOVIC, Z.; DEWHIRST, M.W.; SPASOJEVIĆ, I.; BATINIĆ-HARBELE, I. Lipophilicity of potent porphyrin-based antioxidants: Comparison of *ortho* and *meta* isomers of Mn(III) *N*-alkylpyridylporphyrins. *Free Rad. Biol. Med.*, v. 47, p. 72-78, 2009a.

KOS, I.; BENOVIĆ, L.; SPASOJEVIĆ, I.; REBOUÇAS, J.S.; BATINIĆ-HARBELE, I. High Lipophilicity of *meta* Mn(III) *N*-Alkylpyridylporphyrin-Based Superoxide Dismutase Mimics Compensates for Their Lower Antioxidant Potency and Makes Them as Effective as *Ortho* Analogues in Protecting Superoxide Dismutase-Deficient *Escherichia coli*. *J. Med. Chem.*, v. 52, p. 7868-7872, 2009b.

LINDSEY, J.S.; SCHREIMAN, I.C.; HSU, H.C.; KEARNEY, P.C.; MARGUERETTAZ, A.M. Rothmund and Adler-Longo Reactions Revisited: Synthesis of Tetraphenylporphyrins under Equilibrium Conditions. *J. Org. Chem.*, v. 52, p. 827-836, 1987.

LINDSEY, J.S.; WAGNER, R.W. Investigation of the Synthesis of *Ortho*-Substituted Tetraphenylporphyrins. *J. Org. Chem.*, v. 54, p. 828-836, 1989.

NERI, B.P.; WILSON, G.S. Electrochemical Reduction of Some Tetrapyrrolylporphyrins. *Anal. Chem.*, v. 45, p. 442-445, 1973.

PINTO, V.H.A.; CARVALHODA-SILVA, D.; SANTOS, J.L.M.S.; WEINER, T.; DA FONSECA, M.G.; YOSHIDA, M.I.; IDEMORI, Y.M.; BATINIĆ-HARBELE, I.; REBOUÇAS, J.S. Thermal stability of the prototypical Mn porphyrin-based superoxide dismutase mimic and potent oxidative-stress redox modulator Mn(III) *meso*-tetrakis(*N*-ethylpyridinium-2-yl)porphyrin chloride, MnTE-2-PyP<sup>5+</sup>. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, submetido.

REBOUÇAS, J.S.; CARVALHO, M.E.M.D.; IDEMORI, Y.M. Perhalogenated 2-pyridylporphyrin complexes: synthesis, self-coordinating aggregation properties, and catalytic studies. *J. Porphyrins Phthalocyanines*, v. 6, p. 50-57, 2002.

REBOUÇAS, J.S.; SPASOJEVIĆ, I.; TIAHJONO, D.H.; RICHAUD, A.; MÉNDEZ, F.; BENOVIĆ, L.; BATINIĆ-HARBELE, I. Redox modulation of oxidative stress by Mn porphyrin-based therapeutics: The effect of charge distribution. *Dalton Trans.*, p. 1233-1242, 2008a.

REBOUÇAS, J.S.; SPASOJEVIĆ, I.; BATINIĆ-HARBELE, I. Quality of

potent Mn porphyrin-based SOD mimics and peroxynitrite scavengers for pre-clinical mechanistic/therapeutic purposes. *J. Pharmac. Biomed. Anal.*, v. 48, p. 1046-1049, 2008b.

REBOUÇAS, J.S.; KOS, I.; VUJASKOVIC, Z.; BATINIĆ-HARBELE, I. Determination of residual manganese in Mn porphyrin-based superoxide dismutase (SOD) and peroxynitrite reductase mimics. *J. Pharmac. Biomed. Anal.*, v. 50, p. 1088-1091, 2009.

ROTHEMUND, P. A New Porphyrin Synthesis. The Synthesis of Porphin. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 58, p. 625-627, 1936.

ROTHEMUND, P. Porphyrin Studies. III. The Structure of the Porphine Ring System. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 61, p. 2912-2915, 1939.

### 3 ESTUDO COMPUTACIONAL DA INFLUÊNCIA DO REARRANJO DE CADEIAS LATERAIS OXIGENADAS NA SÍNTESE DE *N*-ALQUILPIRIDILPORFIRINAS

#### 3.1 INTRODUÇÃO

Mn(III) *N*-alquilpiridilporfirinas catiônicas, tais como a MnTE-2-PyP<sup>5+</sup> e a MnTnHex-2-PyP<sup>5+</sup> (Fig. 3.1), apresentam potencial de redução Mn<sup>III</sup>P/Mn<sup>II</sup>P e propriedades eletrostáticas que mimetizam as características eletrônicas e de reatividade das enzimas SOD (REBOUÇAS et al., 2008a; 2008b; BATINIĆ-HABERLE et al., 2010) e permitem que atuem como potentes catalisadores biológicos na redução do peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>), na dismutação do superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) e na modulação da transdução de sinais celulares.

Ao regularem os níveis de ERO/ERN em células e tecidos, estes compostos têm se mostrado particularmente hábeis na diminuição de uma variedade de fisiopatologias associadas ao estresse oxidativo em diversos modelos celulares e animais (BATINIĆ-HARBELE et al.; 2010; 2011; TOVMASYAN et al., 2011).

Enquanto o poder antioxidante intrínseco das Mn-porfirinas é controlado físico-quimicamente, suas atividades biológicas dependem também de propriedades como lipofilicidade, tamanho, carga e forma da porfirina, uma vez que estas influenciam a biodisponibilidade e toxicidade dos compostos (BATINIĆ-HARBELE et al. 2010; 2011; TOVMASYAN et al., 2011).

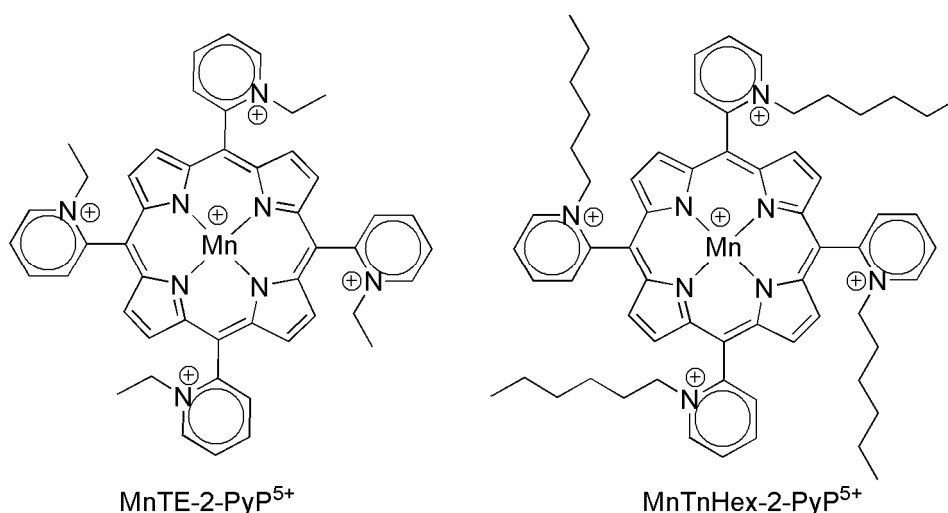


Figura 3.1 - Estrutura da MnTE-2-PyP<sup>5+</sup> e da MnTnHex-2-PyP<sup>5+</sup>.

Uma melhora na eficiência *in vivo* dessas porfirinas pode ser conseguida pelo aumento da cadeia alquílica do grupo piridil, o que resulta em uma maior lipofilicidade (BATINIĆ-HARBELE et al., 2002; KOS et al., 2009a; 2009b) e, conseqüentemente, em um maior acúmulo celular (BATINIĆ-HARBELE et al., 2011). No entanto, um aumento da lipofilicidade com o uso de grupos alquilas longos aumenta também o caráter surfactante dos compostos, que é acompanhado por um aumento de toxicidade (OKADO-MATSUMOTO et al., 2004; KOS et al., 2009a; 2009b).

Uma forma de suprimir a toxicidade dessas porfirinas mais lipofílicas seria a introdução de oxigênio na cadeia alquílica (BATINIĆ-HARBELE et al., 2004; 2006; OKADO-MATSUMOTO, 2004; TOVMASYAN et al., 2011). A incorporação de cadeias laterais oxigenadas, tais como polietilenoglicol (PEG) e metoxietil (representado neste trabalho por MeOC<sub>2</sub>) (Fig. 3.2) (BATINIĆ-HARBELE et al., 2004; 2006), nas Mn(III) *orto N*-piridilporfirinas resultou em espécies como as MnTPEG-2-PyP<sup>5+</sup> e MnTMeOC<sub>2</sub>-2-PyP<sup>5+</sup> (Fig. 3.2) com elevada potência antioxidante, menor toxicidade, mas com limitada lipofilicidade, quando comparadas à MnTnHex-2-PyP<sup>5+</sup> (Fig. 3.1).

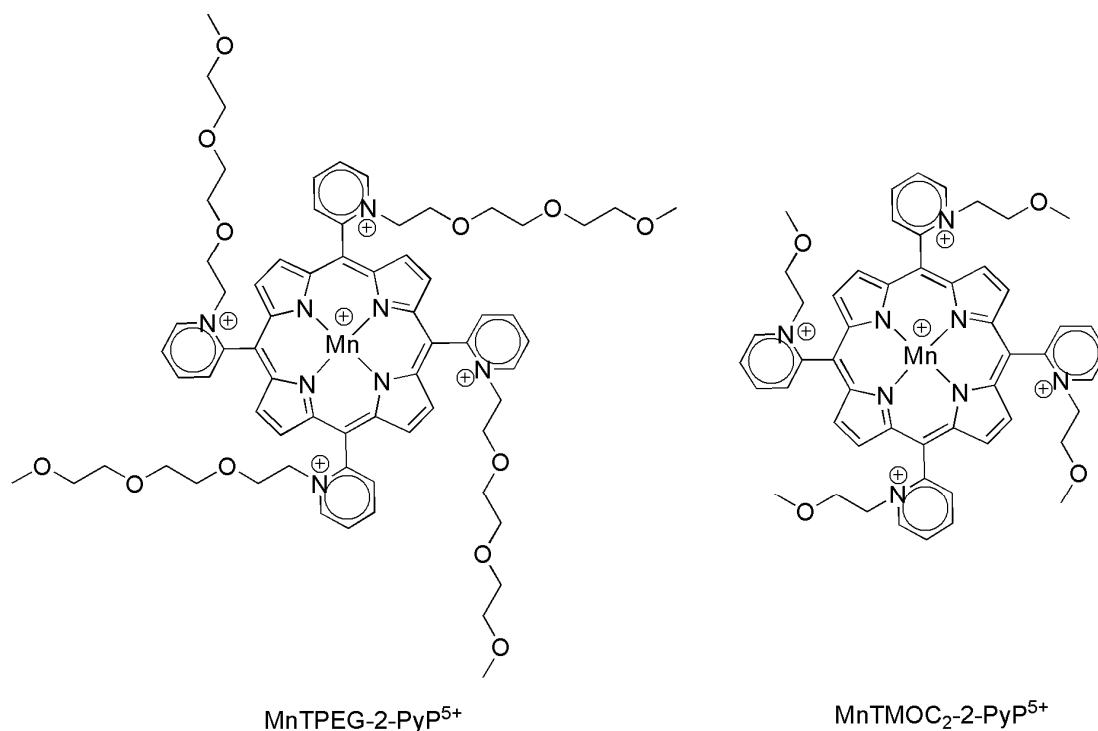


Figura 3.2 – Estruturas da MnTPEG-2-PyP<sup>5+</sup> e MnTMOC<sub>2</sub>-2-PyP<sup>5+</sup>.

Quatro derivados metoxilados MeOalquil (MeOC<sub>n</sub>), onde alquil pode ser etil ( $n = 2$ ), *n*-butil ( $n = 4$ ), *n*-pentil ( $n = 5$ ), e *n*-hexil ( $n = 6$ ), foram estudados para cada *orto*, *meta* e *para* Mn(III) *N*-piridilporfirina. A síntese dessa classe de porfirinas contendo o grupo metóxi se dá pela derivatização dos isômeros *orto*, *meta* ou *para* da *N*-piridilporfirina com tosilato de metoxialquil MeOC<sub>n</sub>OTs (Fig. 3.3). A investigação experimental desses sistemas foi realizada pelo grupo liderado pela Dra. I. Batinić-Haberle (Duke University Medical Center, EUA) e forneceu motivação e subsídio para os estudos computacionais desenvolvidos neste capítulo.

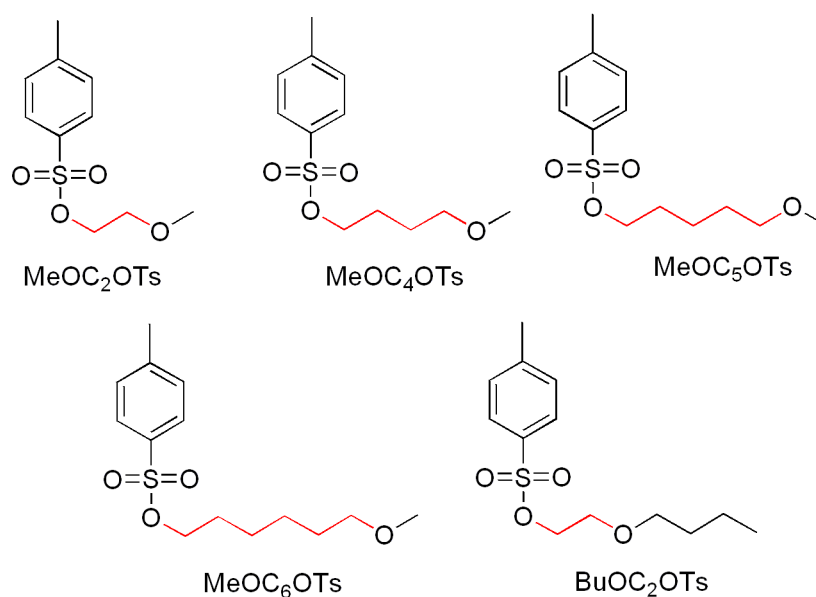


Figura 3.3 – Tosilatos de metoxialquila e butoxietila investigados nesta dissertação.

Durante este processo de alquilação com  $\text{MeOC}_n\text{OTs}$ , observou-se a formação de uma quantidade significativa de porfirinas parcialmente metiladas (Fig. 3.4); em alguns casos, a quantidade de porfirinas metiladas superou as metoxialquiladas de interesse (REBOUÇAS et al., 2011; TOVMASYAN et al., 2011).

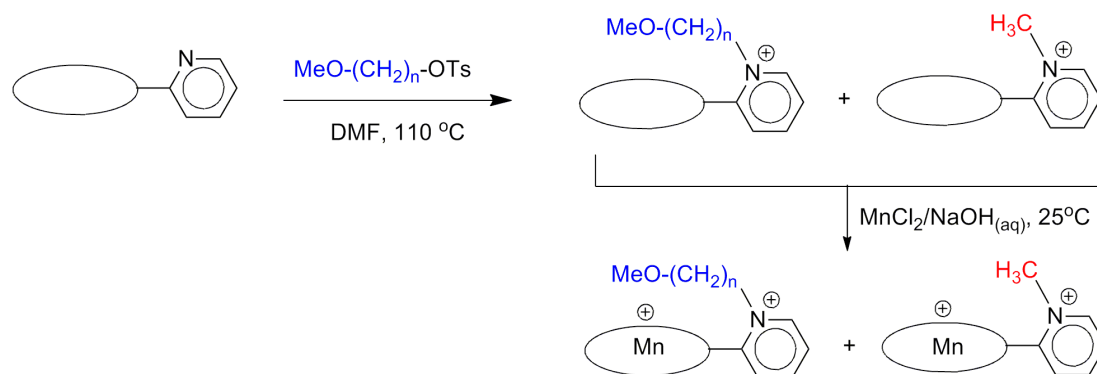


Figura 3.4 – Derivatização de *N*-piridilporfirina com  $\text{MeOC}_n\text{OTs}$  em DMF.

Análises de cromatografia em camada delgada indicaram que os produtos se apresentam como uma mistura de vários compostos. Inicialmente, imaginou-se que se tratavam de atropoisômeros, hipótese que logo foi descartada pois, ao contrário da  $\text{H}_2\text{T-2-PyP}$  (*orto* substituída), os derivados da  $\text{H}_2\text{T-3-PyP}$  (isômero *meta*) e da  $\text{H}_2\text{T-4-PyP}$  (isômero *para*) não apresentam impedimento estéreo

para a rotação  $C_{\text{meso}}-C_{\text{aril}}$ , impossibilitando a existência de atropoisômeros.

As frações foram isoladas cromatograficamente e analisadas separadamente por espectroscopia de massas (ionização por electrospray e detecção massa/massa), possibilitando a identificação dos compostos como espécies contendo combinações de 0-4 grupos metil/4-0 grupos metoxialquil como cadeia lateral das TPyPs.

A distribuição das espécies metiladas e metoxialquiladas nos vários sistemas T-X-PyP/MeOC<sub>n</sub>OTs (onde X = 2, 3, 4; n = 2, 4, 5, 6) é apresentada na Figura 3.5. Os resultados indicam que todas as porfirinas sintetizadas apresentam algum grau de metilação, que está associado à natureza do agente metoxialquilante empregado. Por exemplo, enquanto MeOC<sub>2</sub>OTs resulta preferencialmente na porfirina completamente metoxialquilada H<sub>2</sub>TMeOC<sub>2</sub>-X-PyP<sup>4+</sup> (onde X = 2, 3 ou 4), uma baixíssima seletividade é observada nos sistemas com MeOC<sub>4</sub>OTs e MeOC<sub>5</sub>OTs, onde a distribuição de espécies contendo de 0 a 4 grupos metila foi verificada para qualquer das *N*-piridilporfirinas (Fig. 3.5) (REBOUÇAS et al., 2011)

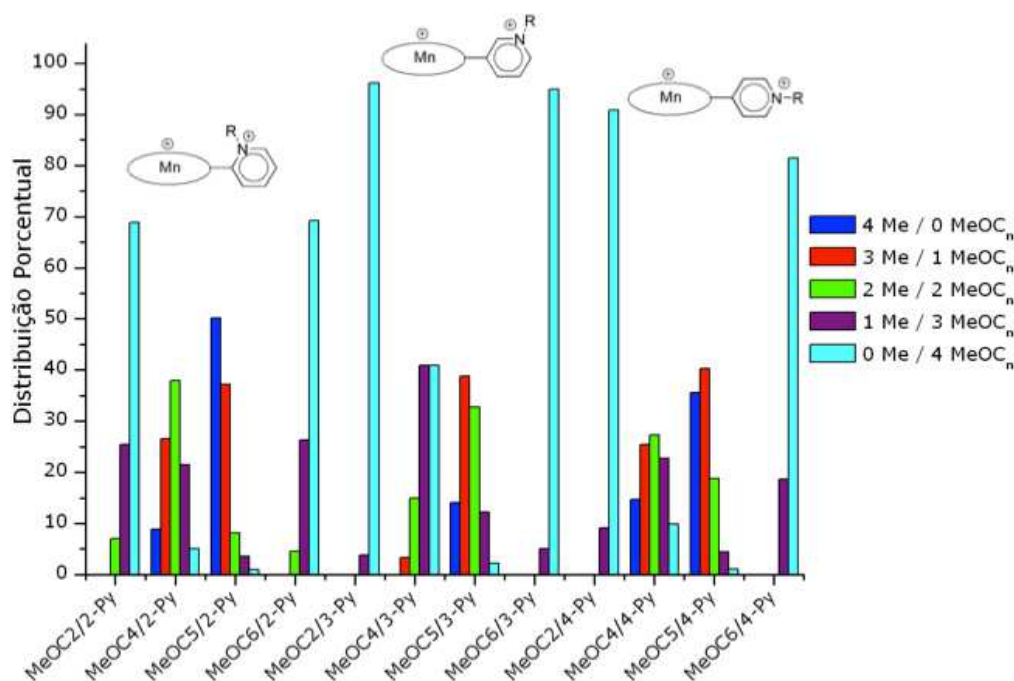


Figura 3.5 – Gráfico da distribuição de espécies contendo os grupos MeOC<sub>n</sub> e metilas nas Mn-porfirinas resultantes dos sistemas H<sub>2</sub>T-X-PyP/MeOC<sub>n</sub>OTs (onde X = 2, 3, 4; n = 2, 4, 5, 6) (Rebouças et al., 2011, dados não publicados).

Ao se analisar a razão de metilação *versus* metoxialquilação em função do tipo de isômero da Mn(III) *N*-piridilporfirina (Fig. 3.6) observa-se uma acentuada metilação nos isômeros *orto* em relação aos isômeros *meta* e *para*. Uma vez que o tempo de reação da síntese dos isômeros *orto* é maior do que o dos outros isômeros (BATINIĆ-HARBELE et al., 2002; KOS et al., 2009a; 2009b; TOVMASYAN et al., 2011), isto possibilita também um maior tempo para o rearranjo do tosilato de metoxialquila e geração *in situ* do tosilato de metila, responsável pela metilação das porfirinas. Além disso verifica-se que a competição entre a reação de metoxialquilação *versus* metilação ao longo da série definida pelos vários MeOC<sub>n</sub>OTs (n = 2, 4, 5, 6) segue essencialmente o mesmo padrão em qualquer das *N*-piridilporfirinas empregadas (REBOUÇAS et al., 2011).

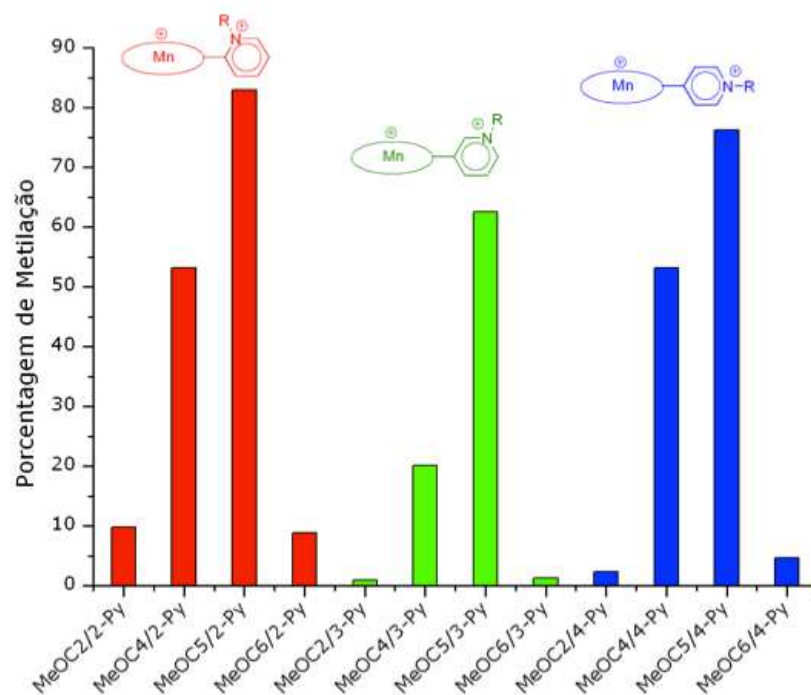


Figura 3.6 – Gráfico da metilação total vs metoxialquilação (Rebouças et al., 2011, dados não publicados).

Um aspecto intrigante nessas reações diz respeito à origem do grupo metila responsável pela metilação competitiva que se observa ao longo da metoxialquilação. Uma vez que o sistema de reação é constituído apenas pelos reagentes (porfirina e tosilato) e solvente (*N,N*-dimetilformamida, DMF), as únicas fontes de grupos metilas se reduzem à DMF e ao próprio tosilato  $\text{MeOC}_n\text{OTs}$ . A participação da DMF na metilação foi descartada ao se utilizar DMF deuterada como solvente: enquanto a reação de metilação continuou a ser observada, nenhum dos compostos metilados apresentava deutério, indicando que a fonte de metila não seria o solvente (Fig. 3.7) (REBOUÇAS et al., 2011).

Após o isolamento da mistura de porfirinas alquiladas/metoxialquiladas, o re-aquecimento destas com a respectiva  $\text{H}_2\text{TPyP}$  precursora em DMF a 100-110°C não levou a qualquer alteração na distribuição dos reagentes, indicando que após formadas, as porfirinas alquiladas/metoxialquiladas são

estáveis e não participam em reações cruzadas. Enquanto o grupo metila não é resultante do solvente nem das próprias porfirinas alquiladas/metoxialquiladas, mas do agente metoxialquilante em si, a compreensão do mecanismo dessa reação se torna necessária para o desenvolvimento de estratégias adequadas para síntese seletiva de novos moduladores redox baseados em Mn-porfirinas catiônicas. Uma vez que os grupos piridínicos não abstraem grupos metila diretamente de grupos metoxilas, supõe-se que a fonte de metilas para a reação competitiva de metilação seja proveniente de um rearranjo do grupo  $\text{MeOC}_n\text{OTs}$  (REBOUÇAS et al., 2011).

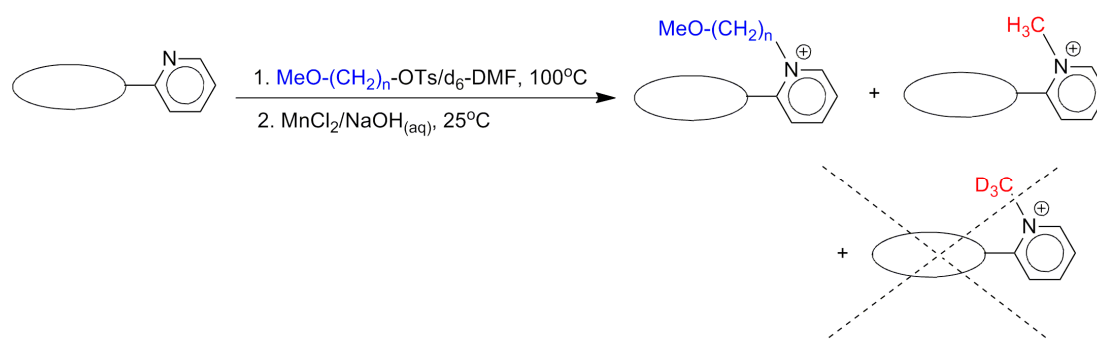


Figura 3.7 - Derivatização da *N*-piridilporfirina com tosilato de metoxialquila em DMF deuterada.

### 3.2 OBJETIVOS

O presente estudo objetiva investigar o mecanismo do rearranjo do grupo  $\text{MeOC}_n\text{OTs}$  ( $n = 2, 4, 5, 6$ ) e do grupo  $\text{BuOC}_2\text{OTs}$  através de simulação computacional. Este rearranjo resulta na formação de produtos metilados/butilados indesejados na síntese de *N*-metoxialquilpiridilporfirinas.

Dentre os objetivos específicos estão:

- estudo do mecanismo de rearranjo do tosilato de metoxialquila e butoxietila por duas rotas independentes;

- cálculos das energias de ativação e reação dos processos (produtos e intermediários);
- determinação da rota preferencial para o rearranjo do grupo MeOC<sub>n</sub>OTs;
- investigação da influência do solvente DMF sobre a alquilação das porfirinas (*versus* reações em fase gasosa).

### 3.3 METODOLOGIA COMPUTACIONAL

O programa GaussView 5.0 (DENNINGTON; KEITH; MILLAM, 2009) foi utilizado para a construção das estruturas dos compostos investigados. Cálculos de otimização e frequência vibracional dos estados fundamentais, intermediários e de transição (TS) foram realizados na fase gasosa (vácuo) e na presença de solvente (DMF), utilizando o método DFT (HOHENBERG; KOHN, 1964), com o funcional híbrido B3LYP (BECKE, 1988; LEE; YANG; PARR, 1988) e o conjunto de bases 6-31G\* (RASSOLOV et al., 1998) implementado no pacote computacional Gaussian 09 (FRISCH et al., 2009). O modelo de solvatação utilizado foi o C-PCM (BARONE; COSSI, 1998; COSSI et al., 2003). As energias relativas para todos os pontos estacionários foram corrigidas com a energia do ponto zero (ZPE). Em todos os cálculos, considerou-se uma temperatura de 105 °C, consistente com a faixa de temperatura (105-110 °C) utilizada experimentalmente.

O cálculo das coordenadas de reação intrínsecas (IRC, do inglês "Intrinsic Reaction Coordinate") (GONZALES; SCHLEGEL, 1989; 1990), que é o caminho de menor energia que liga dois mínimos (reagente e produto) (JENSEN, 1998), foi efetuado para os TS com o método DFT/B3LYP/6-31G\* para garantir que as estruturas dos TS determinados a partir de um TS inicialmente

sugerido sejam realmente pontos de sela e, de fato, os TS da reação.

### 3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os aspectos da ciclização do  $\text{MeOC}_n\text{OTs}$  foram analisados teoricamente e duas rotas foram propostas, conforme apresentadas na Figura 3.8.

Ambas as rotas se iniciam com a ciclização intramolecular do  $\text{MeOC}_n\text{OTs}$  e são mediadas pela formação de um oxacicloalcano (éter cíclico) metilado e do íon tosilato ( $\text{OTs}^-$ ) (Fig. 3.8).

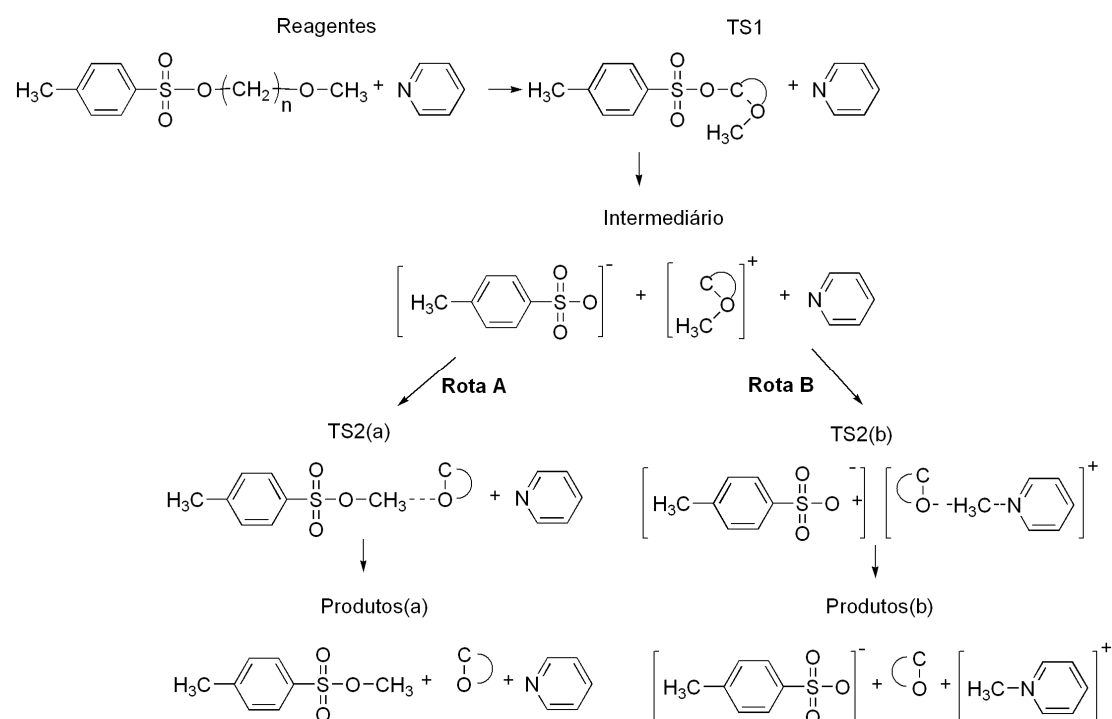


Figura 3.8 – Rotas de reação propostas para a ciclização intramolecular do  $\text{MeOC}_4\text{OTs}$ , usando o grupo piridil como modelo das  $\text{H}_2\text{TPyP}$ .

Na rota A, o metil do intermediário *O*-metil-oxacicloalcano é transferido para o contra-íon  $\text{OTs}^-$  formando  $\text{MeOTs}$ , um composto estável utilizado na síntese de *N*-piridilporfirinas metiladas, e liberando o oxacicloalcano correspondente. Neste mecanismo, a piridina (modelo do grupo piridil de uma *N*-piridilporfirina) permanece como grupo espectador, sendo eventualmente metilada

pelo tosilato de metila formado. A metilação de *N*-piridilporfirinas por MeOTs é a rota clássica de obtenção de *N*-metilpiridilporfirinas (HAMBRIGHT et al., 1985).

Na rota B, a piridina ataca o metil do intermediário *O*-metil-oxacicloalcano levando à formação direta das espécies carregadas *N*-metilpiridínio, o contra-íon tosilato e o oxacicloalcano neutro correspondente (Fig. 3.8).

Nas rotas propostas, a ciclização do MeOalquilOTs envolve 1 intermediário (Inter.) e 2 estados de transição (TS). A coordenada de reação da ciclização intramolecular do MeOC<sub>n</sub>OTs é apresentada na Figura 3.9. As estruturas típicas para o reagente, intermediário, estados de transição e produtos da rota A são ilustrados para o sistema MeOC<sub>2</sub>OTs na Figura 3.9a e as estruturas da rota B na Figura 3.9b. As energias apresentadas neste capítulo (energias dos estados de transição, intermediários e produtos) são todas reportadas utilizando o respectivo reagente de partida como referência, conforme ilustrado na Figura 3.9.

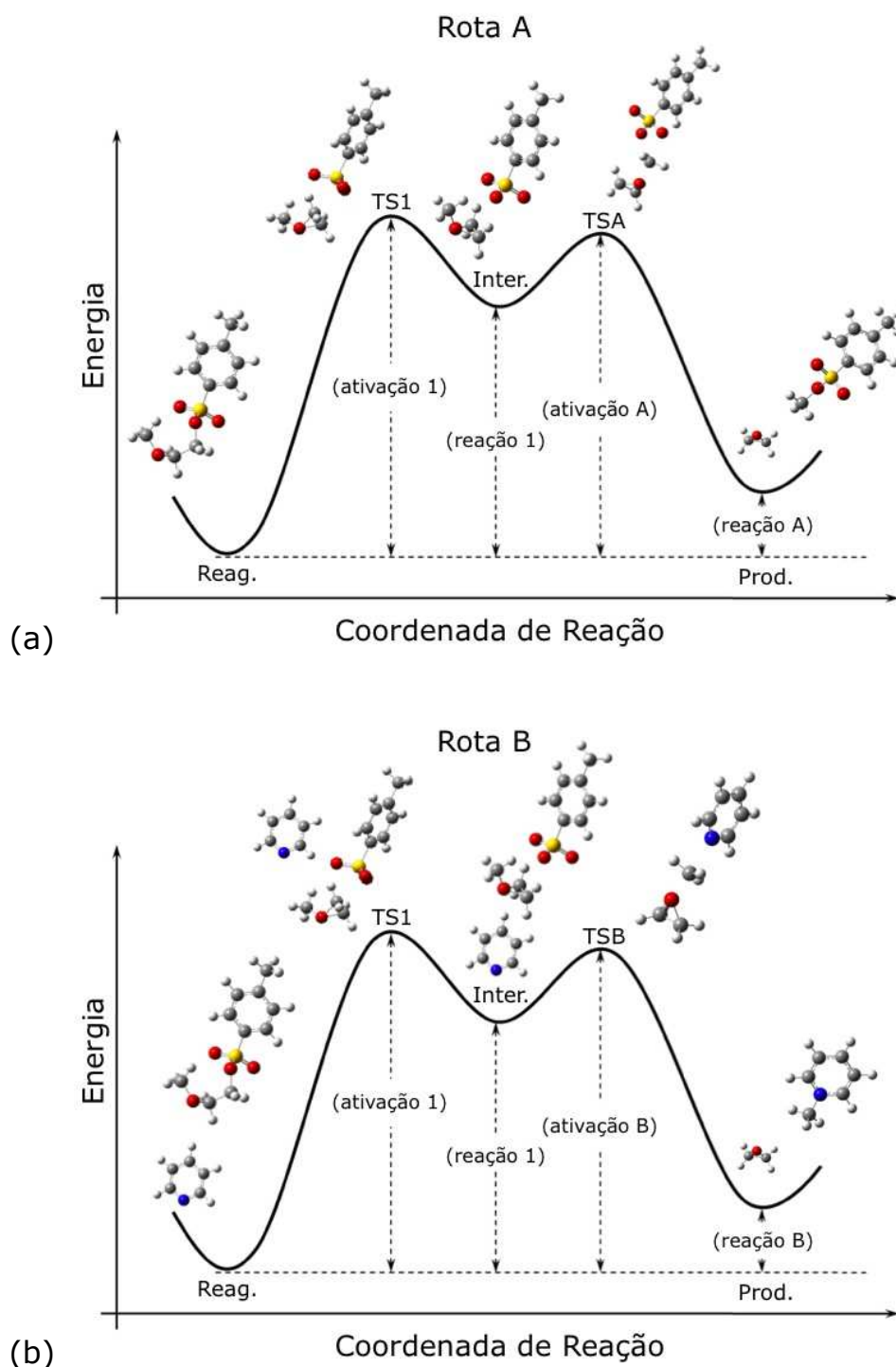


Figura 3.9 – Coordenada de reação da ciclização intramolecular do  $\text{MeOC}_n\text{OTs}$  (a) via rota A e (b) via rota B.

As simulações da coordenada de reação para todas as estruturas investigadas nos dois mecanismos, na ausência e presença de solvente, para cada um dos membros da série  $\text{MeOC}_n\text{OTs}$ , onde  $n = 2, 4, 5$  e  $6$ , estão apresentadas nas Figuras

3.10, 3.11, 3.12 e 3.13 respectivamente. Os cálculos de IRC indicam que o caminho de reação para ciclização intramolecular do MeOC<sub>n</sub>OTS e a origem dos compostos metilados durante a metoxialquilação das *N*-piridilporfirinas ocorrem, muito provavelmente, através da rota B, energeticamente mais favorável nas condições experimentais (DMF, 105 °C).

Para todos os sistemas investigados se observa que, na fase gasosa, a rota A resulta em estruturas mais estáveis, enquanto que na presença de solvente a rota B é preferencial. Esta considerável diminuição da energia do sistema com a alteração do meio de reação de gasoso para solvente é consistente com estudos de um sistema correlato referente à reação de Menshutkin, onde se converte uma amina terciária a um sal de amônio quaternário por um haleto de alquila (SOLÀ et al., 1991).

A rota B torna-se preferencial na presença de solvente por provavelmente causar a estabilização, por solvatação, dos compostos iônicos envolvidos (estado de transição B e produtos), o que resulta em uma diminuição da energia necessária para transferência do grupo metila do intermediário *O*-metil-oxacicloalcano para os produtos. É importante destacar que a ciclização intramolecular do MeOC<sub>n</sub>OTs para originar o intermediário *O*-metil-oxacicloalcano via o estado de transição 1 (TS1) é comum a ambos mecanismos propostos.

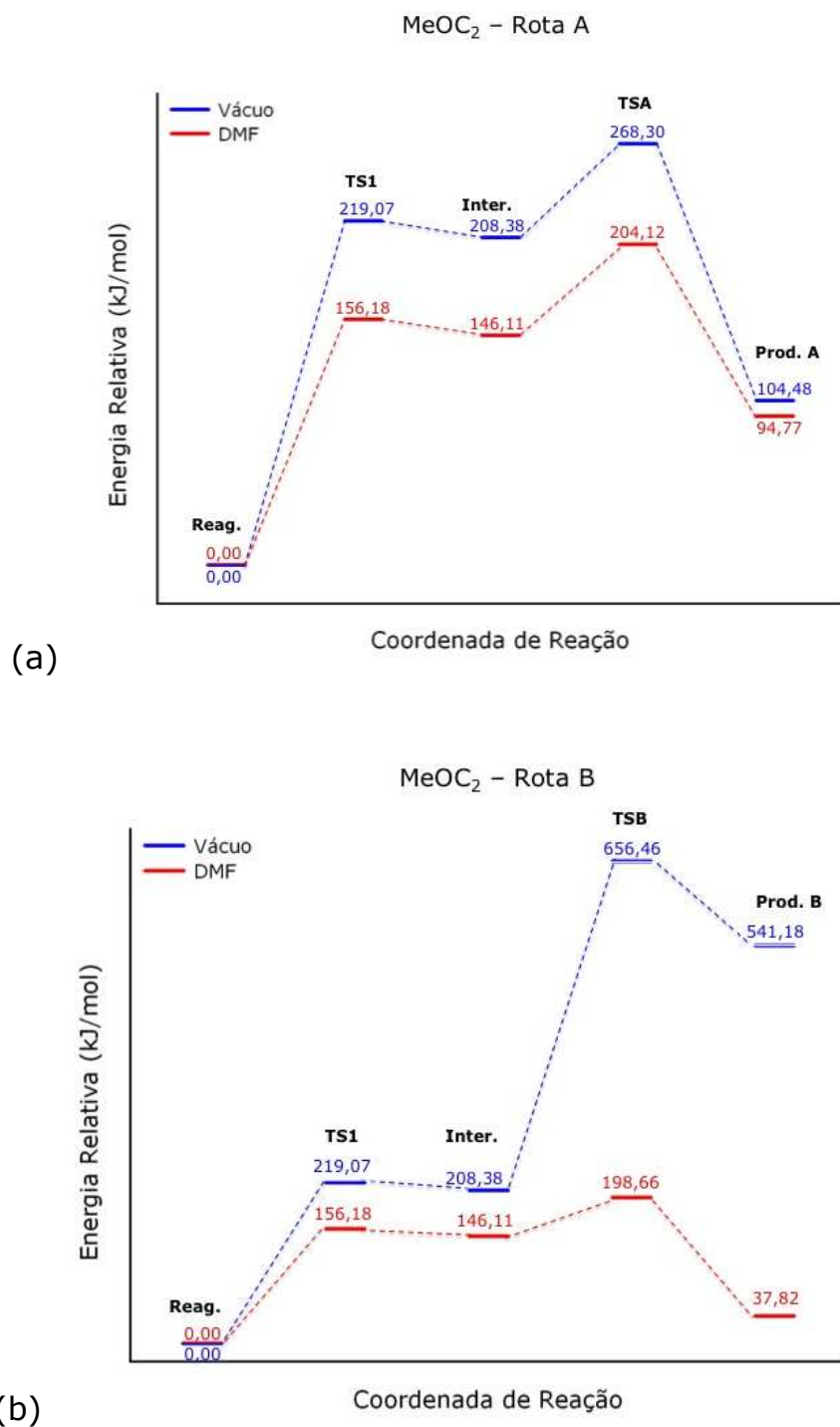


Figura 3.10 – Gráfico da coordenada de reação *versus* energia relativa (kJ/mol) para sistema MeOC<sub>2</sub>OTs/Py na ausência (azul) e presença (vermelho) de solvente (a) via rota A e (b) via rota B, calculadas com o método DFT/B3LYP/6-31G\*.

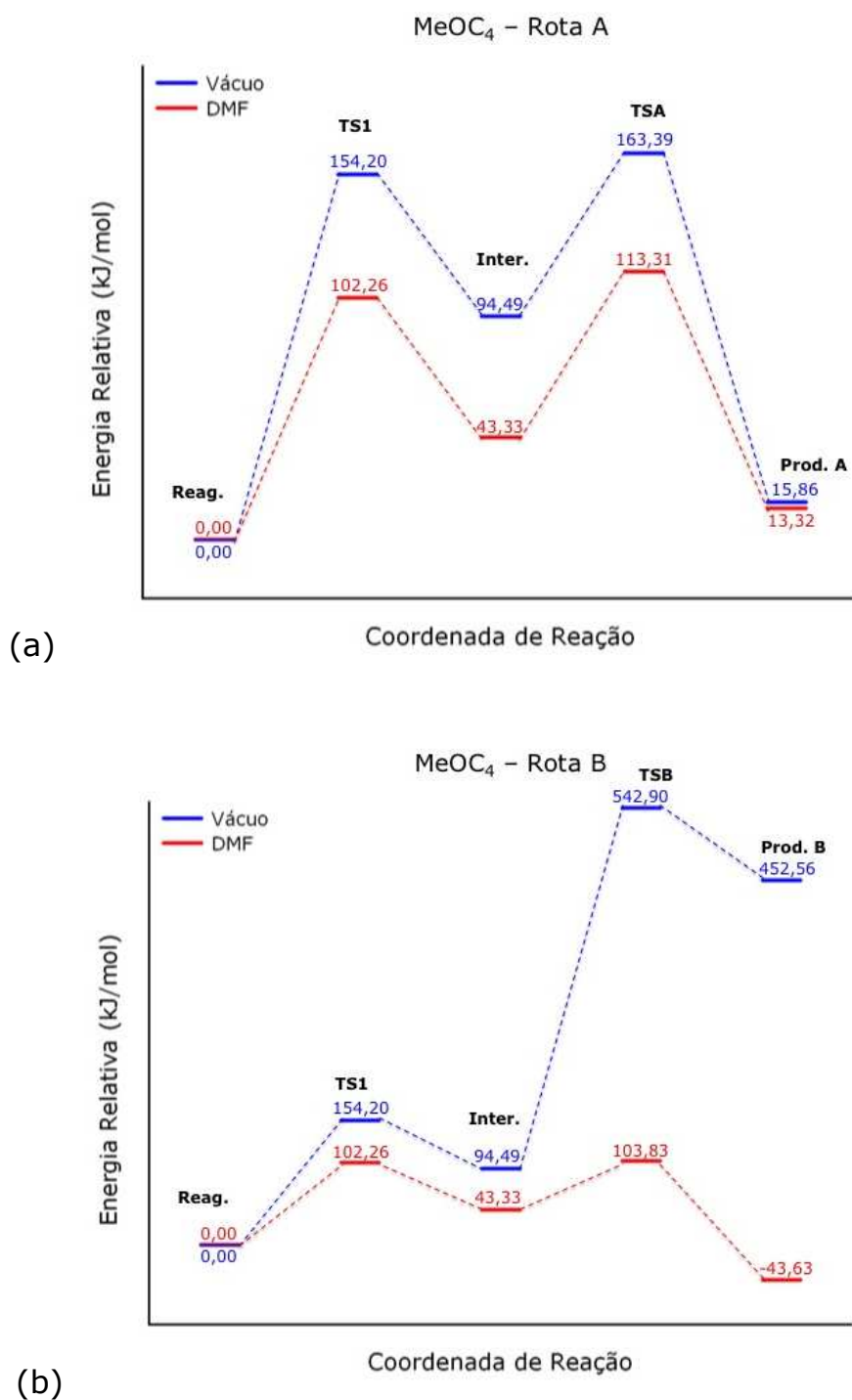


Figura 3.11 - Gráfico da coordenada de reação *versus* energia relativa (kJ/mol) para o sistema MeOC<sub>4</sub>OTs/Py na ausência (azul) e presença (vermelho) de solvente (a) via rota A e (b) via rota B, calculadas com o método DFT/B3LYP/6-31G\*.

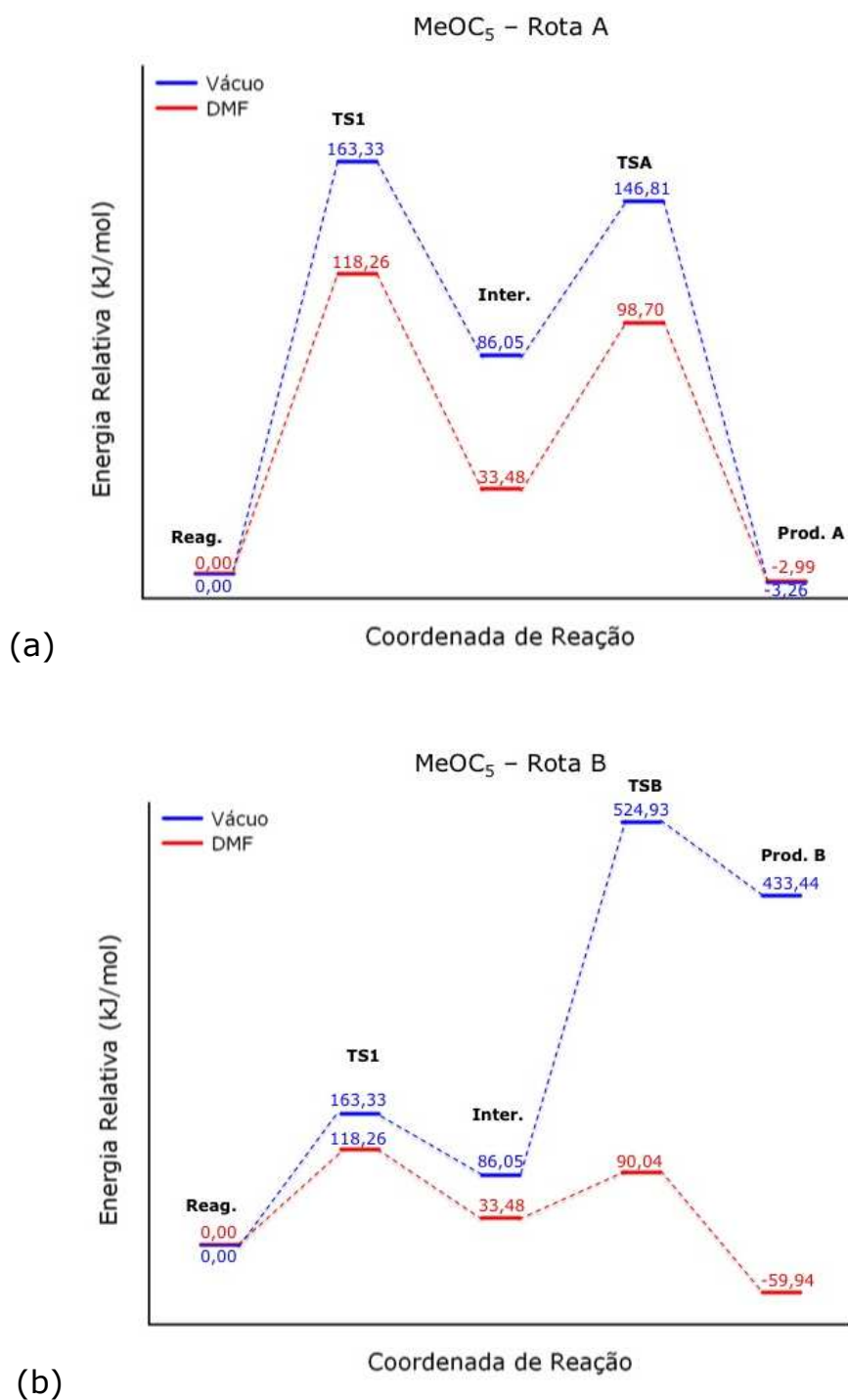


Figura 3.12 - Gráfico da coordenada de reação *versus* energia relativa (kJ/mol) para o sistema MeOC<sub>5</sub>OTs/Py na ausência (azul) e presença (vermelho) de solvente (a) via rota A e (b) via rota B, calculadas com o método DFT/B3LYP/6-31G\*.

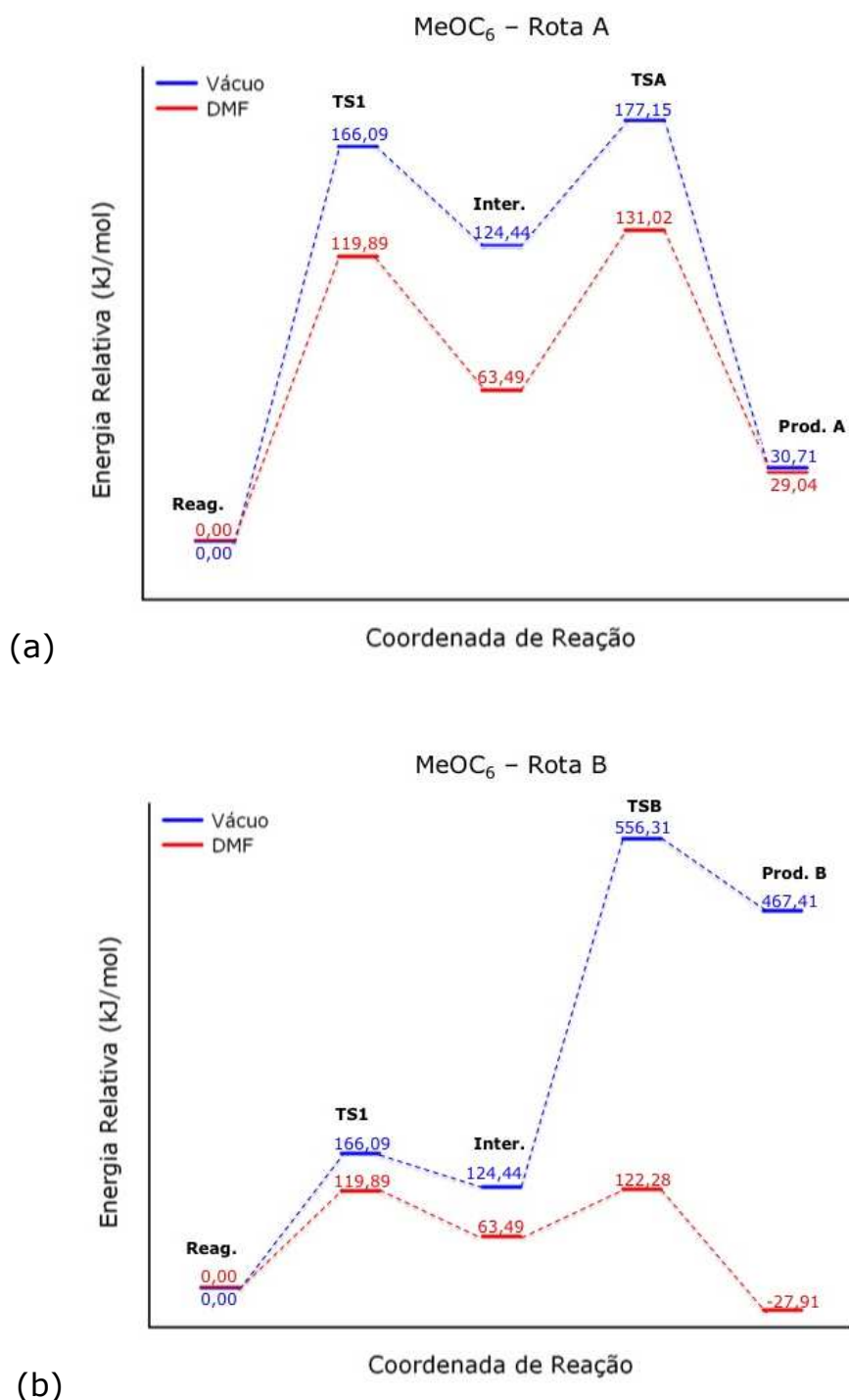


Figura 3.13 – Gráfico da coordenada de reação *versus* energia relativa (kJ/mol) para o sistema MeOC<sub>6</sub>OTs/Py na ausência (azul) e presença (vermelho) de solvente (a) via rota A e (b) via rota B, calculadas com o método DFT/B3LYP/6-31G\*.

A análise dos gráficos para o rearranjo e transferência de metila nos sistemas MeOC<sub>n</sub>OTs/Py, apresentados nas Figuras 3.14 e 3.15, indica que, para ambos os mecanismos, tanto na fase gasosa

quanto na presença de solvente, a reatividade do sistema frente a transferência do grupo metila decresce na seguinte ordem:  $\text{MeOC}_5\text{OTs} > \text{MeOC}_4\text{OTs} > \text{MeOC}_6\text{OTs} > \text{MeOC}_2\text{OTs}$ . É interessante notar que esta tendência relaciona-se à estabilidade clássica de oxacicloalcanos (produto final em ambos mecanismos): oxaciclohexano (pirano)  $>$  oxaciclopentano (tetrahydrofurano)  $>$  oxacicloheptano (oxapano)  $>$  oxaciclopropano (óxido de etileno). O tosilato de metoxipentila ( $\text{MeOC}_5\text{OTs}$ ) é o sistema que apresenta menores energias de ativação e de reação, sendo portanto, o que sofre rearranjo mais facilmente e, conseqüentemente, favorece a metilação os grupos piridínicos em detrimento da metoxipentilação. Comportamento semelhante é observado para o tosilato de metoxibutila ( $\text{MeOC}_4\text{OTs}$ ), que apresenta energias próximas às do  $\text{MeOC}_5\text{OTs}$ . Em contrapartida, os tosilatos de metoxietila ( $\text{MeOC}_2\text{OTs}$ ) e metoxihexila ( $\text{MeOC}_6\text{OTs}$ ) apresentam as maiores energias de ativação e reação, indicando que a ciclização intramolecular não ocorre facilmente, o que eventualmente se traduz em uma menor possibilidade de transferência de grupos metila e formação de porfirinas metiladas. Estes resultados computacionais são consistentes com os dados experimentais apresentados anteriormente na Figura 3.5.

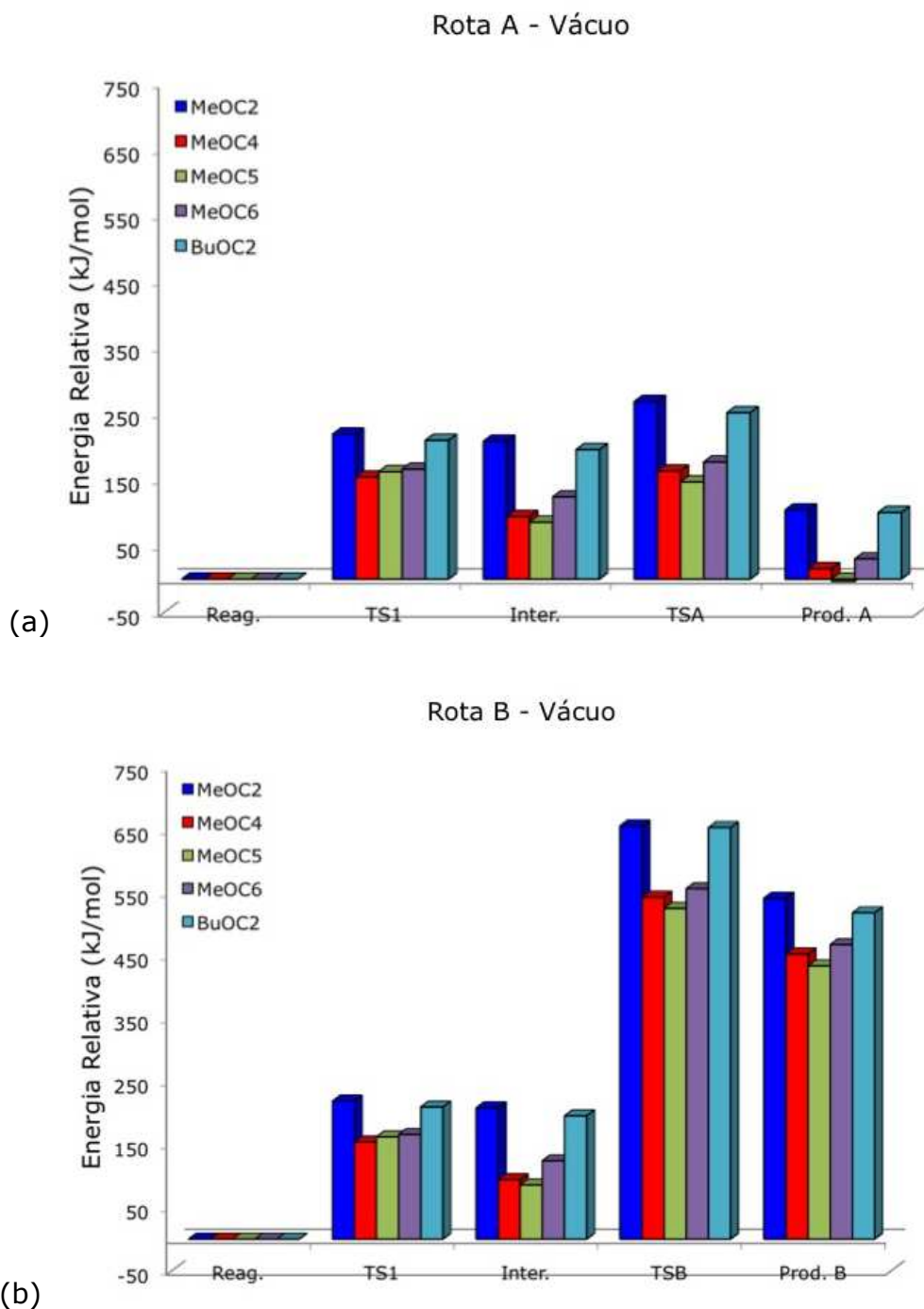
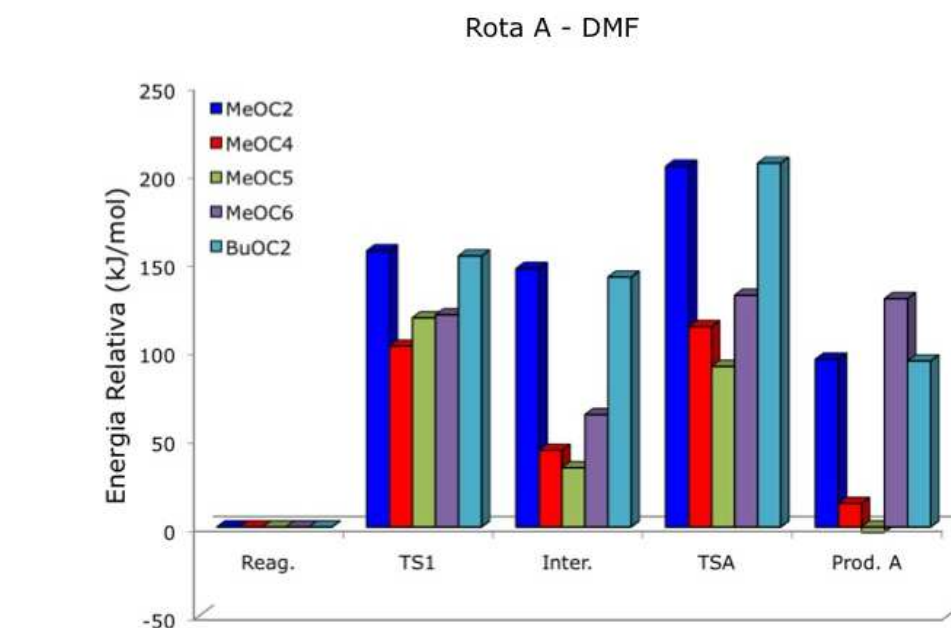
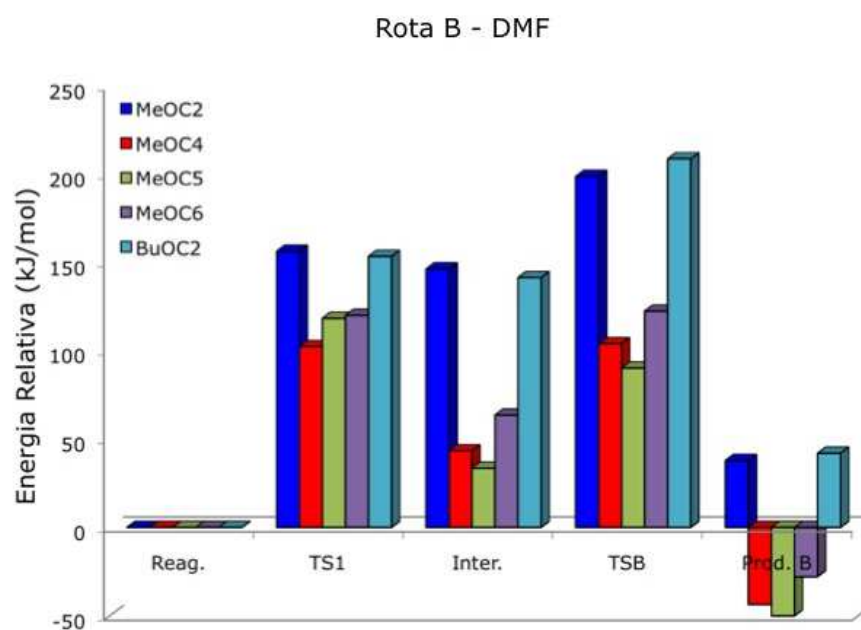


Figura 3.14 – Gráfico das energias relativas (kJ/mol) dos sistemas MeOC<sub>n</sub>OTs/Py investigados em fase gasosa (a) via rota A e (b) via rota B.



(a)



(b)

Figura 3.15 - Gráfico das energias relativas (kJ/mol) dos sistemas  $\text{MeOC}_n\text{OTs/Py}$  investigados em DMF (a) via rota A e (b) via rota B (Notar mudança de escala com relação a Figura 3.14).

### 3.4.1 Sistemas MeOC<sub>2</sub>OTs *versus* BuOC<sub>2</sub>OTs

Os resultados experimentais e computacionais para a série MeOC<sub>n</sub>OTs indicam que os agentes alquilantes, que durante o processo de rearranjo dão origem a oxacicloalcanos instáveis, reduzem a competição da metilação indesejada *versus* a metoxialquilação dos grupos piridínicos. Nesse contexto, uma vez que o grupo epóxido é muito instável, a incorporação de cadeias laterais contendo oxigênio a dois átomos de carbono do grupo piridínico se mostra como uma alternativa viável para a obtenção de porfirinas contendo cadeias laterais oxigenadas com contaminação mínima de grupos alquilas provenientes de rearranjo.

Na tentativa de reduzir a toxicidade das *N*-alquilpiridilporfirinas sem alterar dramaticamente suas lipofilicidades e evitando, ainda, contaminações com produtos alquilados, testou-se a utilização de uma cadeia alquílica longa com 7 átomos (equivalente ao grupo MeOC<sub>5</sub>), mas com o átomo de oxigênio localizado no interior da cadeia, especificamente, a dois carbonos do *N*-piridil (grupo BuOC<sub>2</sub>), ao invés da extremidade (no caso dos derivados metoxilados). Esta estratégia originou uma porfirina com propriedades químicas e biológicas excepcionais, a MnTnBuOC<sub>2</sub>-2-PyP<sup>5+</sup> (Fig. 3.16), sem interferência apreciável de reações de alquilação competitivas (RAJIC et al., 2012).

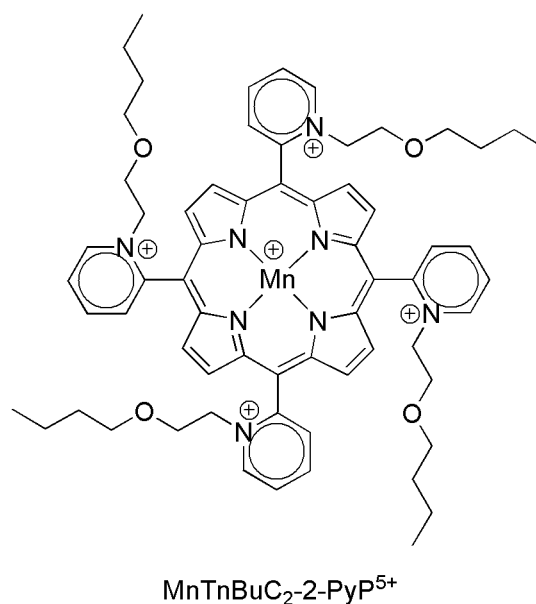


Figura 3.16 - Estrutura da MnTnBuOC<sub>2</sub>-2-PyP<sup>5+</sup>.

As rotas de rearranjo do agente butoxietilante BuOC<sub>2</sub>OTs foram investigados através de simulação computacional, de modo análogo ao descrito para a série metoxilada. Como o BuOC<sub>2</sub>OTs se aproxima estruturalmente do MeOC<sub>2</sub>OTs, os resultados desses dois sistemas são apresentados conjuntamente. Os gráficos das coordenadas de reação para as rotas A e B (em fase gasosa e em solvente) são apresentados nas Figuras 3.17 e 3.18.

O cálculo de IRC do sistema BuOC<sub>2</sub>OTs/Py foi similar ao do MeOC<sub>2</sub>OTs/Py, apresentando um caminho de reação via 1 intermediário e 2 TS. Energeticamente (Figs. 3.19 e 3.20), os dois sistemas são bastante parecidos, o que corrobora a observação experimental de que a reatividade do BuOC<sub>2</sub>OTs e MeOC<sub>2</sub>OTs são semelhantes, sendo a alcóxialquilação favorecida em detrimento à alquilação.

Evidentemente, de modo análogo ao discutido para os sistemas MeOC<sub>n</sub>OTs, o BuOC<sub>2</sub>OTs reage, na fase gasosa, preferencialmente pela rota A, enquanto que na presença de solvente a rota B é preferencial.

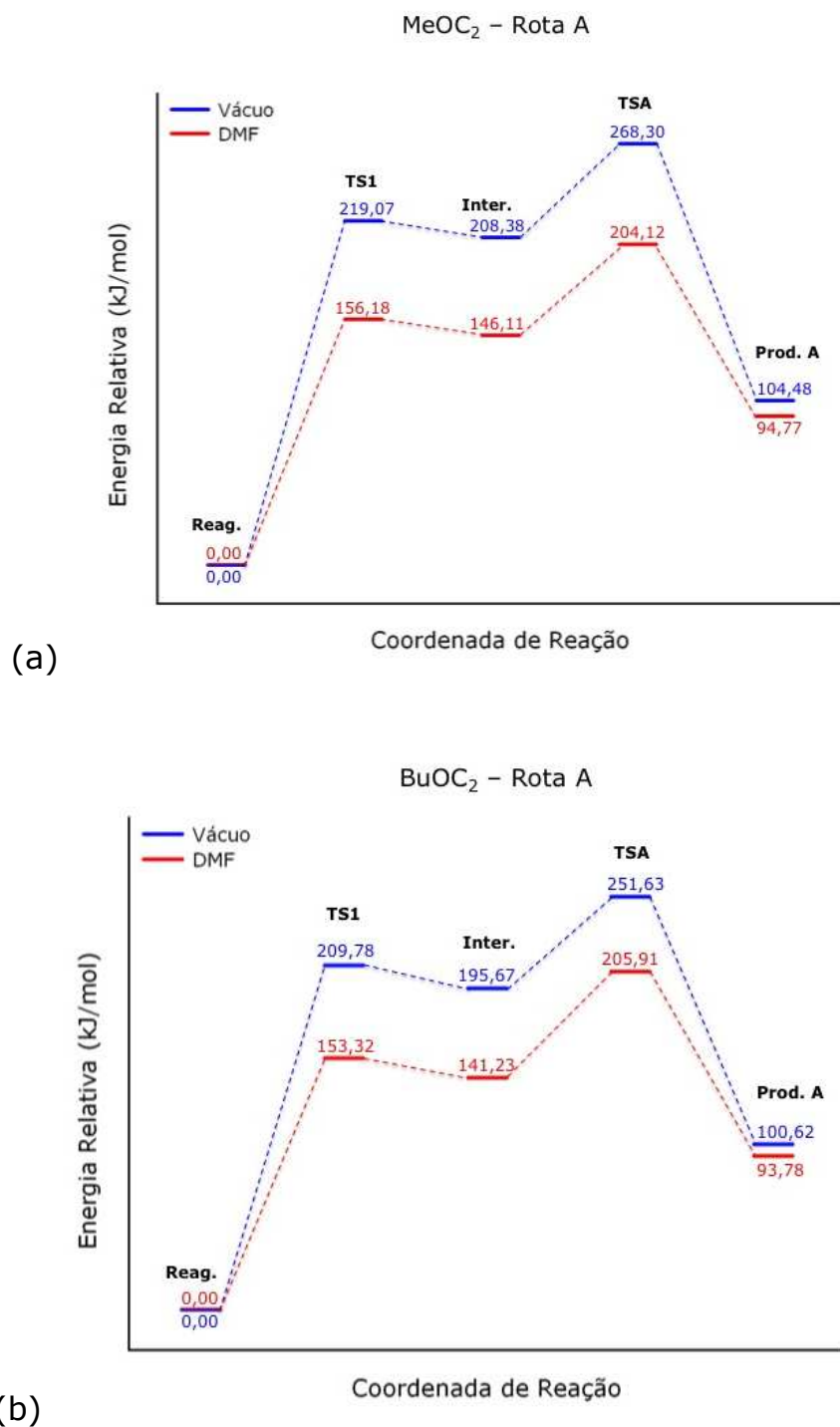
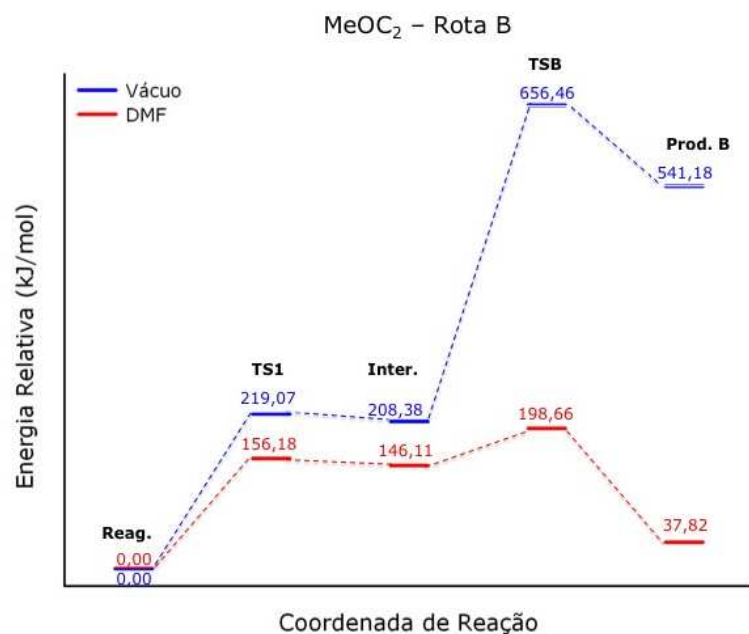
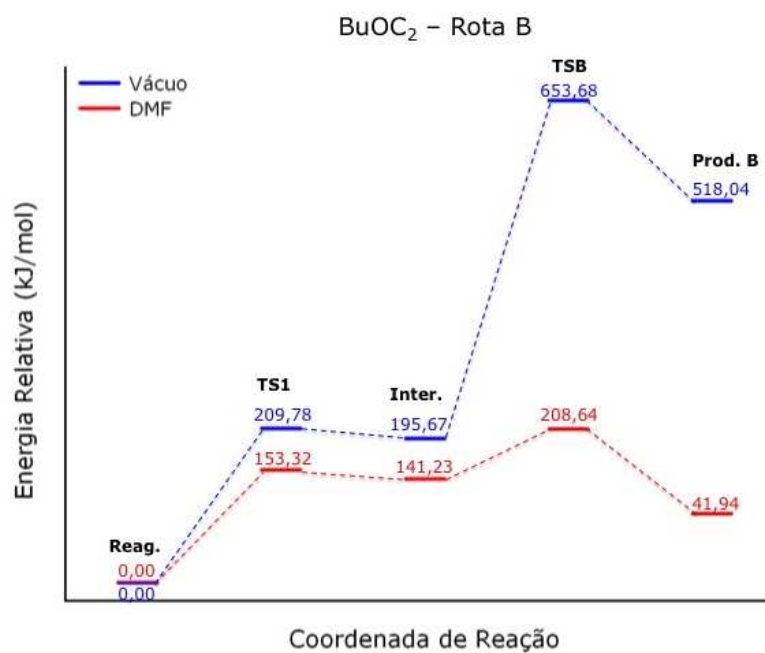


Figura 3.17 - Coordenada de reação *versus* energia relativa via rota A para os sistemas (a) MeOC<sub>2</sub>OTs/Py e (a) BuOC<sub>2</sub>OTs/Py na ausência (azul) e presença (vermelho) de solvente, calculadas com o método DFT/B3LYP/6-31G\*.



(a)



(b)

Figura 3.18 - Coordenada de reação *versus* energia relativa via rota B para os sistemas (a) MeOC<sub>2</sub>OTs/Py e (a) BuOC<sub>2</sub>OTs/Py na ausência (azul) e presença (vermelho) de solvente, calculadas com o método DFT/B3LYP/6-31G\*.

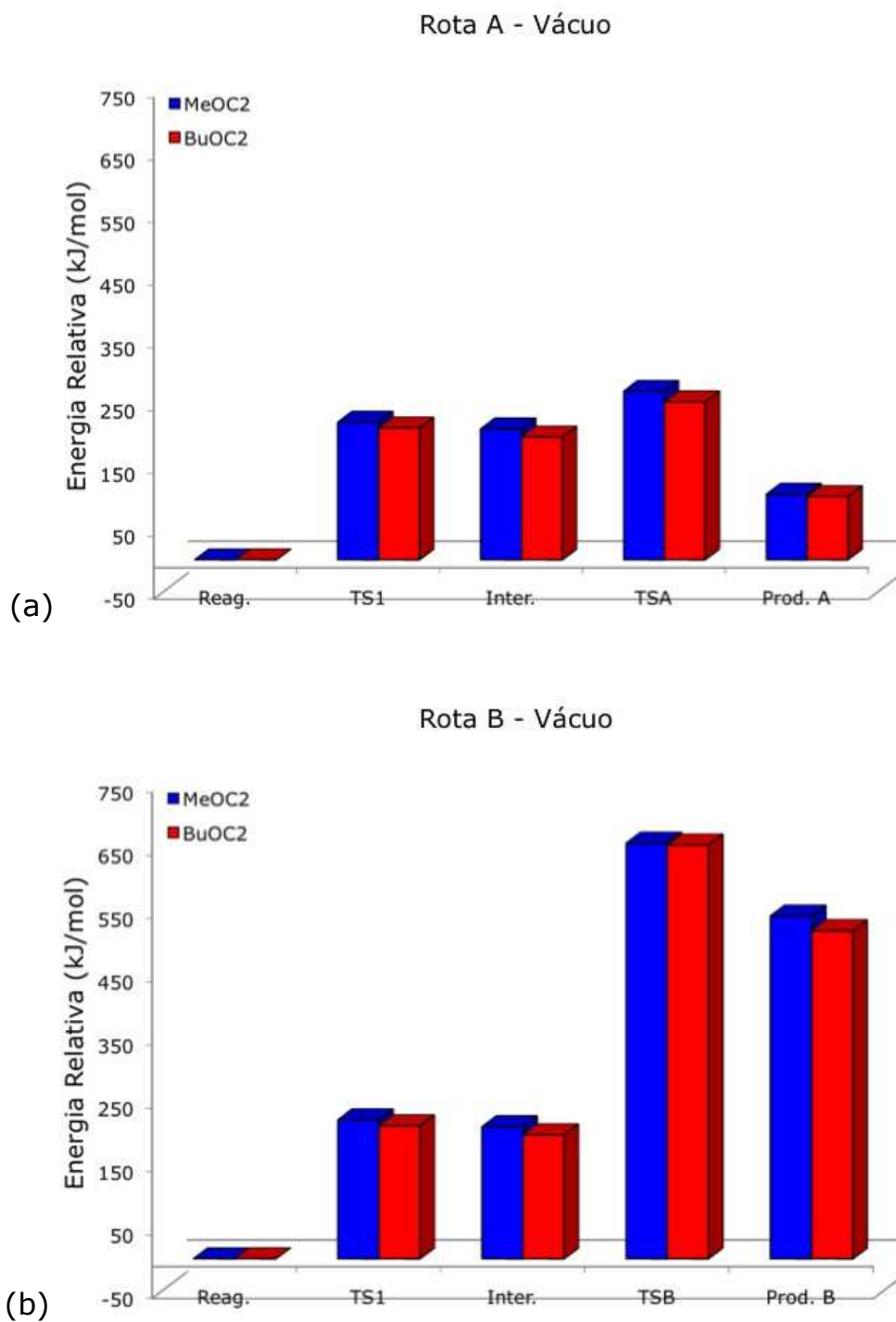


Figura 3.19 - Gráfico das energias relativas (kJ/mol) do MeOC<sub>2</sub> e BuOC<sub>2</sub> investigados em fase gasosa (a) via rota A e (b) via rota B.

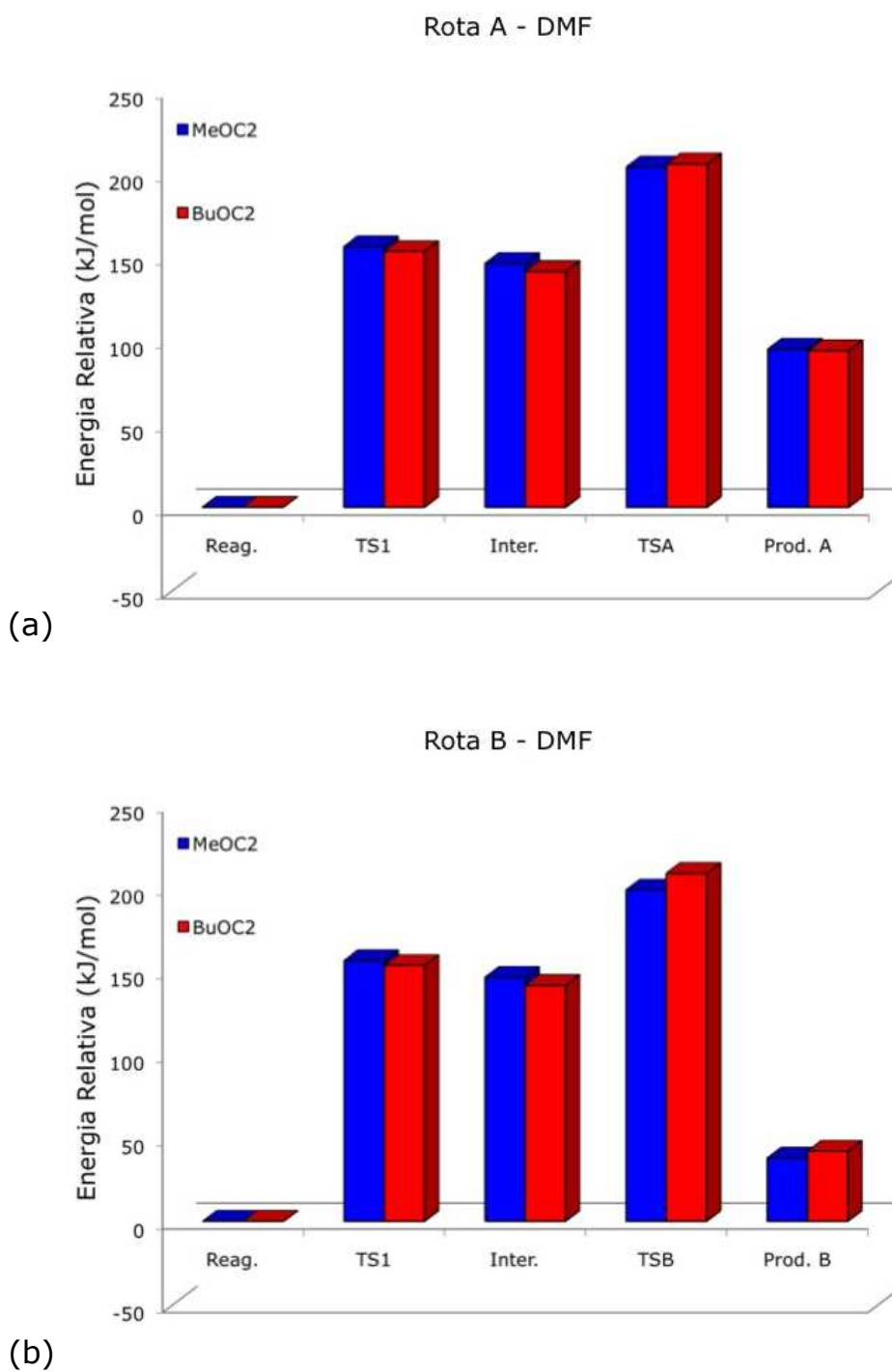


Figura 3.20 - Gráfico das energias relativas (kJ/mol) do MeOC<sub>2</sub> e BuOC<sub>2</sub> investigados em DMF (a) via rota A e (b) via rota B (Notar mudança de escala com relação a Figura 3.19).

### 3.5 CONCLUSÕES

A investigação computacional da ciclização intramolecular da série  $\text{MeOC}_n\text{OTs}$  forneceu subsídios para suportar as hipóteses experimentais de que a origem do grupo metila que compete com a metoxialquilação derivaria do próprio agente metoxialquilante. Além disso, esse estudo serviu também para entender o comportamento de sistemas com diferentes grupos alquilas e para prever a taxa de metilação de todos os isômeros da  $\text{MnTnBuOC}_2\text{PyP}^{5+}$ .

A elevada quantidade de porfirinas metiladas para o sistema utilizando  $\text{MeOC}_4\text{OTs}$  e  $\text{MeOC}_5\text{OTs}$  é justificada pelas energias de ativação e reação relativamente baixas calculadas para os sistemas  $\text{MeOC}_n\text{OTs/Py}$  ( $n = 4$  e  $5$ ).

O  $\text{BuOC}_2\text{OTs}$  apresentou energias semelhantes ao  $\text{MeOC}_2\text{OTs}$ , indicando que a obtenção dessas porfirinas parcialmente butiladas deve ser pequena. De fato, a butoxietilação é a reação dominante na síntese da  $\text{MnTnBuOC}_2\text{-2-PyP}^{5+}$ .

### 3.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARONE, V.; COSSI, M. Quantum calculations of molecular energies and energy gradients in solution by a conductor solvent model. *J. Phys. Chem. A*, v. 102, p. 1995-2001, 1998.

BATINIĆ-HARBELE, I.; SPASOJEVIĆ, I.; STEVENS, R.D.; HAMBRIGHT, P.; FRIDOVICH, I. Manganese(III) *meso*-tetrakis(*ortho*-*N*-alkylpyridyl)porphyrins. Synthesis, characterization, and catalysis of  $O_2^{\cdot-}$  dismutation. *Dalton Trans.*, p. 2689-2696, 2002.

BATINIĆ-HARBELE, I.; SPASOJEVIĆ, I.; STEVENS, R.D.; HAMBRIGHT, P.; NETA, P.; OKADA-MATSUMOTO, A.; FRIDOVICH, I. New class of potent catalysts of  $O_2^{\cdot-}$  dismutation. Mn(III) *ortho*-methoxyethylpyridyl- and di-*ortho*-methoxyethylimidazolylporphyrins. *Dalton Trans.*, p. 1696-1702, 2004.

BATINIĆ-HARBELE, I.; SPASOJEVIĆ, I.; STEVENS, R.D.; BONDURANT, B.; OKADA-MATSUMOTO, A.; FRIDOVICH, I.; VUJAŠKOVIĆ, Ž.; DEWHIRST, M.W. New PEG-ylated Mn(III) porphyrins approaching catalytic activity of SOD enzyme. *Dalton Trans.*, p. 617-624, 2006.

BATINIĆ-HARBELE, I.; REBOUÇAS, J.S.; SPASOJEVIĆ, I. Superoxide Dismutase Mimics: Chemistry, Pharmacology and Therapeutic Potential. *Antioxidants and Redox Signalling*, v.13, p. 877-918, 2010.

BATINIĆ-HARBELE, I.; RAJIC, Z.; TOVMASYAN, A.; REBOUÇAS, J.S.; YE, X.; LEONG, K.W.; DEWHIRST, M.W.; VUJASKOVIC, Z.; BENOVA, L.; SPASOJEVIĆ, I. Diverse functions of cationic Mn(III) *N*-substituted pyridylporphyrins, recognized as SOD mimics. *Free Rad. Bio. Med.*, v. 51, p. 1035-1053, 2011.

BATINIĆ-HARBELE, I.; REBOUÇAS, J.S.; BENOVA, L.; SPASOJEVIĆ, I. *Chemistry, biology and medical effects of water-soluble metalloporphyrins*. Handbook of Porphyrin Science. Singapura: World Scientific, 2011. V. 11, cap. 52, p. 291-393.

BECKE, A.D.; Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic behavior. *Phys. Rev. A*, v. 38, p. 3098-3100, 1988.

COSSI, M.; REGA, N.; SCALMANI, G.; BARONE, V. Energies, structures, and electronic properties of molecules in solution with the C-PCM solvation model. *J. Comp. Chem.*, v. 24, p. 669-681, 2003.

DENNINGTON, R.; KEITH, T.; MILLAM, J. *GaussView, Version 5*. Semichem Inc., Shawnee Mission KS, 2009.

FRISCH, M.J.; TRUCKS, G.W.; SCHLEGEL, H.B.; SCUSERIA, G.E.; ROBB, M.A.; CHEESEMAN, J.R.; SCALMANI, G.; BARONE, V.; MENUCCI, B.; PETERSSON, G.A.; NAKATSUJI, H.; CARICATO, M.; LI, X.; HRATCHIAN, H.P.; IZMAYLOV, A.F.; BLOINO, J.; ZHENG, G.; SONNENBERG, J.L.; HADA, M.; EHARA, M.; TOYOTA, K.; FUKUDA, R.; HASEGAWA, J.; ISHIDA, M.; NAKAJIMA, T.; HONDA, Y.; KITAO, O.; NAKAI, H.; VREVEN, T.; MONTGOMERY, Jr., J.A.; PERALTA, J.E.; OGILARIO, F.; BEARPARK, M.; HEYD, J.J.; BROTHERS, E.; KUDIN, K.N.; STAROVEROV, V.N.; KOBAYASHI, R.; NORMAND, J.; RAGHAVACHARI, K.; RENDELL, A.; BURANT J.C.; IYENGAR, S.S.; TOMASI, J.; COSSI, M.; REGA, N.; MILLAM, N.J.; KLENE, M.; KNOX, J.E.; CROSS, J.B.; BAKKEN, V.; ADAMO, C.; JARAMILLO, J.; GOMPERTS, R.; STRATMANN, R.E.; YAZYEV, O.; AUSTIN, A.J.; CAMMI, R.; POMELLI, C.; OCHTERSKI, J.W.; MARTIN, R.L.; MOROKUMA, K.; ZAKRZEWSKI, V.G.; VOTH, G.A.; SALVADOR, P.; DANNENBERG, J.J.; DAPPRICH, S.; DANIELS, A. D.; FARKAS, Ö.; FORESMAN, J.B.; ORTIZ, J.V.; CIOSLOWSKI, J.; FOX, D.J.. Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2009.

GONZALES, C.; SCHLEGEL, H.B. An improved algorithm for reaction- path following. *J. Chem. Phys.*, v. 94, p. 5523-5527, 1990.

GONZALES, C.; SCHLEGEL, H.B. Reaction-path following in mass-weighted internal coordinates. *J. Chem. Phys.*, v. 90, p. 2154-2161, 1989.

HOHENBERG, P.; KOHN, W. Inhomogeneous Electron Gas. *Phys. Rev. B*, v. 136, p. 864-871, 1964.

JENSEN, F. *Introduction to Computational Chemistry*. 1<sup>st</sup> ed. Chinchester: John Wiley & Sons, 1998. 429 p. ISBN 0471984256.

KOS, I.; REBOUÇAS, J.S.; DEFREITAS-SILVA, G.; SALVEMINI, D.; VUJASKOVIC, Z.; DEWHIRST, M.W.; SPASOJEVIĆ, I.; BATINIĆ-HARBELE, I. Lipophilicity of potent porphyrin-based antioxidants: Comparison of *ortho* and *meta* isomers of Mn(III) *N*-alkylpyridylporphyrins. *Free Rad. Biol. Med.*, v. 47, p. 72-78, 2009a.

KOS, I.; BENOVA, L.; SPASOJEVIĆ, I.; REBOUÇAS, J.S.; BATINIĆ-HARBELE, I. High Lipophilicity of meta Mn(III) *N*-Alkylpyridylporphyrin-Based Superoxide Dismutase Mimics Compensates for Their Lower Antioxidant Potency and Makes Them as Effective as Ortho Analogues in Protecting Superoxide Dismutase-Deficient *Escherichia coli*. *J. Med. Chem.*, v. 52, p. 7868-7872, 2009b.

LEE, C.; YANG, W.; PARR, R.G. Development of the Colic-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. *Phys. Rev. B.*, v. 37, p. 785-789, 1988.

OKADA-MATSUMOTO, A.; BATINIĆ-HARBELE, I.; FRIDOVICH, I. Complementation of SOD-deficient *Escherichia coli* by Manganese Porphyrin Mimics of Superoxide Dismutase Activity. *Free Rad. Biol. Med.*, v. 37, p. 401-410, 2004.

RAJIC, Z.; TOVMASYAN, A.; SPASOJEVIĆ, I.; SHENG, H.; LU, M.; LI, A.M.; GRALLA, E.B.; WARNER, D.S.; BENOVA, L.; BATINIĆ-HARBELE, I. A new SOD mimic, Mn(III) *ortho N*-butoxyethylpyridylporphyrin combines superb potency and lipophilicity with low toxicity. *Free Rad. Biol. Med.*, 2012, no prelo.

RASSOLOV, V.; POPLE, J.A.; RATNER, M.; WINDUS, T.L. 6-31G\* basis set for atoms K through Zn. *J. Chem. Phys.*, v. 109, p. 1223-1229, 1998.

REBOUÇAS, J.S.; SPASOJEVIĆ, I.; TIAHJONO, D.H.; RICHAUD, A.; MÉNDEZ, F.; BENOVA, L.; BATINIĆ-HARBELE, I. Redox modulation of oxidative stress by Mn porphyrin-based therapeutics: The effect of charge distribution. *Dalton Trans.*, p. 1233-1242, 2008a.

REBOUÇAS, J. S.; DEFREITAS-SILVA, G.; IDEMORI, Y. M.; SPASOJEVIĆ, I.; BENOVA, L.; BATINIĆ-HARBELE, I. Impact of electrostatics in redox modulation of oxidative stress by Mn porphyrins: protection of SOD-deficient *Escherichia coli* via alternative mechanism where Mn porphyrin acts as a Mn carrier. *Free Radic. Biol. Med.*, v. 45, p. 201-210, 2008b.

REBOUÇAS, J.S.; RAJIC, Z.; TOVMASYAN, A.; PEIXOTO, I.N.; SPASOJEVIĆ, I.; BENOVA, L.; VENTURA, E.; DO MONTE, S.A.; BATINIĆ-HARBELE, I. Experimental and Computational Studies on Mn Porphyrin-Based Therapeutics: Unforeseen Intramolecular Rearrangements on Methoxyalkyl Analogues of MnTE-2-PyP<sup>5+</sup> and MnTnHex-2-PyP<sup>5+</sup>. *Free Rad. Biol. Med.* v. 51. p. S148-S149, 2011.

SOLÀ, M.; LLEDRÓS, A.; DURAN, M.; BERTRÁN, J.; ABBOUD, J.-L. M. Analysis of Solvent Effects on the Menshutkin Reaction. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 113, p. 2873-2879, 1991.

TOVMASYAN, A.G.; RAJIC, Z.; SPASOJEVIĆ, I.; REBOUÇAS, J.S.; CHEN, X.; SALVEMINI, D.; SHENG, H.; WARNER, D.S.; BENOVA, L.; BATINIĆ-HARBELE, I. Methoxy-derivatization of alkyl chains increases the *in vivo* efficacy of cationic Mn porphyrins. Synthesis, characterization, SOD-like activity, and SOD-deficient *E. coli* study of *meta* Mn(III) *N*-methoxyalkylpyridylporphyrins. *Dalton Trans.*, v. 40, p. 4111-4121, 2011.

## **4 ESTUDO COMPUTACIONAL DA DISTORÇÃO DO ANEL PORFIRÍNICO E DA ROTAÇÃO ARIL-PORFIRINA EM PORFIRINAS MESO-SUBSTITUÍDAS**

### **4.1 INTRODUÇÃO**

A perda da planaridade característica do grupo porfina das porfirinas resulta em distorções ou deformações estruturais do anel porfirínico que são, em geral, acompanhadas por profundas modificações nas propriedades físico-químicas e biológicas de metaloporfirinas e *hemeproteínas* (GENO; HALPERN, 1987; ANDERSON et al., 1993; JENTZEN et al., 1995; 1998; SHELNUTT et al., 1998; SONG et al., 1998a; KOJIMA et al., 2009).

Um exemplo típico da ocorrência de deformações estruturais em porfirinas naturais pode ser encontrado no grupo *heme* de algumas *hemeproteínas*. Estruturas cristalinas de raios-X desse grupo mostram que, quando associados a proteínas e enzimas, este pode apresentar um considerável grau de deformação, como ilustrado na Figura 4.1 (JENTZEN et al.; 1998; SHELNUTT et al., 1998; MEDFORTH et al., 2003; SENGE, 2006). Curiosamente esse mesmo grupo, quando isolado em solução, apresenta estrutura plana.

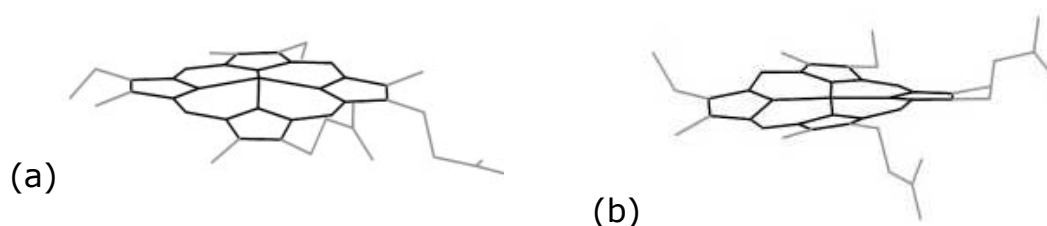


Figura 4.1 – Conformação do grupo *heme* em estruturas cristalinas da (a) desoxi-hemoglobina e do (b) citocromo *c*, respectivamente. A parte protéica foi removida para enfatizar melhor as distorções do anel porfirínico nestes sistemas. Retirado de SHELNUTT et al. (1998).

Além disso, estudos sistemáticos de uma série de *hemeproteínas* diversas indicam que os modos de distorção, para uma mesma classe de *hemeproteínas*, são conservados; mesmo quando estes são energeticamente desfavoráveis (JENTZEN et al.; 1998; SHELNUTT et al., 1998; GRUDEN et al., 2001; OLEA JR.; JOHN; MARLETTA, 2010). Essas observações sugerem fortemente que a conformação estrutural do grupo *heme* é modulada pelo ambiente protéico e pode estar implicado na regulação das funções biológicas das *hemeproteínas*.

Em sistemas porfirínicos simples, tais como os grupos *heme* isolados ou (metalo)porfirinas sintéticas, a introdução de substituintes volumosos na periferia do macrociclo, a protonação dos nitrogênios centrais, a metalação com íons metálicos de tamanho não apropriado para a cavidade central ou a coordenação axial de ligações com alta demanda estérea são alguns dos fatores que ocasionam a perda da planaridade característica das porfirinas (MILGROM, 1997; GRUDEN et al., 2001; KOJIMA et al., 2009; CHAUVIN et al., 2011) originando compostos distorcidos ou deformados estáveis. Uma vez que tais deformações alteram as características geométricas e eletrônicas desses sistemas, acredita-se que estas distorções também devam exercer grande influência nas propriedades e reatividade dos modelos biomiméticos de diversas *hemeproteínas* baseados em *meso*-arilporfirinas; um

aspecto que tem recebido bastante atenção desde o advento de catalisadores porfirínicos de terceira geração, contendo halogênios nas posições  $\beta$ -pirrólicas do macrociclo. Tais compostos apresentam distorções severas do plano médio da porfirina, o que resulta em propriedades espectroscópicas, eletroquímicas e de reatividade bastante diferenciadas dos congêneres planos de primeira e segunda gerações.

Enquanto muitas das deformações estudadas até então são provenientes de natureza estática, associada a um tipo particular de modificação no (ou em torno do) anel porfirínico, distorções do plano porfirínico também podem ser de natureza dinâmica, associadas a intermediários ou estados de transição entre duas conformações planas estáveis. Um exemplo típico ocorre nas *meso*-tetraarilporfirinas simples, como as tetrafenilporfirinas e as *N*-piridilporfirinas, cujas propriedades, tanto no estado sólido, quanto em solução, indicam que os grupos arila posicionam-se aproximadamente perpendicularmente dos anéis porfirínicos planos

A rotação do grupo aril em torno do macrociclo normalmente ocorre em associação a um estado de transição (TS) deformado estruturalmente, de modo a minimizar as interações estéreas entre os dois anéis, em uma configuração temporariamente coplanar entre estes. Uma representação esquemática do mecanismo da rotação do grupo aril em torno do macrociclo é apresentada na Figura 4.2. O impacto da modulação desta rotação pela natureza dos grupos substituintes no anel arila ou no anel porfirínico é evidente pela obtenção de atropoisômeros em algumas porfirinas: grupos arilas *orto*-substituídos, por exemplo, levam à formação de atropoisômeros, enquanto substituintes nas posições *meta* e *para* não impedem a livre rotação aril-porfirina à temperatura ambiente.

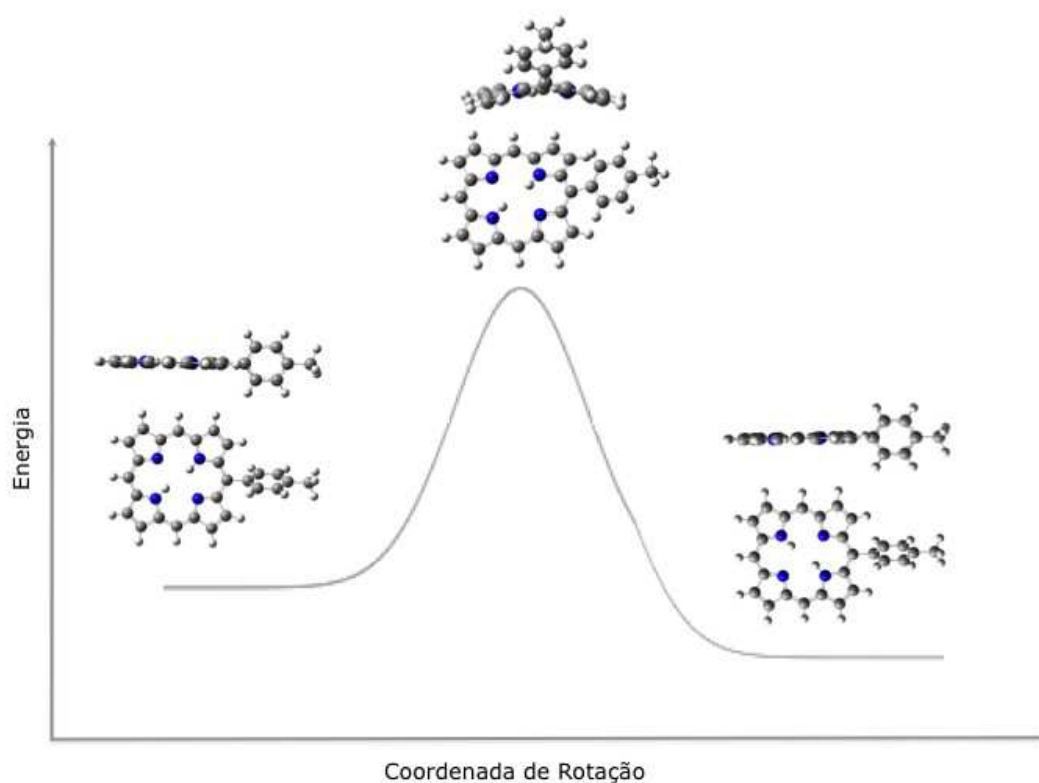


Figura 4.2 - Mecanismo de rotação aril-porfirina, com vista superior e lateral do anel porfirínico.

#### 4.1.1 Classificação da Distorção e Método de Análise

As distorções do anel porfirínico podem ser classificadas em distorções no plano (Dip) ou fora do plano (Doo) (JENTZEN et al., 1998; GRUDEN et al., 2001), sendo esta última a mais pronunciada e de maior impacto para os sistemas biológicos (JARZEŃKI; SPIRO, 2005).

As Doo podem ser separadas e classificadas de acordo com cinco conformações típicas: "saddle" (sad, sela), "ruffle" (ruf, franzida), "wave" (wav, onda, que é duplamente degenerada), "dome" (dom, domo) e "propeller" (pro, ventoinha). Essas conformações típicas estão apresentadas na Figura 4.3.

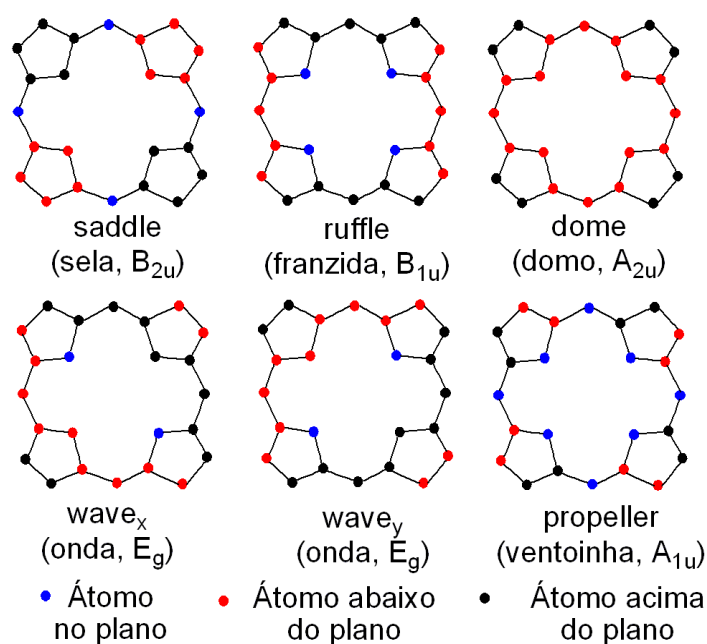


Figura 4.3 - Conformações típicas das Doop.

A Doop geral do anel porfirínico se apresenta como uma combinação dessas conformações básicas (JENTZEN et al.; 1997) e, devido às similaridades entre essas deformações estruturais e os modos normais de vibração do anel porfirínico, um método para a análise da contribuição individual das conformações básicas para a Doop do macrociclo foi proposto. Conhecido como “Normal-coordinate Structural Decomposition” (NSD), este método associa a energia de cada conformação com a energia do modo normal de vibração correspondente em uma porfirina plana. As coordenadas vibracionais de frequência mais baixas. Dessa maneira, a distorção é descrita em termos do deslocamento ao longo da coordenada normal de mais baixa frequência e tratada quantitativamente como um combinação linear de cada conformação, tendo a porfinatocobre(II) como referência (JENTZEN et al., 1997; 1998; SHELNUTT et al., 1998; GRUDEN et al., 2001).

As deformações no plano (Dip), assim como as deformações fora do plano (Doop), são classificadas de acordo com cinco conformações típicas:  $A_{1g}$ ,  $A_{2g}$ ,  $B_{1g}$ ,  $B_{2g}$  e  $E_g$  (duplamente

degenerada) (JENTZEN et al., 1997; SONG et al., 2008b). Essas deformações são ocasionadas pela expansão e compressão do anel porfirínico e, quando comparadas às Doop, são menos intensas e de difícil interpretação física.

Como os derivados das *meso*-tetrafenilporfirinas ( $H_2TPP$ ) e das *meso*-tetrapiridilporfirinas ( $H_2TPyP$ ) se encontram entre os modelos biomiméticos mais relevantes, os derivados dessas porfirinas foram investigados.

## 4.2 OBJETIVOS

O objetivo deste capítulo consiste no estudo, através de simulação computacional, a deformação estrutural de sistemas derivados da 3- e da 4-metilfenilporfirina, que são sistemas ricos em elétrons, e da (*N*-metilpiridínio-3-il)porfirinas e da (*N*-metilpiridínio-4-il)porfirinas, que são deficientes em elétrons.

Dentre os objetivos específicos estão analisar a influência do número de substituintes arilas, padrão de substituição na posição *meso* e das características eletrônicas do grupo arila sobre o mecanismo de rotação aril-porfirina. Procura-se avaliar o impacto desses fatores sobre os modos de deformação do anel porfirínico no estado de transição e na barreira energética da rotação aril-porfirina.

## 4.3 METODOLOGIA COMPUTACIONAL

### 4.3.1 Otimização das Estruturas

O programa GaussView 5.0 (DENNINGTON et al., 2009) foi utilizado para a construção das estruturas das porfirinas investigadas. Cálculos de otimização e frequência vibracional dos estados fundamentais e de transição foram realizados com o método DFT (HOHENBERG; KOHN, 1964), funcional híbrido B3LYP

(BECKE, 1988; LEE et al., 1988) e o conjunto de bases 6-31G\* (RASSOLOV et al., 1998) implementado no pacote computacional Gaussian 09 (FRISCH et al., 2009). As energias relativas para todos os pontos estacionários foram corrigidas com a energia do ponto zero (ZPE).

O padrão de substituição *meso* possibilita a formação de 5 compostos homólogos: **5**-aril- (mono), **5-15**-diaril- (*trans*-di), **5-10**-diaril- (*cis*-di), **5, 10, 15**-trisaril (ponta), **5,10,15**-trisaril (meio) e **5,10,15,20**-tetraarilporfirinas (tetra). Os números em negrito representam a posição do grupo arila rotacionado. Essas estruturas estão apresentadas na Figura 4.4.

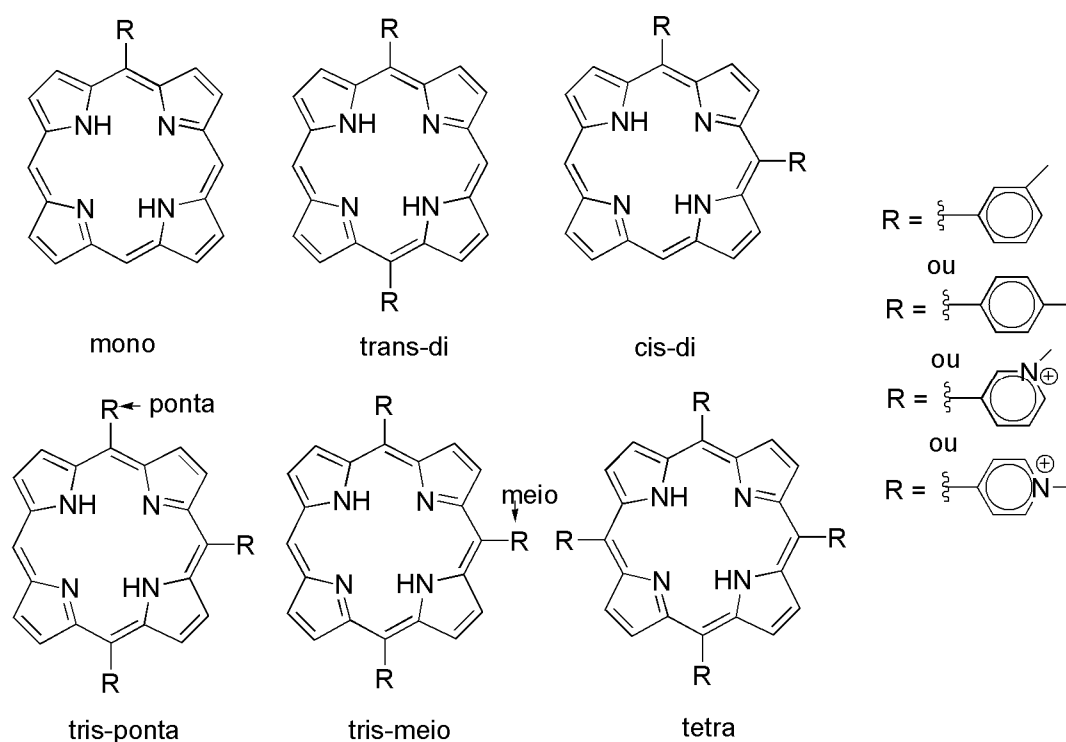


Figura 4.4 - Padrão de substituição das porfirinas investigadas com os grupos arilas investigados.

A rotação do grupo arila na posição 10 e das posições 5 ou 15 na tris-arilporfirina (Fig. 4.4) foram calculadas de maneira independente, uma vez que esses dois conjuntos não são

relacionados por simetria. A rotação dessas posições foi denominada meio e ponta respectivamente (Fig. 4.4).

### 4.3.2 Análise das Deformações Estruturais

A contribuição quantitativa das conformações típicas da Doop na geometria distorcida associada a cada estado de transição do mecanismo de rotação aril-porfirina foi analisada pelo método "Normal-coordinate Structure Decomposition", através do programa computacional NsdGUI (versão 2.0) desenvolvido no Sandia National Laboratories (Albuquerque, NM, EUA) por Dr. Lisong Sun and Dr. John A. Shelnutt e disponível on-line em <http://jasheln.unm.edu>.

Neste tipo de análise, utilizam-se como entrada de dados estruturas otimizadas no formato "Protein Data Base" (pdb). Embora sejam fornecidas para o programa as coordenadas de todos os átomos, este reconhece e analisa apenas o anel porfirínico constituído pelos 20 carbonos e 4 nitrogênios centrais, uma vez que os grupos substituintes não são descritos pelas conformações típicas de deformação estrutural.

### 4.3.3 PCA

As contribuições das conformações típicas da Doop, foram analisadas, juntamente com as barreiras rotacionais, por análise de componentes principais (PCA) associada ao pacote estatístico The Unscrambler. Todos os gráficos foram construídos no Origin 7.5.

## 4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A ocorrência de deformações estruturais do anel porfirínico influencia as propriedades físico-químicas e biológicas das porfirinas. Essas deformações estruturais nas *meso*-arilporfirinas, podem estar associadas a estados de transição entre duas

conformações estáveis (Fig. 4.2), denominadas nesta dissertação reagente e produto.

Essas deformações estruturais podem ser classificadas em deformações no plano (Dip) e fora do plano (DooP) se apresentam como uma combinação das suas conformações básicas, que para a Dip são  $A_{1g}$ ,  $A_{2g}$ ,  $B_{1g}$ ,  $B_{2g}$  e  $E_g$  (duplamente degenerada) e "saddle" (sela,  $B_{2u}$ ), "ruffle" (franzida,  $B_{1u}$ ), "wave" (onda,  $E_g$ , que é duplamente degenerada), "dome" (domo,  $A_{2u}$ ) e "propeller" (ventoinha,  $A_{1u}$ ) para as DooP. A contribuição de cada conformação para a referente deformação na geometria distorcida associada à cada estado de transição do mecanismo de rotação aril-porfirina foram calculadas pelo método NSD.

As deformações no plano (Dip) e fora do plano (DooP) para todas as estruturas investigadas são apresentadas na Figura 4.5. Estes gráficos indicam que a deformação fora do plano (DooP) é significativamente mais intensa e relevante que a deformação no plano (Dip), o que é consistente com os dados para outras porfirinas da literatura (SHELNUTT et al., 1998).

Embora a Dip possa futuramente vir a ter alguma interpretação física, a análise neste estudo, de modo semelhante àqueles da literatura (JENTZEN et al., 1997; SHELNUTT et al., 1998; SONG et al., 2008b), limitou-se às investigações da DooP. Os valores elevados de DooP podem ser interpretados como um reflexo da alta deformação do anel porfirínico necessária para acomodar o grupo arila em uma configuração coplanar, minimizando a interação estérea entre os hidrogênios *orto*-arilas e aqueles  $\beta$ -pirrólicos, em consonância com o mecanismo de rotação aril-porfirina proposto (Fig. 4.2).

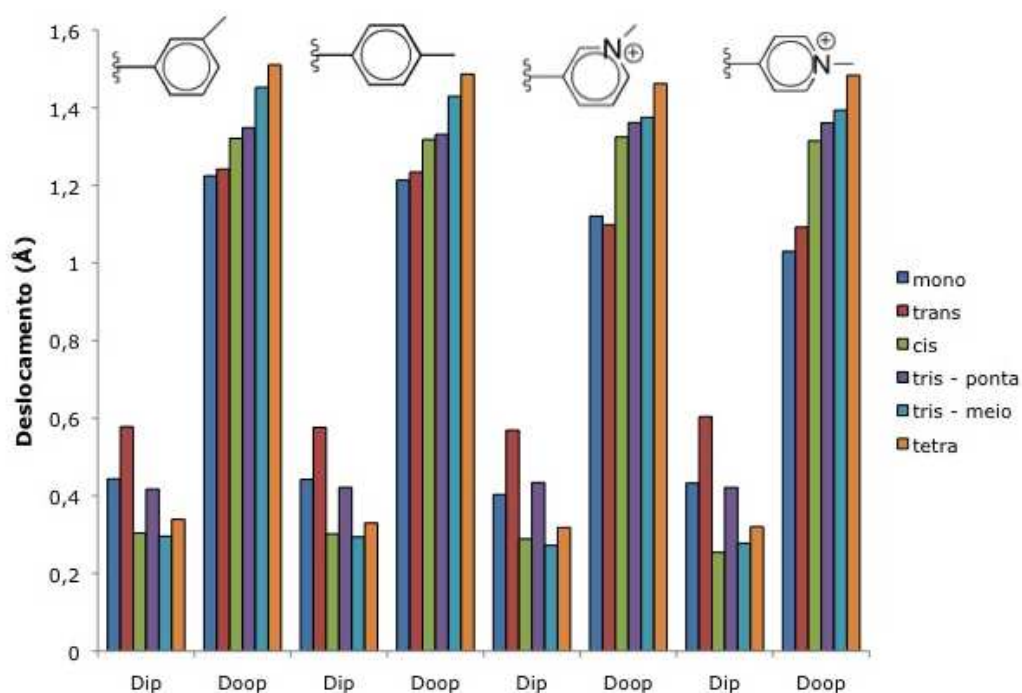


Figura 4.5 – Gráfico das distorções no plano (Dip) e fora do plano (DooP) do anel porfirínico para todos os sistemas investigados.

Para facilitar a interpretação física da DooP, foram determinadas as contribuições das conformações típicas de DooP (Fig. 4.3) para a deformação DooP total em cada um dos sistemas, conforme apresentado nas Figuras 4.6 e 4.7.

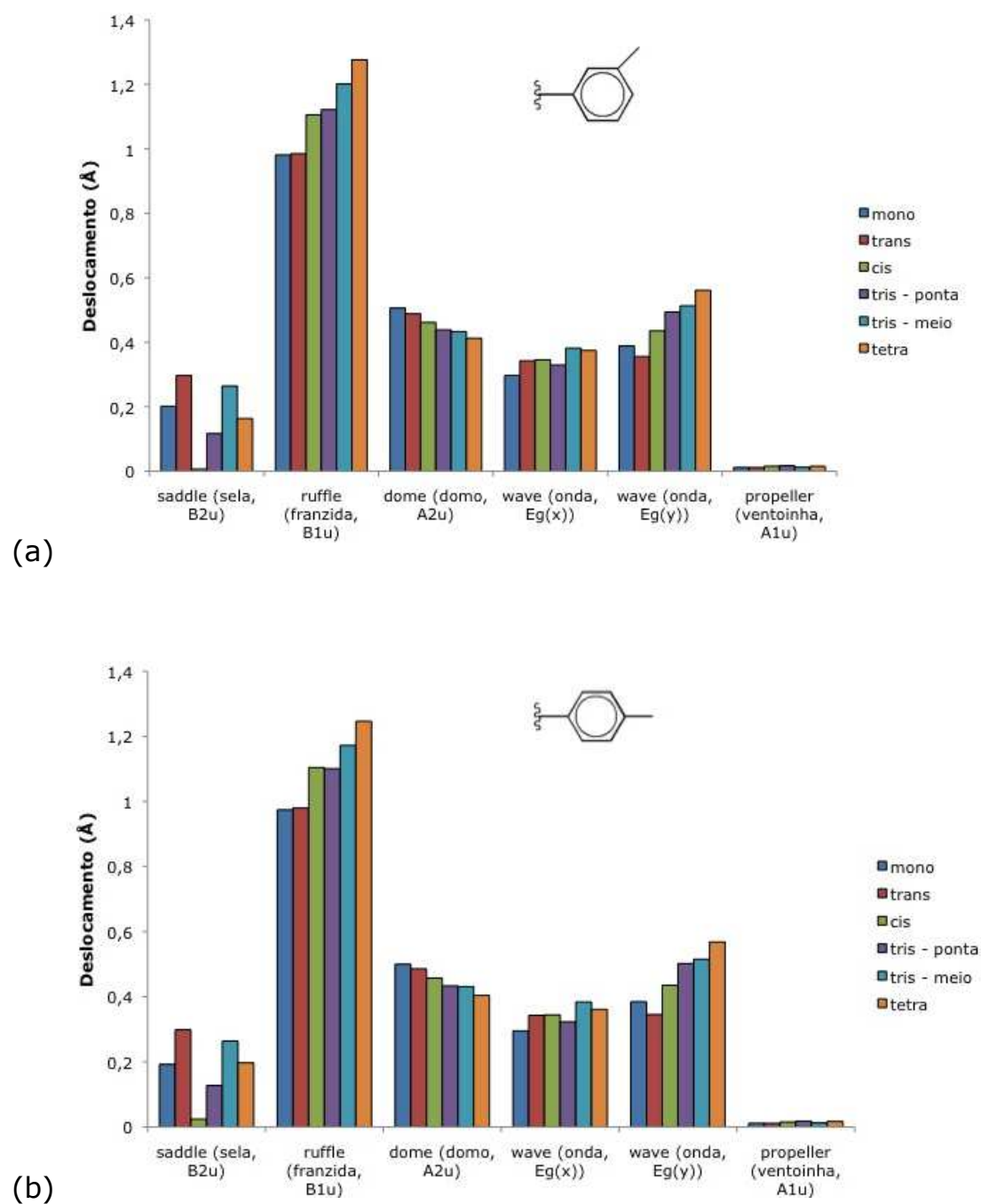


Figura 4.6 – Distribuição das conformações típicas da Doop para (a) 3-metilfenil e (b) 4-metilfenilporfirinas.

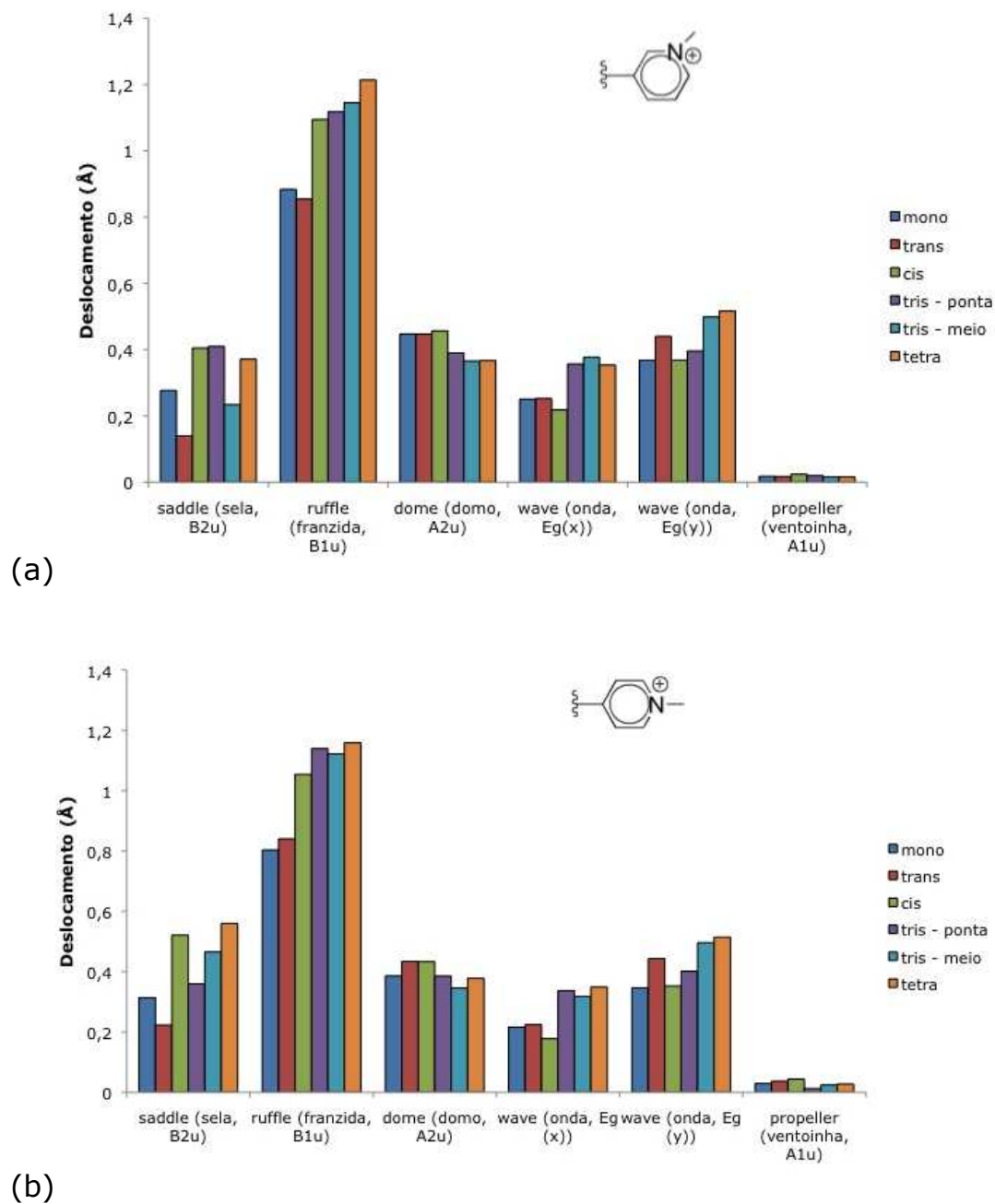


Figura 4.7 - Distribuição das conformações típicas da Doop para (a) *N*-metilpiridínio-3-il e (b) *N*-metilpiridínio-4-il porfirinas.

Em qualquer dos sistemas estudados, a deformação do tipo "ruffle" (franzida,  $B_{1u}$ ) é a que mais contribui para a Doop (Figs. 4.6 e 4.7), sendo preferencial em todos os padrões de substituição.

As deformações "wave" (onda,  $E_g$ ), "dome" (domo,  $A_{2u}$ ) e "saddle" (sela,  $B_{2u}$ ) contribuem de forma moderada para a Doop (Figs. 4.6 e 4.7).

As deformações "wave" (onda,  $E_g$ ) e "dome" (domo,  $A_{2u}$ ) respondem de maneira oposta ao padrão de substituição e ao número de substituintes arila. Para todas as porfirinas investigadas, a contribuição da deformação "dome" (domo,  $A_{2u}$ ) diminui com o aumento do padrão de substituição e com o número de substituintes arila, enquanto que a contribuição das deformações "wave" (onda,  $E_g$ ) aumenta com o aumento do padrão de substituição e com o número de substituintes arila.

A deformação "saddle" (sela,  $B_{2u}$ ) se mostra bastante sensível ao padrão de substituição e ao número de substituintes arila (Fig. 4.6 e 4.7).

Já a deformação "propeller" (ventoinha,  $A_{1u}$ ) praticamente não contribuem para a Doop.

Com relação à barreira de rotação aril-porfirina, esta se mostra sensível ao caráter eletrônico do substituinte arila (Fig. 4.8). Para as porfirinas com substituintes ricos em elétrons (grupo metilfenila) o seu valor diminui com o aumento do número de substituintes arila enquanto que, para porfirinas com substituintes deficientes em elétrons (*N*-metilpiridínio), a barreira de energia aumenta com o aumento do número de substituintes arila. Este resultado indica que o aumento da densidade eletrônica no anel porfirínico facilita a sua distorção e conseqüentemente a rotação aril-porfirina.

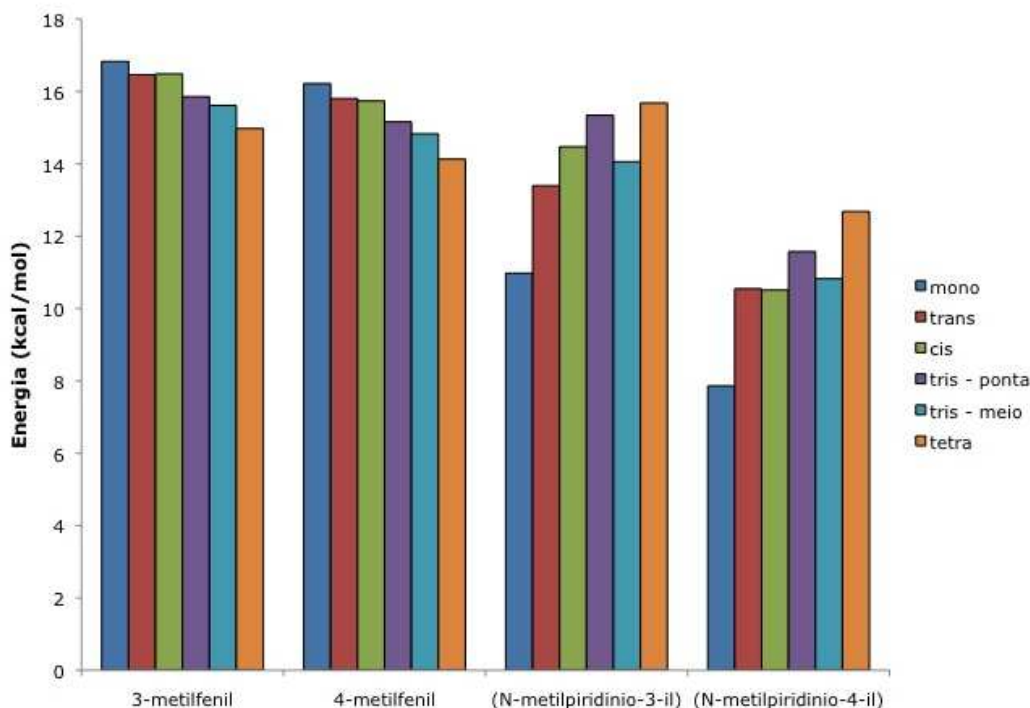


Figura 4.8 - Gráfico da barreira de energia (kcal/mol) dos sistemas investigados.

A análise das contribuições das deformações para a Doop e para barreira realizada anteriormente foi puramente fenomenológica, de modo que as análises foram refinadas utilizando-se a análise de componentes principais (PCA). Neste sentido, gráficos de escores (Fig. 4.9a) e de pesos (Fig. 4.9b) foram construídos para verificar as similaridades menos óbvias entre os sistemas estudados. As propriedades utilizadas nesta análise foram as contribuições das deformações típicas da Doop e a barreira de energia para a rotação aril-porfirina.

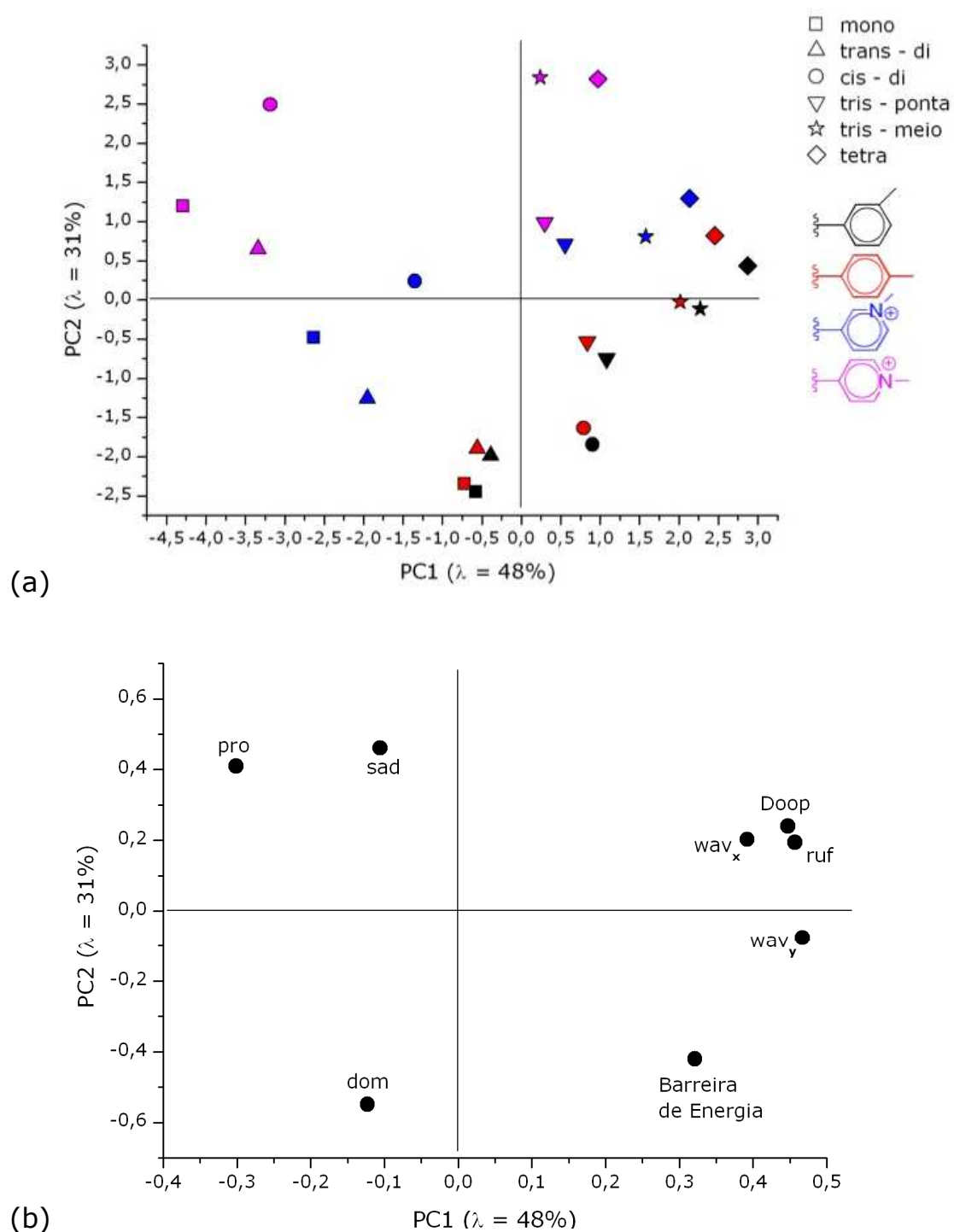


Figura 4.9 – Gráfico de (a) escores e (b) pesos da componente principal das porfirinas substituídas em função do padrão de substituição e da barreira de energia.

No gráfico de escores (Fig. 4.9a) se observa que, ao longo de PC1, o número de substituintes arila aumenta para todos os sistemas investigados e que a mesma sequência do padrão de

substituição se mantém para todos os sistemas investigados. Dessa maneira PC1 modela o número de substituintes arila e o padrão de substituição. Neste mesmo gráfico (Fig. 4.9a) se observa uma separação do caráter eletrônico dos substituintes ao longo de PC2, indicando que esta componente principal responde pelo caráter eletrônico do substituinte.

O gráfico dos pesos (Fig. 4.9b) indica as contribuições que as deformações típicas da Doop e a barreira de energia exercem sobre as coordenadas principais (PC). As deformações "ruffle" (franzida,  $B_{1u}$ ) e "wave" (onda,  $E_g$ ) respondem pelos pesos mais positivos em PC1, indicando que estas deformações são mais intensas com o aumento do número de substituintes e com o padrão de substituição em porfirinas mais substituídas. Além disso, observa-se também que há um agrupamento das deformações "ruffle" (franzida,  $B_{1u}$ ) e "wave" (onda,  $E_g$ ) com a Doop total (Fig. 4.9b), indicando que estas deformações gerais são as que mais contribuem para a magnitude da variação de Doop total.

Com relação a PC2, as deformações do tipo "saddle" (sela,  $B_{2u}$ ) e "propeller" (ventoinha,  $A_{1u}$ ) respondem pelos pesos mais positivos, enquanto "dome" (domo,  $A_{2u}$ ) responde pelos pesos mais negativos (Fig. 4.9b). Dessa maneira, as contribuições relativas das deformações variam com o caráter eletrônico do substituinte, sendo que as deformações do tipo "saddle" (sela,  $B_{2u}$ ) e "propeller" (ventoinha,  $A_{1u}$ ) aumentam com o efeito retirador de elétrons do substituinte (Fig. 4.10a e 4.10b) e a deformação do tipo "dome" (domo,  $A_{2u}$ ) aumenta com o efeito doador de elétrons do substituinte (Fig. 4.10c).

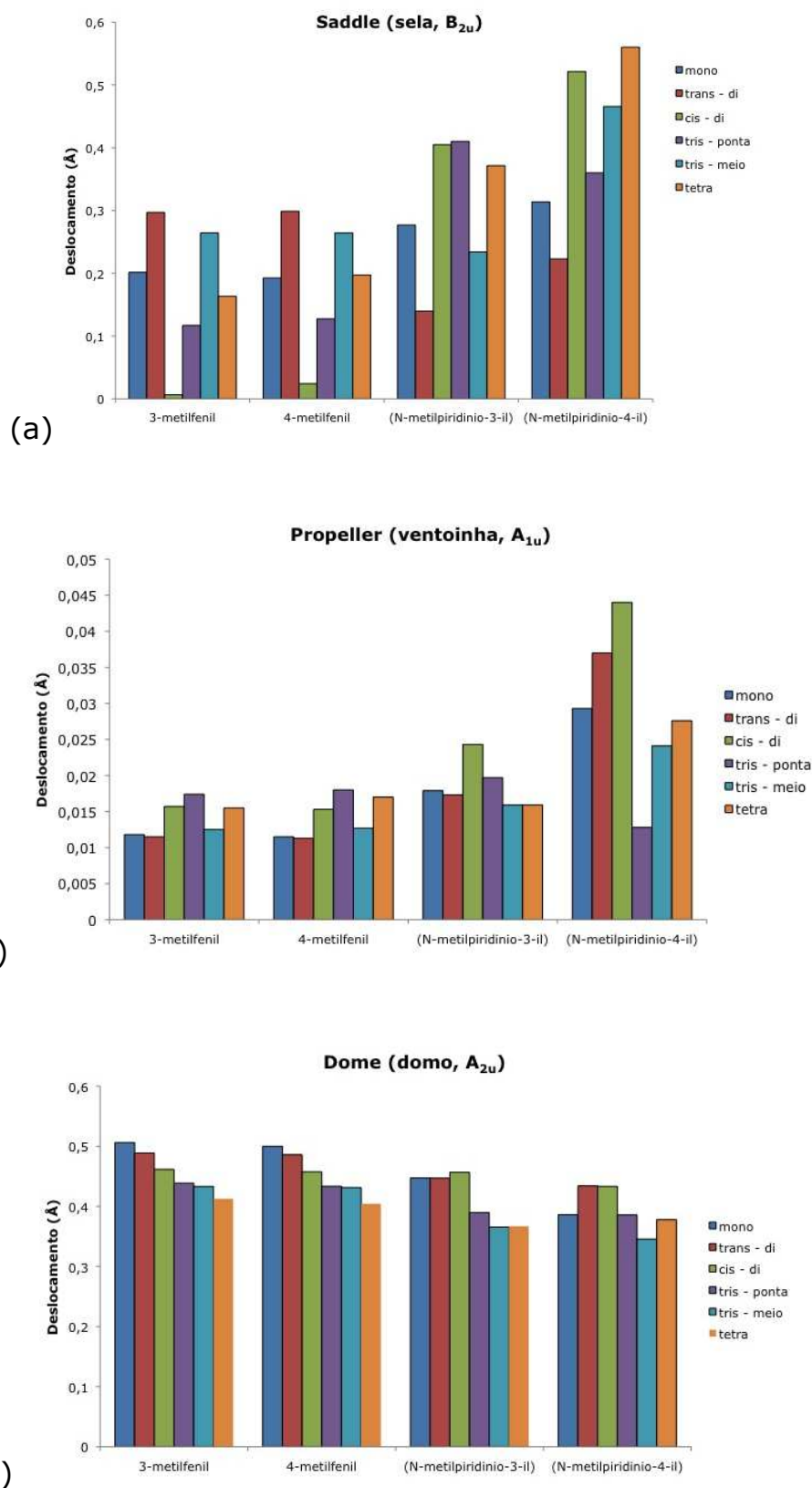


Figura 4.10 - Gráficos das deformações do tipo (a) "saddle" (sela,  $B_{2u}$ ), (b) "propeller" (ventoinha,  $A_{1u}$ ) e (c) "dome" (domo,  $A_{2u}$ ) para todos os sistemas investigados.

Nos gráficos dos escores (Fig. 4.9a) se observa também que a tendência do aumento do número de substituintes é mantida com a mudança do caráter eletrônico do substituinte e se observa uma semelhança entre determinados padrões de substituição, sendo mais intenso para os sistemas com substituintes ricos em elétrons (3- e 4-metilfenil). Para os sistemas mais ricos em elétrons, as porfirinas *trans*-di-substituídas, apesar de ter o mesmo número de substituintes que as porfirinas *cis*-di-substituídas, apresentam deformações gerais e barreira de energia semelhante às porfirinas mono-substituída. Este comportamento é resultante da ausência de substituintes vizinhos ao grupo aril que está sofrendo rotação em ambas as porfirinas (Fig. 4.11).

Comportamento semelhante acontece com a rotação do substituinte da “ponta” das porfirinas tris-substituídas. Esse substituinte, assim como o substituinte na posição *cis* das porfirinas di-substituídas, “sente” a presença de grupo arila apenas de um lado (Fig. 4.11), fazendo com que essas porfirinas apresentem deformações globais e barreira de energia semelhantes. As porfirinas tris-substituídas em que o grupo aril do meio sofre rotação se apresentam características semelhantes às porfirinas tetrasubstituídas, porque, assim como o grupo aril da tetraporfirina, o grupo aril do meio está rodeado de outros grupos arilas (Fig. 4.11), que influenciam sua rotação e a barreira de energia.

Todas as análises concordam com a literatura (SHELNUTT et al., 1998), que indica que a deformação total da porfirina é uma combinação da contribuição das deformações típicas. Verifica-se também que, independente do caráter eletrônico, do número de substituintes e do padrão de substituição, a deformação do tipo “ruffle” (franzida,  $B_{1u}$ ) é preferencial.

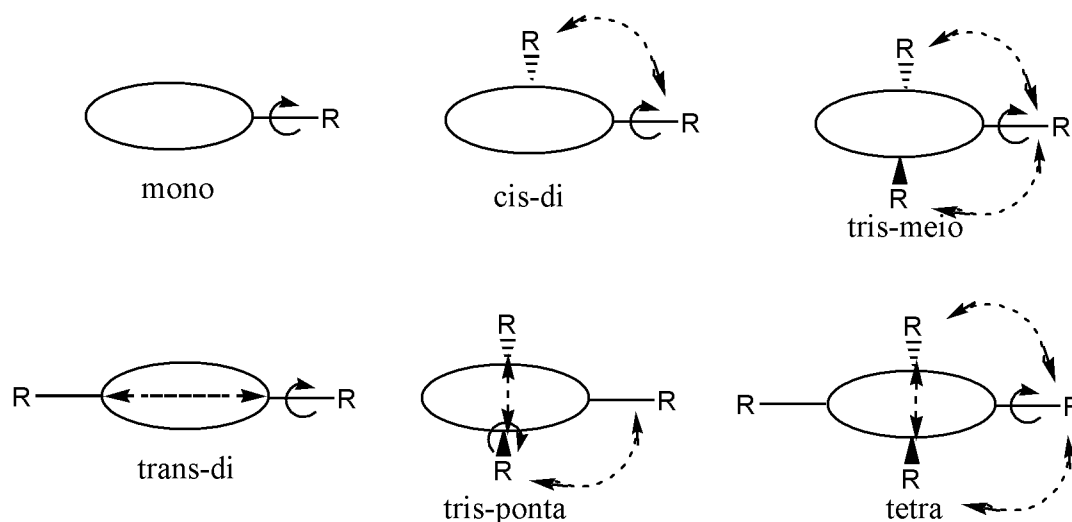


Figura 4.11 – Representação esquemática do comportamento do padrão de substituição.

#### 4.5 CONCLUSÕES

Os cálculos NSD mostram que a deformação fora do plano (Doop) é mais intensa do que a deformação no plano (Dip) e que esta deformação aumenta com o número de substituintes.

A deformação do tipo "ruffle" (franzida,  $B_{1u}$ ) é a que mais contribui para a Doop e, assim como a Doop, seu valor aumenta com o aumento do número de substituintes, mas não sofre influência do caráter eletrônico do substituinte. A deformação do tipo "saddle" (sela,  $B_{2u}$ ) contribui pouco para a Doop, mas é consideravelmente influenciada pelo caráter eletrônico do substituinte. Esses resultados mostram que os modos de distorção do estado de transição estão associados tanto ao padrão de substituição quanto ao caráter eletrônico do substituinte.

Além do padrão de substituição usualmente considerado, o caráter eletrônico do substituinte também influencia a energia da barreira de rotação, que diminui com o aumento do número de substituintes ricos de elétrons (3- e 4-metilfenil) e aumenta para substituintes deficientes em elétrons (*N*-metilpiridínio-3-il e *N*-

metilpiridínio-4-il). Este comportamento indica que a distorção do anel porfirínico, e consequentemente a rotação aril-porfirina, é facilitada com o aumento da densidade eletrônica do anel porfirínico.

## 4.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSON, K.K.; HOBBS, J.D.; LUO, L.; STANLEY, K.D.; QUIRKE, J.M.E.; SHELNUTT, J.A. Planar-nonplanar conformational equilibrium in metal derivatives of octaethylporphyrin and meso-nitrooctaethylporphyrin. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 115, p. 12346-12352, 1993.

BECKE, A.D.; Density-fnnctional exchange-energy approximation with correct asymptotic behavior. *Phys. Rev. A*, v. 38, p. 3098-3100, 1988.

BRERETON, R.G. *Chemometrics: Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant*. Chichester: John Wiley & Sons, 2003. 489 p. ISBN 0471489778.

CHAUVIN, B.; KASSELOURI, A.; CHAMINADE, P.; QUIAMESO, R.; NICOLIS, I.; MAILLARD, P.; PROGNON, P. Diprotonation process of meso-tetraphenylporphyrin derivatives designed for Photodynamic Therapy of cancers: From Multivariate Curve Resolution to predictive QSPR modeling. *Anal. Chim. Acta.*, v. 705, p. 306-314, 2011.

DENNINGTON, R.; KEITH, T.; MILLAM, J. *GaussView, Version 5*. Semichem Inc., Shawnee Mission KS, 2009.

FRISCH, M.J.; TRUCKS, G.W.; SCHLEGEL, H.B.; SCUSERIA, G.E.; ROBB, M.A.; CHEESEMAN, J.R.; SCALMANI, G.; BARONE, V.; MENUCCI, B.; PETERSSON, G.A.; NAKATSUJI, H.; CARICATO, M.; LI, X.; HRATCHIAN, H.P.; IZMAYLOV, A.F.; BLOINO, J.; ZHENG, G.; SONNENBERG, J.L.; HADA, M.; EHARA, M.; TOYOTA, K.; FUKUDA, R.; HASEGAWA, J.; ISHIDA, M.; NAKAJIMA, T.; HONDA, Y.; KITAO, O.; NAKAI, H.; VREVEN, T.; MONTGOMERY, Jr., J.A.; PERALTA, J.E.; OGLIARO, F.; BEARPARK, M.; HEYD, J.J.; BROTHERS, E.; KUDIN, K.N.; STAROVEROV, V.N.; KOBAYASHI, R.; NORMAND, J.; RAGHAVACHARI, K.; RENDELL, A.; BURANT J.C.; IYENGAR, S.S.; TOMASI, J.; COSSI, M.; REGA, N.; MILLAM, N.J.; KLENE, M.; KNOX, J.E.; CROSS, J.B.; BAKKEN, V.; ADAMO, C.; JARAMILLO, J.; GOMPERTS, R.; STRATMANN, R.E.; YAZYEV, O.; AUSTIN, A.J.; CAMMI, R.; POMELLI, C.; OCHTERSKI, J.W.; MARTIN, R.L.; MOROKUMA, K.; ZAKRZEWSKI, V.G.; VOTH, G.A.; SALVADOR, P.; DANNENBERG, J.J.; DAPPRICH, S.; DANIELS, A. D.; FARKAS, Ö.; FORESMAN, J.B.; ORTIZ, J.V.; CIOSLOWSKI, J.; FOX, D.J. Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2009.

GENO, M.K.; HALPERN, J. Why Does Nature Not Use the Porphyrin Ligand in Vitamin B12?. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 109, p. 1238-1240, 1987.

GOLUBCHIKOV, O.A.; PUKHOVSKAYA, S.G.; KUVSHINOVA, E.M. Structures and properties of spatially distorted porphyrins. *Russ. Chem. Rev.*, v. 74, p. 249-264, 2005.

GRUDEN, M.; GRUBIŠIĆ, S.; COUTSOLELOS, A.G.; NIKETIĆ, S.R. Conformational analysis of octa- and tetrahalogenated tetraphenylporphyrins and their metal derivatives. *J. Mol. Struct.*, v. 595, p. 209-224, 2001.

HOHENBERG, P.; KOHN, W. Inhomogeneous Electron Gas. *Phys. Rev. B*, v. 136, p. 864-871, 1964.

JARZĘCKI, A.A.; SPIRO, T.G. Porphyrin Distortion from Resonance Raman Intensities of Out-of-Plane Modes: Computation and Modeling of *N*-Methylmesoporphyrin, a Ferrochelatase Transition State Analog. *J. Phys. Chem. A*, v. 109, p. 421-430, 2005.

JENTZEN, W.; SIMPSON, M.C.; HOBBS, J.D.; SONG, X.; EMA, T.; NELSON, N.Y.; MEDFORTH, C.J.; SMITH, K.M.; VEYRAT, M.; MAZZANTI, M.; RAMASSEUL, R.; MARCHON, J.-C.; TAKEUCHI, T.; GODDARD, W.A.; SHELNUTT, J.A. Ruffling in a Series of Nickel(II) *meso*-Tetrasubstituted Porphyrins as a Model for the Conserved Ruffling of the Heme of Cytochromes *c*. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 117, p. 11085-11097, 1995.

JENTZEN, W.; SONG, X.-Z.; SHELNUTT, J.A. Structural Characterization of Synthetic and Protein-Bound Porphyrins in Terms of the Lowest-Frequency Normal Coordinates of the Macrocycle. *J. Phys. Chem. B*, v. 101, p. 1684-1699, 1997.

JENTZEN, W.; MA, J.; SHELNUTT, J.A. Conservation of the Conformation of the Porphyrin Macrocycle in Hemoproteins. *Biophys. J.*, v. 74, p. 753-763, 1998.

KOJIMA, T.; NAKANISHI, T.; HONDA, T.; HARADA, R.; SHIRO, M.; FUKUZUMI, S. Impact of Distortion of Porphyrins on Axial Coordination in (Porphyrinato)zinc(II) Complexes with Aminopyridines as Axial Ligands. *Eur. J. Inorg. Chem.*, v. 6, p. 727-734, 2009.

LEE, C.; YANG, W.; PARR, R.G. Development of the Colic-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. *Phys. Rev. B*, v. 37, p. 785-789, 1988.

MEDFORTH, C.J.; HADDAD, R.E.; MUZZI, C.M.; DOOLEY, N.R.; JAQUINOD, L.; SHYR, D.C.; NURCO, D.J.; OLMSTEAD, M.M.; SMITH, K.M.; MA, J.; SHELNUTT, J.A. Unusual Aryl-Porphyrin Rotational Barriers in Peripherally Crowded Porphyrins. *Inorg. Chem.*, v.42, p. 2227-2241, 2003.

MILGROM, L.R. *The Colours of Life: An Introduction to the Chemistry of Porphyrins and Related Compounds*. Oxford: Oxford University Press, 1997. 249 p. ISBN 0198553803.

OLEA JR., C.; JOHN, K.; MARLETTA, M.A. Modulating Heme Redox Potential through Protein-Induced Porphyrin Distortion *J. Am. Chem. Soc.*, v. 132, p. 12794-12795, 2010.

RASSOLOV, V.; POPLE, J.A.; RATNER, M.; WINDUS, T.L. 6-31G\* basis set for atoms K through Zn. *J. Chem. Phys.*, v. 109, p. 1223-1229, 1998.

RINGNÉR, M. What is principal component analysis?. *Nat. Biotechnol.*, v. 26, p. 303-304, 2008.

SENGE, M.O. Exercises in molecular gymnastics—bending, stretching and twisting porphyrins. *Chem. Commun.*, v. 243, p. 243-256, 2006.

SHELNUTT, J.A.; SONG, X.; MA, J.; JIA, S.; JENTZEN, W.; MEDFORTH, C.J. Nonplanar porphyrins and their significance in proteins. *Chem. Soc. Rev.*, v. 27, p. 31-41, 1998.

SONG, X.-Z.; JAQUINOD, L.; JENTZEN, W.; NURCO, D.J.; JIA, S.-L.; KHOURY, R.G.; MA, J.-G.; MEDFORTH, C.J.; SMITH, K.M.; SHELNUTT, J.A. Metal Dependence of the Contributions of Low Frequency Normal Coordinates to the Sterically Induced Distortions of Meso-Dialkyl-Substituted Porphyrins. *Inorg. Chem.*, v. 37, p. 2009-2019, 1998a.

SONG, X.-Z.; JENTZEN, W.; JAQUINOD, L.; KHOURY, R.G.; MEDFORTH, C.J.; JIA, S.-L.; SMITH, K.M.; SHELNUTT, J.A. Substituent-Induced Perturbation Symmetries and Distortions of *meso-tert*-Butylporphyrins. *Inorg. Chem.*, v. 37, p. 2117-2128, 1998b.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Para a síntese do isômero *meta* da *N*-piridilporfirina se investigou a influência de sete fatores, codificados de A a G, a dois níveis cada. Planejamento fatorial completo e fracionário e metodologias de superfície de resposta estão entre as técnicas quimiométricas empregadas neste estudo. Rendimentos de 24% foram alcançados e os resultados indicaram que, para os níveis investigados, apenas dois dos sete fatores, A e B, foram significativos para a otimização na região experimental investigada. Vale destacar que rendimentos de 20% são suficientes para tornar o desenvolvimento de moduladores redox baseados em *N*-piridilporfirinas economicamente viáveis. O emprego de ferramentas quimiométricas foram de fundamental importância para a otimização da síntese dessa porfirina, pois possibilitaram investigar um número considerável de fatores e condições experimentais com uma quantidade aceitável de experimentos.

Para o estudo do rearranjo de cadeiras laterais oxigenadas na síntese de *N*-alquilpiridilporfirinas se investigou teoricamente a ciclização intramolecular do MeOC<sub>n</sub>OTs. Duas rotas foram propostos para esta ciclização e ambos se iniciam com a formação de um oxacicloalcano metilado e do íon tosilato. Na rota A se propõe a transferência do metil do intermediário *O*-metil-oxacicloalcano para o contra-íon OTs<sup>-</sup> formando MeOTs e liberando o oxacicloalcano correspondente. O produto MeOTs é amplamente utilizado na síntese de *N*-piridilporfirinas metiladas e pode ser a

fonte de metila do sistema. A piridina, neste mecanismo, é apenas um grupo espectador que pode vir a ser metilado pelo tosilato de metila formado. Na rota B, a piridina é quem ataca o metil do intermediário *O*-metil-oxacicloalcano e forma diretamente as espécies carregadas *N*-metilpiridínio, o contra-íon tosilato e o oxacicloalcano neutro correspondente. Para todos os membros da série MeOC<sub>n</sub>OTs, onde *n* = 2, 4, 5 e 6, os cálculos de IRC indicam que em fase gasosa, a ciclização do MeOC<sub>n</sub>OTs ocorre via rota A, mas, na presença de solvente, via rota B. A reatividade desses sistemas na ausência/presença de solvente decresce na seguinte ordem: MeOC<sub>5</sub>OTs > MeOC<sub>4</sub>OTs > MeOC<sub>6</sub>OTs > MeOC<sub>2</sub>OTs. Observou-se também que o BuOC<sub>2</sub>OTs se comporta de maneira semelhante ao MeOC<sub>2</sub>OTs, indicando que a alcoxialquilação é favorecida em detrimento à alquilação. Estes resultados computacionais são consistentes e fundamentam as observações experimentais.

No estudo da distorção do anel porfirínico e da rotação aril-porfirina se observa que as deformações fora do plano (Doop) são mais intensas do que as deformações no plano (Dip). Em termos da contribuição das deformações gerais ("saddle", "ruffle", "dome", "wave" e "propeller") para a Doop, a deformação do tipo "ruffle" é a que mais contribui enquanto que a "propeller" praticamente não contribui para a Doop. A deformação do tipo "ruffle" é preferencial para todas as porfirinas investigadas, seu valor aumenta com o aumento do número de substituintes arila e com o padrão de substituição e não sofre influência do caráter eletrônico do substituinte. O caráter eletrônico do substituinte, juntamente com o padrão de substituição, influencia a barreira de rotação aril-porfirina. Para os sistemas com substituintes rico em elétrons (3- e 4-metilfenil) a barreira de rotação aumenta com o

padrão de substituição, enquanto que para os sistemas deficientes em elétrons observa-se o inverso.

Entre as perspectivas futuras deste trabalho podem-se citar:

- otimizar o procedimento de isolamento da H<sub>2</sub>T-3-PyP, buscando-se minimizar o uso de cromatografia, a fim de baratear os custos de purificação.
- efetuar uma comparação entre as condições ótimas de síntese dos isômeros *orto*, *meta* e *para* das *N*-piridilporfirinas. Embora neste estágio algumas considerações moleculares/mecanísticas importantes na síntese da H<sub>2</sub>T-2-PyP e H<sub>2</sub>T-3-PyP já sejam possíveis e bastante reveladoras, a impossibilidade de se apresentar os resultados mais claramente, por limitação das normas de patente, demanda que essa exploração mecanística seja efetuada em um futuro próximo, em outra oportunidade.
- investigar nos estudos teóricos novos métodos e funcionais para corroborar os resultados já obtidos.

## ANEXO

Anexo 1 - Valores da energia livre de Gibbs (kJ/mol) para o rearranjo intramolecular de cadeias laterais para as Rotas A e B, em vácuo e na presença de solvente (DMF), com notação de acordo com a Figura 3.9.

| Rota A - Vácuo    |                         |                              |                         |                              | Rota A - DMF            |                              |                         |                              |
|-------------------|-------------------------|------------------------------|-------------------------|------------------------------|-------------------------|------------------------------|-------------------------|------------------------------|
|                   | G <sub>ativação 1</sub> | $\Delta G_{\text{reação 1}}$ | G <sub>ativação A</sub> | $\Delta G_{\text{reação A}}$ | G <sub>ativação 1</sub> | $\Delta G_{\text{reação 1}}$ | G <sub>ativação A</sub> | $\Delta G_{\text{reação A}}$ |
| MeOC <sub>2</sub> | 213,1407                | 197,0648                     | 256,1306                | 28,6678                      | 149,2071                | 135,6044                     | 195,1166                | 21,3059                      |
| MeOC <sub>4</sub> | 154,9911                | 103,3370                     | 163,5266                | -49,6351                     | 102,7962                | 34,8036                      | 114,3825                | -54,0774                     |
| MeOC <sub>5</sub> | 165,9211                | 91,9004                      | 155,2589                | -63,1669                     | 120,4133                | 37,9490                      | 99,6141                 | -65,2253                     |
| MeOC <sub>6</sub> | 183,1260                | 145,7572                     | 189,4009                | -23,4090                     | 132,8004                | 80,5319                      | 141,4750                | -27,0216                     |
| BuOC <sub>2</sub> | 205,0305                | 189,5637                     | 239,1856                | 29,6078                      | 147,9942                | 137,4318                     | 197,4822                | 29,0196                      |
| Rota B - Vácuo    |                         |                              |                         |                              | Rota B - DMF            |                              |                         |                              |
|                   | G <sub>ativação 1</sub> | $\Delta G_{\text{reação 1}}$ | G <sub>ativação B</sub> | $\Delta G_{\text{reação B}}$ | G <sub>ativação 1</sub> | $\Delta G_{\text{reação 1}}$ | G <sub>ativação B</sub> | $\Delta G_{\text{reação B}}$ |
| MeOC <sub>2</sub> | 213,1407                | 197,0648                     | 637,6682                | 472,9129                     | 149,2071                | 135,6044                     | 189,5191                | -25,2127                     |
| MeOC <sub>4</sub> | 154,9911                | 103,3370                     | 540,9317                | 394,6100                     | 102,7962                | 34,8036                      | 105,5687                | -95,7651                     |
| MeOC <sub>5</sub> | 165,9211                | 91,9004                      | 522,2618                | 381,0781                     | 120,4133                | 37,9490                      | 93,0687                 | -106,9130                    |
| MeOC <sub>6</sub> | 183,1260                | 145,7572                     | 558,2574                | 420,8361                     | 132,8004                | 80,5319                      | 137,1614                | -68,7093                     |
| BuOC <sub>2</sub> | 205,0305                | 189,5637                     | 634,8931                | 451,4520                     | 147,9942                | 137,4318                     | 199,9134                | -13,2351                     |

Anexo 2 - Valores da energia (kJ/mol) para o rearranjo intramolecular de cadeias laterais para as Rotas A e B, em vácuo e na presença de solvente (DMF), com notação de acordo com a Figura 3.9.

| <b>Rota A - Vácuo</b> |                         |                              |                         |                              | <b>Rota A - DMF</b>     |                              |                         |                              |
|-----------------------|-------------------------|------------------------------|-------------------------|------------------------------|-------------------------|------------------------------|-------------------------|------------------------------|
|                       | $E_{\text{ativação 1}}$ | $\Delta E_{\text{reação 1}}$ | $E_{\text{ativação A}}$ | $\Delta E_{\text{reação A}}$ | $E_{\text{ativação 1}}$ | $\Delta E_{\text{reação 1}}$ | $E_{\text{ativação A}}$ | $\Delta E_{\text{reação A}}$ |
| MeOC <sub>2</sub>     | 219,0742                | 208,3807                     | 268,2980                | 104,4753                     | 156,1803                | 146,1135                     | 204,1176                | 94,7738                      |
| MeOC <sub>4</sub>     | 154,2008                | 94,4878                      | 163,3873                | 15,8633                      | 102,2586                | 43,3297                      | 113,3091                | 13,3204                      |
| MeOC <sub>5</sub>     | 162,3287                | 86,0495                      | 146,8081                | -3,2645                      | 118,2641                | 33,4781                      | 98,6988                 | -2,9895                      |
| MeOC <sub>6</sub>     | 166,0924                | 124,4429                     | 177,1496                | 30,7129                      | 119,8850                | 63,4928                      | 131,0219                | 29,0352                      |
| BuOC <sub>2</sub>     | 209,7771                | 195,6651                     | 251,6255                | 100,7175                     | 153,3241                | 141,2250                     | 205,9132                | 93,7847                      |
| <b>Rota B - Vácuo</b> |                         |                              |                         |                              | <b>Rota B - DMF</b>     |                              |                         |                              |
|                       | $E_{\text{ativação 1}}$ | $\Delta E_{\text{reação 1}}$ | $E_{\text{ativação B}}$ | $\Delta E_{\text{reação B}}$ | $E_{\text{ativação 1}}$ | $\Delta E_{\text{reação 1}}$ | $E_{\text{ativação B}}$ | $\Delta E_{\text{reação B}}$ |
| MeOC <sub>2</sub>     | 219,0742                | 208,3807                     | 656,4636                | 541,1766                     | 156,1803                | 146,1135                     | 198,6638                | 37,8248                      |
| MeOC <sub>4</sub>     | 154,2008                | 94,4878                      | 542,9004                | 452,5646                     | 102,2586                | 43,3297                      | 103,8315                | -43,6272                     |
| MeOC <sub>5</sub>     | 162,3287                | 86,0495                      | 524,9320                | 433,4367                     | 118,2641                | 33,4781                      | 90,0376                 | -59,9371                     |
| MeOC <sub>6</sub>     | 166,0924                | 124,4429                     | 556,3068                | 467,4142                     | 119,8850                | 63,4928                      | 122,2757                | -27,9124                     |
| BuOC <sub>2</sub>     | 209,7771                | 195,6651                     | 653,6818                | 518,0422                     | 153,3241                | 141,2250                     | 208,6373                | 41,9380                      |

Anexo 3 – Valores numéricos das deformações (Å) calculadas pelo método NSD e da barreira de rotação (kcal/mol) para a 3-metilfenilporfirina.

| <b>3-metilfenilporfirina</b>   |         |            |          |              |             |         |
|--------------------------------|---------|------------|----------|--------------|-------------|---------|
|                                | mono    | trans - di | cis - di | tris - ponta | tris - meio | tetra   |
| Dip                            | 0,4438  | 0,5781     | 0,3042   | 0,4172       | 0,296       | 0,3396  |
| B2g                            | 0,3765  | 0,5276     | 0,1901   | 0,338        | 0,1407      | 0,1875  |
| B1g                            | 0,1269  | 0,1163     | 0,1164   | 0,106        | 0,1207      | 0,1125  |
| Eu(x)                          | 0,0872  | 0,0885     | 0,114    | 0,1211       | 0,139       | 0,1751  |
| Eu(y)                          | 0,0951  | 0,1007     | 0,1159   | 0,1286       | 0,1379      | 0,1503  |
| A1g                            | 0,1486  | 0,1537     | 0,128    | 0,1299       | 0,1189      | 0,1187  |
| A2g                            | 0,0184  | 0,0263     | 0,0074   | 0,0209       | 0,028       | 0,0151  |
| Doop                           | 1,2245  | 1,2417     | 1,3212   | 1,3484       | 1,4525      | 1,5106  |
| saddle (sela, B2u)             | 0,2016  | 0,297      | 0,0066   | 0,117        | 0,2644      | 0,1635  |
| ruffle (franzida, B1u)         | 0,9813  | 0,9852     | 1,1058   | 1,122        | 1,2012      | 1,2763  |
| dome (domo, A2u)               | 0,5062  | 0,4888     | 0,4616   | 0,4387       | 0,4332      | 0,4126  |
| wave (onda, Eg(x))             | 0,2974  | 0,3425     | 0,3457   | 0,3297       | 0,3819      | 0,3747  |
| wave (onda, Eg(y))             | 0,3884  | 0,3558     | 0,4357   | 0,4941       | 0,5132      | 0,5614  |
| propeller (ventoinha, A1u)     | 0,0118  | 0,0115     | 0,0157   | 0,0174       | 0,0125      | 0,0155  |
| Barreira de Rotação (kcal/mol) | 16,8302 | 16,4623    | 16,4875  | 15,8567      | 15,6168     | 14,9758 |

Anexo 4 - Valores numéricos das deformações ( $\text{\AA}$ ) calculadas pelo método NSD e da barreira de rotação (kcal/mol) para a 4-metilfenilporfirina.

| 4-metilfenilporfirina                   |         |            |          |              |             |         |
|-----------------------------------------|---------|------------|----------|--------------|-------------|---------|
|                                         | mono    | trans - di | cis - di | tris - ponta | tris - meio | tetra   |
| Dip                                     | 0,4423  | 0,5764     | 0,3019   | 0,422        | 0,2940      | 0,3299  |
| B2g                                     | 0,3749  | 0,5264     | 0,1870   | 0,3442       | 0,1399      | 0,1801  |
| B1g                                     | 0,1273  | 0,1147     | 0,1161   | 0,1046       | 0,1206      | 0,1082  |
| Eu(x)                                   | 0,0863  | 0,0863     | 0,1123   | 0,1203       | 0,1359      | 0,1703  |
| Eu(y)                                   | 0,0923  | 0,0988     | 0,1159   | 0,1261       | 0,1368      | 0,1463  |
| A1g                                     | 0,1503  | 0,1553     | 0,1289   | 0,1333       | 0,1201      | 0,1182  |
| A2g                                     | 0,0176  | 0,0255     | 0,0052   | 0,0239       | 0,0269      | 0,0180  |
| Doop                                    | 1,2134  | 1,2341     | 1,3183   | 1,3315       | 1,4296      | 1,4867  |
| saddle (sela, B <sub>2u</sub> )         | 0,1925  | 0,2988     | 0,0242   | 0,1273       | 0,2642      | 0,1972  |
| ruffle (franzida, B <sub>1u</sub> )     | 0,9745  | 0,98       | 1,1043   | 1,1009       | 1,1724      | 1,2466  |
| dome (domo, A <sub>2u</sub> )           | 0,5001  | 0,4861     | 0,4576   | 0,4335       | 0,4314      | 0,4043  |
| wave (onda, E <sub>g(x)</sub> )         | 0,2953  | 0,343      | 0,3444   | 0,3232       | 0,3841      | 0,3615  |
| wave (onda, E <sub>g(y)</sub> )         | 0,3850  | 0,3455     | 0,4354   | 0,5021       | 0,5154      | 0,5684  |
| propeller (ventoinha, A <sub>1u</sub> ) | 0,0115  | 0,0113     | 0,0153   | 0,018        | 0,0127      | 0,0170  |
| Barreira de Rotação (kcal/mol)          | 16,2189 | 15,8065    | 15,7384  | 15,1608      | 14,8304     | 14,1302 |

Anexo 5 - Valores numéricos das deformações (Å) calculadas pelo método NSD e da barreira de rotação (kcal/mol) para a (N-metilpiridínio-3-il)porfirina.

| (N-metilpiridínio-3-il)porfirina        |         |            |          |              |             |         |
|-----------------------------------------|---------|------------|----------|--------------|-------------|---------|
|                                         | mono    | trans - di | cis - di | tris - ponta | tris - meio | tetra   |
| Dip                                     | 0,4034  | 0,5692     | 0,2891   | 0,4342       | 0,2723      | 0,3183  |
| B2g                                     | 0,334   | 0,5128     | 0,1733   | 0,3541       | 0,139       | 0,1722  |
| B1g                                     | 0,1104  | 0,106      | 0,136    | 0,1164       | 0,1052      | 0,1142  |
| Eu(x)                                   | 0,0582  | 0,0845     | 0,067    | 0,0792       | 0,1095      | 0,1453  |
| Eu(y)                                   | 0,0631  | 0,0806     | 0,0888   | 0,1431       | 0,1055      | 0,1351  |
| A1g                                     | 0,1769  | 0,1901     | 0,1463   | 0,1478       | 0,1419      | 0,1346  |
| A2g                                     | 0,0155  | 0,0066     | 0,0358   | 0,0308       | 0,0225      | 0,034   |
| Doop                                    | 1,1207  | 1,0987     | 1,3245   | 1,3616       | 1,375       | 1,4621  |
| saddle (sela, B <sub>2u</sub> )         | 0,2769  | 0,1397     | 0,4049   | 0,41         | 0,2341      | 0,3714  |
| ruffle (franzida, B <sub>1u</sub> )     | 0,8837  | 0,8543     | 1,0945   | 1,1178       | 1,145       | 1,2137  |
| dome (domo, A <sub>2u</sub> )           | 0,4473  | 0,4471     | 0,4567   | 0,3898       | 0,3656      | 0,367   |
| wave (onda, E <sub>g(x)</sub> )         | 0,2505  | 0,2524     | 0,2182   | 0,3566       | 0,3772      | 0,3534  |
| wave (onda, E <sub>g(y)</sub> )         | 0,368   | 0,4403     | 0,3683   | 0,396        | 0,4985      | 0,5166  |
| propeller (ventoinha, A <sub>1u</sub> ) | 0,0179  | 0,0173     | 0,0243   | 0,0197       | 0,0159      | 0,0159  |
| Barreira de Rotação (kcal/mol)          | 10,9759 | 13,3961    | 14,4723  | 15,3439      | 14,0589     | 15,6830 |

Anexo 6 - Valores numéricos das deformações (Å) calculadas pelo método NSD e da barreira de rotação (kcal/mol) para a (*N*-metilpiridínio-4-il)porfirina.

| (N-metilpiridínio-4-il)porfirina        |        |            |          |              |             |         |
|-----------------------------------------|--------|------------|----------|--------------|-------------|---------|
|                                         | mono   | trans - di | cis - di | tris - ponta | tris - meio | tetra   |
| Dip                                     | 0,4327 | 0,6041     | 0,2543   | 0,4217       | 0,2781      | 0,3204  |
| B2g                                     | 0,3652 | 0,5517     | 0,1187   | 0,3382       | 0,1595      | 0,1931  |
| B1g                                     | 0,0925 | 0,0919     | 0,1132   | 0,1098       | 0,1007      | 0,1193  |
| Eu(x)                                   | 0,058  | 0,0799     | 0,0772   | 0,0788       | 0,0945      | 0,1374  |
| Eu(y)                                   | 0,0459 | 0,0745     | 0,0764   | 0,1446       | 0,0951      | 0,1241  |
| A1g                                     | 0,199  | 0,2005     | 0,1551   | 0,1537       | 0,1484      | 0,1398  |
| A2g                                     | 0,0138 | 0,0061     | 0,0434   | 0,0253       | 0,0421      | 0,041   |
| Doop                                    | 1,0298 | 1,0923     | 1,3148   | 1,3609       | 1,3937      | 1,4837  |
| saddle (sela, B <sub>2u</sub> )         | 0,3137 | 0,2229     | 0,5213   | 0,3599       | 0,4657      | 0,5601  |
| ruffle (franzida, B <sub>1u</sub> )     | 0,8035 | 0,8405     | 1,0542   | 1,1398       | 1,1217      | 1,1587  |
| dome (domo, A <sub>2u</sub> )           | 0,3861 | 0,4341     | 0,4333   | 0,3857       | 0,3456      | 0,378   |
| wave (onda, E <sub>g(x)</sub> )         | 0,2161 | 0,2243     | 0,1778   | 0,3368       | 0,3182      | 0,3491  |
| wave (onda, E <sub>g(y)</sub> )         | 0,3462 | 0,4436     | 0,3525   | 0,4014       | 0,4961      | 0,5143  |
| propeller (ventoinha, A <sub>1u</sub> ) | 0,0293 | 0,037      | 0,044    | 0,0128       | 0,0241      | 0,0276  |
| Barreira de Rotação (kcal/mol)          | 7,8620 | 10,5476    | 10,5104  | 11,5733      | 10,8234     | 12,6829 |