

UFMG/ICE_x/DQ.1175^a

T. 527 ^a

Marcela Luísa Gomes

Porfirinas de Bismuto e Antimônio: Obtenção, Avaliação
da Atividade Leishmanicida e Investigação dos Possíveis
Mecanismos de Ação

Tese apresentada ao Departamento de
Química do Instituto de Ciências Exatas da
Universidade Federal de Minas Gerais, como
requisito parcial para obtenção do título de
Doutora em Ciências – Química.

Belo Horizonte
2016

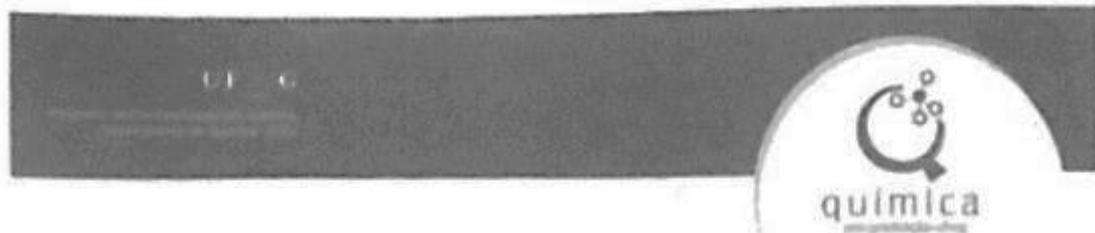
G631 Gomes, Marcela Luisa.
2014 Porfirinas de bismuto e antimônio [manuscrito]:
I obtenção, avaliação da atividade leishmanicida e
investigação dos possíveis mecanismos de ação /
Marcela Luisa Gomes. 2016.
[xvii], 91 f.: il.

Orientadora: Ynara Mariana Idemori
Co-orientadora: Cynthia Peres Demicheli

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas
Gerais - Departamento de Química.

1. Química inorgânica - Teses 2. Porfirinas e
compostos de porfirinas - Teses 3. Leishmaniose -
Teses I. Idemori, Ynara Mariana, Orientador II.
Demicheli, Cynthia Peres III. Título

CDU 043



"Porfirinas de Bismuto e Antimônio: Obtenção, Avaliação da Atividade Leishmanicida e Investigações dos Possíveis Mecanismos de Ação"

Marcela Luísa Gomes

Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:


Profa. Ynara Marina Idemori - Orientadora
UFMG


Profa. Cynthia Peres Demicheli - Coorientadora
UFMG


Profa. Elene Cristina Perreira Maia
UFMG


Prof. Tingo Antônio da Silva Brandão
UFMG


Prof. Julio Santos Rebouças
UEPB


Profa. Renata Galvão de Lima
FACIP/UFU

Este trabalho foi desenvolvido sob a orientação da Profa. Dra. Ynara Marina Idemori e co-orientação da Profa. Dra. Cynthia Peres Demicheli.

Aos meus pais, Fábio e Vânia, pelo amor incondicional, exemplo, educação e aos quais dedico a minha vida.

Ao meu amor, Marcelo, pelo carinho, amor, incentivo, companheirismo, paciência e compreensão.

Aos meus irmãos, Rafaela e Bruno, e à minha sobrinha Alícia pelos momentos de descontração.

Às minhas orientadoras, Ynara e Cynthia, pelo grande aprendizado.

Agradecimentos

Agradeço a Deus por abençoar tanto a minha vida.

Aos meus pais por toda dedicação. Sem eles essa conquista não seria possível.

Aos meus irmãos Rafaela e Bruno por tantos momentos de descontração.

Ao meu marido Marcelo, meu grande amor, pelo amor e carinho.

À minha sobrinha Alícia por me proporcionar tanta alegria.

À Ynara e à Cynthia pelos ensinamentos, dedicação e excelente orientação.

Ao professor Gilson pela paciência e ajuda infinitas.

Ao professor Dr. Frédéric Frezard (ICB) e ao Dr. Rubens do Monte (Fiocruz) pela colaboração.

À professora Dayse pela ajuda.

Aos amigos do laboratório, Adriano, Alexandre, Ana Luíza, Camila, Carol, Felipe, Flávia, Guilherme, Igor, Mateus, Sophia, Vinícius, pelos bons momentos.

A todos os amigos do Departamento de Química pelo companheirismo.

À Priscila (ICB), Nayara (ICB) e Bruno (Química) pela grande ajuda.

A todos os meus amigos e familiares pela presença, apoio e carinho.

Às funcionárias da secretaria de Pós-Graduação pela atenção.

A todos que de alguma forma contribuíram para essa conquista.

À Fapemig e Capes, pela bolsa concedida.

Sumário

| | |
|---|------|
| Resumo | vi |
| Abstract | vii |
| Lista de Abreviaturas | ix |
| Lista de Esquemas | xi |
| Lista de Figuras | xii |
| Lista de Tabelas | xvi |
| Organização da tese | xvii |
| 1 Capítulo 1. Introdução geral | 1 |
| 1.1 Porfirinas e metaloporfirinas | 1 |
| 1.2 Compostos de antimônio e bismuto | 5 |
| 1.2.1. Porfirinas de bismuto e antimônio | 6 |
| 1.2.2. Bismuto e antimônio na medicina | 6 |
| 1.3. Leishmaniose | 8 |
| 1.3.1. Ciclo de vida da leishmania | 9 |
| 1.3.2. Tratamento da leishmaniose | 10 |
| 1.3.3. Mecanismos de ação | 11 |
| 1.4. Objetivos | 12 |
| 2. Capítulo 2. Procedimentos gerais e equipamentos | 14 |
| 2.1. Purificação de Solventes e Reagentes | 14 |
| 2.2. Equipamentos | 15 |
| 3. Capítulo 3. Síntese e caracterização das metaloporfirinas | 17 |
| 3.1. Procedimento experimental | 17 |
| 3.1.1. Síntese das metaloporfirinas hidrofóbicas de bismuto | 17 |
| 3.1.2. Síntese das metaloporfirinas hidrofóbicas de antimônio | 20 |
| 3.1.3. Síntese das metaloporfirinas hidrossolúveis | 22 |
| 3.2. Resultados e discussão | 25 |
| 3.2.1. Síntese das metaloporfirinas hidrofóbicas de bismuto | 25 |

| | | |
|--------|---|----|
| 3.2.2. | Síntese das metaloporfirinas hidrofóbicas de antimônio..... | 44 |
| 3.2.3. | Síntese da metaloporfirina hidrossolúvel | 55 |
| 4. | Capítulo 4. Avaliação da atividade antileishmania dos compostos de Bi(III) e Sb(V) | 58 |
| 4.1. | Procedimento experimental..... | 58 |
| 4.1.1. | Avaliação <i>in vitro</i> da atividade antileishmania das porfirinas H ₂ T4CMPP, [Sb(V)Br ₂ (T4CMPP)]Br e [Bi(III)T4CMPP]NO ₃ | 58 |
| 4.1.2. | Avaliação <i>in vitro</i> da atividade antileishmania das metaloporfirinas [Sb(V)BrCl(T4MPP)]Br; [Bi(III)(T4MPP)]NO ₃ ; [Sb(V)BrCl(T3,5DMPP)]Br; [Bi(III)(T3,5DMPP)]NO ₃ ; [Bi(III)(APTPP)]NO ₃ ; [Bi(III)(NPTPP)]NO ₃ ; <i>cis/trans</i> -[Bi(III)(DAPDPP)]NO ₃ ; <i>cis/trans</i> -[Bi(III)(DNPDP)]NO ₃ | 60 |
| 4.2. | Resultados e discussão..... | 62 |
| 4.2.1. | Avaliação <i>in vitro</i> da atividade antileishmania..... | 62 |
| 5. | Capítulo 5. Avaliação da inibição da biossíntese de ergosterol | 68 |
| 5.1. | Procedimento experimental..... | 68 |
| 5.1.1. | Avaliação da inibição da biossíntese de ergosterol por CCD..... | 68 |
| 5.1.2. | Avaliação da inibição da biossíntese de ergosterol por Cromatografia a Gás Acoplada a Espectrometria de massas (GC/MS) | 68 |
| 5.2.2. | Análise do perfil de esteróis de por CCD..... | 70 |
| 5.2.3. | Análise do perfil de esteróis por Cromatografia a Gás Acoplada à Espectrometria de massas (GC/MS)..... | 72 |
| 6. | Capítulo 6. Interação com <i>calf-thymus</i> DNA (CT-DNA)..... | 76 |
| 6.1. | Procedimento experimental..... | 76 |
| 6.2. | Resultados e discussão..... | 77 |
| 7. | Capítulo 7. Conclusões | 82 |
| | Referências bibliográficas | 83 |
| | Anexos..... | 88 |

Resumo

Os compostos de bismuto e antimônio têm ampla aplicação na medicina, principalmente para o tratamento de distúrbios gástricos e da leishmaniose, respectivamente. São descritos neste trabalho os métodos de obtenção e caracterização de complexos inéditos de Sb(V) e Bi(III) derivados das seguintes porfirinas de segunda geração: 5,10,15,20-tetraquis(4-metoxifenil)porfirina (H₂T4MPP); 5,10,15,20-tetraquis(3,5-dimetoxifenil)-porfirina (H₂T3,5DMPP); 5-(4-aminofenil)-10,15,20-trisfenilporfirina (H₂APTPP); 5-(4-nitrofenil)-10,15,20-trisfenilporfirina (H₂NPTPP); da mistura de isômeros 5,10-bis(4-aminofenil)-15,20-bisfenilporfirina (cis-H₂DAPDPP) e 5,15-bis(4-aminofenil)-10,20-bisfenilporfirina (trans-H₂DAPDPP) e da mistura de isômeros 5,10-bis(4-nitrofenil)-15,20-bisfenilporfirina (cis-H₂DNPDP) e 5,15-bis(4-nitrofenil)-10,20-bisfenilporfirina (trans-H₂DNPDP). Os complexos foram caracterizados por análise elementar (CHN), espectroscopias de absorção na região do ultravioleta/visível (UV-vis), ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ¹H) e espectrometria de massas. Posteriormente, os compostos foram testados, *in vitro*, contra as formas promastigotas da *Leishmania*. Nestes ensaios, os complexos [Sb(V)Br₂(T4CMPP)]Br (CI₅₀ = 1,23 μmol L⁻¹, obtido durante o mestrado da autora deste trabalho) e [Sb(V)BrCl(T4MPP)]Br (CI₅₀ = 0,2 μmol L⁻¹) foram os mais ativos e também foram testados contra as formas amastigotas intracelulares. O complexo [Sb(V)Br₂(T4CMPP)]Br mostrou 50% de redução do índice de infecção em 72,8 ± 1,3 μmol L⁻¹ para as estirpes resistentes e 53,0 ± 1,2 μmol L⁻¹ para as sensíveis. Surpreendentemente, esse complexo foi muito mais ativo do que a droga convencional, glucantime[®]. Já o complexo [Sb(V)BrCl(T4MPP)]Br apresentou um valor de CI₅₀ igual a 0,07 μmol L⁻¹, ou seja, menor que os demais valores para promastigotas. Os possíveis mecanismos de ação dos compostos testados também foram investigados, como a inibição da biossíntese do ergosterol e interação com DNA. Os complexos estudados apresentaram média capacidade de interação com o DNA, com constantes K_b na ordem de 10⁵. Para os parasitas tratados com os compostos [Sb(V)Br₂(T4CMPP)]Br e [Sb(V)BrCl(T4MPP)]Br, houve significativa redução dos níveis de ergosterol, inferindo-se assim que esse pode ser o mecanismo de ação desses complexos. Portanto, esses dois complexos surgem como potenciais candidatos a fármacos leishmanicidas, tendo a inibição da biossíntese do ergosterol como possível mecanismo de ação.

Palavras chave: Porphirinas de Sb(V); porfirinas de Bi(III); *Leishmania*; ergosterol; interação com DNA

Abstract

Bismuth and antimony porphyrins: synthesis, leishmanicide activity evaluation and possible action mechanisms investigation

Bismuth and antimony compounds have wide application in medicine, mainly for the treatment of gastric diseases and leishmaniasis, respectively. We describe at this work the syntheses and characterization of new Sb(V) e Bi(III) complexes derived from the following second generation porphyrins: 5,10,15,20-tetrakis(4-methoxyphenyl)porphyrin (H₂T4MPP); 5,10,15,20-tetrakis(3,5-dimethoxyphenyl)porphyrin (H₂T3,5DMPP); 5-(4-aminophenyl)-10,15,20-trisphenylporphyrin (H₂APTPP); 5-(4-nitrophenyl)-10,15,20-trifenilporphyrin (H₂NPTPP); 5,10-bis(4-aminophenyl)-15,20-diphenylporphyrin (cis-H₂DAPDPP) e da 5,15-bis(4-aminophenyl)-10,20-diphenylporphyrin (trans-H₂DAPDPP); 5,10-bis(4-nitrophenyl)-15,20-diphenylporphyrin (cis-H₂DNPDP) e da 5,15-bis(4-nitrophenyl)-10,20-diphenylporphyrin (trans-H₂DNPDP). The compounds were characterized by elemental analysis (CHN), spectroscopic absorption in the ultraviolet/visible region (UV-vis and nuclear magnetic resonance of hydrogen (¹H NMR) and mass spectrometry. Due to the wide applicability of antimony and bismuth compounds in medicine, the activity of these complexes was verified against *Leishmania parasites*. Initially, the compounds were tested against *Leishmania promastigotes*. The [Sb(V)Br₂(T4CMPP)]Br (IC₅₀ = 1.23 μmolL⁻¹, obtained during the Masters) and [Sb(V)BrCl(T4MPP)]Br (IC₅₀ = 0.2 μmolL⁻¹) complexes were the most active and then they were also tested against the intracellular amastigotes. The [Sb(V)Br₂(T4CMPP)]Br complex showed 50% reduction in infection index at 72.8 ± 1.3 μmol for resistant strains and 53.0 ± 1.2 μmol L⁻¹ to sensitive. Surprisingly, the complex was much more active than conventional drug, the glucantime[®]. The [Sb(V)BrCl(T4MPP)]Br complex showed IC₅₀ = 0.07 μmol L⁻¹, that is, smaller than the other values for promastigotes. The possible action mechanisms were also investigated, as the ergosterol biosynthesis inhibition and DNA interactions. For parasites treated with [Sb(V)Br₂(T4CMPP)]Br and [Sb(V)BrCl(T4MPP)]Br compounds, a significant level ergosterol reduction was observed, thus inferring that this may be the action mechanism of these complexes. In addition, the studied complexes have high ability to interact with DNA, with constants (K_b) at 10⁵ order. In parasites treated with the compounds [Sb(V)Br₂(T4CMPP)]Br and [Sb(V)BrCl(T4MPP)] Br, there was significant reduction of ergosterol levels, inferring that this may be the action mechanism of these complexes. Therefore, these two compound appear as potential

antileishmanial drugs candidates and its action mechanism may be ergosterol biosynthesis inhibition.

Keywords: Sb(V) porphyrins; Bi(III) porphyrins; Leishmania; ergosterol, DNA interaction

Lista de Abreviaturas

Abreviaturas

DMF - N,N-dimetilformamida
 MP - metaloporfirina monometálica
 BSS - subsalicilato de bismuto
 CBS - subcitrato de bismuto coloidal
 UV-vis - ultravioleta e visível
 CCD - cromatografia em camada delgada
 α -MEM - meio de cultura mínimo essencial
 FBS -soro fetal bovino
 PBS - tampão fosfato-salino
 HG - tampão HEPES Glucose

Porfirinas e Metaloporfirinas

H₂T4MPP - 5,10,15,20-tetraquis(4-metoxifenil)porfirina
 H₂T3,5DMPP - 5,10,15,20-tetraquis(3,5-dimetoxifenil)porfirina
 H₂APTPP - 5-(4-aminofenil)-10,15,20-trisfenilporfirina
 H₂NPTPP - 5-(4-nitrofenil)-10,15,20-trisfenilporfirina
 Mistura de isômeros *cis/trans* - H₂DAPDPP - 5,15-bis(4-aminofenil)-10,20-bisfenilporfirina
 Mistura de isômeros *cis/trans* - H₂DNPDP - 5,15-bis(4-nitrofenil)-10,20-bisfenilporfirina
 [Bi(III)(T4MPP)]NO₃ - Nitrato de 5,10,15,20-tetraquis(4-metoxifenil)porfirinatobismuto(III)
 [Bi(III)(T3,5DMPP)]NO₃ - Nitrato de 5,10,15,20-tetraquis(3,5-dimetoxifenil)porfirinatobismuto(III)
 [Bi(III)APTPP]NO₃ - Nitrato de 5-(4-aminofenil)-10,15,20-trisfenilporfirinatobismuto(III)
 [Bi(III)NPTPP]NO₃ - Nitrato de 5-(4-nitrofenil)-10,15,20-trisfenilporfirinatobismuto(III)
 [Bi(III)DAPDPP]NO₃ - Nitrato de 5,10-bis(4-aminofenil)-15,20-bisfenilporfirinatobismuto(III) e nitrato de 5,15-bis(4-aminofenil)-10,20-bisfenilporfirinatobismuto(III)

[Bi(III)DNPDP]NO₃ - Nitrato de 5,10-bis(4-nitrofenil)-15,20-bisfenilporfirinatobismuto(III) e nitrato de 5,15-bis(4-nitrofenil)-10,20-bisfenilporfirinatobismuto(III)

[Sb(V)BrCl(T4MPP)]Br - Brometo de bromidoclorido-5,10,15,20-tetraquis(4-metoxifenil)porfirinatoantimônio(V)

[Sb(V)BrCl(T3,5DMPP)]Br - Brometo de bromidoclorido-5,10,15,20-tetraquis(3,5-dimetoxifenil)porfirinatoantimônio(V)

[Bi(III)(T3MPyP)](PF₆)₅ - Hexafluorofosfato de 5,10,15,20-tetraquis(3-metilpiridil)porfirinatobismuto(III)

Lista de Esquemas

| | |
|--|----|
| Esquema 1. Representação da reação de formação da $[\text{Bi(III)(T4MPP)}]\text{NO}_3$ | 26 |
| Esquema 2. Representação da reação de formação da $[\text{Bi(III)(T3,5DMPP)}]\text{NO}_3$ | 31 |
| Esquema 3. Representação da reação de formação da $[\text{Bi(III)(APTPP)}]\text{NO}_3$ | 35 |
| Esquema 4. Representação da reação de formação da $[\text{Bi(III)(NPTPP)}]\text{NO}_3$ | 38 |
| Esquema 5. Representação da reação de formação da <i>cis</i> - $[\text{Bi(III)(DAPDPP)}]\text{NO}_3$ | 40 |
| Esquema 6. Representação da reação de formação da <i>cis</i> - $[\text{Bi(III)(DNPDP)}]\text{NO}_3$ | 43 |
| Esquema 7. Representação da reação de formação da $[\text{Sb(V)BrCl(T4MPP)}]\text{Br}$ | 45 |
| Esquema 8. Representação da reação de formação da $[\text{Sb(V)BrCl(T3,5DMPP)}]\text{Br}$ | 50 |

Lista de Figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1. Representação do macrociclo tetrapirrólico característico das porfirinas. | 1 |
| Figura 2. Representação da reação para formação de uma metaloporfirina monometálica MP..... | 1 |
| Figura 3. Representação do grupo heme [3]. Fonte: Buchler, J. W; Dolphin, D., 1978. | 2 |
| Figura 4. Representação das posições do macrociclo porfirínico. | 2 |
| Figura 5. Representação estrutural da porfirina de primeira geração 5,10,15,20-tetrafenilporfirina (H ₂ TPP)..... | 3 |
| Figura 6. Representação estrutural da porfirina de segunda geração 5,10,15,20-tetraquis(pentafluorfenil)porfirina (H ₂ TPFPP)..... | 3 |
| Figura 7. Representação estrutural da porfirina iodeto de 5-[4-(trimetilamônio)fenil]-10,15,20-tris(2,4,6-trimetoxifenil)porfirina. | 4 |
| Figura 8. Representação estrutural da porfirina de terceira geração 5,10,15,20-tetrafenil-β-octabromoporfirina (H ₂ Br ₈ TPP). | 5 |
| Figura 9. Representação da estrutura do subsalicilato de bismuto [Bi ₃₈ O ₄₄ (HSal) ₂₆ (Me ₂ CO) ₁₆ (H ₂ O) ₂]. Os pontos verdes representam os átomos de bismuto e os vermelhos, átomos de oxigênio. Os ligantes salicilato estão representados na cor cinza [37]. Fonte: Keogan, D. M.; Griffith, D. M., 2014. | 7 |
| Figura 10. Representação da estrutura do subcitrato de bismuto coloidal K(NH ₄)[Bi ₂ (cit) ₂ (H ₂ O) ₂].4H ₂ O [29]. Os pontos azuis representam os átomos de carbono; os vermelhos, átomos de oxigênio; e os amarelos, átomos de bismuto [37]. Fonte: Keogan, D. M.; Griffith, D. M., 2014. | 8 |
| Figura 11. Duas formas do protozoário Leishmania: A – amastigota e B – promastigota [40]. Fonte: Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, 2010..... | 9 |
| Figura 12. Estrutura do tártaro emético [43]. Fonte: Cadernos Temáticos De Química Nova Na Escola Antimônio No Tratamento De Zoonoses, 2005..... | 10 |
| Figura 13. Representação das estruturas do Pentostam [®] (a) e do Glucantime [®] (b) [43, 46, 47]. | 11 |
| Figura 14. Representação das estruturas dos macrociclos porfirínicos H ₂ T4MPP e H ₂ T3,5DMPP..... | 12 |
| Figura 15. Representação das estruturas dos macrociclos porfirínicos H ₂ APTPP, <i>cis/trans</i> -H ₂ DAPDPP, H ₂ NPTPP e <i>cis/trans</i> -H ₂ DNPDP. | 13 |
| Figura 16. Espectros eletrônicos de absorção UV-vis de H ₂ T4MPP e [Bi(III)(T4MPP)]NO ₃ , em CH ₂ Cl ₂ | 27 |
| Figura 17. Espectro de RMN ¹ H, em aparelho de 200 MHz, em CDCl ₃ (25 °C) da [Bi(III)(T4MPP)]NO ₃ : δ = 4,12 (12H, s, metílicos); δ = 7,30 – 7,35 (8 H, m, m-arílicos); δ = 8,16 (8 H, m, o-arílicos); δ = 9,23 (8H, s, β-pirrólicos)..... | 28 |

| | |
|--|----|
| Figura 18. Classificação dos átomos de hidrogênio em uma porfirina | 29 |
| Figura 19. Espectro de RMN ^1H , em aparelho de 200 MHz, em CDCl_3 (25 °C) da $\text{H}_2\text{T4MPP}$: $\delta = 2,75$ (2 H, N-pirrólicos); $\delta = 4,10$ (12H, s, metílicos); $\delta = 7,31$ (8 H, s, o-arílicos); $\delta = 8,10-8,15$ (8 H, m, m-arílicos); $\delta = 8,86$ (8H, s, β -pirrólicos). | 29 |
| Figura 20. Espectro de massas da $[\text{Bi(III)(T4MPP)]NO}_3$ obtido em metanol. | 30 |
| Figura 21. Espectros eletrônicos de absorção UV-vis de $\text{H}_2\text{T3,5DMPP}$ e $[\text{Bi(III)(T3,5DMPP)]NO}_3$, em CH_2Cl_2 | 31 |
| Figura 22. Espectro de RMN ^1H em aparelho de 200 MHz em CDCl_3 (25°C) da $[\text{Bi(III)(T3,5DMPP)]NO}_3$. $\delta = 3,98$ (24 H, s, metílicos); $\delta = 6,95$ (4 H, m, p-arílicos); $\delta = 7,31 - 7,57$ (8 H, m, o-arílicos); $\delta = 9,31$ (8H, s, β -pirrólicos). | 32 |
| Figura 23. Espectro de RMN ^1H em aparelho de 200 MHz em CDCl_3 (25°C) da $\text{H}_2\text{T3,5DMPP}$. $\delta = -2,80$ (2 H, s, N-pirrólicos); $\delta = 3,97$ (24 H, s, metílicos); $\delta = 6,91$ (4 H, m, p-arílicos); $\delta = 7,41$ (8 H, m, o-arílicos); $\delta = 8,94$ (8H, s, β -pirrólicos). | 33 |
| Figura 24. Espectro de massas da $[\text{Bi(III)(T3,5DMPP)]NO}_3$, em metanol. | 34 |
| Figura 25. Espectros eletrônicos de absorção UV-vis de H_2APTTP e $[\text{Bi(III)(APTTP)]NO}_3$, em CH_2Cl_2 | 35 |
| Figura 26. Classificação dos átomos de hidrogênio em H_2APTTP | 37 |
| Figura 27. Espectro de massas da $[\text{Bi(III)(APTTP)]NO}_3$, em metanol. | 37 |
| Figura 28. Espectros eletrônicos de absorção UV-vis de H_2NPTTP e $[\text{Bi(III)(NPTTP)]NO}_3$, em CH_2Cl_2 | 39 |
| Figura 29. Espectro de massas da $[\text{Bi(III)(NPTTP)]NO}_3$, em metanol. | 40 |
| Figura 30. Espectros eletrônicos de absorção UV-vis das misturas <i>cis/trans</i> - H_2DAPDPP e <i>cis/trans</i> - $[\text{Bi(III)(DAPDPP)]NO}_3$, em CHCl_2 | 41 |
| Figura 31. Espectro de massas da mistura de isômeros <i>cis/trans</i> - $[\text{Bi(III)(DAPDTPP)]NO}_3$, em metanol. | 42 |
| Figura 32. Espectros eletrônicos de absorção UV-vis de <i>cis/trans</i> - H_2DNPDPP e <i>cis/trans</i> - $[\text{Bi(III)(DNPDPP)]NO}_3$, em CH_2Cl_2 | 43 |
| Figura 33. Espectro eletrônico de absorção UV-vis de $[\text{Sb(III)(T4MPP)]Cl}$, em CH_2Cl_2 | 45 |
| Figura 34. Espectro eletrônico de absorção UV-vis da $[\text{Sb(V)BrCl(T4MPP)]Br}$ e da $\text{H}_2\text{T4MPP}$, em CH_2Cl_2 | 46 |
| Figura 35. Espectro de massas da $[\text{Sb(V)BrCl(T4MPP)]Br}$, em MeOH. | 48 |
| Figura 36. Simulação do espectro de massas para a $[\text{Sb(V)BrCl(T4MPP)]}^+$ gerada pelo programa computacional Scientific Instrument Services. | 49 |
| Figura 37. Simulação do espectro de massas para a $[\text{Sb(V)Br}_2(\text{TP4MPP})]^+$ gerada pelo programa computacional Scientific Instrument Services. | 49 |

| | |
|---|----|
| Figura 38. Simulação do espectro de massas para a $[\text{Sb(V)Cl}_2(\text{TP4MPP})]^+$ gerada pelo programa computacional Scientific Instrument Services..... | 49 |
| Figura 39. Espectro eletrônico de absorção UV-vis de $[\text{Sb(III)(T3,5DMPP)]Cl}$, em CH_2Cl_2 | 51 |
| Figura 40. Espectro eletrônico de absorção UV-vis da $[\text{Sb(V)BrCl(T3,5DMPP)]Br}$, e $\text{H}_2\text{T3,5DMPP}$, em CH_2Cl_2 | 52 |
| Figura 41. Espectro de massas da $[\text{Sb(V)BrCl(T3,5DMPP)]Br}$, em MeOH. | 53 |
| Figura 42. Simulação do espectro de massas para a $[\text{Sb(V)BrCl(T3,5DMPP)}]^+$ gerada pelo programa computacional Scientific Instrument Services..... | 54 |
| Figura 43. Simulação do espectro de massas para a $[\text{Sb(V)Cl}_2(\text{T3,5DMPP})]^+$ gerada pelo programa computacional Scientific Instrument Services..... | 54 |
| Figura 44. Simulação do espectro de massas para a $[\text{Sb(V)Br}_2(\text{T3,5DMPP})]^+$ gerada pelo programa computacional Scientific Instrument Services..... | 54 |
| Figura 45. Representação da estrutura da $[\text{Bi(III)(T3MPyP)}]^{5+}$ | 55 |
| Figura 46. Espectro eletrônico UV-vis da $\text{H}_x\text{T3MPyP}^{(2+x)+}$ em CH_3OH . X pode ser igual a 3 ou 4. | 56 |
| Figura 47. Espectro eletrônico de absorção UV-vis da $[\text{Bi(III)T3MPyP}]^{5+}$, em metanol. | 56 |
| Figura 48. Estruturas das porfirinas obtidas durante o período de mestrado..... | 62 |
| Figura 49. (a) A placa de sílica após a separação dos lipídios, para os parasitas tratados com o complexo e para os não tratados; (b) duas placas de sílica que retratam separações de lipídios de acordo com a literatura. As manchas destacadas em vermelho nas placas correspondem ao ergosterol. CHO – colesterol; ERGOST/ERG – ergosterol; MS – esteróis metilados; DG – diacilglicerol; CHOE – colesterol esterificado; TG - triglicerídeos [63, 64]. Fonte: Andrade-Neto <i>et al.</i> , 2011. | 71 |
| Figura 50. Cromatograma dos lipídeos extraídos dos promastigotas de <i>L. infantum</i> não tratados (controle). | 72 |
| Figura 51. Cromatograma dos lipídeos extraídos dos promastigotas de <i>L. infantum</i> tratados com miconazol ($4\mu\text{mol L}^{-1}$). | 72 |
| Figura 52. Cromatograma dos lipídeos extraídos dos promastigotas de <i>L. infantum</i> tratados com $[\text{Sb(V)BrCl(T4MPP)]Br}$ ($0,2\mu\text{mol L}^{-1}$). | 73 |
| Figura 53. Cromatograma dos lipídeos extraídos dos promastigotas de <i>L. infantum</i> tratados com $[\text{Bi(III)T4MPP}]NO_3$ ($0,2\mu\text{mol L}^{-1}$). | 73 |
| Figura 54. Estrutura em dupla hélice do DNA [73]. Fonte: Árias, G., 2004..... | 78 |
| Figura 55. Tipos de interações do DNA: covalentes e não covalentes [74]. Fonte: Barra, C. V.; Netto, A. V. G, 2015. | 78 |
| Figura 56. Espectros de absorção na região do UV-vis para a titulação da solução do complexo $[\text{Sb(V)BrCl(T4MPP)]Br}$ com a solução de CT-DNA (temperatura de 25°C e tempo de incubação de 30 minutos após cada adição de CT-DNA). (b) Representação da relação $[\text{DNA}]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$ versus $[\text{DNA}]$ considerando a equação de Scatchard. $[[\text{Sb(V)BrCl(T4MPP)]Br}] = 1,52 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ | 80 |

- Figura 57.** Espectros de absorção na região do UV-vis para a titulação da solução do complexo $[\text{Sb(V)Br}_2(\text{T4CMPP})]\text{Br}$ com a solução de CT-DNA (temperatura de 25°C e tempo de incubação de 30 minutos após cada adição de CT-DNA). (b) Representação da relação $[\text{DNA}]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$ versus $[\text{DNA}]$ considerando a equação de Scatchard. $[[\text{Sb(V)Br}_2(\text{T4CMPP})]\text{Br}] = 5,59 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$80
- Figura 58.** Espectros de absorção na região do UV-vis para a titulação da solução do complexo $[\text{Bi(III)(APTTPP)]NO}_3$ com a solução de CT-DNA (temperatura de 25°C e tempo de incubação de 30 minutos após cada adição de CT-DNA). (b) Representação da relação $[\text{DNA}]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$ versus $[\text{DNA}]$ considerando a equação de Scatchard. $[[\text{Bi(III)(APTTPP)]NO}_3] = 1,71 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$81
- Figura 59.** Espectro de RMN ^1H da $[\text{Bi(III)(APTTPP)]NO}_3$ em aparelho de 200 MHz em CDCl_3 (25°C). δ 9,24 (m, 8H, β -pirrólico), 8,24 (d, 6H, orto fenil), 8,01 (s, 2H, aminofenil), 7,84 (m, 9H, meta/para fenis), 7,1 (s, 2 H, aminofenil), 4 (2H, amino).88
- Figura 60.** Espectro de RMN ^1H da $[\text{Bi(III)(NPTTPP)]NO}_3$ em aparelho de 200 MHz em CDCl_3 (25°C). δ 9,21 (m, 6 H, β -pirrólico), 8,88 (d, 2 H, β -pirrólico), 8,68 (d, 2 H, nitrofenil), 8,50 (d, 2 H, nitrofenil), 8,23 (m, 6 H, orto arila), 7,80 (m, 9 H, meta/para arila).89
- Figura 61.** Espectro de RMN ^1H da *cis/trans*- $[\text{Bi(III)DAPDPP}]NO_3$ em aparelho de 200 MHz em CDCl_3 (25°C). δ 9,34 (s, 4H, β -pirrólico), 9,22 (s, 4H, β -pirrólico), 8,23-8,25 (m, 4H, ortofenil), 8,04 (s, 4H, aminofenil), 7,81-7,84 (m, 6H, meta/para fenis), 7,12 (s, 4H, aminofenil), 4,11 (4H, amino). 89
- Figura 62.** Espectro de RMN de ^1H da *cis/trans*- $[\text{Bi(III)(DNPDP)]NO}_3$ em aparelho de 200 MHz em CDCl_3 (25°C). δ 8,90 (m, 4H, β -pirrólico), 8,78 (d, 4H, β -pirrólico), 8,69 (d, 4H, nitrofenil), 8,43 (d, 4H, nitrofenil), 8,24(m, 6H, orto fenil), 7,80 (m, 6 H, meta/para fenil).90
- Figura 63.** Espectro RMN ^1H da $[\text{Sb(V)BrCl(T4MPP)]Br}$ em CDCl_3 (25 °C): $\delta = 4,17$ (12 H, s, metílicos); $\delta = 7,47 - 7,51$ (8 H, m, o-arílicos); $\delta = 8,26 - 8,30$ (8 H, m, m-arílicos); $\delta = 9,60 - 9,65$ (8H, m, β -pirrólicos).90
- Figura 64.** Espectro RMN ^1H da $[\text{Sb(V)BrCl(T3,5DMPP)]Br}$ em CDCl_3 (25 °C): $\delta = 4,12$ (24 H, s, metílicos); $\delta = 7,75$ (4 H, m, p-arílicos); $\delta = 8,68$ (8 H, m, o-arílicos); $\delta = 9,71$ (8H, s, β -pirrólicos). .91

Lista de Tabelas

| | |
|---|----|
| Tabela 1. Condições das reações de metalação da H ₂ TM3PyPCl ₄ | 24 |
| Tabela 2. Sinais de RMN ¹ H da H ₂ APTPP e [Bi(III)(APTPP)]NO ₃ em aparelho de 200 MHz (25°C). | 36 |
| Tabela 3. Sinais de RMN ¹ H da H ₂ NPTPP e [Bi(III)(NPTPP)]NO ₃ em aparelho de 200 MHz (25°C). | 39 |
| Tabela 4. Sinais de RMN ¹ H da <i>cis/trans</i> -H ₂ DAPDPP e <i>cis/trans</i> -[Bi(III)(DAPDPP)]NO ₃ em aparelho de 200 MHz (25°C). | 42 |
| Tabela 5. Sinais de RMN ¹ H da <i>cis/trans</i> -H ₂ DNPDP e <i>cis/trans</i> -[Bi(III)(DNPDP)]NO ₃ em aparelho de 200 MHz (25°C). | 44 |
| Tabela 6. Sinais de RMN ¹ H da H ₂ T4MPP e [Sb(V)BrCl(T4MPP)]Br em CDCl ₃ em aparelho de 200 MHz (25 °C). | 47 |
| Tabela 7. Sinais de RMN ¹ H da H ₂ T3,5DMPP e [Sb(V)BrCl(T3,5DMPP)]Br em aparelho de 200 MHz (25°C). | 52 |
| Tabela 8. Concentrações inibitórias do crescimento (CI ₅₀) do H ₂ T4CMPP e de seus complexos de Sb(V) e Bi(III) para <i>Leishmania amazonensis</i> sensível (SbS) e resistente (SbR) ao sal de Sb(III). | 63 |
| Tabela 9. Citotoxicidade do ligante porfirina e do complexo de Sb(V) contra macrófagos peritoniais de camundongos e índice seletivo resultante. | 65 |
| Tabela 10. Concentrações inibitórias do crescimento (CI ₅₀) dos ligantes e de seus complexos de SB(V) e Bi(III) | 66 |
| Tabela 11. Efeito do miconazol (1) e dos complexos [Sb(V)BrCl(T4MPP)]Br (2) e [Bi(III)(T4MPP)]NO ₃ (3) sobre a composição de esteróis de promastigotas de <i>L. infantum</i> | 74 |
| Tabela 12. Dados experimentais da interação com CT-DNA. | 76 |
| Tabela 13. Alíquotas da solução de CT-DNA adicionadas e concentração dos complexos na cubeta. .. | 77 |
| Tabela 14. Valores das constantes de ligação K _b para os complexos estudados. | 81 |

Organização da tese

Esta tese está organizada em sete capítulos, os quais estão descritos a seguir.

No Capítulo 1 há uma introdução geral, na qual são abordados os conceitos principais de porfirinas e leishmanioses, além dos objetivos gerais e específicos deste trabalho. Já no capítulo 2 estão relacionados os reagentes, materiais e equipamentos utilizados.

No capítulo 3 estão descritos detalhadamente os métodos de obtenção e caracterização das metaloporfirinas de Bi(III) e Sb(V). Há ainda uma discussão de todos os resultados obtidos.

Os testes antileishmania, os quais foram realizados em colaboração com o professor Dr. Frédéric Frézard, do Departamento de Fisiologia e Biofísica da UFMG e com o pesquisador Dr. Rubens Lima do Monte Neto, do Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR/FIOCRUZ), são relatados no capítulo 4.

Nos dois capítulos seguintes é apresentada uma investigação dos mecanismos de ação dos complexos obtidos. No capítulo 5 é estudado o mecanismo via inibição da biossíntese do ergosterol e, no capítulo 6, por meio da interação dos complexos com CT-DNA.

Em cada etapa deste trabalho foram obtidas importantes conclusões, encontradas no capítulo 7.

1 Capítulo 1. Introdução geral

1.1 Porfirinas e metaloporfirinas

O ligante porfirina apresenta uma estrutura básica plana e cíclica constituída de quatro anéis pirrólicos unidos por uma ponte metilidênica (Figura 1). É uma molécula tetradentada que possui quatro átomos de nitrogênio internos, os quais podem se coordenar a um íon metálico [1]. Quando o ligante porfirina não está coordenado a um íon metálico, é conhecido como “porfirina base livre”; caso possua um centro metálico coordenado passa a ser denominado metaloporfirina (MP).

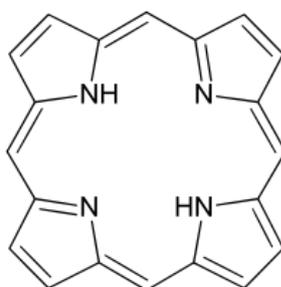


Figura 1. Representação do macrociclo tetrapirrólico característico das porfirinas.

A metaloporfirina (MP) é geralmente obtida pela reação da “porfirina base livre” (H_2P) com um sal metálico (MX_2). Essa reação é conhecida como “metalação”, e a reação inversa é uma “desmetalação” [2] (Figura 2).

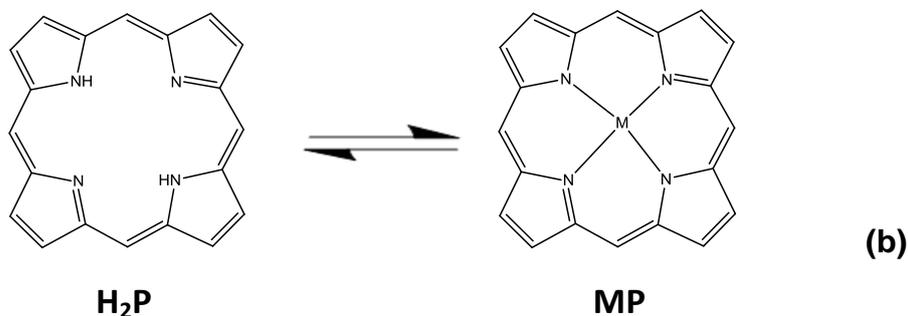


Figura 2. Representação da reação para formação de uma metaloporfirina monometálica MP.

A hemoglobina, proteína responsável pelo transporte de oxigênio no sistema circulatório, contém um representante natural dessa classe de compostos. O grupo heme (Figura 3), que é a parte não proteica da hemoglobina, é uma metaloporfirina cujo íon metálico central é o Fe^{2+} [3].

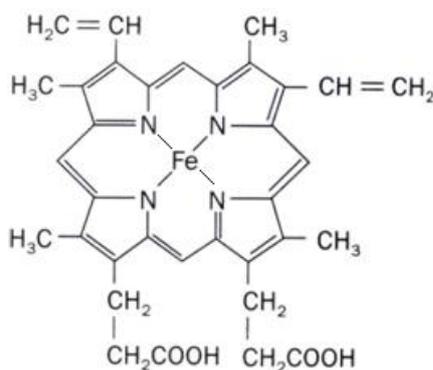


Figura 3. Representação do grupo heme [3]. Fonte: Buchler, J. W; Dolphin, D., 1978.

As porfirinas são moléculas cujas propriedades físico-químicas podem ser facilmente modificadas por meio de substituições nas posições *meso* e/ou β -pirrólicas do macrociclo (Figura 4).

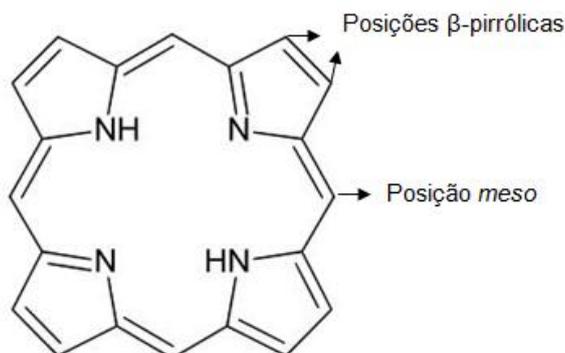


Figura 4. Representação das posições do macrociclo porfirínico.

De acordo com os grupos substituintes em suas posições *meso* e/ou β pirrólicas, as porfirinas podem ser classificadas em compostos de primeira, segunda e terceira gerações. As porfirinas de primeira geração apresentam apenas uma estrutura básica do macrociclo porfirínico, com grupos alquila e/ou arila nas posições *meso* e/ou β pirrólicas [4, 5] (Figura 5, pág. 3). Esses compostos tendem a ser altamente hidrofóbicos e as respectivas

metaloportirinas são poucos estáveis quando empregadas como catalisadores de reações de oxidação de substratos orgânicos [4].

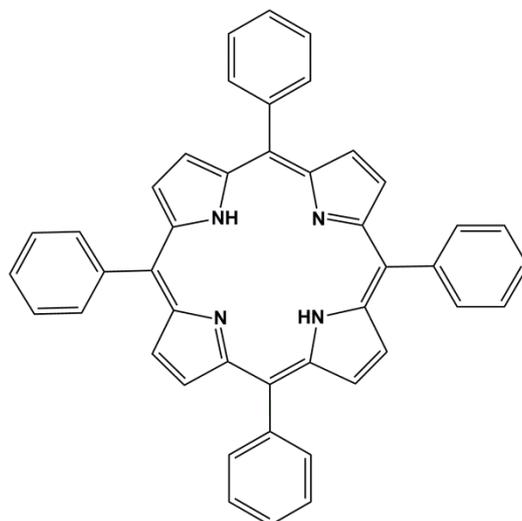


Figura 5. Representação estrutural da porfirina de primeira geração 5,10,15,20-tetrafenilporfirina (H_2TPP).

As porfirinas que apresentam diferentes substituintes nos grupos arila (localizados nas posições meso), como $-NH_2$, $-NO_2$ e halogênios são classificadas como porfirinas de segunda geração [4, 5, 6] (Figura 6).

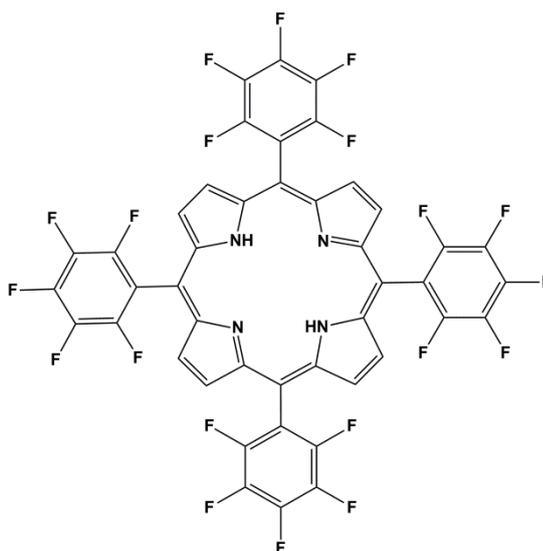


Figura 6. Representação estrutural da porfirina de segunda geração 5,10,15,20-tetraquis(pentafluorfenil)porfirina (H_2TPFPP).

Pela escolha dos substituintes que estão presentes no grupo arila das posições meso é possível alcançar determinadas propriedades físico-químicas para os compostos porfirínicos e expandir as possibilidades de aplicação em sistemas biológicos. Estudos recentes demonstraram o alto potencial de porfirinas de segunda geração na medicina. Por exemplo, algumas porfirinas com substituintes metoxi (-OCH₃) vêm sendo aplicadas contra células tumorais, usando-se a técnica da terapia fotodinâmica [7]. A terapia fotodinâmica tem como princípio básico a localização de um agente fotossensibilizador no tumor, que é ativado pela luz direcionada ao local. Esse processo resulta na formação de espécies altamente reativas, as quais são responsáveis pela morte do tecido tumoral. No estudo desenvolvido por Alvarez *et al.* [7], o composto iodeto de 5-[4-(trimetilamônio)fenil]-10,15,20-tris(2,4,6-trimetoxifenil)porfirina (Figura 7) foi previamente incorporado em lipossomas e em seguida injetada no organismo. Por meio dessa metodologia, foi observada uma diminuição do tamanho dos tumores tratados.

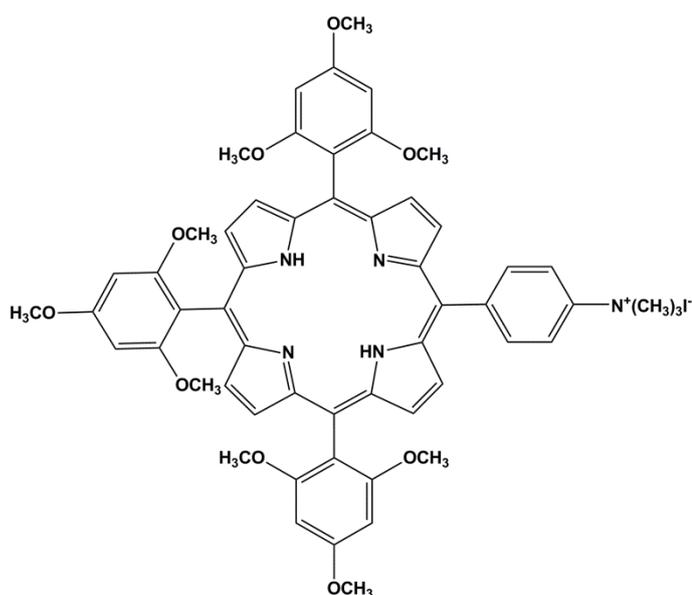


Figura 7. Representação estrutural da porfirina iodeto de 5-[4-(trimetilamônio)fenil]-10,15,20-tris(2,4,6-trimetoxifenil)porfirina.

Alguns macrociclos porfirínicos têm sido investigados também contra certas doenças parasitárias, como malária, leishmanioses e tripanossomíase africana (doença do sono), apresentando resultados promissores [8]. Essas doenças são negligenciadas e apresentam elevados índices de mortalidade, devido principalmente à toxicidade das drogas e ao

surgimento de formas resistentes dos parasitas. Uma porfirina de segunda geração também contendo substituintes metóxi (-OCH₃) apresentou atividade *in vitro* contra a espécie *Plasmodium falciparum*, causadora da malária [8].

As porfirinas de terceira geração (Figura 8) são procedentes das porfirinas de primeira e segunda gerações, pela introdução de substituintes volumosos e/ou retiradores de elétrons nas posições β-pirrólicas, como os grupos nitro (NO₂) ou halogênios (Br, Cl, F) [6].

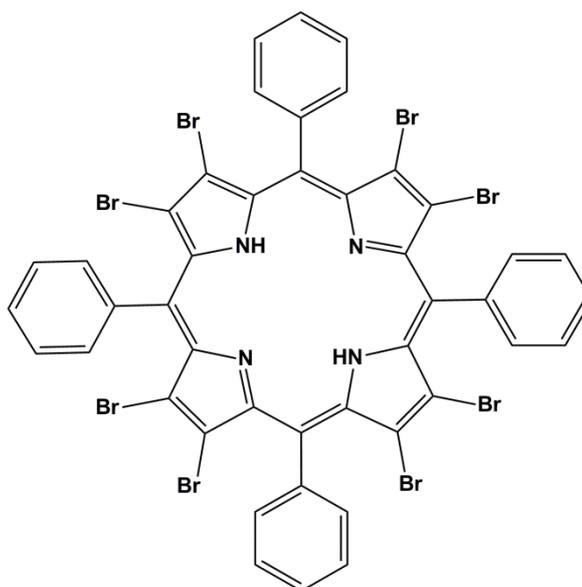


Figura 8. Representação estrutural da porfirina de terceira geração 5,10,15,20-tetrafenil-β-octabromoporfirina (H₂Br₈TPP).

A terapia fotodinâmica utilizando macrociclos porfirínicos como fotossensibilizadores também tem sido testada no tratamento da leishmaniose. Algumas porfirinas de terceira geração contendo substituintes amina e imina nas posições β-pirrólicas mostraram alto potencial no tratamento dessa enfermidade [9].

1.2 Compostos de antimônio e bismuto

O bismuto foi descoberto no século XV, mas somente foi classificado como elemento químico no século XVIII. Seus sais apresentam baixa toxicidade e estão presentes na formulação de diversos cosméticos e medicamentos. O bismuto pode se apresentar como Bi(III) ou Bi(V), porém, devido ao efeito do par inerte, é mais facilmente encontrado na

forma trivalente [10]. Nesse fenômeno, o estado de oxidação mais baixo (Bi(III)) é estabilizado pois seria necessária uma grande quantidade de energia para se remover os 2 elétrons do subnível 6s, após a remoção dos 3 elétrons do subnível 6p [3, 11].

O antimônio é considerado um metaloide e pode ser encontrado nos minerais estibinita (Sb_2S_3) e ulmanita (NiSbS). Assim como ocorre com o bismuto, o antimônio também pode se apresentar como Sb(III) ou Sb(V). Os compostos de antimônio são amplamente usados na medicina [10].

1.2.1. Porfirinas de bismuto e antimônio

As primeiras metaloporfirinas de Bi(III) foram descritas em 1969 por Treibs [12]. A partir daí aumentaram-se as tentativas de preparação desses compostos. O grande desafio, desde o princípio (e até os tempos atuais), foi manter o íon metálico coordenado ao macrociclo porfirínico. O íon Bi(III) é grande (1,50 Å) e se coordena fora do plano do macrociclo porfirínico [13-15]. Em grande parte das sínteses relatadas na literatura, inicialmente é feita a inserção de grupos volumosos no ligante porfirínico. Esses grupos geralmente possuem átomos doadores de elétrons em sua estrutura e têm a função de impedir a desmetalização da porfirina [16-20]. Michaudet *et. al.* [19] usaram o oxigênio como átomo doador, inserindo grupos volumosos contendo metoxi e hidroxila em sua estrutura.

As porfirinas de antimônio são conhecidas como metaloide porfirinas [21]. Os primeiros complexos porfirínicos (dimetilestermesoporfirina e etioporfirina) de antimônio foram descritos em 1969 [10]. Novas metaloide porfirinas de Sb foram preparadas desde então para aplicações em diversas áreas [22-31].

As metaloporfirinas de antimônio podem apresentar o Sb(III) ou Sb(V) coordenados aos átomos de nitrogênio. As que apresentam o Sb(V) como centro metálico geralmente necessitam de ligantes axiais para completar sua esfera de coordenação.

1.2.2. Bismuto e antimônio na medicina

Os compostos de antimônio e bismuto vêm sendo muito usados na medicina. O primeiro relato do uso de um composto de bismuto como medicamento foi no século XVIII, para o tratamento da indigestão. No século seguinte, o bismuto mostrou seu potencial também no tratamento da sífilis [32, 33].

Estudos recentes têm investigado o potencial dos complexos de bismuto na radioterapia. Seus isótopos radioativos bismuto-212 (^{212}Bi) e bismuto-213 (^{213}Bi), emissores de partículas α , têm se revelado potenciais radiofármacos, no tratamento contra o câncer [34, 35].

O principal uso do bismuto na atualidade é no tratamento de distúrbios gastrintestinais, como indisposição estomacal e úlceras gástricas. Entre os medicamentos mais usados tem-se o Pepto-Bismol[®] (BSS, subsalicilato de bismuto) e o De-Nol[®] (CBS, subcitrato de bismuto coloidal) [36]. O subsalicilato de bismuto (Figura 9) é comumente usado para a prevenção e tratamento de diarreia e dispepsia. Já o subcitrato de bismuto coloidal (Figura 10, pág. 8) é indicado para o tratamento de úlceras gástrica e duodenal. O principal alvo dos fármacos à base de bismuto é a *H. Pylori*, bactéria responsável pelo desenvolvimento de diversas doenças gástricas [36, 37].

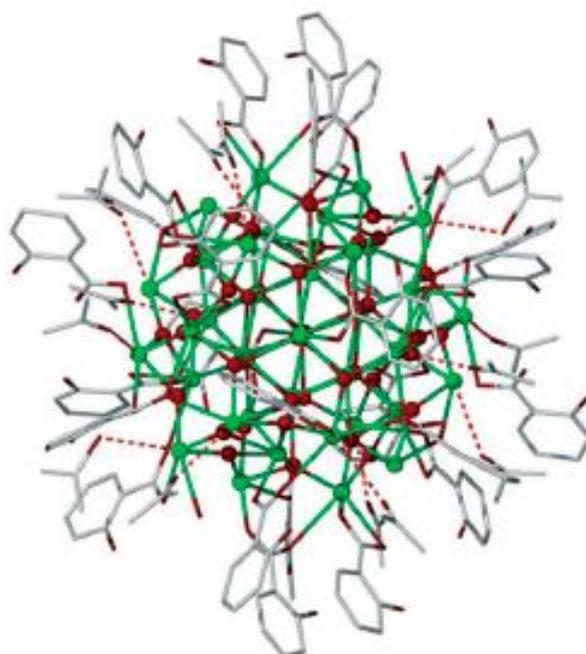


Figura 9. Representação da estrutura do subsalicilato de bismuto $[\text{Bi}_{38}\text{O}_{44}(\text{HSal})_{26}(\text{Me}_2\text{CO})_{16}(\text{H}_2\text{O})_2]$. Os pontos verdes representam os átomos de bismuto e os vermelhos, átomos de oxigênio. Os ligantes salicilato estão representados na cor cinza [37]. Fonte: Keogan, D. M.; Griffith, D. M., 2014.

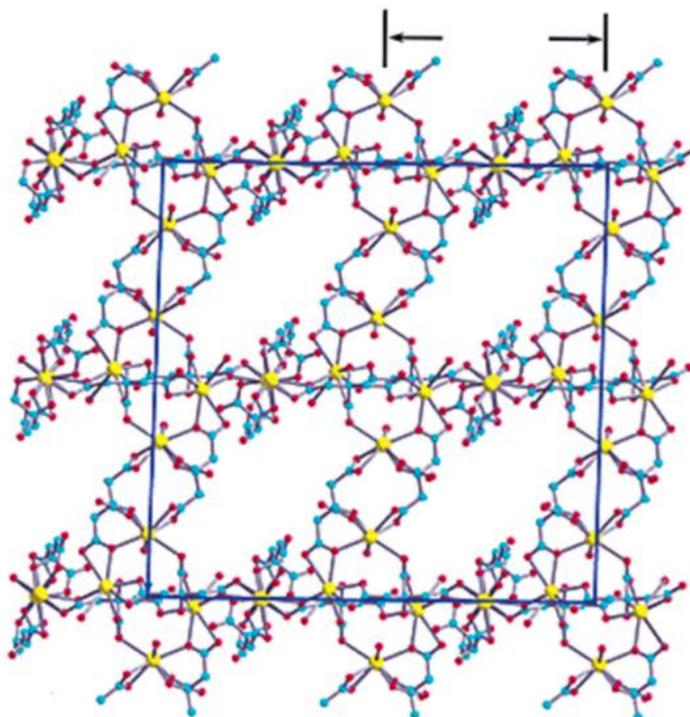


Figura 10. Representação da estrutura do subcitrato de bismuto coloidal

$\text{K}(\text{NH}_4)[\text{Bi}_2(\text{cit})_2(\text{H}_2\text{O})_2] \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ [29]. Os pontos azuis representam os átomos de carbono; os vermelhos, átomos de oxigênio; e os amarelos, átomos de bismuto [37]. Fonte: Keogan, D. M.; Griffith, D. M., 2014.

Os compostos de antimônio têm sido utilizados como medicamentos desde o século XIV, tempo no qual era utilizado para o tratamento de várias enfermidades. Atualmente o antimônio é amplamente utilizado na terapia das leishmanioses [36].

1.3. Leishmaniose

As leishmanioses são doenças parasitárias infecciosas, transmitidas pela fêmea do mosquito palha e causadas por protozoários do gênero *Leishmania*. Atingem principalmente populações pobres e marginalizadas. Os parasitas da *Leishmania* podem assumir duas formas diferentes: a forma promastigota e a forma amastigota. A forma promastigota é extracelular, flagelada e habita no intestino do inseto; a amastigota, que é intracelular e não possui movimento, reside nos vertebrados (homem e animais) [38-42] (Figura 11, pág. 9).

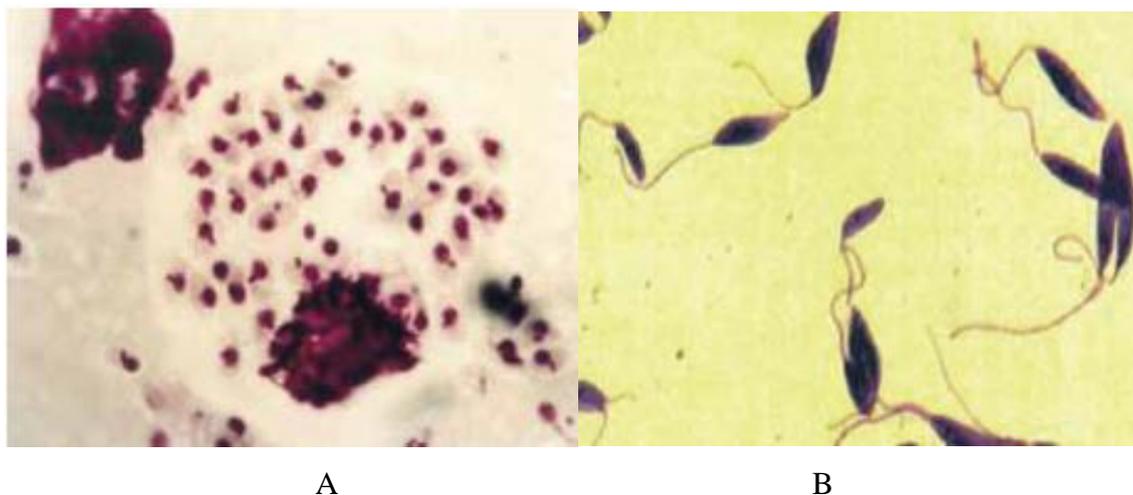


Figura 11. Duas formas do protozoário *Leishmania*: A – amastigota e B – promastigota [40]. Fonte: Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, 2010.

A leishmaniose foi inicialmente relatada em 1903, por Willian Leishman. Anteriormente, em meados de 1500, houve uma doença, com sintomas semelhantes ao da leishmaniose, que dizimou muitos povos no Peru [43].

A leishmaniose pode se manifestar de diferentes maneiras, desde lesões cutâneas e nas mucosas (Leishmaniose Tegumentar) até lesões nas vísceras (Leishmaniose Visceral ou calazar), a depender da espécie da *Leishmania*. A leishmaniose tegumentar é a forma mais branda da doença e pode ser causada pela espécie *L. brasiliensis*, enquanto a visceral é uma doença crônica grave, geralmente fatal e pode ser causada pelas espécies *L. donovani*, *L. chagasi* e *L. infantum*. Os principais sintomas da calazar são a hepatoesplenomegalia, a febre e a anemia [39-44].

1.3.1. Ciclo de vida da leishmania

As fêmeas do mosquito ingerem as formas amastigotas da *Leishmania* ao picarem os vertebrados infectados. Dentro do tubo digestivo do inseto, elas se transformam em promastigotas. Ao picarem novamente um hospedeiro vertebrado, o mosquito libera os parasitas na forma promastigota que, ao adentrarem os macrófagos, transformam-se em amastigotas dentro das células fagocíticas mononucleares, como o baço, o fígado e a medula óssea [42].

1.3.2. Tratamento da leishmaniose

Em 1912, o médico Gaspar Vianna relatou a eficácia de um antimônio trivalente no tratamento da leishmaniose. O tártaro emético (Figura 12) foi eficaz no tratamento das leishmanioses tegumentar e visceral. Todavia, esse medicamento apresentava diversos efeitos tóxicos, como distúrbios gastrintestinais e cardiológicos [43, 45]. Em razão disso, os complexos de Sb(III) foram substituídos por complexos de Sb(V) [37, 46]. Acredita-se que os fármacos à base de Sb(V) atuam como uma pró-droga, e se convertem em Sb(III) no organismo, já que o Sb(III) é sugerido como o responsável pela toxicidade dessas drogas [37, 41, 43, 46].

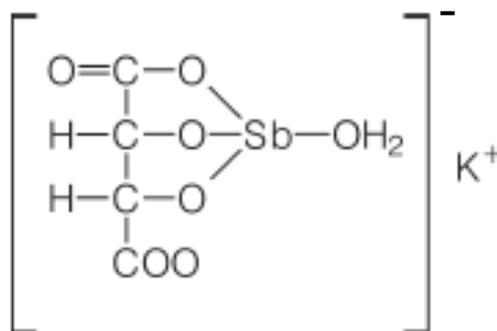


Figura 12. Estrutura do tártaro emético [43]. Fonte: Cadernos Temáticos De Química Nova Na Escola Antimônio No Tratamento De Zoonoses, 2005.

Desde meados do século passado, dois medicamentos à base de Sb(V) vêm sendo utilizados: o antimoniato de N-metil glucamina ou antimoniato de meglumina (Glucantime[®]) e o estibogluconato de sódio (Pentostam[®]) (Figura 13, pág. 11). O fármaco de primeira escolha para o tratamento das leishmanioses no Brasil é o antimoniato de meglumina [43, 45, 46].

A leishmaniose é uma doença negligenciada que ocorre principalmente em zonas rurais. A administração dos fármacos é feita por injeções diárias (endovenosa ou intramuscular), num período de 20-40 dias e acarreta diversos efeitos colaterais ao paciente, como dores abdominais, alterações hepáticas e distúrbios cardiológicos. Todos esses fatores corroboram para o aumento dos índices de interrupção do tratamento e, conseqüentemente, começam a surgir formas resistentes do parasita [41, 43, 45, 46].

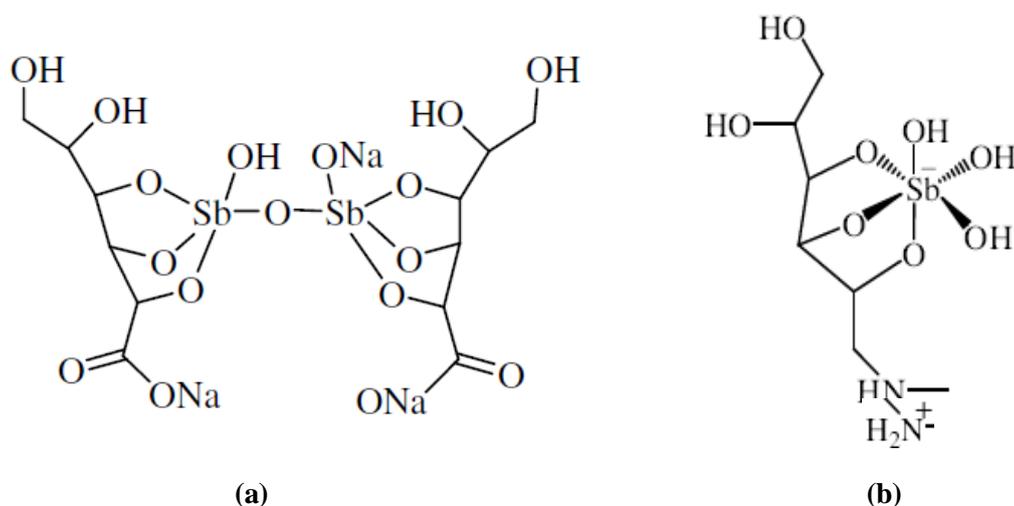


Figura 13. Representação das estruturas do Pentostam[®] (a) e do Glucantime[®] (b) [43, 46, 47].
Fontes: Rath, S. *et al.*, 2003/ Frézard, F. *et al.*, 2008.

Paralelamente aos antimoniais pentavalentes, outros fármacos como a anfotericina B (coloidal ou encapsulada em lipossomas) e a pentamidina vêm sendo utilizados como tratamento alternativo contra as leishmanioses. Alguns desses medicamentos ainda se encontram em fase de testes [41, 46].

1.3.3. Mecanismos de ação

Paralelamente aos estudos de atuação do Sb(V) como uma pró-droga, outros mecanismos de ação desses medicamentos vêm sendo estudados, como a inibição da biossíntese do ergosterol. Alguns microrganismos, como fungos e parasitas do gênero *Leishmania* possuem em sua membrana um componente vital e indispensável ao seu crescimento: o ergosterol. Tem sido demonstrado recentemente que alguns fármacos, como o itraconazol e o posaconazol, podem estar atuando como inibidores da biossíntese desse importante esterol em fungos e *Leishmania* [48, 49, 50].

1.4. Objetivos

Objetivos gerais

Este trabalho teve como principal objetivo obter novos complexos porfirínicos de Bi(III) e Sb(V), bem como avaliar a atividade leishmanicida dos mesmos e investigar os seus possíveis mecanismos de ação contra os parasitas.

Objetivos específicos

Este trabalho teve como objetivos específicos:

- preparar metaloporfirinas de Bi(III) e Sb(V) derivadas de porfirinas simétricas H₂T4MPP e H₂T3,5DMPP (Figura 14);

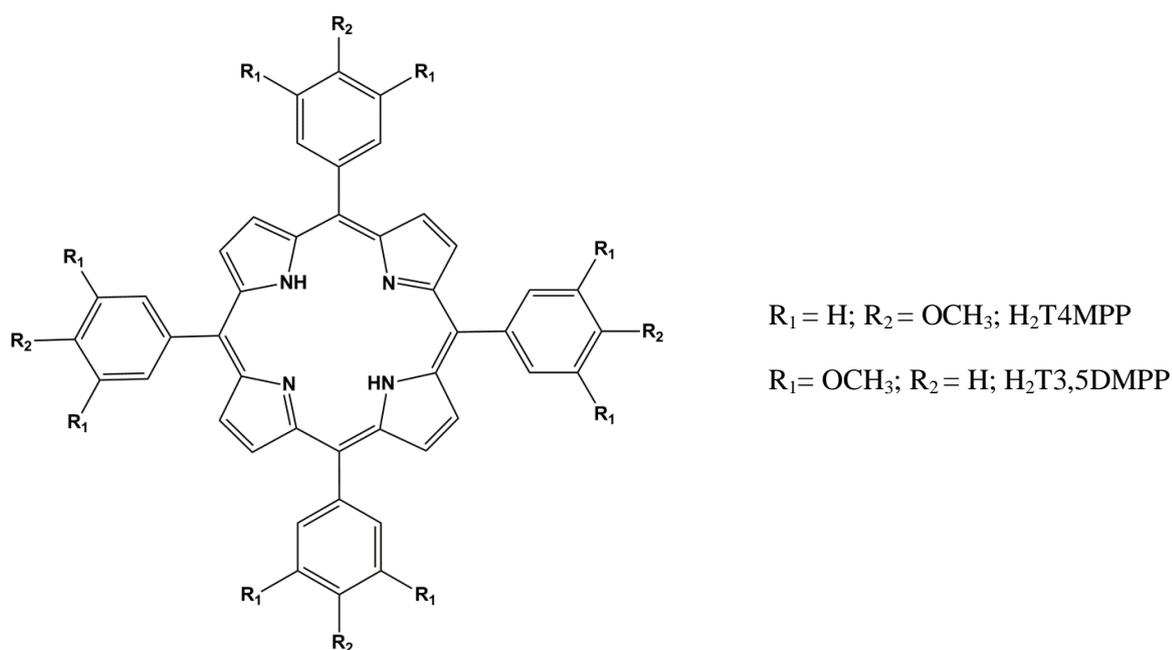


Figura 14. Representação das estruturas dos macrociclos porfirínicos H₂T4MPP e H₂T3,5DMPP.

- preparar metaloporfirinas de Bi(III) e Sb(V) derivadas de porfirinas não-simétricas H₂NPTPP, H₂APTPP, *cis/trans*-H₂DAPDPP e *cis/trans*-H₂DNPDP (Figura 15);

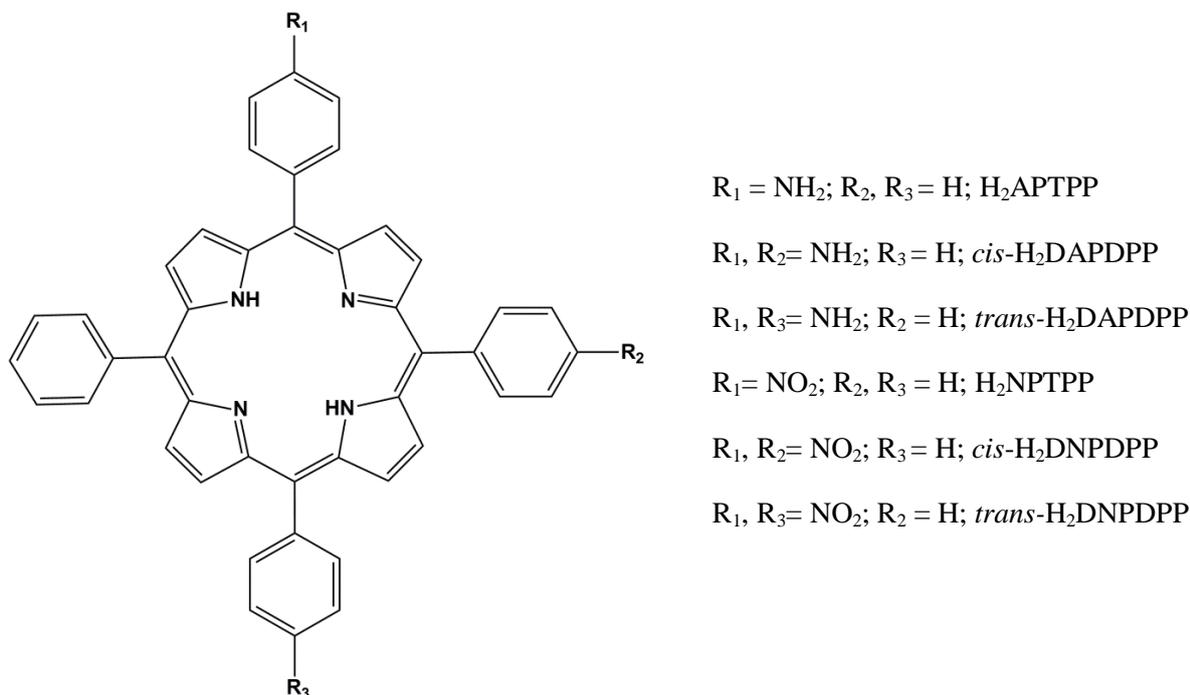


Figura 15. Representação das estruturas dos macrociclos porfirínicos H₂APTPP, *cis/trans*-H₂DAPDPP, H₂NPTPP e *cis/trans*-H₂DNPDP.

- Avaliar a atividade leishmanicida, *in vitro*, de todos os compostos contra as formas promastigotas do parasita;
- Avaliar a atividade leishmanicida, *in vitro*, dos compostos [Bi(III)(T4CMPP)]NO₃ e [Sb(V)Br₂(T4CMPP)]Br (obtidos durante o período de mestrado da autora deste trabalho) contra as formas promastigotas do parasita;
- Para os complexos que obtiveram resultado significativo nos ensaios com as formas promastigotas, avaliar também a atividade leishmanicida contra as formas amastigotas do parasita;
- Investigar os possíveis mecanismos de ação dos compostos testados: pela inibição da biossíntese do ergosterol e pela interação dos complexos com CT-DNA (“*Deoxyribonucleic acid from calf thymus*”, ácido desoxirribonucleico de timo de vitelo).

2. Capítulo 2. Procedimentos gerais e equipamentos

2.1. Purificação de Solventes e Reagentes

A – Clorofórmio (CHCl_3), Diclorometano (CH_2Cl_2) e Metanol (MeOH)

Para que fossem utilizados durante os processos de síntese e purificação, esses reagentes (Vetec) permaneceram sobre pastilhas de CaCl_2 durante 12 horas. Em seguida, os solventes foram filtrados e submetidos à destilação simples. Eles foram armazenados em frascos contendo peneira molecular (Aldrich, 4Å) previamente ativada.

B – *N, N*-Dimetilformamida (DMF)

Esse solvente (Vetec) foi armazenado em frasco contendo peneira molecular (Aldrich, 4Å), previamente ativada.

C – Tartarato de antimônio e potássio ($\text{C}_8\text{H}_4\text{K}_2\text{O}_{12}\text{Sb}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, Sigma-Aldrich), glucantime da Sanofi-Aventis (São Paulo, SP, Brazil), tricloreto de antimônio (SbCl_3 , Aldrich), *n*-hexano (C_6H_{14} , Vetec), Nitrato de bismuto pentahidratado ($\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, Carlo Erba), 2,4,6-colidina ($((\text{CH}_3)_3\text{C}_5\text{H}_2\text{N}$, Aldrich), bromo líquido (Sigma-Aldrich) e CT-DNA (“*Deoxyribonucleic acid from calf thymus*”, ácido desoxirribonucleico de timo de vitelo, Sigma-Aldrich) foram utilizados sem prévia purificação. Os macrociclos porfirínicos $\text{H}_2\text{T4MPP}$ (Sigma-Aldrich), $\text{H}_2\text{T3,5DMPP}$, H_2APTPP , H_2NPTPP , H_2DAPDPP , H_2DNPDP e $\text{H}_2\text{TM3PyP}^{4+}$ foram previamente sintetizados no laboratório [51, 52, 53].

D – A solução estoque do tampão universal foi preparada conforme descrito por Perrin, D. D e Dempsey, B. [54]. Esse tampão é composto de ácido cítrico (Sigma-Aldrich), fosfato monobásico de potássio (Sigma-Aldrich), tetraborato de sódio (Sigma-Aldrich), trishidroximetilaminometano (pK_a 7,2) (Sigma-Aldrich), cloreto de potássio (Sigma-Aldrich), todos na concentração $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Para o preparo de 200mL do tampão em pH 7 (a 25°C) foram acrescentados 22,4 mL de solução de hidróxido de sódio (Sigma-Aldrich) $0,4 \text{ mol L}^{-1}$.

2.2. Equipamentos

A – Balança Analítica

As medidas de massa foram realizadas em uma balança analítica Sartorius, modelo BP 210 D, com carga máxima de 210 g.

B – Câmara com lâmpada ultravioleta

As análises de cromatografia em camada delgada (CCD) e o monitoramento dos processos de metalação, pela perda de fluorescência do macrociclo porfirínico, foram feitos com auxílio de uma lâmpada ultravioleta adaptada a uma câmara escura Spectroline, modelo CX-20.

C – Espectrofotômetro de absorção na região do ultravioleta e visível (UV-vis)

Os espectros eletrônicos de absorção na região do UV-vis foram registrados no espectrofotômetro HP, modelo 8453, utilizando cubetas de vidro ou quartzo de 10 mm de caminho óptico.

D – Espectrômetro de Massas

As análises foram feitas em colaboração com o Prof. Rodiney Augusti do Departamento de Química da UFMG. Foi usado um espectrômetro de massas LCQ Fleet (Thermo Scientific) com fonte de ionização por spray de elétrons (ISE) e analisador ion trap. Os espectros foram obtidos no modo positivo.

E – Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de RMN ^1H foram obtidos em espectrômetros Bruker, modelos Avance DRX-400 (400 MHz) e Avance DPX-200 (200 MHz), utilizando CDCl_3 como solvente e tetrametilsilano (TMS) como referência interna.

F – Evaporador Rotatório

Os processos de eliminação de solvente foram realizados em um evaporador rotatório da marca Büchi R-114, modelo B-480.

G – Câmara Neubauer

Todas as células foram contadas com o auxílio de câmara de Neubauer e microscópio de luz branca comum.

H – Cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas (CG-EM)

As amostras foram injetadas no equipamento GCMS-QP2010 Ultra (Shimadzu Scientific Instruments, Tóquio, Japão).

3. Capítulo 3. Síntese e caracterização das metaloporfirinas

3.1. Procedimento experimental

3.1.1. Síntese das metaloporfirinas hidrofóbicas de bismuto

a) Nitrato de 5,10,15,20-tetraquis(4-metoxifenil)porfirinatobismuto(III) – $[\text{Bi(III)(T4MPP)}]\text{NO}_3$

A obtenção da metaloporfirina inédita $[\text{Bi(III)(T4MPP)}]\text{NO}_3$ foi realizada usando-se DMF como solvente. Em um balão tritubulado de fundo redondo, foram adicionados 30 mL de DMF. O solvente foi desaerado usando-se $\text{N}_2(\text{g})$ durante quinze minutos. O balão, sob atmosfera de N_2 , foi levado a aquecimento em banho de óleo a 110°C e, ao DMF, foram acrescentados 20,0 mg (0,0409 mmol) de $\text{H}_2\text{T4MPP}$. Esse sistema foi refluxado, sob agitação magnética, durante 15 minutos. Em seguida, 198 mg (0,409 mmol) de $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ foram adicionados ao balão. O sistema foi mantido sob aquecimento, à temperatura de 110°C , durante 5 horas e sob atmosfera de nitrogênio. O progresso da metalação foi acompanhado por CCD e espectroscopia eletrônica de absorção na região do UV-vis. Ao final da reação (quando não se observou mais nenhuma alteração espectral do meio de reação), o sistema foi resfriado à temperatura ambiente (25°C). Adicionou-se água destilada ao balão até que se percebesse a precipitação da metaloporfirina, que foi filtrada (funil com placa de vidro sinterizado número 4) para remoção do solvente. Após a secagem no funil (sob vácuo), o sólido resultante foi dissolvido em diclorometano e percolado em uma coluna cromatográfica (diâmetro: 1,1 cm e altura: 7,0 cm) de sílica gel (Aldrich). A porfirina base livre que não reagiu foi eluída com diclorometano. O produto desejado, $[\text{Bi(III)(T4MPP)}]\text{NO}_3$, foi recolhido com uma mistura de diclorometano:metanol (60:1). A fração correspondente à metaloporfirina teve o solvente eliminado no evaporador rotatório, sob pressão reduzida. O sólido obtido foi seco e mantido no dessecador contendo cloreto de cálcio. A caracterização do complexo foi realizada por espectroscopia de absorção na região do UV-vis, RMN ^1H e espectrometria de massas.

Rendimento: 77%. $^1\text{H NMR}$ (200 MHz, CDCl_3): $\delta = 4,12$ (12H, s, metílicos); $\delta = 7,30 - 7,35$ (8 H, m, m-arílicos); $\delta = 8,16$ (8 H, m, o-arílicos); $\delta = 9,23$ (8H, s, β -pirrólicos). Espectrometria de massas (intensidade): m/z 941,41 $[\text{Bi(III)(T4MPP)}]^+$ (100 %).

b) Nitrato de 5,10,15,20-tetraquis(3,5-dimetoxifenil)porfirinatobismuto(III) – $[\text{Bi(III)(T3,5DMPP)}]\text{NO}_3$

A obtenção e purificação da metaloporfirina inédita $[\text{Bi(III)(T3,5DMPP)}]\text{NO}_3$ foi realizada de forma similar à citada anteriormente (item 3.1.1, a, pág. 17). As quantidades adicionadas no balão tritubulado de fundo redondo, foram 30 mL de DMF, 10 mg (0,0117 mmol) de $\text{H}_2\text{T3,5DMPP}$ e 57,6 mg (0,117 mmol) de $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. O sistema foi mantido sob aquecimento, à temperatura de 110°C , durante 6 horas.

Rendimento: 63%. $^1\text{H NMR}$ (200 MHz, CDCl_3): $\delta = 3,98$ (24 H, s, metílicos); $\delta = 6,95$ (4 H, m, p-arílicos); $\delta = 7,31 - 7,57$ (8 H, m, o-arílicos); $\delta = 9,31$ (8H, s, β -pirrólicos). Espectrometria de massas (intensidade): m/z 1061,36 $[\text{Bi(III)(T3,5DMPP)}]^+$ (100 %). Análise calculada para $\text{C}_{52}\text{H}_{44}\text{BiN}_5\text{O}_{11}$: C, 55,57; H, 3,95; N, 6,23. Encontrada: C, 56,06; H, 4,02; N, 5,35.

c) Nitrato de 5-(4-aminofenil)-10,15,20-trisfenilporfirinatobismuto(III) – $[\text{Bi(III)APTPP}]\text{NO}_3$

A obtenção e purificação da metaloporfirina inédita $[\text{Bi(III)APTPP}]\text{NO}_3$ também foi realizada de acordo com o procedimento descrito anteriormente (item 3.1.1, a, pág. 17). As quantidades adicionadas no balão tritubulado de fundo redondo foram 30 mL de DMF, 30 mg (0,047 mmol) de H_2APTPP e 227 mg (0,47 mmol) de $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. 3 gotas de 2,4,6-colidina foram adicionadas ao sistema e o mesmo foi mantido sob aquecimento, à temperatura de 115°C , durante 5 dias (8 horas por dia). Na coluna cromatográfica, a porfirina base livre que não reagiu foi eluída com diclorometano. O produto desejado – $[\text{Bi(III)APTPP}]\text{NO}_3$ – foi recolhido com uma mistura diclorometano:metanol (100:1).

Rendimento: 42%. $^1\text{H NMR}$ (200 MHz, CDCl_3): δ 9,36 (m, 8H, β -pirrólico), 9,24 (d, 6H, orto fenil), 8,04 (2H, aminofenil), 7,84 (m, 9H, meta/para fenis), 7,12 (s, 2 H, aminofenil), 3,96 (2H, amino). Espectrometria de massas: m/z 836,38 $[\text{Bi(III)APTPP}]^+$.

d) Nitrato de 5-(4-nitrofenil)-10,15,20-trisfenilporfirinatobismuto(III) - [Bi(III)NPTPP]NO₃

A obtenção e purificação da metaloporfirina inédita [Bi(III)NPTPP]NO₃ foi realizada de forma similar à citada anteriormente (item 3.1.1, a, pág. 17). As quantidades adicionadas no balão tritubulado de fundo redondo foram 15 mL de DMF, 10,83 mg (0,0164 mmol) de H₂NPTPP e 79,54 mg (0,164 mmol) de Bi(NO₃)₃.5H₂O. 3 gotas de 2,4,6-colidina foram adicionadas ao sistema e o mesmo foi mantido sob aquecimento, à temperatura de 115°C, durante 3 dias (8 horas por dia). Na coluna cromatográfica, a porfirina base livre que não reagiu foi eluída com diclorometano. O produto desejado – [Bi(III)NPTPP]NO₃ – foi recolhido com uma mistura diclorometano:metanol (80:1).

Rendimento: 39%. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 9,21 (m, 6 H, β-pirrólico), 8,88 (d, 2 H, β-pirrólico), 8,68 (d, 2 H, nitrofenil), 8,50 (d, 2 H, nitrofenil), 8,23 (m, 6 H, orto arila), 7,80 (m, 9 H, meta/para arila). Espectrometria de massa: *m/z* 866,23 [Bi(III)NPTPP]⁺.

e) Nitrato de 5,10-bis(4-aminofenil)-15,20-bisfenilporfirinatobismuto(III) e nitrato de 5,15-bis(4-aminofenil)-10,20-bisfenilporfirinatobismuto(III) – *cis/trans*-[Bi(III)DAPDPP]NO₃

A obtenção e caracterização da mistura de isômeros das metaloporfirinas inéditas *cis/trans*-[Bi(III)DAPDPP]NO₃ foi realizada de forma similar à citada anteriormente (item 3.1.1, a, pág. 17). As quantidades adicionadas no balão tritubulado de fundo redondo foram 20 mL de DMF, 20 mg (0,031 mmol) de *cis/trans*-H₂DAPDPP e 150,55 mg (0,31 mmol) de Bi(NO₃)₃.5H₂O. 3 gotas de 2,4,6-colidina foram adicionadas ao sistema e o mesmo foi mantido sob aquecimento, à temperatura de 115°C, durante 2 horas. Na coluna cromatográfica, a porfirina base livre que não reagiu foi eluída com diclorometano. O produto desejado – *cis/trans*-[Bi(III)DAPDPP]NO₃ – foi recolhido com uma mistura diclorometano:metanol (100:1).

Rendimento: 79%. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 9,34 (s, 4H, β-pirrólico), 9,21 (s, 4H, β-pirrólico), 8,26 (m, 4H, ortofenil), 8,04 (s, 4H, aminofenil), 7,83 (m, 6H, meta/para fenis), 7,13 (m, 4H, aminofenil), 4,08 (4H, amino). Espectrometria de massa *m/z* 851,36 *cis/trans*-[Bi(III)DAPDPP]⁺.

f) Nitrato de 5,10-bis(4-nitrofenil)-15,20-bisfenilporfirinatobismuto(III) e nitrato de 5,15-bis(4-nitrofenil)-10,20-bisfenilporfirinatobismuto(III) – *cis/trans*-[Bi(III)DNPDP]NO₃

A obtenção da mistura de isômeros das metaloporfirinas inéditas *cis/trans*-[Bi(III)DNPDP]NO₃ foi realizada de forma similar à citada anteriormente (item 3.1.1, a, pág. 17). As quantidades adicionadas no balão tritubulado de fundo redondo foram 15 mL de DMF, 30,4 mg (0,043 mmol) de *cis/trans*-H₂DNPDP e 209 mg (0,43 mmol) de Bi(NO₃)₃.5H₂O. 3 gotas de 2,4,6-colidina foram adicionadas ao sistema e o mesmo foi mantido sob aquecimento, à temperatura de 115°C, durante 5 dias (8 horas por dia). Na coluna cromatográfica, a porfirina base livre que não reagiu foi eluída com diclorometano. O produto desejado – *cis/trans*-[Bi(III)DNPDP]NO₃ – foi recolhido com uma mistura diclorometano:metanol (60:1).

Rendimento: 47%. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 8,90 (m, 4H, β-pirrólico), 8,78 (d, 4H, β-pirrólico), 8,69 (d, 4H, nitrofenil), 8,43 (d, 4H, nitrofenil), 8,24 (m, 6H, orto fenil), 7,81 (m, 6 H, meta/para fenil).

3.1.2. Síntese das metaloporfirinas hidrofóbicas de antimônio

a) Brometo de bromidoclorido-5,10,15,20-tetraquis(4-metoxifenil)porfirinatoantimônio(V) – [Sb(V)BrCl(T4MPP)]Br

A obtenção da metaloporfirina inédita [Sb(V)BrCl(T4MPP)]Br foi realizada em diclorometano. Em um balão tritubulado de fundo redondo, foram adicionados 30 mL de CH₂Cl₂ e 15 mg (0,0204 mmol) de H₂T4MPP. Deixou-se o sistema sob refluxo durante 15 minutos. Em seguida, acrescentaram-se 46,6 mg (0,204 mmol) de SbCl₃ ao balão. A solução imediatamente passou de roxa para verde claro. Adicionaram-se, então, 3 gotas de 2,4,6-colidina e a mistura foi refluxada, sob agitação magnética, durante uma hora. O progresso da metalação foi acompanhado por CCD e espectroscopia eletrônica de absorção UV-vis. A mistura de reação resultante apresentou coloração verde escuro. Acrescentaram-se, então, duas gotas de Br₂(l) à mistura de reação [31]. A solução ficou verde. Desligou-se o aquecimento e o sistema foi resfriado à temperatura ambiente. Foi adicionado n-hexano à

solução resultante, o qual favoreceu a precipitação da metaloporfirina. A mistura resultante foi filtrada em um funil de placa sinterizada (número 4) e o precipitado solubilizado em diclorometano. O solvente foi eliminado usando-se o evaporador rotatório. O sólido resultante foi dissolvido em uma mínima quantidade de diclorometano e percolado em uma coluna cromatográfica (diâmetro: 1,1 cm e altura: 6,0 cm) de alumina neutra (Aldrich). A porfirina base livre (H₂T4MPP) foi rapidamente eluída como uma fração roxa com diclorometano. O produto desejado [Sb(V)BrCl(T4MPP)]Br foi recolhido como uma fração verde, com uma mistura de diclorometano:metanol (90:1). O solvente das frações correspondentes à metaloporfirina foi eliminado usando o evaporador rotatório. O sólido obtido foi seco em uma pistola de secagem com vapor de água e mantido no dessecador contendo cloreto de cálcio. A caracterização do complexo foi realizada por espectroscopia de absorção na região do UV-vis, RMN ¹H e espectrometria de massas.

Rendimento: 94%. $\delta = 4,17$ (12 H, s, metílicos); $\delta = 7,47 - 7,51$ (8 H, m, m, p-arílicos); $\delta = 8,26 - 8,30$ (8 H, m, o-arílicos); $\delta = 9,60 - 9,65$ (8H, m, β -pirrólicos). Espectrometria de massa (intensidade): m/z 969,16 [Sb(V)BrCl(T4MPP)]⁺ (100 %). Análise calculada para C₄₈H₃₆Br₂ClN₄O₄Sb.CH₂Cl₂: C, 51,86; H, 3,38; N, 4,94. Encontrada: C, 51,86; H, 3,89; N, 4,83.

b) Brometo de bromidoclorido-5,10,15,20-tetraquis(3,5-dimetoxifenil)porfirinatoantimônio(V) – [Sb(V)BrCl(T3,5DMPP)]Br

A obtenção da metaloporfirina inédita [Sb(V)BrCl(T3,5DMPP)]Br foi realizada de forma similar à citada anteriormente (item 3.1.2, a, pág. 20). As quantidades adicionadas no balão tritubulado de fundo redondo foram 30 mL de diclorometano, 10 mg (0,0117 mmol) de H₂T3,5DMPP, 26,7 mg (0,117 mmol) de SbCl₃ e 3 gotas de 2,4,6-colidina (Aldrich). Na coluna cromatográfica, a porfirina base livre (H₂T3,5DMPP) foi rapidamente eluída como uma fração roxa com diclorometano. O produto desejado [Sb(V)BrCl(T3,5DMPP)]Br foi recolhido como uma fração roxa com a mistura diclorometano:metanol (90:1).

Rendimento: 91%. $\delta = 4,12$ (24 H, s, metílicos); $\delta = 7,75$ (4 H, m, p-arílicos); $\delta = 8,68$ (8 H, m, o-arílicos); $\delta = 9,71$ (8H, s, β -pirrólicos). Espectrometria de massa (intensidade): m/z 1089,18 [Sb(V)BrCl(T3,5DMPP)]⁺. (100 %).

3.1.3. Síntese das metaloporfirinas hidrossolúveis

a) Síntese da porfirina base livre 5,10,15,20-tetraquis(3-metilpiridil)porfirina – H₂TM3PyP

Etapa 1: Obtenção da 5,10,15,20-tetraquis(3-piridil)porfirina – H₂T3PyP

Em um balão tritubulado, 100 mL de ácido propiônico foram aquecidos a 90° C. Em seguida, foram adicionados, lentamente, 3,8 mL de 3-piridina-carboxaldeído e 2,8 mL de pirrol (recém-destilado). Esta mistura foi aquecida sob refluxo por 45 minutos. O balão foi resfriado até a temperatura ambiente. Foi adicionada então uma solução saturada de NaOH até que se observasse a formação de precipitado preto. O precipitado foi filtrado a vácuo e, em seguida, recolhido com clorofórmio. Eliminou-se o solvente com o auxílio de um evaporador rotatório.

O sólido obtido foi percolado em coluna de sílica, usando-se uma mistura de clorofórmio:metanol (20:1) como eluente. Foram recolhidas 16 frações (de colorações, marrom, roxa e verde), as quais foram analisadas por espectroscopia eletrônica de absorção na região UV-vis.

A porfirina obtida foi purificada mais duas vezes em coluna de sílica, utilizando a mistura clorofórmio: metanol (20:1) como eluente. A H₂T3PyP foi caracterizada por espectroscopia de absorção na região do UV-vis.

Etapa 2: Síntese da 5,10,15,20-tetraquis(3-metilpiridil)porfirina – H₂TM3PyPCL₄

A metilação da H₂T3PyP foi realizada de acordo com o método descrito por Kos *et al.*[55]. A H₂T3PyP foi solubilizada em 40 mL de DMF. A solução obtida foi aquecida (100°C, banho de óleo), sob agitação magnética, em sistema de refluxo durante cinco minutos. A esta solução foi adicionado tosilato de metila (4 mL, 26,4 mmol), em excesso molar de 80 vezes. A mistura de reação foi mantida sob refluxo e agitação magnética durante uma hora. A reação foi acompanhada por meio de espectroscopia eletrônica de absorção UV-vis e por cromatografia de camada delgada (SiO₂, KNO₃(sat):H₂O:CH₃CN, 1:1:8). Terminada a reação, a mistura foi transferida para um funil de separação, ao qual foram adicionados 80 mL de CHCl₃ e 50 mL de água destilada. Formou-se uma mistura bifásica que foi

vigorosamente agitada. A fase orgânica foi recolhida e a fase aquosa (contendo a porfirina metilada) foi lavada com CHCl_3 por 3 vezes. A fase aquosa foi recolhida e a ela adicionada água destilada até o volume final de, aproximadamente, 150 mL.

À solução aquosa da porfirina base livre foram adicionadas algumas gotas de solução aquosa saturada de NH_4PF_6 , até que se observasse a completa precipitação da porfirina. A mistura resultante foi filtrada em um funil de placa sinterizada (número 4). A porfirina (retida no filtro) foi solubilizada com acetona. Adicionou-se então, à solução da porfirina em acetona, algumas gotas de solução saturada de cloreto de tetrabutylamônio (em acetona), até que se observasse a precipitação da metaloporfirina, que foi filtrada em um funil de placa sinterizada e o precipitado lavado com acetona. A $\text{H}_2\text{TM3PyPCL}_4$ foi recolhida e o solvente eliminado no evaporador rotatório, sob vácuo, em seguida o sólido foi recolhido e guardado em um dessecador.

b) Hexafluorofosfato de 5,10,15,20-tetraquis(3-metilpiridil)porfirinatobismuto(III) – $[\text{Bi(III)(TM3PyP)}](\text{PF}_6)_5$

A metalação da $[\text{H}_2\text{TM3PyP}]^{4+}$ com Bi(III) foi realizada por adaptação do método descrito na literatura para obtenção de metaloporfirinas de manganês [56]. Em um béquer, foram adicionados 15 mL de água desionizada e 10,0 mg (0,0122 mmol) de $\text{H}_2\text{TM3PyPCL}_4$. O sistema foi mantido sob agitação contínua. O pH da solução foi ajustado para 12, mediante a adição de 3 gotas de solução de NaOH 1 mol L^{-1} . Adicionaram-se, então, 118 mg (0,244 mmol) de $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ à solução, o que imediatamente propiciou a formação de uma grande quantidade de precipitado branco (óxidos e hidróxidos de bismuto). Aumentou-se a agitação do sistema. Em pH 8, filtrou-se a solução em um funil de placa sinterizada para a completa remoção do precipitado. Ao filtrado foram adicionadas algumas gotas de solução aquosa saturada de NH_4PF_6 , até que se observasse a completa precipitação da metaloporfirina. A mistura resultante foi filtrada em um funil de placa sinterizada. A metaloporfirina (retida no filtro) foi solubilizada com acetona. Adicionou-se então, à solução da porfirina em acetona, algumas gotas de solução saturada de cloreto de tetrabutylamônio (em acetona), até que se observasse a precipitação da metaloporfirina, que foi filtrada em um funil de placa sinterizada. A metaloporfirina (retida no filtro) foi solubilizada em água. Ao filtrado foram adicionadas, novamente, algumas gotas de solução saturada de NH_4PF_6 . Esse processo de precipitação com diferentes contra-íons (Cl^- e PF_6^-) foi feito duas vezes para completa remoção de sal residual.

Posteriormente eliminou-se toda a acetona no evaporador rotatório. O sólido resultante foi dissolvido em uma mínima quantidade de acetona e percolado em uma coluna cromatográfica (diâmetro: 1,1 cm e altura: 5,0 cm) de alumina neutra. A porfirina base livre que não reagiu foi totalmente eluída com acetonitrila. Porém, não foi possível isolar a $[\text{Bi(III)(TM3PyP)}](\text{PF}_6)_5$ pois a mesma ficou retida na coluna.

c) Tentativas de metalação da $\text{H}_2\text{TM3PyPCL}_4$ com bismuto e antimônio

Além do procedimento descrito no item anterior (3.1.3, a, pág. 22), foram realizadas diversas tentativas de metalação da $\text{H}_2\text{TM3PyPCL}_4$ com Sb e Bi (Tabela 1), na expectativa de se obterem porfirinas hidrossolúveis de Sb(V) e Bi(III).

Tabela 1. Condições das reações de metalação da $\text{H}_2\text{TM3PyPCL}_4$.

| Solvente | Sal | Descrição |
|------------------------------|---|---|
| DMF | SbCl ₃ Bi(NO ₃) ₃ .5H ₂ O Bi(CH ₃ COO) ₃ Sb(CH ₃ COO) ₃ | Reação com e sem atmosfera de nitrogênio, em banho de óleo a 115°C, durante 8 horas |
| Metanol:clorofórmio (1:1) | SbCl ₃ Bi(NO ₃) ₃ .5H ₂ O Bi(CH ₃ COO) ₃ Sb(CH ₃ COO) ₃ | |
| Metanol:clorofórmio (2:1) | SbCl ₃ Bi(NO ₃) ₃ .5H ₂ O Bi(CH ₃ COO) ₃ Sb(CH ₃ COO) ₃ | |
| Água | Bi(CH ₃ COO) ₃ Sb(CH ₃ COO) ₃ | Agitação contínua, durante 3 horas, em pH 12 |

Não se conseguiu isolar as porfirinas hidrossolúveis de Sb(V) e Bi(III).

3.2. Resultados e discussão

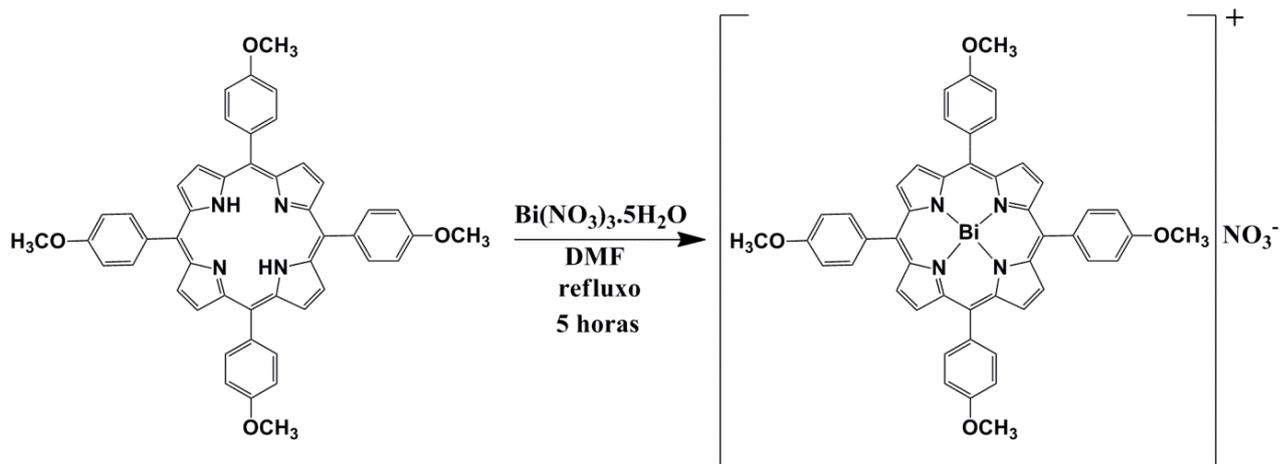
3.2.1. Síntese das metaloporfirinas hidrofóbicas de bismuto

O solvente comumente usado na metalação de porfirinas com bismuto(III) é a piridina [22]. A piridina favorece a desprotonação da porfirina base livre, o que propicia a complexação. Contudo, por ser um solvente de elevada toxicidade, a piridina foi substituída pela *N,N*-dimetilformamida. Essa metodologia já foi adequadamente desenvolvida durante o período de mestrado da autora deste trabalho [57].

Ao analisarmos o bismuto como centro metálico, seria mais natural a ocorrência de porfirinas de Bi(V) em vez de Bi(III), já que o íon Bi(III) é maior que a cavidade da porfirina e está localizado fora do plano do macrociclo. Todavia, não há na literatura relatos de porfirinas de Bi(V), apenas de Bi(III). Conforme já discutido anteriormente, a prevalência dos compostos com Bi(III) se deve ao fenômeno do efeito do par inerte [3, 11].

a) Nitrato de 5,10,15,20-tetraquis(4-metoxifenil)porfirinatobismuto(III) – $[\text{Bi(III)(T4MPP)}]\text{NO}_3$

A reação de metalação foi feita sob atmosfera de nitrogênio para eliminar a umidade, fator esse que favorece a desmetalção. Com isso, manteve-se a integridade dos reagentes e dos produtos formados. A mistura de reação, que inicialmente era roxa, tornou-se verde. No início da reação, o espectro eletrônico de absorção UV-vis comprovou a existência da porfirina base livre $\text{H}_2\text{T4MPP}$. Os espectros medidos no decorrer da reação confirmaram o progresso da mesma, no sentido de formação do produto $[\text{Bi(III)(T4MPP)}](\text{NO}_3)$ (Esquema 1, pág. 26).



Esquema 1. Representação da reação de formação da $[\text{Bi(III)(T4MPP)}]\text{NO}_3$.

As porfirinas base livre e as metaloporfirinas exibem espectros de absorção característicos na região do ultravioleta-visível (UV-vis). Ambas apresentam em seu espectro uma banda de absorção intensa ($\epsilon \sim 10^5 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) denominada banda Soret (ou banda B) na região compreendida entre 400 e 500 nm, e outras bandas de menor intensidade ($\epsilon \sim 10^3$ ou $10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) denominadas bandas Q na região de 500 a 700 nm. No espectro de absorção da porfirina base livre, a banda B se encontra na região $\lambda \sim 420 \text{ nm}$ e há geralmente quatro bandas Q [2]. Já no espectro de uma metaloporfirina geralmente ocorre um deslocamento batocrômico da banda B as quatro bandas Q se reduzem a duas (Figura 16, pág. 27).

O macrociclo porfirínico é um sistema aromático composto por 22 elétrons π . São eles que geralmente determinam as propriedades óticas das porfirinas. De acordo com seus espectros de absorção, as metaloporfirinas podem ser classificadas em regulares ou irregulares [58].

As metaloporfirinas irregulares classificam-se em hipso e hiperporfirinas. As hiperporfirinas, além das bandas B e Q, apresentam em seu espectro bandas de absorção extras em $\lambda \sim 320 \text{ nm}$. Podem ser do tipo *p* ou *d*. As hiperporfirinas tipo *d* são obtidas geralmente com centros metálicos de configuração d^m , $1 \leq m \leq 6$. As bandas de absorção extras observadas são atribuídas à transferência de carga do ligante para o íon metálico ($a_{1u}(\pi)$, $a_{2u}(\pi)$ ligante $\rightarrow e_g(d_\pi)$ metal). As hiperporfirinas tipo *p* são obtidas geralmente com íons metálicos em baixo estado de oxidação, como o Bi(III) e o Sb(III). As bandas de absorção extras observadas são atribuídas à transferência de carga do metal para o ligante [58].

Na síntese da $[\text{Bi(III)(T4MPP)}]\text{NO}_3$, observou-se que após 50 minutos de reação, a banda Soret se deslocou de 418 nm para 467 nm. Além disso, duas das bandas Q desapareceram. Ao se comparar os espectros de absorção na região do UV-vis (Figura 16) da metaloporfirina de bismuto obtida com aquele da respectiva base livre, $[\text{Bi(III)(T4MPP)}]\text{NO}_3$ e $\text{H}_2\text{T4MPP}$ respectivamente, observa-se que o complexo apresenta um espectro hiper tipo *p*, com uma banda de absorção extra em $\lambda \sim 320$ nm.

No processo de purificação por cromatografia em coluna (SiO_2), a $\text{H}_2\text{T4MPP}$ foi eluída rapidamente como uma fração roxa com o solvente CH_2Cl_2 e a $[\text{Bi(III)(T4MPP)}]\text{NO}_3$ foi eluída como uma fração verde escuro com a mistura $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ (60:1). A $[\text{Bi(III)(T4MPP)}]\text{NO}_3$ pura não foi facilmente obtida; foram necessários três processos de purificação em coluna para obtê-la, pois sempre restavam traços da porfirina base livre na fração metalada. Essa metaloporfirina desmetala facilmente em presença de ácidos.

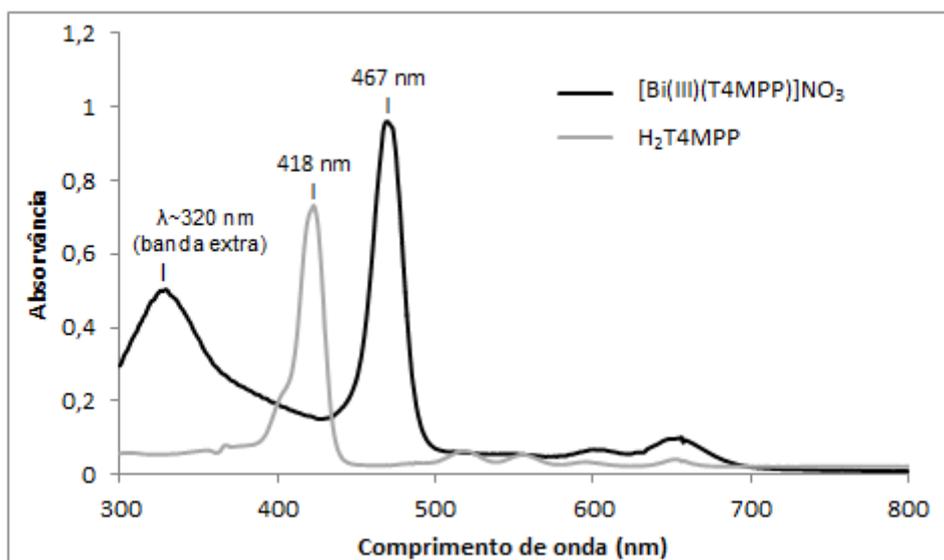


Figura 16. Espectros eletrônicos de absorção UV-vis de $\text{H}_2\text{T4MPP}$ e $[\text{Bi(III)(T4MPP)}]\text{NO}_3$, em CH_2Cl_2 .

Ao se analisar o espectro de RMN ^1H da $[\text{Bi(III)(T4MPP)}]\text{NO}_3$ (Figura 17, pág. 28), verificou-se que o sinal referente aos átomos de hidrogênio β -pirrólicos (Figura 18, pág. 29) tornaram-se mais desblindados ($\delta = 9,23$ ppm), ou seja, estão em um ambiente de menor densidade eletrônica quando comparados aos átomos de hidrogênio β -pirrólicos da porfirina base livre ($\delta = 8,86$ ppm) (Figura 19, pág. 29).

Pode-se verificar também o desaparecimento do sinal $\delta = -2,75$ ppm (correspondente aos hidrogênios N-pirrólicos) na $[\text{Bi(III)(T4MPP)}](\text{NO}_3)$, indicando a coordenação do íon metálico aos nitrogênios pirrólicos da porfirina base livre.

A presença do bismuto em apenas uma face da molécula (íon Bi(III) fora do plano do anel) é responsável pelos diferentes deslocamentos dos hidrogênios na posição orto.

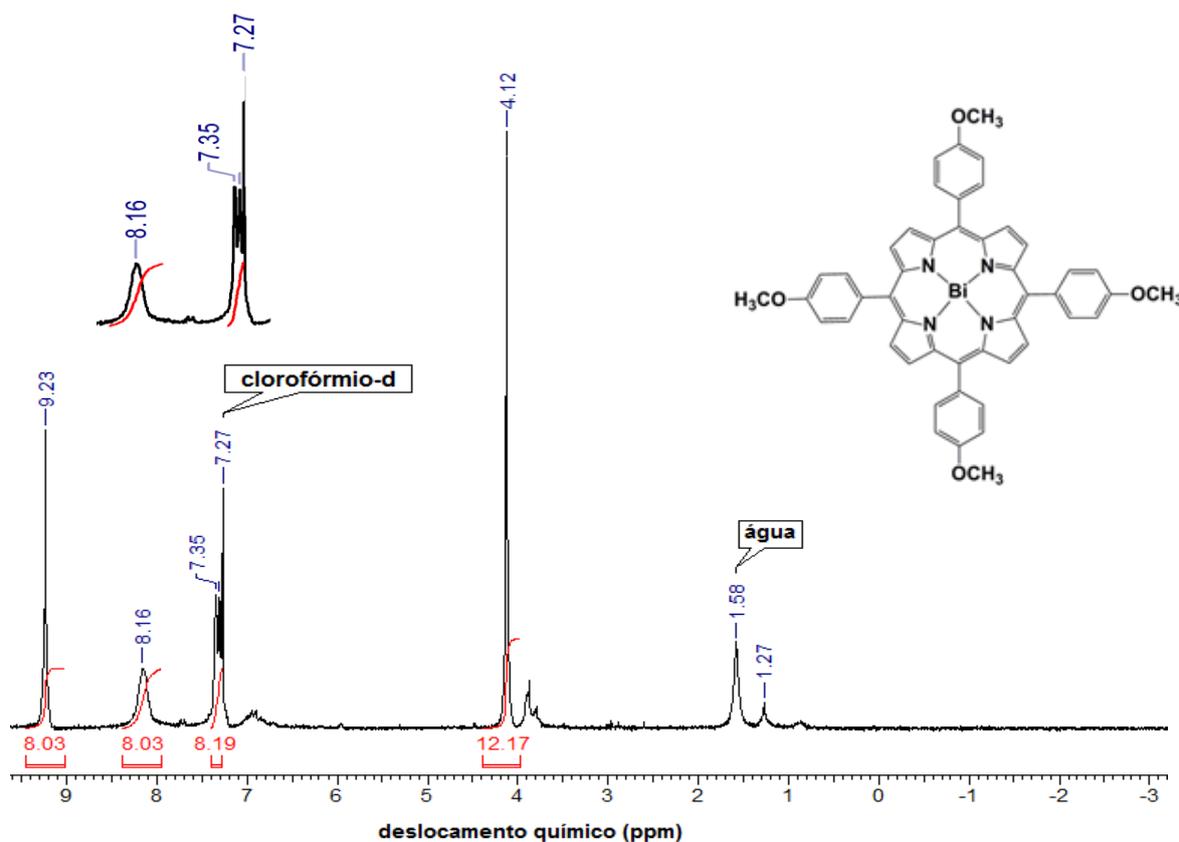


Figura 17. Espectro de RMN ^1H , em aparelho de 200 MHz, em CDCl_3 (25 °C) da $[\text{Bi(III)(T4MPP)}](\text{NO}_3)$: $\delta = 4,12$ (12H, s, metílicos); $\delta = 7,30 - 7,35$ (8 H, m, m-arílicos); $\delta = 8,16$ (8 H, m, o-arílicos); $\delta = 9,23$ (8H, s, β -pirrólicos).

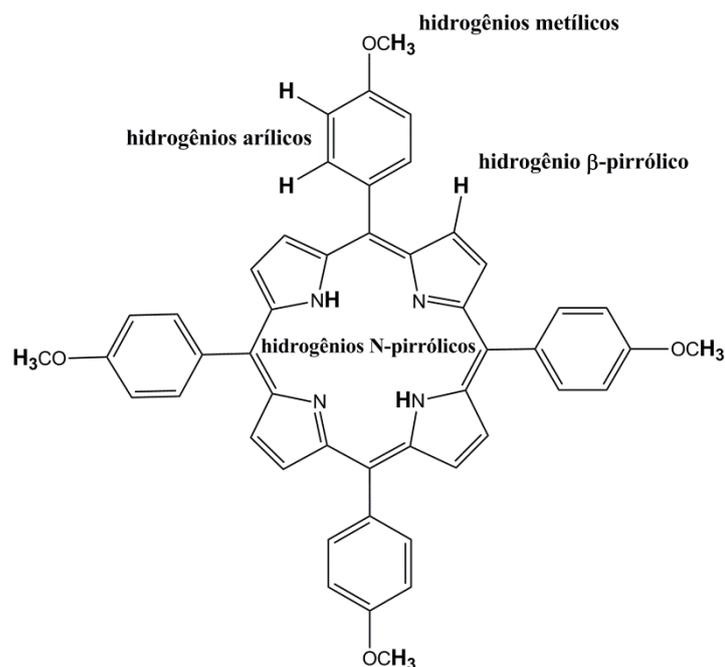


Figura 18. Classificação dos átomos de hidrogênio em uma porfirina

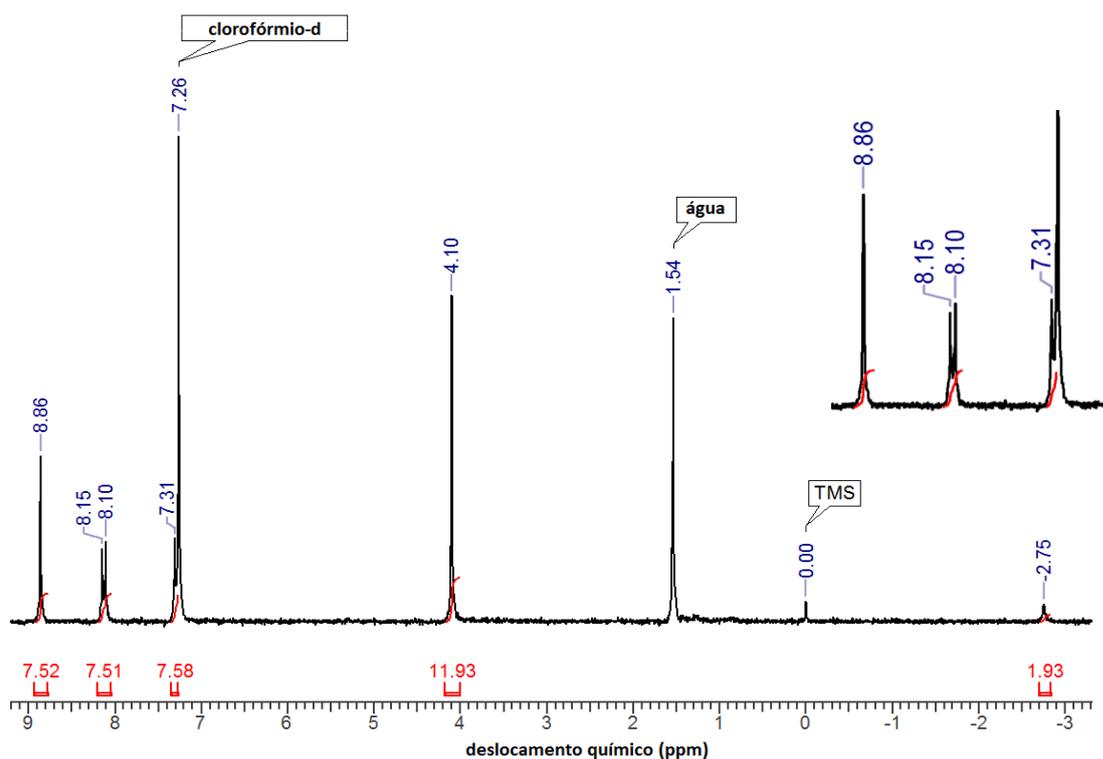


Figura 19. Espectro de RMN ¹H, em aparelho de 200 MHz, em CDCl₃ (25 °C) da H₂T4MPP: δ = -2,75 (2 H, N-pirrólicos); δ = 4,10 (12H, s, metílicos); δ = 7,31 (8 H, s, o-arílicos); δ = 8,10-8,15 (8 H, m, m-arílicos); δ = 8,86 (8H, s, β-pirrólicos).

Os sinais presentes entre $\delta = 0$ ppm e $\delta = 4$ ppm correspondem a solventes que não foram totalmente eliminados, apesar de as porfirinas terem sido secas em pistola de secagem a vácuo durante vários dias. Os sinais em $\delta = 1,54$ ppm (Figura 19, pág. 29) e $\delta = 1,58$ ppm (Figura 17, pág. 28) correspondem à H_2O [59].

A espectrometria de massas (EM-ISE) indicou a obtenção da $[\text{Bi(III)(T4MPP)}]\text{NO}_3$ (Figura 20). O pico m/z 941,41 (modo positivo, valor calculado 941,25) corresponde à espécie $[\text{Bi(III)(T4MPP)}]^+$.

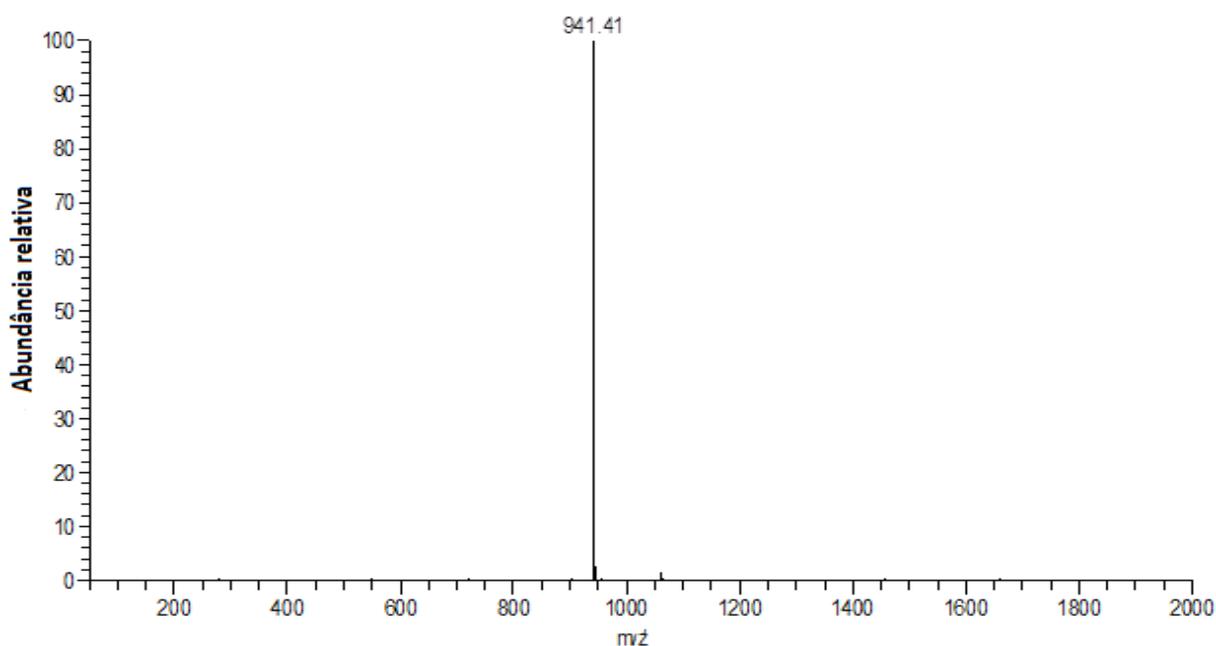
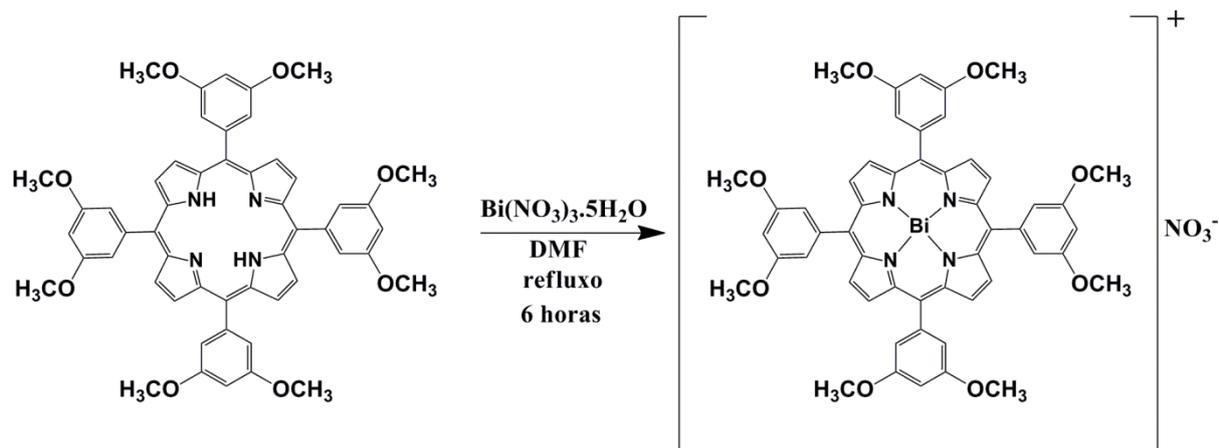


Figura 20. Espectro de massas da $[\text{Bi(III)(T4MPP)}]\text{NO}_3$ obtido em metanol.

b) Nitrato de 5,10,15,20-tetraquis(3,5-dimetoxifenil)porfirinatobismuto(III) – $[\text{Bi(III)(T3,5DMPP)}]\text{NO}_3$

A obtenção da $[\text{Bi(III)(T3,5DMPP)}]\text{NO}_3$ ocorreu de forma similar à da $[\text{Bi(III)(T4MPP)}]\text{NO}_3$. Os espectros UV-vis obtidos no decorrer da reação confirmaram o progresso da mesma no sentido de formação do produto $[\text{Bi(III)(T3,5DMPP)}]\text{NO}_3$ (Esquema 2, pág. 31). Após 6 horas de reação, a mistura estava verde escuro e não houve mais alteração nos espectros, o que caracterizou o final da reação.



Esquema 2. Representação da reação de formação da $[\text{Bi(III)(T3,5DMPP)}]\text{NO}_3$.

No processo de purificação por cromatografia em coluna (SiO_2), a $\text{H}_2\text{T3,5DMPP}$ foi eluída como uma fração roxa e a $[\text{Bi(III)(T3,5DMPP)}]\text{NO}_3$ como uma fração verde escuro. Ao se analisar o espectro eletrônico de absorção UV-vis da metaloporfirina de bismuto obtida $[\text{Bi(III)(T3,5DMPP)}]\text{NO}_3$ (Figura 21), observa-se que a mesma apresenta um espectro hiper tipo *p*, com duas bandas Q entre 500 e 700 nm, a banda Soret localizada em 472 nm e bandas de absorção extra em $\lambda \sim 320\text{nm}$.

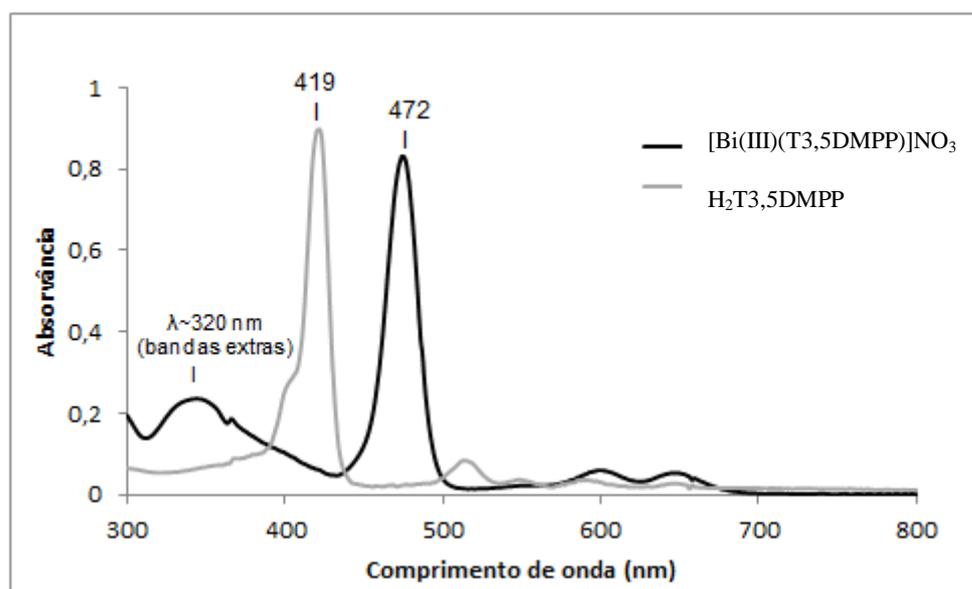


Figura 21. Espectros eletrônicos de absorção UV-vis de $\text{H}_2\text{T3,5DMPP}$ e $[\text{Bi(III)(T3,5DMPP)}]\text{NO}_3$, em CH_2Cl_2 .

Ao se analisar o espectro de RMN ^1H da $[\text{Bi(III)(T3,5MPP)}]\text{NO}_3$ (Figura 22), verificou-se que o sinal referente aos átomos de hidrogênio β -pirrólicos tornaram-se mais desblindados ($\delta = 9,31$ ppm) quando comparados aos átomos de hidrogênio β -pirrólicos da porfirina base livre ($\delta = 8,94$ ppm) (Figura 23, pág. 33), exibindo um comportamento similar ao da $[\text{Bi(III)(T4MPP)}]\text{NO}_3$ discutido anteriormente.

Pode-se observar também o desaparecimento do sinal correspondente aos hidrogênios N-pirrólicos na $[\text{Bi(III)(T3,5DMPP)}]\text{NO}_3$, indicando que a coordenação do íon metálico aos nitrogênios pirrólicos da porfirina foi efetiva.

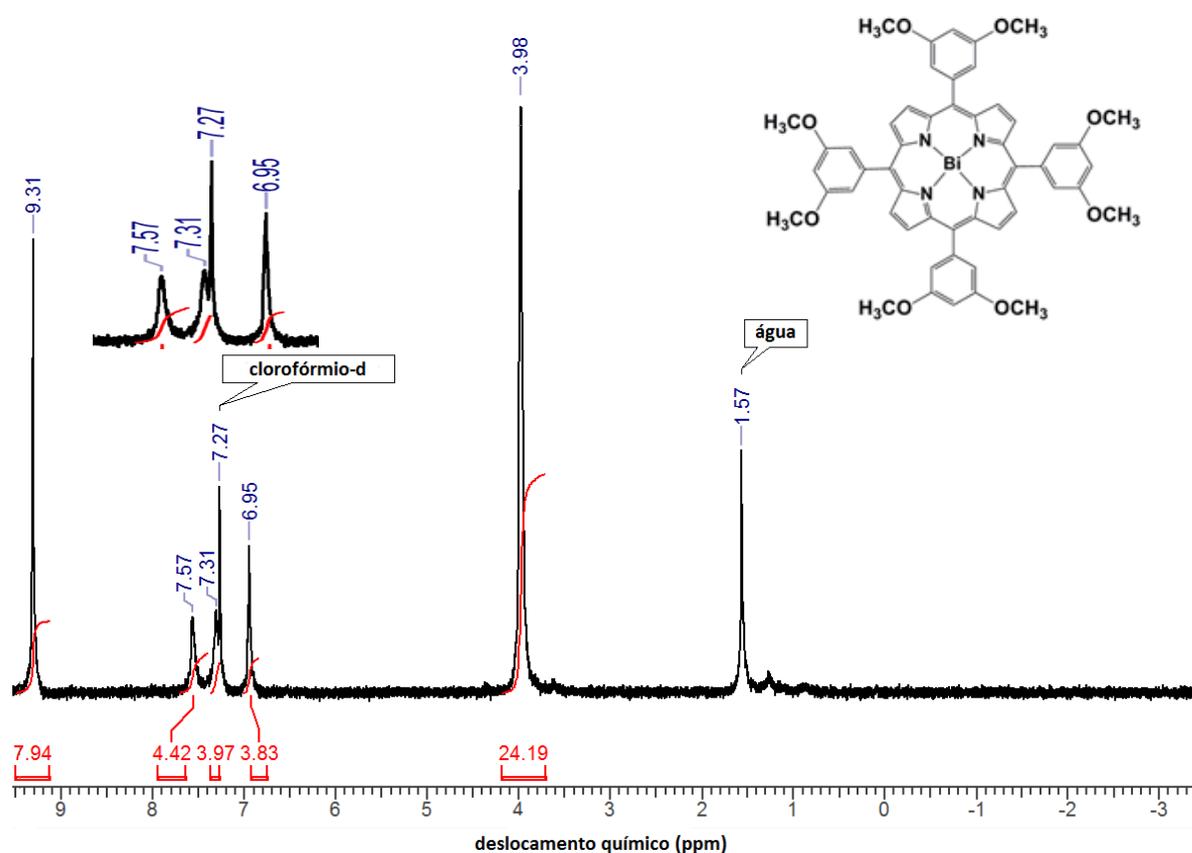


Figura 22. Espectro de RMN ^1H em aparelho de 200 MHz em CDCl_3 (25°C) da $[\text{Bi(III)(T3,5DMPP)}]\text{NO}_3$. $\delta = 3,98$ (24 H, s, metílicos); $\delta = 6,95$ (4 H, m, p-arílicos); $\delta = 7,31 - 7,57$ (8 H, m, o-arílicos); $\delta = 9,31$ (8H, s, β -pirrólicos).

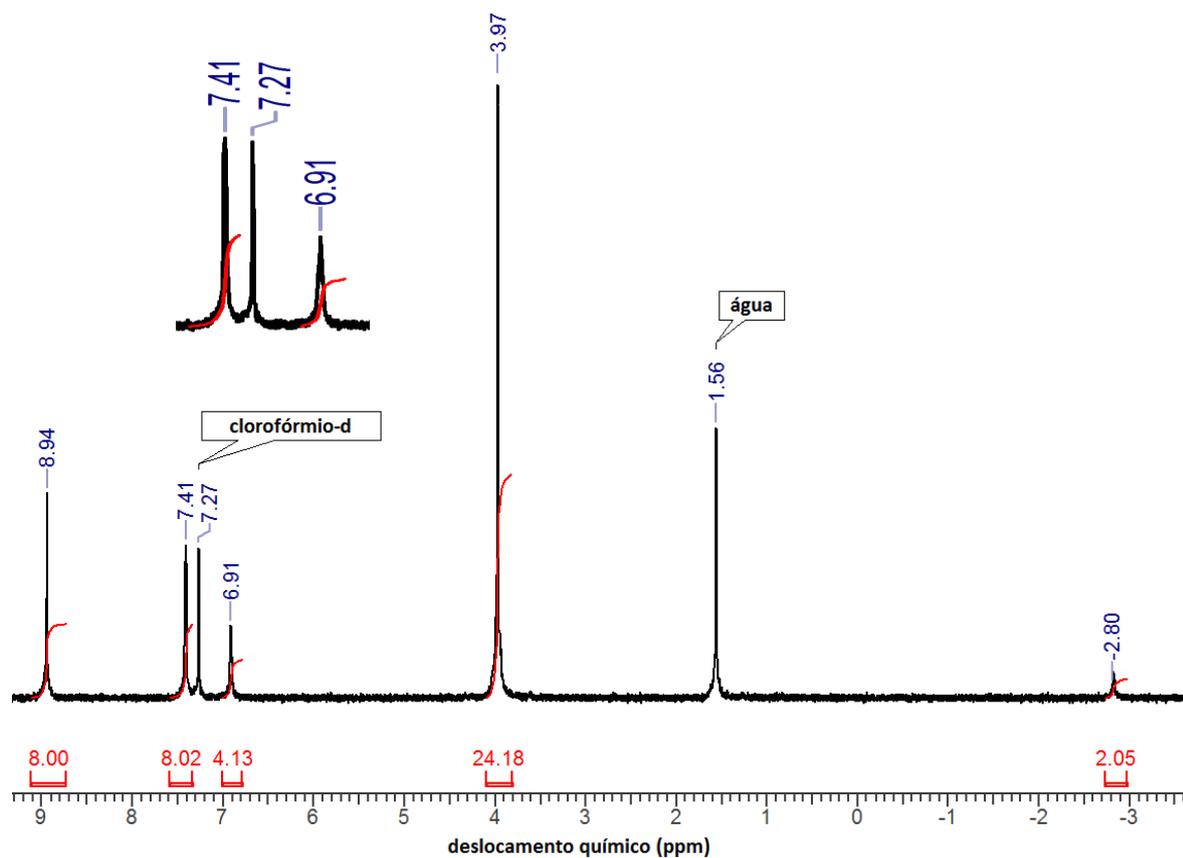


Figura 23. Espectro de RMN ^1H em aparelho de 200 MHz em CDCl_3 (25°C) da $\text{H}_2\text{T3,5DMPP}$. $\delta = -2,80$ (2 H, s, N-pirrólicos); $\delta = 3,97$ (24 H, s, metílicos); $\delta = 6,91$ (4 H, m, p-arílicos); $\delta = 7,41$ (8 H, m, o-arílicos); $\delta = 8,94$ (8H, s, β -pirrólicos).

A espectrometria de massas (EM-ISE) indicou a obtenção da $[\text{Bi(III)(T3,5DMPP)]\text{NO}_3$ (Figura 24, pág. 34). O pico m/z 1061,36 (modo positivo, valor calculado 1061,30) corresponde à espécie $[\text{Bi(III)(T3,5DMPP)]^+$.

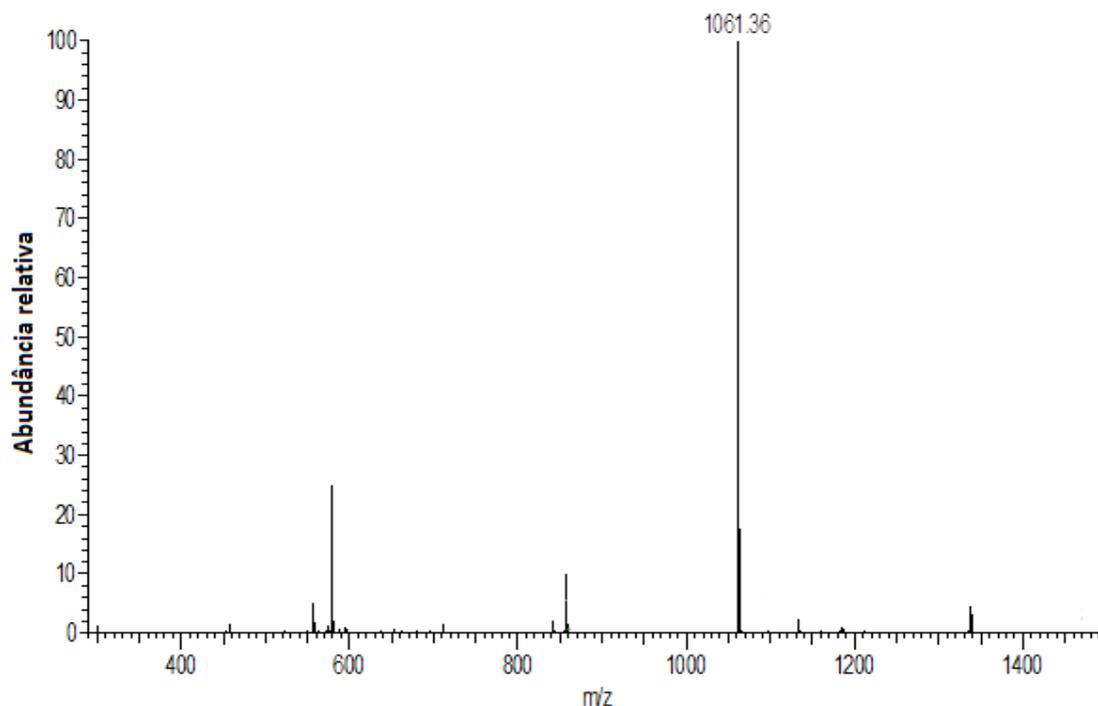
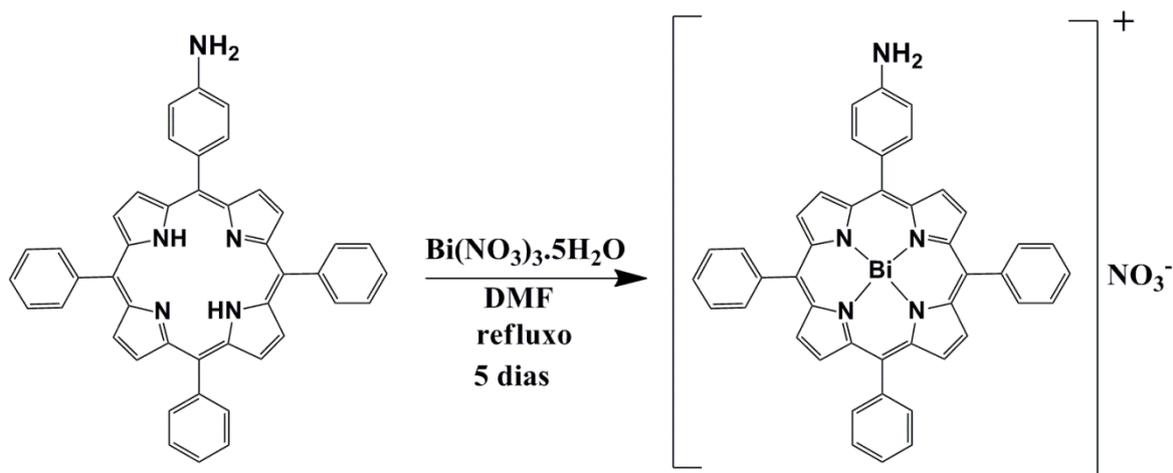


Figura 24. Espectro de massas da $[\text{Bi(III)(T3,5DMPP)]NO}_3$, em metanol.

c) Nitrato de 5-(4-aminofenil)-10,15,20-trisfenilporfirinatobismuto(III)
 $[\text{Bi(III)APTPP}]NO_3$

A obtenção da metaloporfirina inédita $[\text{Bi(III)APTPP}]NO_3$ ocorreu de forma similar às anteriores, porém, a reação se prolongou por um tempo maior: 5 dias (8 horas por dia sob sistema de refluxo). A mistura de reação, que inicialmente era roxa, começou a ficar esverdeada quando se completaram 10 horas de reação. No início da reação, o espectro eletrônico de absorção UV-vis (que foi medido imediatamente após a adição dos reagentes) era o da porfirina base livre H_2APTPP . Os espectros obtidos no decorrer da reação confirmaram o progresso da mesma no sentido de formação do produto $[\text{Bi(III)APTPP}]NO_3$ (Esquema 3, pág. 35). Após 40 horas de reação, a mistura estava verde escuro e não houve mais alteração nos espectros, o que caracterizou o final da reação.



Esquema 3. Representação da reação de formação da $[\text{Bi(III)(APTPP)}]\text{NO}_3$.

Ao se comparar o espectro eletrônico de absorção UV-vis da porfirina de bismuto obtida com aquele de sua base livre, $[\text{Bi(III)APTPP}]\text{NO}_3$ e H_2APTPP , respectivamente (Figura 25), observa-se que a $[\text{Bi(III)APTPP}]\text{NO}_3$ possui duas bandas Q (região entre 500 e 700 nm), enquanto a porfirina base livre (H_2APTPP) apresenta quatro bandas nessa região. Observa-se também o deslocamento da banda Soret de 423 nm para 476 nm. O complexo $[\text{Bi(III)APTPP}]\text{NO}_3$ apresenta um espectro hiper tipo *p*.

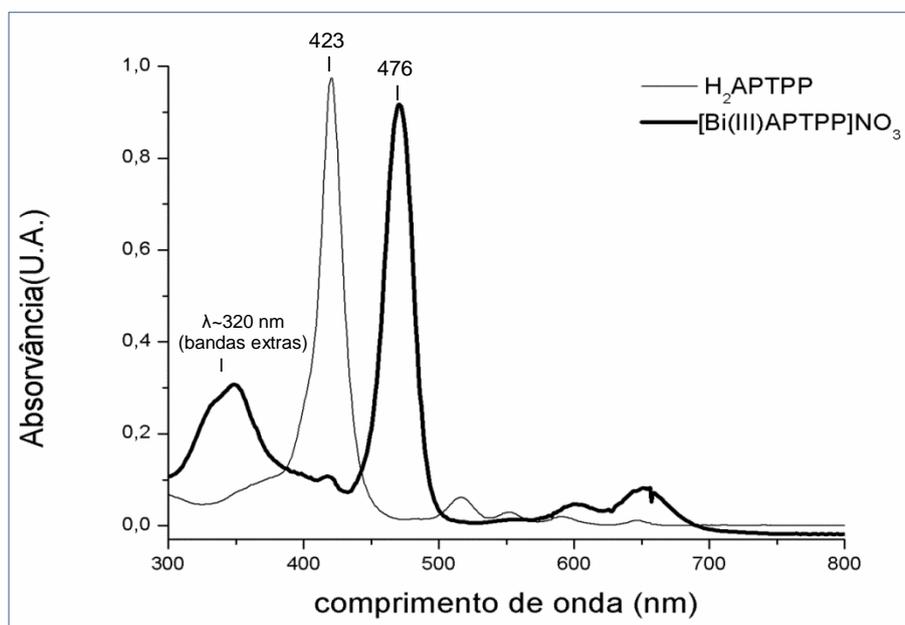


Figura 25. Espectros eletrônicos de absorção UV-vis de H_2APTPP e $[\text{Bi(III)(APTPP)}]\text{NO}_3$, em CH_2Cl_2

No processo de purificação por cromatografia em coluna (SiO_2), a H_2APTTP foi eluída como uma fração roxa e a $[\text{Bi(III)APTTP}]\text{NO}_3$ como uma fração verde escuro. A $[\text{Bi(III)APTTP}]\text{NO}_3$ pura não foi facilmente obtida, sendo necessários quatro processos de purificação em coluna para obtê-la, pois sempre restavam traços da porfirina base livre na fração metalada.

A análise de RMN ^1H da $[\text{Bi(III)(APTTP)}]\text{NO}_3$ mostra que o sinal referente aos átomos de hidrogênio β -pirrólicos tornaram-se mais desblindados quando comparados aos átomos de hidrogênio β -pirrólicos da porfirina base livre (Tabela 2), exibindo um comportamento similar ao das metaloporfirinas discutidas anteriormente. Pode-se observar também o desaparecimento do sinal correspondente aos hidrogênios N-pirrólicos na $[\text{Bi(III)(APTTP)}]\text{NO}_3$, indicando que a coordenação do íon metálico aos nitrogênios pirrólicos da porfirina foi efetiva. Apesar da elevada concentração das soluções usadas para obtenção dos espectros (saturação do soluto no solvente) e do elevado número de scans durante as análises, os sinais referente aos átomos de hidrogênio dos grupos arila (Figura 26, pág. 37) apresentaram uma baixa intensidade. Esse fenômeno ocorreu com todas as metaloporfirinas de Bi(III) oriundas das porfirinas não simétricas (H_2NPTTP , *cis/trans*- H_2DAPDPP e *cis-trans*- H_2DNPDP). Os espectros dessa classe de metaloporfirinas encontram-se em anexo.

Tabela 2. Sinais de RMN ^1H da H_2APTTP e $[\text{Bi(III)(APTTP)}]\text{NO}_3$ em aparelho de 200 MHz (25°C).

| Hidrogênio | Deslocamento químico (δ , ppm) $[\text{Bi(III)(APTTP)}]\text{NO}_3$ | Deslocamento químico (δ , ppm) H_2APTTP |
|----------------------------|--|--|
| β -pirrólico (m, 8H) | 9,36 | 8,97 |
| o-arila (d, 6H) | 9,24 | 8,24 |
| o-anilina (s, 2H) | 8,04 | 8,01 |
| m/p-arila (m, 9H) | 7,84 | 7,76 |
| m-anilina (s, 2 H) | 7,12 | 7,07 |
| Amino (2H) | 3,96 | 4,04 |
| N-pirrólicos (s, 2H) | - | -2,73 |

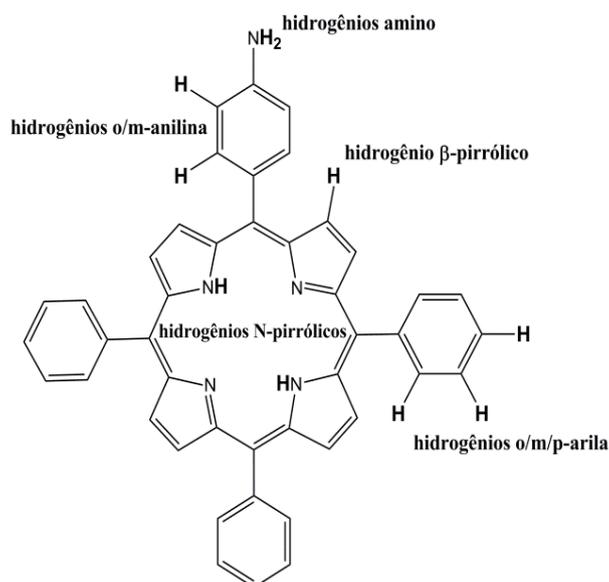


Figura 26. Classificação dos átomos de hidrogênio em H₂APTPP.

A espectrometria de massas (EM-ISE) indicou a obtenção da [Bi(III)APTPP]NO₃ (Figura 27). O pico m/z 836,38 (modo positivo, valor calculado 836,22) corresponde à espécie [Bi(III)APTPP]⁺. O pico m/z 630,1970 (modo positivo, valor calculado 629,26) corresponde à espécie [H₂APTPP]⁺, que pode ter sido gerada durante o processo de ionização por espectrometria de massas.

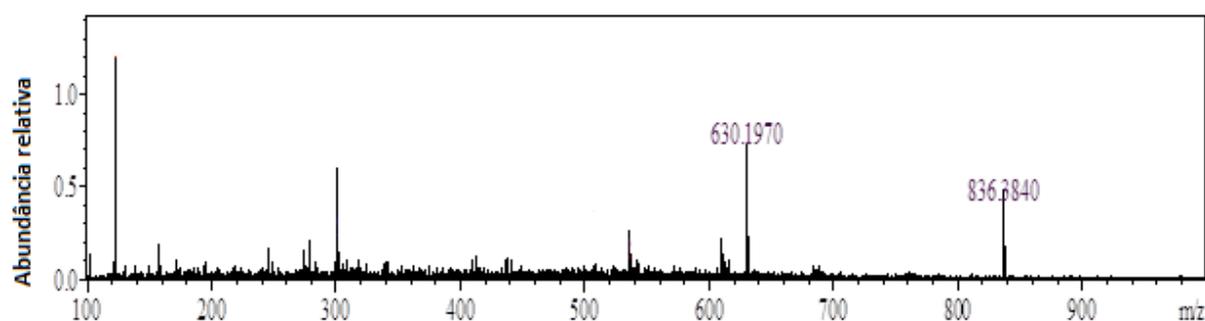
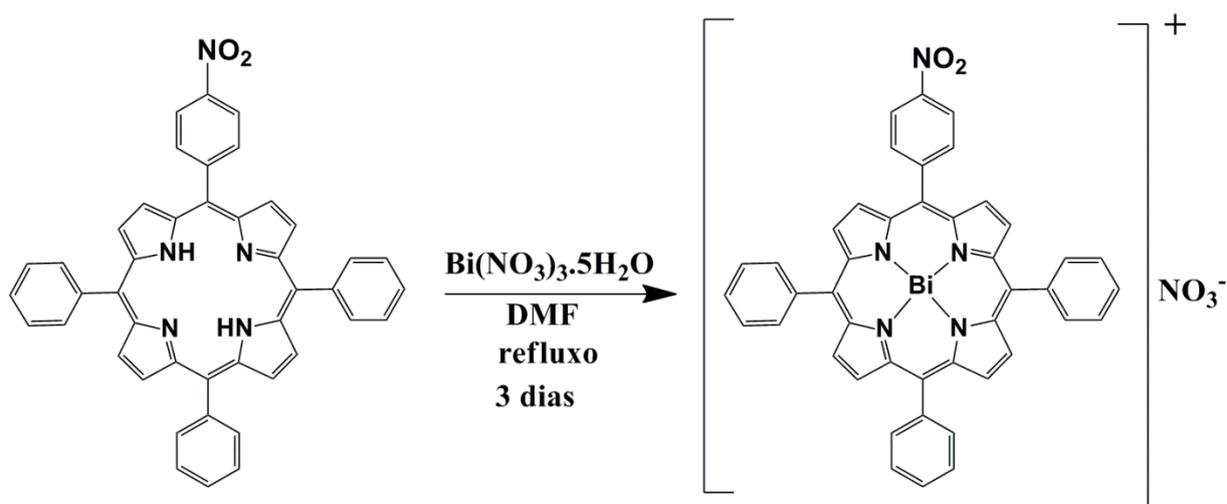


Figura 27. Espectro de massas da [Bi(III)(APTPP)]NO₃, em metanol.

d) Nitrato de 5-(4-nitrofenil)-10,15,20-trisfenilporfirinatobismuto(III)
[Bi(III)NPTPP]NO₃

A obtenção da metaloporfirina inédita [Bi(III)NPTPP]NO₃ ocorreu de forma similar à anterior, porém, a reação se prolongou por um tempo menor: 3 dias (8 horas por dia em sistema de refluxo) (Esquema 4).



Esquema 4. Representação da reação de formação da [Bi(III)(NPTPP)]NO₃

Ao se comparar o espectro eletrônico de absorção UV-vis da porfirina de bismuto obtida com aquele de sua base livre, [Bi(III)NPTPP]NO₃ e H₂NPTPP, respectivamente (Figura 28, pág. 39), observa-se que o complexo [Bi(III)NPTPP]NO₃ apresenta um espectro hiper tipo *p*.

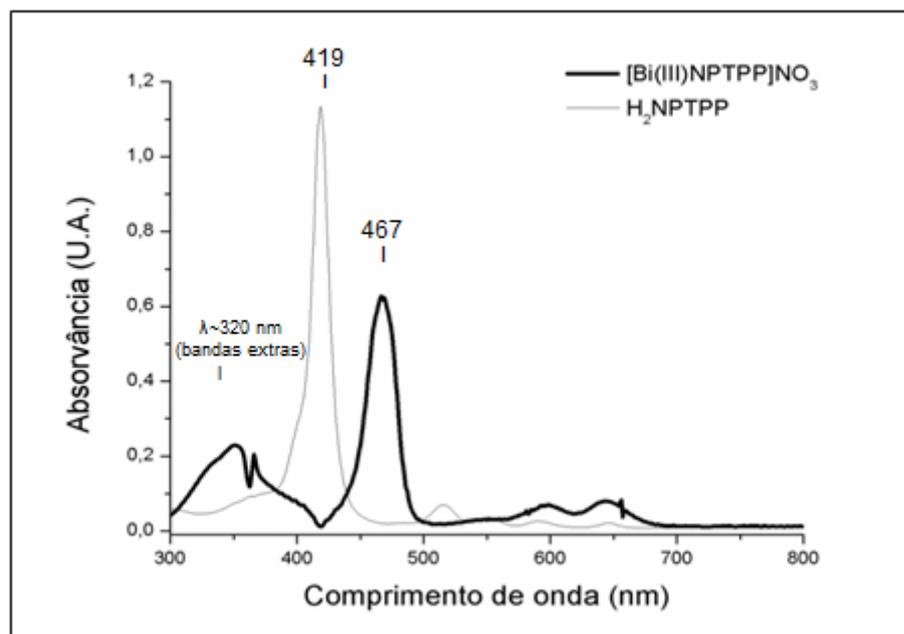


Figura 28. Espectros eletrônicos de absorção UV-vis de H_2NPTPP e $[\text{Bi(III)(NPTPP)}]\text{NO}_3$, em CH_2Cl_2 .

A análise de RMN ^1H da $[\text{Bi(III)(NPTPP)}]\text{NO}_3$ mostra que o sinal referente aos átomos de hidrogênio β -pirrólicos tornaram-se mais desblindados quando comparados aos átomos de hidrogênio β -pirrólicos da porfirina base livre (Tabela 3), exibindo um comportamento similar ao das metaloporfirinas discutidas anteriormente. Pode-se observar também o desaparecimento do sinal correspondente aos hidrogênios N-pirrólicos na $[\text{Bi(III)(NPTPP)}]\text{NO}_3$, indicando que a coordenação do íon metálico aos nitrogênios pirrólicos da porfirina foi efetiva.

Tabela 3. Sinais de RMN ^1H da H_2NPTPP e $[\text{Bi(III)(NPTPP)}]\text{NO}_3$ em aparelho de 200 MHz (25°C).

| Hidrogênio | Deslocamento químico (δ , ppm) | |
|----------------------------|--|--------------------------|
| | $[\text{Bi(III)(NPTPP)}]\text{NO}_3$ | H_2NPTPP |
| β -pirrólico (m, 6H) | 9,21 | 8,88 |
| β -pirrólico (m, 2H) | 8,88 | 8,76 |
| o-nitroarila(d, 2H) | 8,68 | 8,63 |
| m-nitroarila(d, 2H) | 8,50 | 8,39 |
| o-arila (m, 6H) | 8,23 | 8,22 |
| m/p-arila (m, 9H) | 7,80 | 7,80 |
| N-pirrólicos (s, 2H) | - | -2,76 |

A espectrometria de massas (EM-ISE) indicou a obtenção da $[\text{Bi(III)NPTPP}]\text{NO}_3$ (Figura 29). O pico m/z 866,23 (modo positivo, valor calculado 866,20) corresponde à espécie $[\text{Bi(III)NPTPP}]^+$.

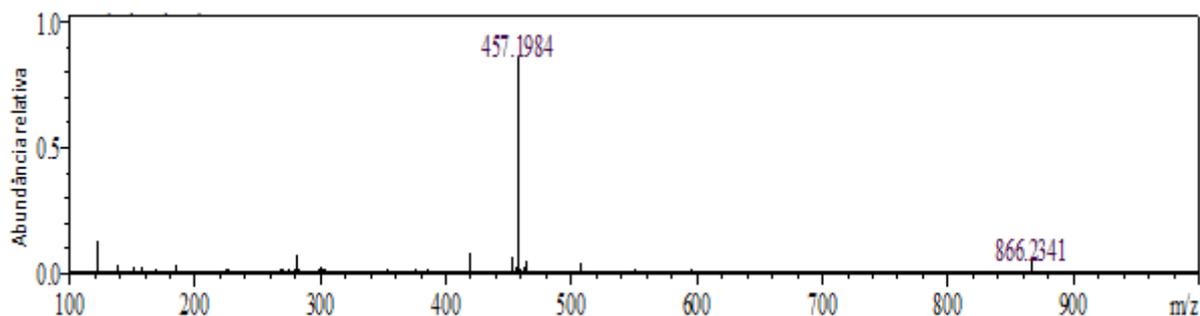
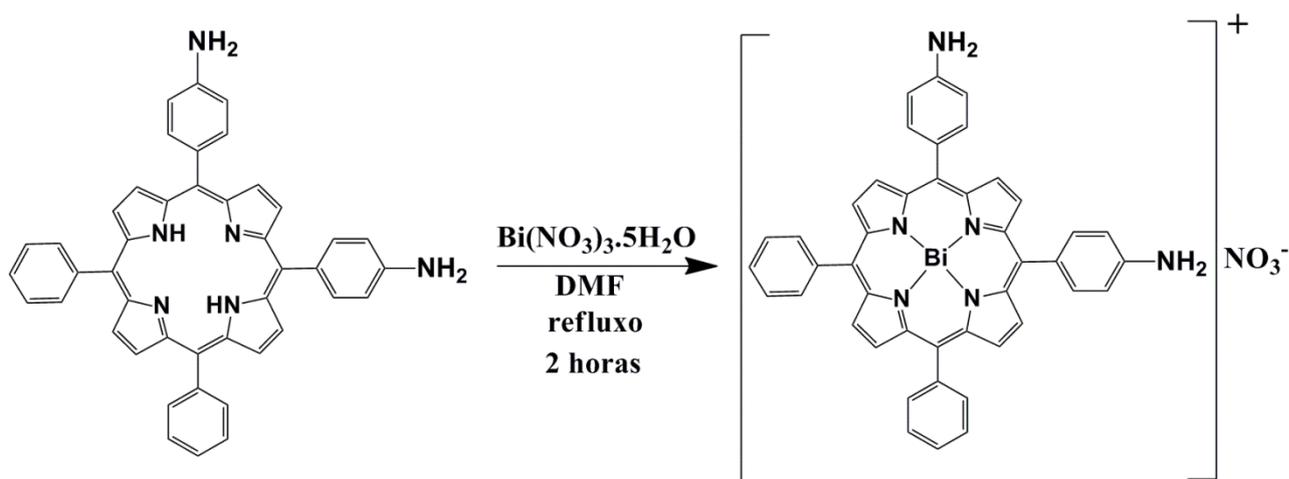


Figura 29. Espectro de massas da $[\text{Bi(III)NPTPP}]\text{NO}_3$, em metanol.

e) Nitrato de 5,10-bis(4-aminofenil)-15,20-bisfenilporfirinatobismuto(III) e Nitrato de 5,15-bis(4-aminofenil)-10,20-bisfenilporfirinatobismuto(III)–*cis/trans*- $[\text{Bi(III)DAPDPP}]\text{NO}_3$

A obtenção da mistura de isômeros das metaloporfirinas inéditas *cis/trans*- $[\text{Bi(III)DAPDPP}]\text{NO}_3$ ocorreu de forma similar às anteriores, porém, a reação se prolongou por um tempo bem menor: 2 horas (Esquema 5).



Esquema 5. Representação da reação de formação da *cis*- $[\text{Bi(III)(DAPDPP)}]\text{NO}_3$.

A mistura de metaloporfirinas *cis/trans*-[Bi(III)DAPDPP]NO₃ apresenta um espectro de absorção UV-vis similar às demais anteriores: hiper tipo *p* (Figura 30), com uma banda de absorção extra situada em $\lambda \sim 320$ nm.

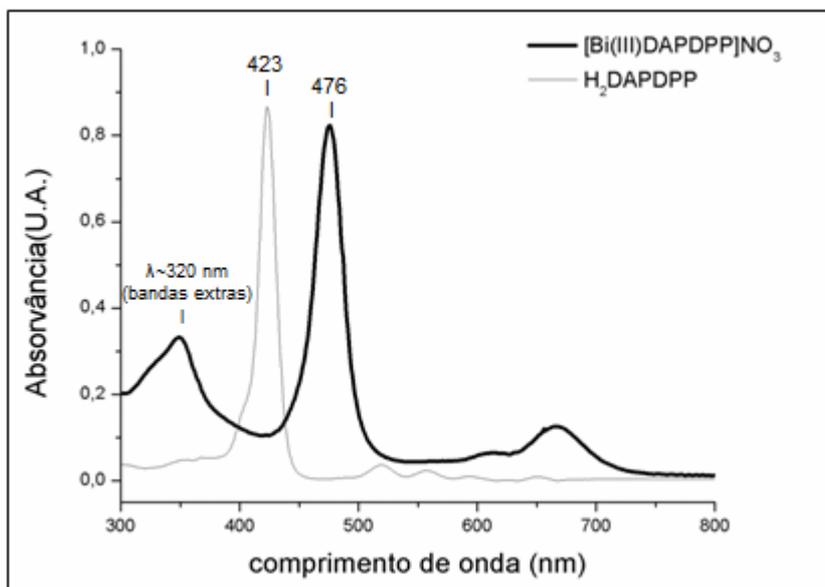


Figura 30. Espectros eletrônicos de absorção UV-vis das misturas *cis/trans*-H₂DAPDPP e *cis/trans*-[Bi(III)(DAPDPP)]NO₃, em CHCl₂.

A análise de RMN ¹H da mistura de isômeros *cis/trans*-[Bi(III)(DAPDPP)]NO₃ mostra que os sinais referentes aos átomos de hidrogênio β -pirrólicos tornaram-se mais desblindados quando comparados aos átomos de hidrogênio β -pirrólicos da porfirina base livre (Tabela 4, pág. 42), exibindo um comportamento análogo ao das metaloporfirinas discutidas anteriormente. Pode-se observar também o desaparecimento do sinal correspondente aos hidrogênios N-pirrólicos na *cis/trans*-[Bi(III)(DADPPP)]NO₃, indicando que a coordenação do íon metálico aos nitrogênios pirrólicos da porfirina foi efetiva.

Tabela 4. Sinais de RMN ^1H da *cis/trans*- H_2DAPDPP e *cis/trans*- $[\text{Bi(III)(DAPDPP)]NO}_3$ em aparelho de 200 MHz (25°C).

| Hidrogênio | Deslocamento químico (δ , ppm) <i>cis/trans</i> - $[\text{Bi(III)(DAPDPP)]NO}_3$ | Deslocamento químico (δ , ppm) <i>cis/trans</i> - H_2DAPDPP |
|----------------------------|---|--|
| β -pirrólico (s, 4H) | 9,34 | 8,94 |
| β -pirrólico (s, 4H) | 9,22 | 8,83 |
| o-arila(m, 4H) | 8,23-8,25 | 8,24 |
| o-anilina (s, 4 H) | 8,04 | 8,03 |
| m/p-arila (m, 6H) | 7,81-7,84 | 7,78 |
| m-anilina (s, 4 H) | 7,12 | 7,10 |
| Amino (4H) | 4,11 | 4,04 |
| N-pirrólicos (s, 2H) | - | -2,73 |

A espectrometria de massas (EM-ISE) indicou a obtenção da metaloporfirina inédita $[\text{Bi(III)(DAPDPP)]NO}_3$ (Figura 31). O pico m/z 851,36 (modo positivo, valor calculado 851,23) corresponde à espécie *cis/trans*- $[\text{Bi(III)(DAPDPP)]}^+$.

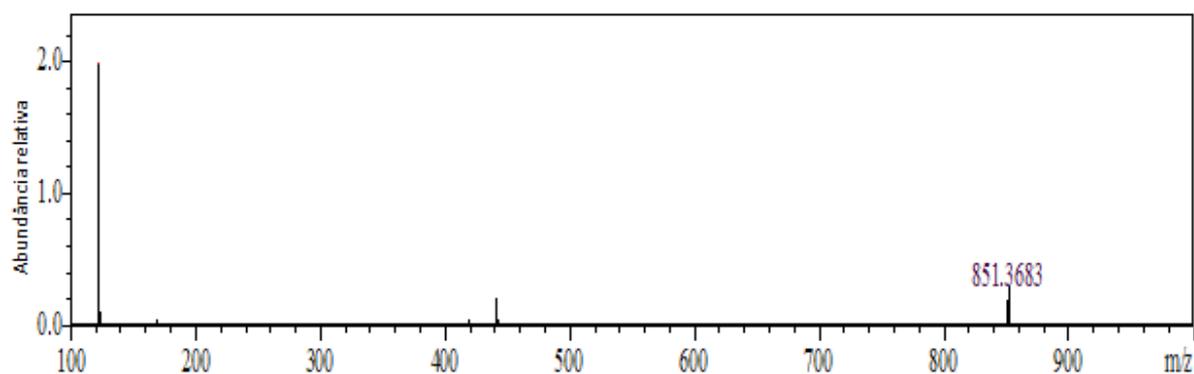
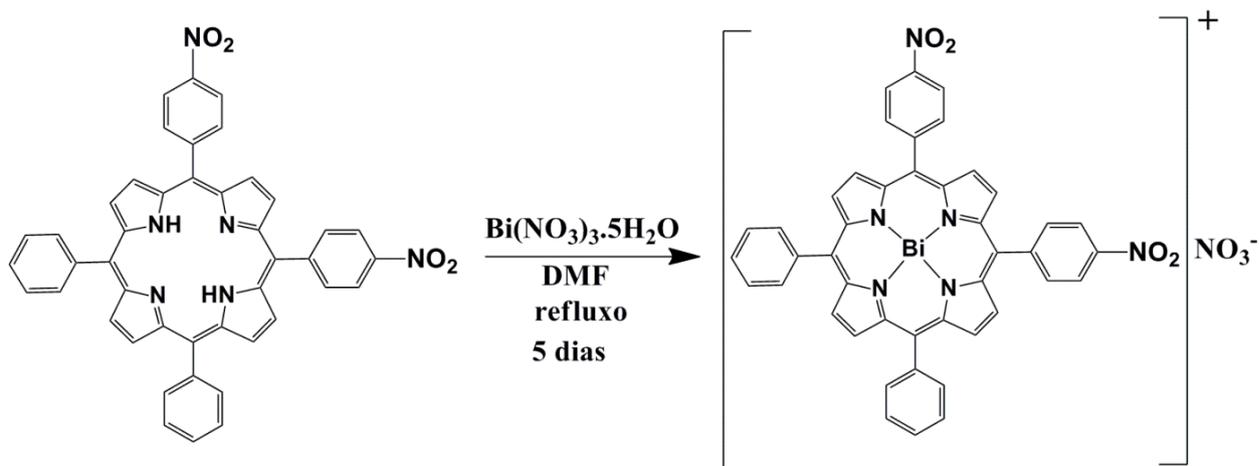


Figura 31. Espectro de massas da mistura de isômeros *cis/trans*- $[\text{Bi(III)(DAPDTPP)]NO}_3$, em metanol.

f) Nitrato de 5,10-bis(4-nitrofenil)-15,20-bisfenilporfirinatobismuto(III) e Nitrato de 5,15-bis(4-nitrofenil)-10,20-bisfenilporfirinatobismuto(III)–*cis/trans*- $[\text{Bi(III)(DNPDP)]NO}_3$

A reação de obtenção da mistura de metaloporfirinas *cis/trans*- $[\text{Bi(III)(DNPDP)]NO}_3$ ocorreu de forma similar às anteriores. Porém, a reação se prolongou por 5 dias (8 horas por dia). (Esquema 6, pág. 43).



Esquema 6. Representação da reação de formação da *cis*-[Bi(III)(DNPDPDP)]NO₃.

Ao se comparar o espectro eletrônico de absorção UV-vis da porfirina de bismuto obtida com aquele de sua base livre, *cis/trans*-[Bi(III)DNPDPDP]NO₃ e *cis/trans*-H₂DNPDPDP, respectivamente (Figura 32), observa-se que a metaloporfirina também apresenta um espectro hiper tipo *p*, com uma banda de absorção extra em $\lambda \sim 320$ nm.

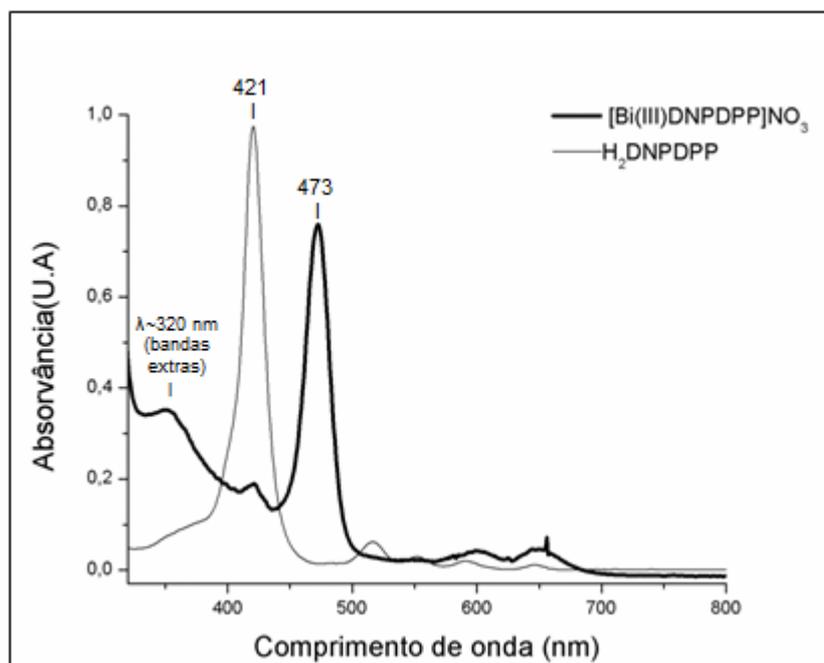


Figura 32. Espectros eletrônicos de absorção UV-vis de *cis/trans*-H₂DNPDPDP e *cis/trans*-[Bi(III)(DNPDPDP)]NO₃, em CH₂Cl₂.

A análise de RMN ^1H da mistura de isômeros *cis/trans*-[Bi(III)(DNPDP)]NO₃ em aparelho de 200 MHz em CDCl₃ mostra variação mínima no deslocamento químico de todos os sinais em relação à respectiva base livre (Tabela 5). Pode-se observar também o desaparecimento do sinal correspondente aos hidrogênios N-pirrólicos na *cis/trans*-[Bi(III)(DNDPPP)]NO₃, indicando que a coordenação do íon metálico aos nitrogênios pirrólicos da porfirina foi efetiva.

Tabela 5. Sinais de RMN ^1H da *cis/trans*-H₂DNPDP e *cis/trans*-[Bi(III)(DNPDP)]NO₃ em aparelho de 200 MHz (25°C).

| Hidrogênio | Deslocamento químico (δ , ppm) [Bi(III)(DNPDP)]NO ₃ | Deslocamento químico (δ , ppm) H ₂ DNPDP |
|----------------------------|---|--|
| β -pirrólico (m, 4H) | 8,90 | 8,91 |
| β -pirrólico (m, 4H) | 8,78 | 8,80 |
| o-nitroarila(d, 4H) | 8,69 | 8,63 |
| p-nitroarila(d, 4H) | 8,43 | 8,42 |
| o-arila (m, 6H) | 8,24 | 8,21 |
| m/p-arila (m, 9H) | 7,80 | 7,81 |
| N-pirrólicos (s, 2H) | - | -2,77 |

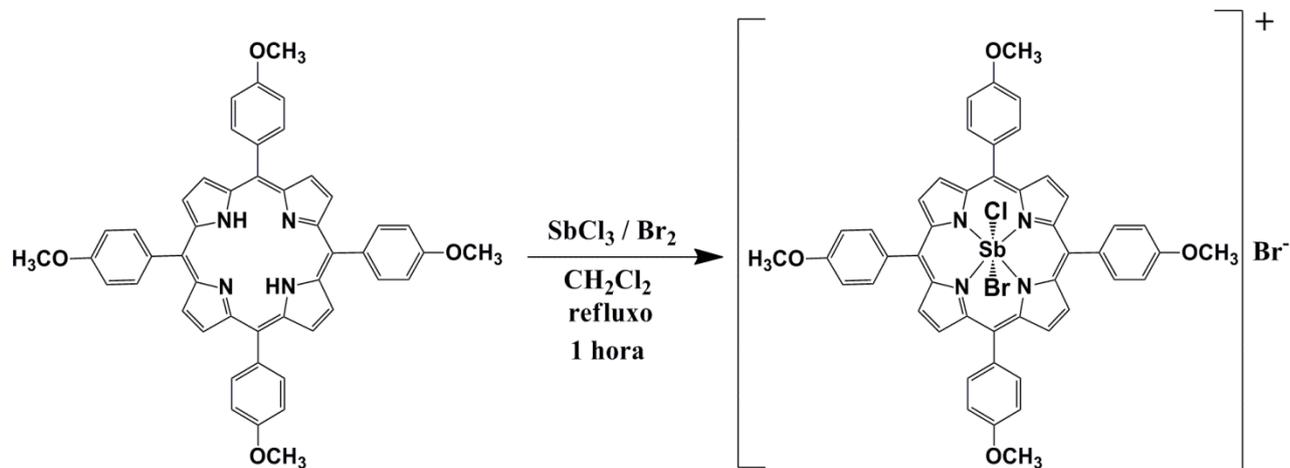
3.2.2. Síntese das metaloporfirinas hidrofóbicas de antimônio

a) Brometo de bromidoclorido-5,10,15,20-tetraquis(4-metoxifenil) porfirinato antimônio(V) – [Sb(V)BrCl(T4MPP)]Br

A síntese foi realizada conforme descrito no item 3.1.2 (pág. 20), porém, após o final da primeira hora de reação, foi adicionado o Br₂(l), que agiu como um oxidante, mudando o nox do Sb de 3+ para 5+ [31]. Ou seja, a metaloporfirina [Sb(III)(T4MPP)]Cl foi oxidada à [Sb(V)BrCl(T4MPP)]Br. A solução adquiriu coloração verde claro e o espectro eletrônico de absorção UV-vis, com a redução do número de bandas Q, comprovou a formação da metaloporfirina em questão (Esquema 7, pág. 45).

Após a precipitação da metaloporfirina com n-hexano, o sólido resultante foi dissolvido em uma quantidade mínima de diclorometano e percolado em uma coluna cromatográfica de alumina neutra. A porfirina base livre (H₂T4MPP) foi rapidamente eluída como uma fração

roxa com diclorometano e a metaloporfirina $[\text{Sb}(\text{V})\text{BrCl}(\text{T4MPP})]\text{Br}$ foi recolhida como uma fração verde com uma mistura de diclorometano:metanol (90:1).



Esquema 7. Representação da reação de formação da $[\text{Sb}(\text{V})\text{BrCl}(\text{T4MPP})]\text{Br}$.

Após a adição do sal SbCl_3 à porfirina base livre $\text{H}_2\text{T4MPP}$, o espectro começou a se modificar. Após uma hora de reação, a solução tornou-se verde escuro e o espectro eletrônico de absorção na região do UV-vis confirmou a presença de uma porfirina metalada (Figura 33).

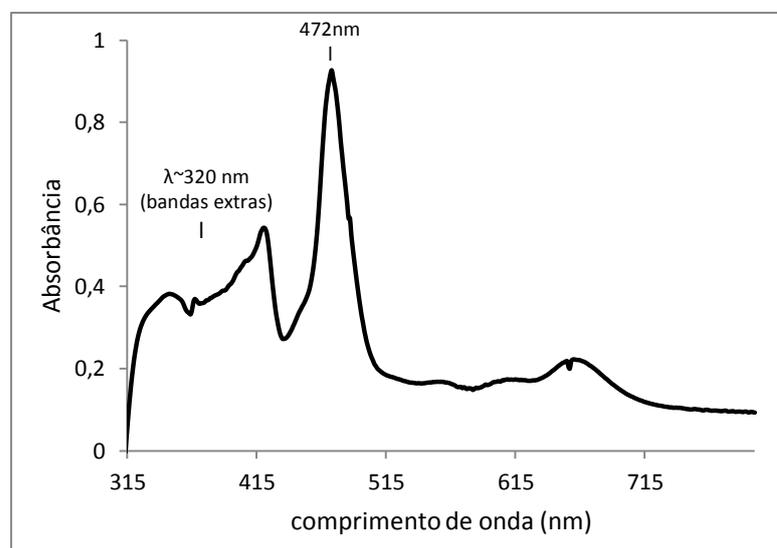


Figura 33. Espectro eletrônico de absorção UV-vis de $[\text{Sb}(\text{III})(\text{T4MPP})]\text{Cl}$, em CH_2Cl_2 .

Esse é um espectro hiper tipo p , demonstrando que inicialmente houve a formação da $[\text{Sb}(\text{III})(\text{T4MPP})]\text{Cl}$ como intermediário da reação. Após a adição do oxidante $\text{Br}_{2(l)}$, a

solução ficou verde claro e o espectro UV-vis final (Figura 34) indicou a formação da $[\text{Sb}(\text{V})\text{BrCl}(\text{T4MPP})]\text{Br}$.

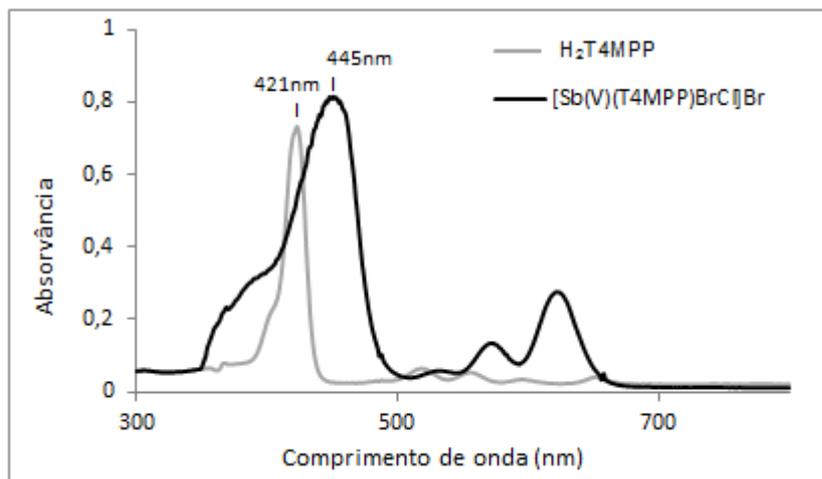


Figura 34. Espectro eletrônico de absorção UV-vis da $[\text{Sb}(\text{V})\text{BrCl}(\text{T4MPP})]\text{Br}$ e da $\text{H}_2\text{T4MPP}$, em CH_2Cl_2 .

Ao se comparar os espectros eletrônicos de absorção UV-vis (Figura 34) da porfirina de $\text{Sb}(\text{V})$ obtida com aquele de sua base livre, $[\text{Sb}(\text{V})\text{BrCl}(\text{T4MPP})]\text{Br}$ e $\text{H}_2\text{T4MPP}$, respectivamente, observa-se que a $[\text{Sb}(\text{V})\text{BrCl}(\text{T4MPP})]\text{Br}$ apresenta um espectro de absorção normal, com duas bandas Q (região entre 500 e 700 nm), enquanto a porfirina base livre apresenta quatro bandas nessa região. Observa-se também o deslocamento da banda Soret de 421 nm para 445 nm.

Uma gota de solução (em CH_2Cl_2) da metaloporfirina $[\text{Sb}(\text{V})\text{BrCl}(\text{T4MPP})]\text{Br}$ foi colocada em uma placa de alumina neutra. Essa amostra foi então eluída com diclorometano e não houve separação de frações, indicando que a $[\text{Sb}(\text{V})\text{BrCl}(\text{T4MPP})]\text{Br}$ estava pura. Sob radiação ultravioleta, notou-se a ausência de fluorescência da porfirina metalada.

O espectro de RMN ^1H da $[\text{Sb}(\text{V})\text{BrCl}(\text{T4MPP})]\text{Br}$, apesar de a solução estar bastante concentrada (solução saturada), apresentou os sinais referentes aos átomos de hidrogênio dos grupos arila com baixa intensidade, ou seja, apresentou o mesmo comportamento dos espectros das metaloporfirinas de $\text{Bi}(\text{III})$ com ligantes não-simétricos. Pela Tabela 6 (pág. 47), verifica-se que o sinal referente aos átomos de hidrogênio β -pirrólicos tornaram-se mais desblindados quando comparados aos átomos de hidrogênio β -pirrólicos da porfirina base livre, exibindo um comportamento análogo ao das metaloporfirinas discutidas anteriormente.

Pode-se observar também a supressão da banda correspondente aos hidrogênios N-pirrólicos na $[\text{Sb(V)BrCl(T4MPP)}]\text{Br}$ indicando a coordenação do íon metálico aos nitrogênios pirrólicos da porfirina. Os espectros de RMN ^1H das metaloporfirinas de antimônio encontram-se em anexo.

Tabela 6. Sinais de RMN ^1H da $\text{H}_2\text{T4MPP}$ e $[\text{Sb(V)BrCl(T4MPP)}]\text{Br}$ em CDCl_3 em aparelho de 200 MHz (25 °C).

| Hidrogênio | Deslocamento químico (δ , ppm) | |
|----------------------------|--|--------------------------|
| | $[\text{Sb(V)BrCl(T4MPP)}]\text{Br}$ | $\text{H}_2\text{T4MPP}$ |
| β -pirrólico (m, 8H) | 9,60-9,65 | 8,86 |
| ortoarílicos (m, 8H) | 7,47-7,51 | 7,31 |
| metaarílicos (m, 8H) | 8,26-8,30 | 8,10-8,15 |
| Metílicos (s, 12H) | 4,17 | 4,10 |
| N-pirrólicos (s, 2H) | - | -2,75 |

A espectrometria de massas (EM-ISE) indicou a obtenção do composto de interesse $[\text{Sb(V)BrCl(T4MPP)}]^+$ (Figura 35, pág. 48). Além disso, observaram-se os picos referentes à espécies $[\text{Sb(V)Cl}_2(\text{TP4MPP})]^+$ e $[\text{Sb(V)Br}_2(\text{T4MPP})]^+$ (Figura 35, pág. 48). O pico m/z 969,16 (modo positivo, valor calculado 969) corresponde à espécie $[\text{Sb(V)BrCl(T4MPP)}]^+$. As demais espécies ($[\text{Sb(V)Cl}_2(\text{TP4MPP})]^+$ e $[\text{Sb(V)Br}_2(\text{T4MPP})]^+$) podem ter sido geradas durante o processo de ionização por espectrometria de massas, ou podem fazer parte do sólido obtido, sendo este uma mistura de metaloporfirinas.

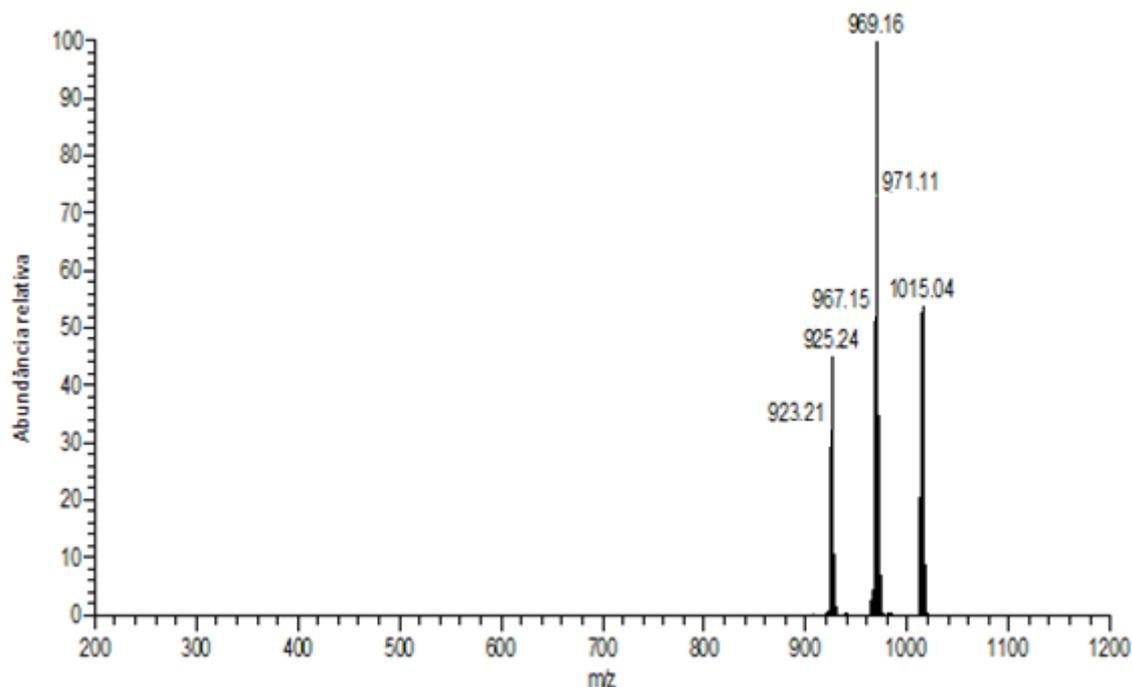


Figura 35. Espectro de massas da $[\text{Sb}(\text{V})\text{BrCl}(\text{T4MPP})]\text{Br}$, em MeOH.

Para se fazer a análise isotópica dos átomos de Br e Cl, foi utilizado o programa computacional Scientific Instrument Services (disponível em <http://www.sisweb.com/mstools/isotope.htm#1>) que simula o espectro de massas, a partir da fórmula molecular do composto. Foram obtidos os seguintes espectros: Figura 36 (pág. 49) para a espécie $[\text{Sb}(\text{V})\text{BrCl}(\text{T4MPP})]^+$; Figura 37 (pág. 49) para a espécie $[\text{Sb}(\text{V})\text{Br}_2(\text{T4MPP})]^+$ e Figura 38 (pág. 49) para a espécie $[\text{Sb}(\text{V})\text{Cl}_2(\text{T4MPP})]^+$. Quando se compara o espectro obtido no modo positivo com os espectros gerados pelo simulador, percebe-se a similaridade dos picos. Nas três espécies analisadas podem ser observados os picos correspondentes a M, M+2 e M-2, característicos de compostos contendo átomos de Cl e Br.

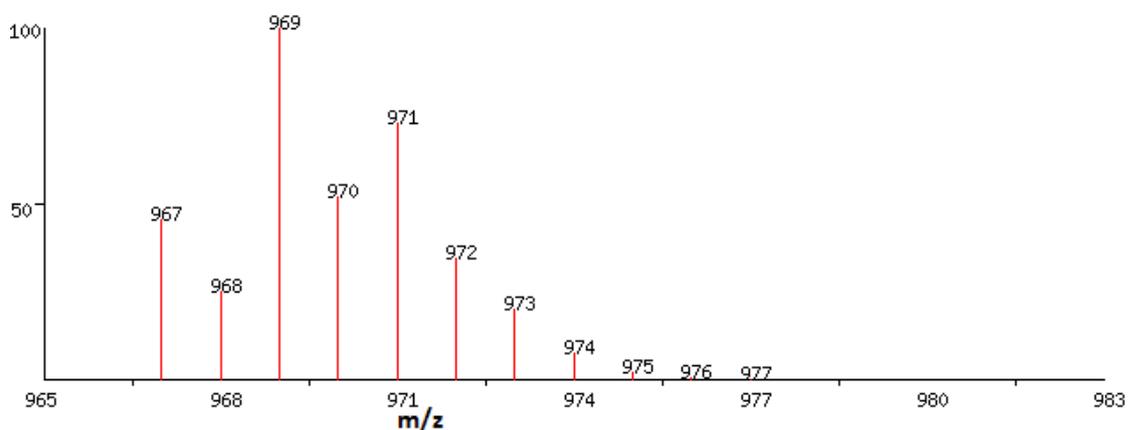


Figura 36. Simulação do espectro de massas para a $[Sb(V)BrCl(T4MPP)]^+$ gerada pelo programa computacional Scientific Instrument Services.

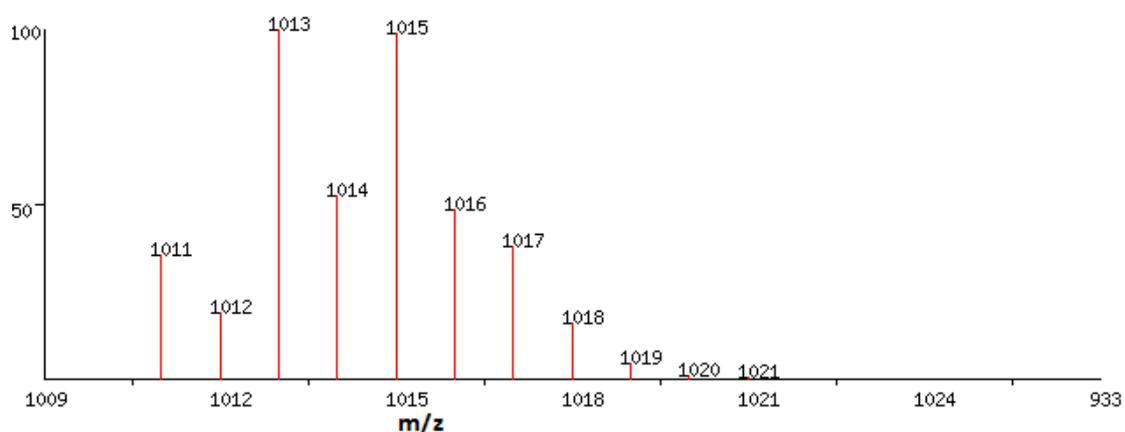


Figura 37. Simulação do espectro de massas para a $[Sb(V)Br_2(TP4MPP)]^+$ gerada pelo programa computacional Scientific Instrument Services.

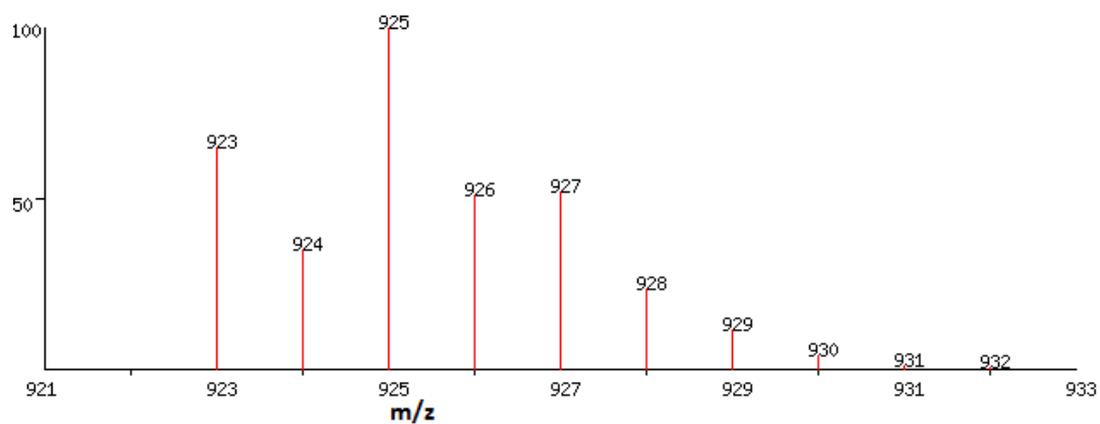


Figura 38. Simulação do espectro de massas para a $[Sb(V)Cl_2(TP4MPP)]^+$ gerada pelo programa computacional Scientific Instrument Services.

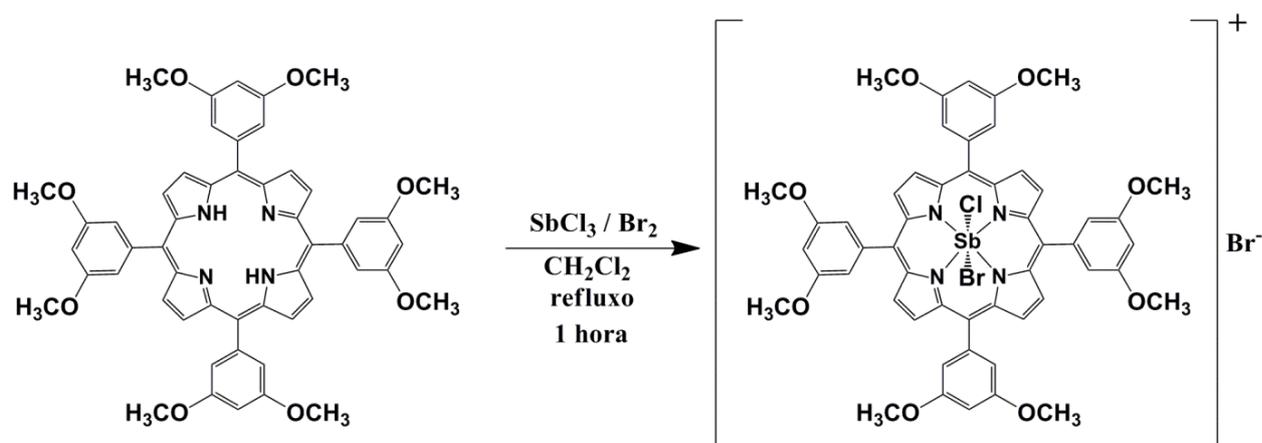
b) Brometo de bromidoclorido-5,10,15,20-tetraquis(3,5-dimetoxifenil)porfirinato-antimônio(V) -[Sb(V)BrCl(T3,5DMPP)]Br

A síntese foi realizada de forma similar à relatada para o complexo [Sb(V)BrCl(T4MPP)]Br (Esquema 8), discutida no item anterior. Para esse processo, observou-se a protonação dos hidrogênios N-pirrólicos da H₂T3,5DMPP no início da reação e foi necessário adicionar colidina ao meio. Após a adição da colidina, houve o reaparecimento da espécie neutra H₂T3,5DMPP.

Após a adição do sal SbCl₃ à solução da porfirina base livre H₂T3,5DMPP, o espectro começou a se modificar. Após uma hora de reação, a solução tornou-se verde escuro e o espectro eletrônico de absorção UV-vis confirmou a presença de uma porfirina metalada, com a presença de duas bandas Q (Figura 39, pág. 51).

Após uma hora de reação, a metaloporfirina [Sb(III)(T3,5DMPP)]Cl havia se formado e, com a adição do agente oxidante Br₂(l), essa metaloporfirina de Sb(III) foi oxidada à [Sb(V)BrCl(T3,5DMPP)]Br. A solução adquiriu coloração roxa e o espectro eletrônico de absorção UV-vis comprovou a formação dessa porfirina de Sb(V).

O sólido resultante da reação de metalação foi dissolvido em uma quantidade mínima de diclorometano e percolado em uma coluna cromatográfica de alumina neutra. A porfirina base livre (H₂T3,5DMPP) foi rapidamente eluída como uma fração roxa com diclorometano e a metaloporfirina [Sb(V)BrCl(T4MPP)]Br foi recolhida como uma fração roxa com uma mistura de diclorometano:metanol (90:1).



Esquema 8. Representação da reação de formação da [Sb(V)BrCl(T3,5DMPP)]Br.

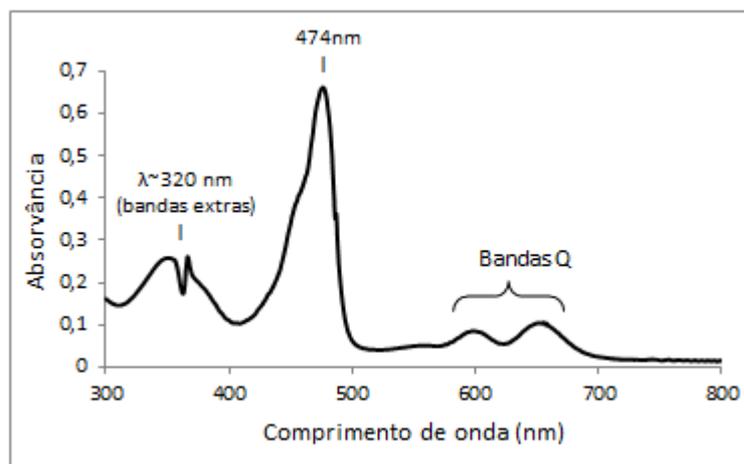


Figura 39. Espectro eletrônico de absorção UV-vis de $[\text{Sb(III)(T3,5DMPP)]Cl}$, em CH_2Cl_2 .

A Figura 39 representa um espectro de porfirinas irregulares hiper tipo *p*, demonstrando que inicialmente houve a formação do intermediário $[\text{Sb(III)(T3,5DMPP)]Cl}$. Após a adição do oxidante $\text{Br}_2(\text{l})$, a solução ficou roxa e o espectro de absorção na região do UV-vis indicou a formação da $[\text{Sb(V)BrCl(T3,5DMPP)]Br}$.

Ao se comparar os espectros eletrônicos de absorção UV-vis (Figura 40, pág. 52) da porfirina de Sb(V) obtida com aquele de sua base livre, $[\text{Sb(V)BrCl(T3,5DMPP)]Br}$ e $\text{H}_2\text{T3,5DMPP}$, respectivamente, observa-se que a $[\text{Sb(V)BrCl(T3,5DMPP)]Br}$ apresenta apenas uma banda Q (região entre 500 e 700 nm), enquanto a porfirina base livre apresenta quatro bandas nessa região. Observa-se também o deslocamento da banda Soret de 419 nm para 429 nm. As porfirinas de Sb(V) possuem espectro de absorção normal, o qual é determinado essencialmente pelos elétrons π do anel porfirínico, com uma mínima perturbação dos elétrons do íon metálico central.

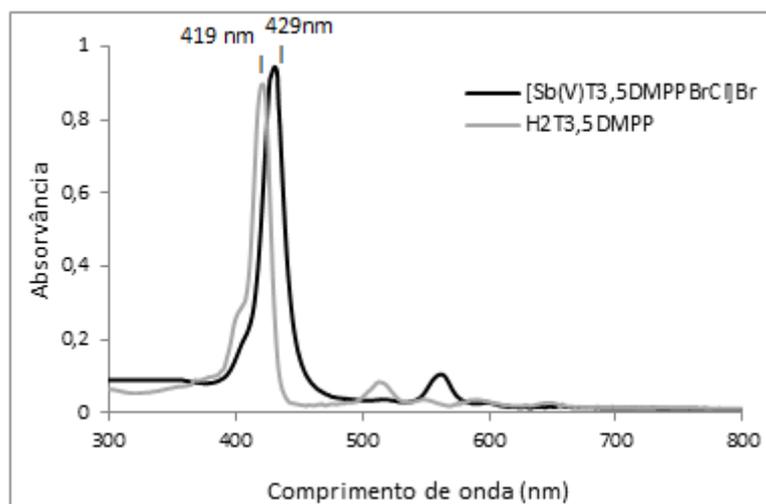


Figura 40. Espectro eletrônico de absorção UV-vis da $[Sb(V)BrCl(T3,5DMPP)]Br$, e $H_2T3,5DMPP$, em CH_2Cl_2 .

O espectro de RMN 1H da $[Sb(V)BrCl(T3,5DMPP)]Br$, apesar de a solução estar bastante concentrada (solução saturada), apresentou os sinais referentes aos átomos de hidrogênio dos grupos arila com baixa intensidade, ou seja, apresentou o mesmo comportamento dos espectros das metaloporfirinas de Bi(III) com ligantes não-simétricos. Pela análise da Tabela 7, pode-se verificar que os sinais referentes aos átomos de hidrogênio da $[Sb(V)BrCl(T3,5DMPP)]Br$ tornaram-se mais desblindados quando comparados aos átomos de hidrogênio da porfirina base livre exibindo um comportamento análogo ao da metaloporfirina discutida anteriormente. Pode-se observar também a supressão da banda correspondente aos hidrogênios N-pirrólicos na $[Sb(V)BrCl(T3,5DMPP)]Br$, indicando a coordenação do íon metálico aos nitrogênios da porfirina.

Tabela 7. Sinais de RMN 1H da $H_2T3,5DMPP$ e $[Sb(V)BrCl(T3,5DMPP)]Br$ em aparelho de 200 MHz (25°C)

| Hidrogênio | Deslocamento químico (δ , ppm) $[Sb(V)BrCl(T3,5DMPP)]Br$ | Deslocamento químico (δ , ppm) $H_2T3,5DMPP$ |
|----------------------------|---|---|
| β -pirrólico (m, 8H) | 9,71 | 8,94 |
| o-arílicos (m, 8H) | 8,68 | 7,41 |
| p-arílicos (m, 4H) | 7,75 | 6,91 |
| Metílicos (d, 24H) | 4,12 | 3,97 |
| N-pirrólicos (s, 2H) | - | -2,80 |

A espectrometria de massas (EM-ISE) confirmou a obtenção das espécies $[\text{Sb(V)BrCl(T3,5DMPP)}]^+$, $[\text{Sb(V)Br}_2(\text{T3,5DMPP})]^+$ e $[\text{Sb(V)Cl}_2(\text{T3,5DMPP})]^+$ (Figura 41). O pico m/z 1089,18 (modo positivo, valor calculado 1089) corresponde à espécie $[\text{Sb(V)BrCl(T3,5DMPP)}]^+$. Esse é o maior pico e, portanto, é a espécie presente em maior quantidade. O pico m/z 1045,21 (modo positivo, valor calculado 1045) corresponde à espécie $[\text{Sb(V)Cl}_2(\text{T3,5DMPP})]^+$. O pico m/z 1135,02 (modo positivo, valor calculado 1035) corresponde à espécie $[\text{Sb(V)Br}_2(\text{T3,5DMPP})]^+$. Essas duas últimas espécies podem ter sido geradas durante o processo de ionização ou podem fazer parte do sólido obtido, sendo este uma mistura de metaloporfirinas.

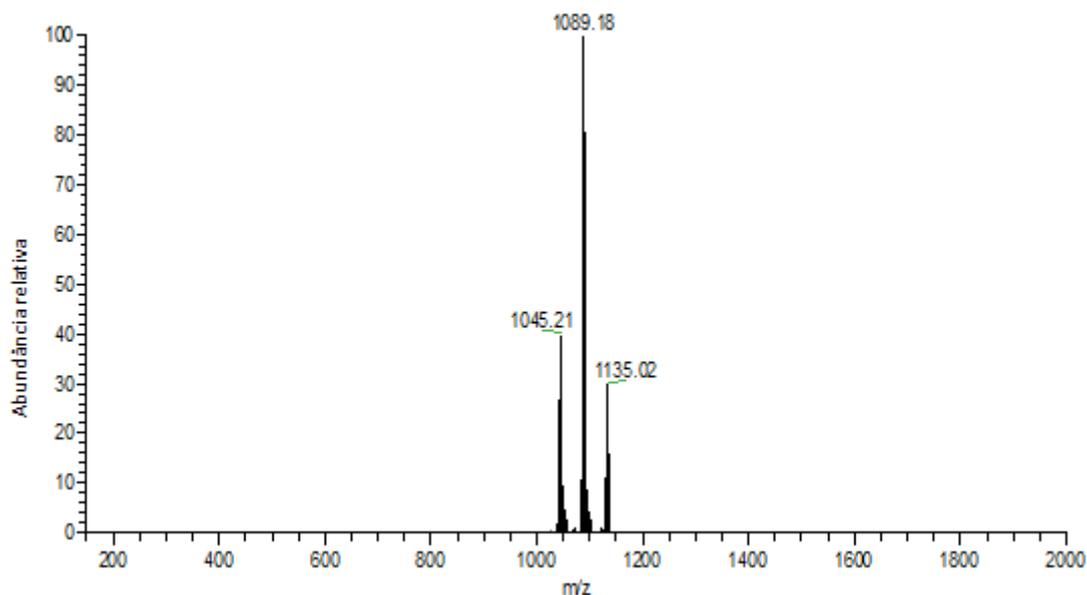


Figura 41. Espectro de massas da $[\text{Sb(V)BrCl(T3,5DMPP)}]\text{Br}$, em MeOH.

De maneira análoga ao feito com a $[\text{Sb(V)BrCl(T4MPP)}]\text{Br}$, foi realizada a análise isotópica dos átomos de Br e Cl utilizando o programa computacional Scientific Instrument Services (disponível em <http://www.sisweb.com/mstools/isotope.htm#1>), que simula o espectro de massas a partir da fórmula molecular do composto. Foram obtidos os seguintes espectros: Figura 42 (pág. 54) para a espécie $[\text{Sb(V)BrCl(T3,5DMPP)}]^+$; Figura 43 (pág. 54) para a espécie $[\text{Sb(V)Cl}_2(\text{T3,5DMPP})]^+$ e Figura 44 (pág. 54) para a espécie $[\text{Sb(V)Br}_2(\text{T3,5DMPP})]^+$. Quando se compara o espectro obtido no modo positivo com os espectros gerados pelo simulador, percebe-se a similaridade dos picos. Nas três espécies geradas na análise podem ser observados os picos correspondentes a M , $M+2$ e $M-2$, característicos de compostos contendo átomos de Cl e Br.

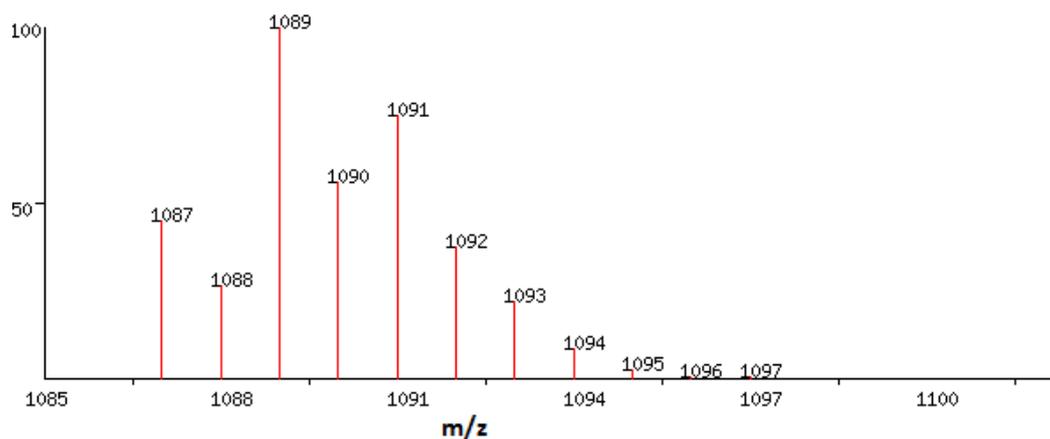


Figura 42. Simulação do espectro de massas para a $[\text{Sb(V)BrCl(T3,5DMPP)}]^+$ gerada pelo programa computacional Scientific Instrument Services.

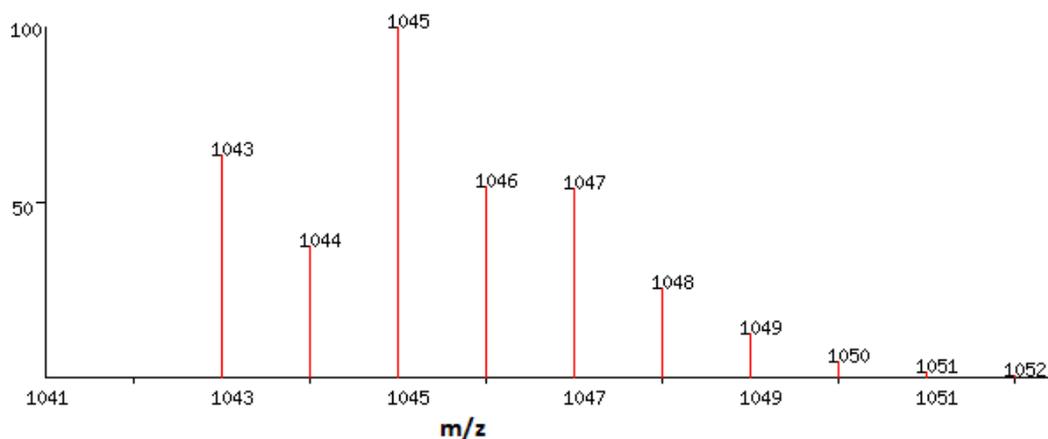


Figura 43. Simulação do espectro de massas para a $[\text{Sb(V)Cl}_2(\text{T3,5DMPP})]^+$ gerada pelo programa computacional Scientific Instrument Services.

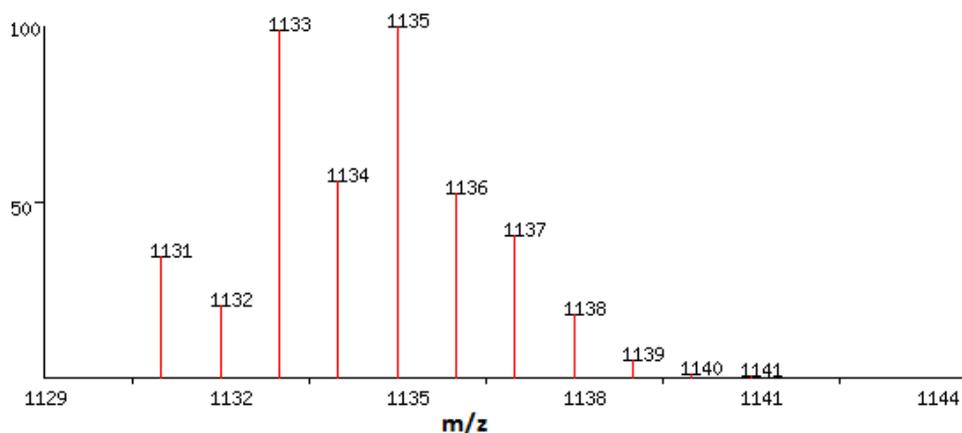


Figura 44. Simulação do espectro de massas para a $[\text{Sb(V)Br}_2(\text{T3,5DMPP})]^+$ gerada pelo programa computacional Scientific Instrument Services.

3.2.3. Síntese da metaloporfirina hidrossolúvel

a) Hexafluorofosfato de 5,10,15,20-tetraquis(3-metilpiridil)porfirinatobismuto(III) – [Bi(III)(T3MPyP)](PF₆)₅

O interesse em estudar as porfirinas hidrossolúveis de bismuto e antimônio advém dos resultados promissores obtidos nos testes biológicos das porfirinas hidrofóbicas. Esses resultados, que serão explicitados posteriormente, apontaram para o potencial desses complexos de Bi(III) e Sb(V) no estudo de novos fármacos para o tratamento da leishmaniose.

A metodologia de obtenção da [Bi(III)(T3MPyP)]⁵⁺ (Figura 45) descrita na literatura também utiliza piridina como solvente. Tentou-se, nesse trabalho, substituir a piridina por DMF, seguindo o método da [Bi(III)(T4MPP)]NO₃ e da [Bi(III)(T3,5DMPP)]NO₃ (discutidos anteriormente). Deixou-se a reação ocorrer durante vários dias, mas não se observou evolução alguma no decorrer da mesma. Todos os espectros registrados mostravam que só havia porfirina base livre na mistura.

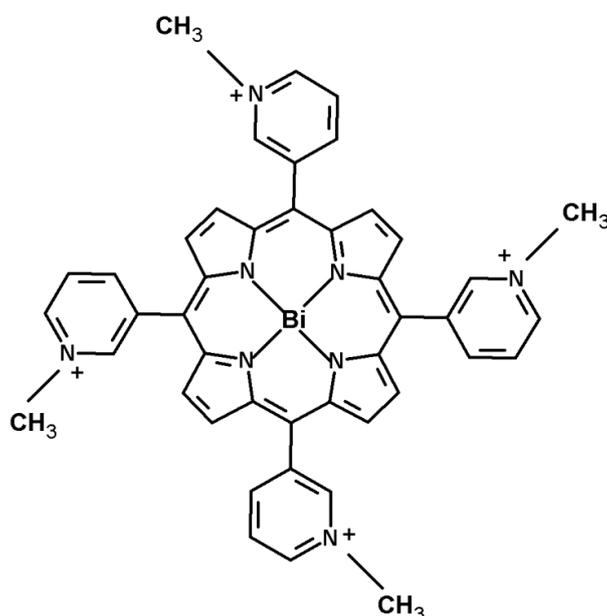


Figura 45. Representação da estrutura da [Bi(III)(T3MPyP)]⁵⁺.

Tentou-se, então, substituir o solvente por uma mistura de metanol:clorofórmio, em diferentes proporções (1:1, 2:1 e 3:1). Na proporção 3:1, pôde ser observada a mudança de cor

da porfirina de roxa para verde. Porém, o espectro eletrônico de absorção UV-vis da mesma mostrou que houve apenas a protonação dos hidrogênios N-pirrólicos da porfirina base livre (Figura 46). A protonação da porfirina foi comprovada por meio da adição de colidina à cubeta.

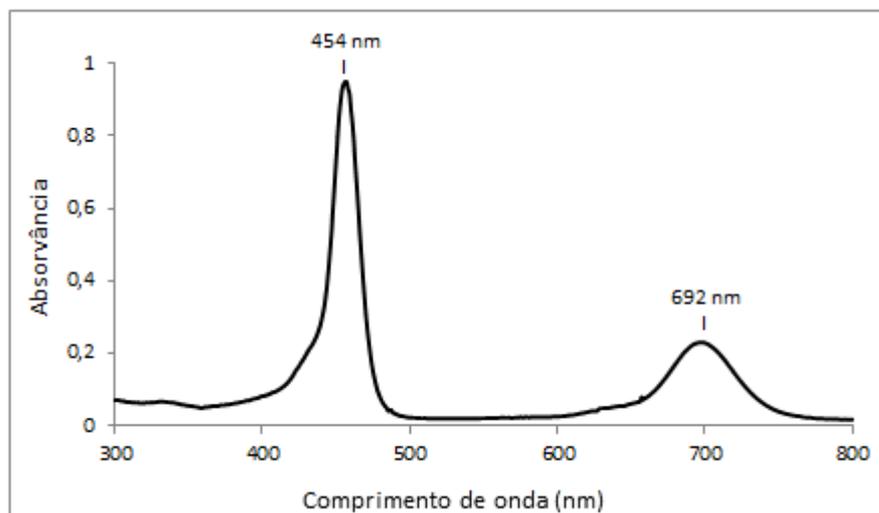


Figura 46. Espectro eletrônico UV-vis da $H_xT3MPyP^{(2+x)+}$ em CH_3OH . X pode ser igual a 3 ou 4.

Ao se avaliar o espectro eletrônico de absorção UV-vis da metaloporfirina $[Bi(III)(T3MPyP)]^{5+}$ (Figura 47), observa-se o surgimento da banda Soret em 461 nm (correspondente à $[Bi(III)(T3MPyP)]^{5+}$) e uma banda Soret menor em 415 nm, referente à base livre que não reagiu. O complexo $[Bi(III)(T3MPyP)]^{5+}$ apresenta um espectro *hiper* tipo *p*, com uma banda de absorção extra em $\lambda \sim 320$ nm.

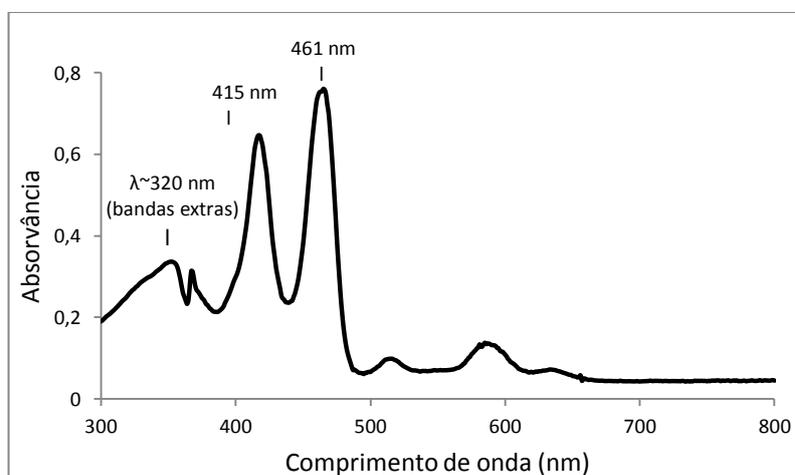


Figura 47. Espectro eletrônico de absorção UV-vis da $[Bi(III)T3MPyP]^{5+}$, em metanol.

Foram diversas as tentativas de metalação da $H_2T3MPyPCL_4$ com Sb e Bi, na expectativa de se obterem porfirinas hidrossolúveis de Sb(V) e Bi(III). Todos os métodos utilizados e testados foram resumidos na Tabela 1 (pág. 24). Entretanto, após inúmeras tentativas, com diversos sais e solventes, não houve sucesso na síntese de metaloporfirinas hidrossolúveis puras.

4. Capítulo 4. Avaliação da atividade antileishmania dos compostos de Bi(III) e Sb(V)

4.1. Procedimento experimental

Os testes de atividade antileishmania em promastigotas e amastigotas e de toxicidade em macrófagos peritoneais de camundongo foram realizados em colaboração com o professor Dr. Frédéric Frézard, do Departamento de Fisiologia e Biofísica, UFMG e com o pesquisador Dr. Rubens Lima do Monte Neto, do Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR/FIOCRUZ).

4.1.1. Avaliação *in vitro* da atividade antileishmania das porfirinas H₂T4CMPP, [Sb(V)Br₂(T4CMPP)]Br e [Bi(III)T4CMPP]NO₃

Foi realizada a avaliação da atividade dos compostos obtidos durante o mestrado da autora deste trabalho contra os parasitas *Leishmania* (*Leishmania amazonensis*).

Cultivo e manutenção dos parasitos

Os parasitas *Leishmania* (*Leishmania amazonensis*) (sensíveis e resistentes ao Sb(III)), na sua forma promastigota, foram incubados a 25°C em meio de cultura mínimo essencial (α -MEM), suplementado com: soro fetal bovino (FBS, 10%) inativado pelo calor, kanamicina (100 mg mL⁻¹), ampicilina (50 mg mL⁻¹), L-glutamina (2 mmol L⁻¹), hemina (5 mg mL⁻¹) e biopterina (5 mmol L⁻¹) [60]. Os *L. amazonensis* resistentes a Sb(III) foram selecionados em α -MEM na presença de concentrações crescentes de Sb(III) (tartarato de potássio e antimônio) até 2700 μ mol L⁻¹.

Avaliação da atividade antileishmania contra formas promastigotas do parasito

A atividade antileishmania foi avaliada por espectrofotometria no visível ($\lambda = 600$ nm) em promastigotas de *Leishmania amazonensis*, em cepas sensíveis e resistentes ao Sb(III), mediante a determinação da concentração do composto que inibe o crescimento celular dos parasitas em 50% (CI₅₀) em relação ao crescimento das parasitas não tratadas com os compostos, utilizando-se o programa GraphPad Prism 5.0 [61].

As formas promastigotas *L. amazonensis* em fase de crescimento logarítmica, foram diluídos em α -MEM e colocadas em placas de cultura de células com 24 poços contendo 1,5 mL de suspensão (meio de cultura e parasitas), com a concentração final de 1×10^6 parasitas mL⁻¹. As células foram incubadas na presença de diferentes concentrações dos compostos a serem testados, a 25°C, sob agitação constante durante 72 horas. Parasitas não tratados foram utilizados para comparação de crescimento. As soluções contendo as metaloporfirinas foram preparadas em DMF e posteriormente diluídas na cultura de células até a faixa de concentração do teste. A concentração final de DMF no meio não excede 0,1 %, a qual não é tóxica para os parasitas de *Leishmania*. Todas as análises foram realizadas em triplicata. As concentrações dos compostos estavam na faixa de 0 – 250 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Avaliação da toxicidade em macrófagos

A citotoxicidade dos compostos em relação aos macrófagos peritoneais de murino foi avaliada usando o clássico método do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT) [60]. Esse método baseia-se na capacidade das células viáveis intactas de reduzirem o sal de tetrazólio por ação de enzimas mitocondriais ou citoplasmáticas.

Os macrófagos foram obtidos por lavagem das cavidades peritoneais de camundongos com 10 mL de meio de cultura RPMI-1640 (Gibco, Invitrogen, Nova Iorque, EUA) frio e sem FBS. Após a lavagem, as células foram incubadas em placas de 96 poços, com o volume de células ajustado para $4,0 \times 10^6$ macrófagos por poço em um volume final de 0,1 mL. Os macrófagos foram deixados em repouso para aderirem às placas, a 37°C, durante 1 hora, e as células não aderentes foram removidas por lavagem com meio de cultura RPMI.

Os compostos sob estudo foram então adicionados aos poços em concentrações variadas, e as células foram incubadas em meio de cultura RPMI suplementado com 10 % de FBS, a 37°C em atmosfera de 5% CO₂ por 24 horas. Como controle positivo do experimento, macrófagos aderidos foram incubados na presença apenas de RPMI 1640 completo. Posteriormente, o meio de cultura foi substituído por um meio RPMI fresco contendo MTT (0,5 mg mL⁻¹) e as placas foram incubadas por mais 4 h. O sobrenadante de cada poço foi aspirado, e os cristais de formazan formados foram solubilizados em DMSO e as placas foram submetidas à leitura em espectrofotômetro, onde a densidade ótica foi lida em comprimento de onda de 570 nm. A viabilidade das células foi calculada a partir da razão entre a absorvância do formazano no poço contendo o composto em teste e a do poço sem o

composto. A concentração citotóxica (CC₅₀), a qual induz 50% de morte dos macrófagos, foi calculada utilizando-se o programa GraphPad Prism 5.0.

Avaliação da atividade antileishmania contra formas amastigotas intracelulares do parasito

Os macrófagos foram obtidos por lavagem das cavidades peritoneais de camundongos e deixados aderir diretamente nas placas de vidro microscópicas a uma densidade celular de 5×10^5 células por poço. Depois de duas horas, as células foram lavadas duas vezes, suavemente, com PBS (tampão fosfato-salino) para remover as células não-aderentes. As células aderentes foram cultivadas em α -MEM (suplementado com 10% de FBS e 100 unidades de penicilina / estreptomicina), a 34°C, numa atmosfera contendo 5% de CO₂. Os macrófagos foram infectados com promastigotas *L. amazonensis* em uma proporção de 10:1 (parasita:macrófago). Após 4 h, os macrófagos foram lavados com α -MEM para remover parasitas livres. O tratamento de células infectadas foi feito 24 h após a infecção com diferentes concentrações dos compostos ([Sb(V)(T4CMPP)Br₂]Br, H₂T4CMPP e glucantime[®]), durante 72 h a 34°C numa atmosfera contendo 5% de CO₂. As células foram então lavadas com PBS e coradas com um corante Panótico (fornecido pela LABORCLIN) de acordo com as instruções do fabricante. Para cada lamela, cerca de 250 macrófagos e o número médio de parasitas por macrófagos foram contados. Amastigotas individuais eram claramente visíveis no citoplasma dos macrófagos infectados. Os resultados foram expressos como o Índice de Infecção (II), que é obtido pela fórmula: $II = (\% \text{ de macrófagos infectados}) \times (\text{amastigotas} / \text{macrófagos infectados} / 100)$. O índice inibitório foi obtido.

4.1.2. Avaliação *in vitro* da atividade antileishmania das metaloporfirinas [Sb(V)BrCl(T4MPP)]Br; [Bi(III)(T4MPP)]NO₃; [Sb(V)BrCl(T3,5DMPP)]Br; [Bi(III)(T3,5DMPP)]NO₃; [Bi(III)(APTPP)]NO₃; [Bi(III)(NPTPP)]NO₃; *cis/trans*-[Bi(III)(DAPDPP)]NO₃; *cis/trans*-[Bi(III)(DNPDPP)]NO₃

Foi realizada a avaliação da atividade antileishmania dos compostos obtidos neste trabalho contra os parasitas *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Leishmania) infantum* e *Leishmania (Viannia) guyanensis*. Os testes foram realizados pelo pesquisador Dr. Rubens Lima do Monte Neto, do Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR/FIOCRUZ).

Cultivo e manutenção dos parasitos

As cepas de *Leishmania (Viannia) braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2904), *Leishmania (Leishmania) infantum* (MHOM/MA/67/ITMAP-263), *Leishmania (Viannia) guyanensis* (MHOM/BR/1975/M4147) e *Leishmania (L.) infantum* (MCAN/BR/2000/BH400) foram cultivadas em meio α -MEM suplementado com 10 % de soro bovino fetal, 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de hemina e 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de biópterina em pH 7 a 25°C.

Avaliação da atividade antileishmania contra formas promastigotas do parasito

Formas promastigotas de *L. braziliensis* e *L. infantum* em fase logarítmica de crescimento foram semeadas em placa de cultura celular de 24 poços contendo 1500 μL de meio α -MEM e incubadas sob agitação a 25°C durante 72 horas na presença de diferentes concentrações dos complexos das metaloporfirinas diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO). Parasitas não tratados foram considerados como controles na comparação dos perfis de crescimento. A atividade antileishmania foi expressa na CI_{50} . Análise de regressão não linear foi utilizada na construção do perfil de sensibilidade as drogas.

Avaliação da toxicidade em macrófagos

Macrófagos diferenciados derivados da linhagem monocítica imortalizada humana – THP-1, e fibroblastos murinos da linhagem L929 foram mantidos em meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 10% de soro bovino fetal, 2 mmol L^{-1} de Glutamina, 100 U/mL de penicilina e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de estreptomicina. O percentual de viabilidade celular foi medido pela contagem diferencial de células na presença do azul de trypan. A concentração citotóxica (CC_{50}) foi determinada pelo emprego do método colorimétrico clássico de viabilidade celular utilizando o reagente MTT. Os macrófagos foram semeados em placas de cultura celular de 96 poços contendo 0,1 mL de meio RPMI. Diferentes concentrações dos complexos foram adicionadas à cultura e as placas foram incubadas 24 h a 37°C em atmosfera úmida contendo 5 % de CO_2 . Após este período, o meio foi substituído por RPMI contendo 0,5 mg mL^{-1} de MTT e as placas foram incubadas por 4 horas adicionais. Os sobrenadantes foram removidos e os cristais foram solubilizados em DMSO. A medida de absorbância a 570 nm foi aferida para a obtenção do perfil de viabilidade celular.

Avaliação da atividade antileishmania contra formas amastigotas intracelulares do parasito

Esse ensaio foi realizado conforme descrito no item ‘Avaliação da atividade antileishmania contra formas amastigotas intracelulares do parasito’ (pág. 60).

4.2. Resultados e discussão

4.2.1. Avaliação *in vitro* da atividade antileishmania

Avaliação da atividade antileishmania contra formas promastigotas e amastigotas do parasito

Inicialmente, o ligante H₂T4CMPP e os seus complexos [Sb(V)Br₂(T4CMPP)]Br e [Bi(III)T4CMPP]NO₃ (Figura 48), obtidos durante o período do mestrado da autora deste trabalho, foram avaliados quanto à sua atividade contra as estirpes de Leishmania da espécie *L. amazonensis*, relacionado à forma cutânea da doença [62].

Surpreendentemente, o ligante mostrou atividade leishmanicida (Tabela 8, pág. 63) com valores de CI₅₀ em cerca de 53 μmol L⁻¹ para Leishmania resistente e de 94 μmol L⁻¹ para Leishmania sensível ao sal de Sb(III), ou seja, o ligante foi 1,77 vezes mais ativo na estirpe resistente.

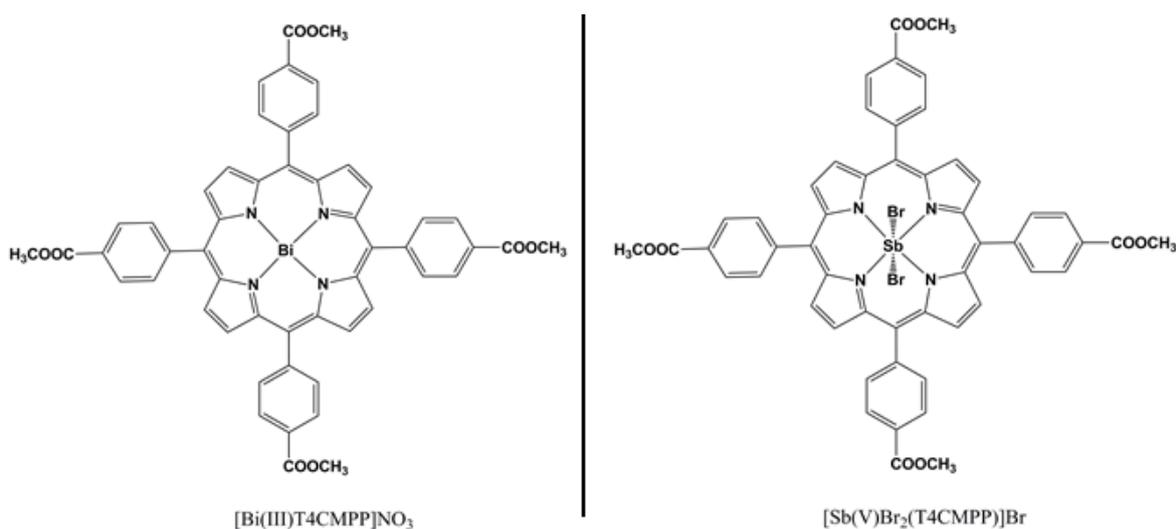


Figura 48. Estruturas das porfirinas obtidas durante o período de mestrado

Para avaliar o impacto da complexação de Sb(V) e Bi(III) ao ligante porfirina sobre sua atividade antileishmania, os valores de CI_{50} foram comparados entre o ligante e os seus respectivos complexos (Tabela 8).

Tabela 8. Concentrações inibitórias do crescimento (CI_{50}) do H₂T4CMPP e de seus complexos de Sb(V) e Bi(III) para *Leishmania amazonensis* sensível (SbS) e resistente (SbR) ao sal de Sb(III).

| ^a $CI_{50} \pm EPM (\mu\text{mol L}^{-1})$ | | |
|---|-----------------------|-----------------------|
| Composto | <i>L. amazonensis</i> | <i>L. amazonensis</i> |
| | SbS | SbR |
| H ₂ T4CMPP | 94 ± 1 | 52 ± 1 |
| Bi(III)T4CMPP(NO ₃) | > 100 | > 100 |
| [Sb(V)Br ₂ (T4CMPP)]Br | 4 ± 1 | 1,0 ± 0,2 |
| ^b TA | 110 ± 1 | > 3000 |

^a CI_{50} : concentração do composto que inibe 50% do crescimento do parasita;

EPM: erro padrão da média;

SbS: sensível ao sal de Sb(III);

SbR: resistente ao sal de Sb(III);

^bTA: tartarato de potássio e antimônio como fonte de Sb(III).

O complexo de Sb(V) também se mostrou mais ativo na estirpe resistente ao Sb(III) do que na sensível, e mostrou surpreendentemente baixos valores de CI_{50} , 1,2 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 4,4 $\mu\text{mol L}^{-1}$ respectivamente. Esses dados contrastam com o que se obteve com o complexo tartarato de antimônio (III) de potássio, que é praticamente inativo contra espécies resistentes a Sb(III), com CI_{50} de 110 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para estirpes sensíveis.

Diferente do antimônio, a complexação com bismuto resultou em redução da atividade em relação ao ligante. Na concentração máxima possível de ser avaliada, 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$, nenhuma atividade leishmanicida foi observada.

Devido ao bom desempenho da [Sb(V)Br₂(T4CMPP)]Br contra a forma promastigota, este composto foi também testado contra amastigotas intracelulares no modelo macrófago-infectado, o qual reproduz de forma mais próxima a condição de infecção no hospedeiro mamífero. O complexo mostrou 50% de redução do índice de infecção em 72,8 ± 1,3 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para as estirpes resistentes e 53,0 ± 1,2 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para as sensíveis. Surpreendentemente, o complexo foi muito mais ativo do que a droga convencional, glucantime[®], que apresenta 50%

de redução do índice de infecção em $6797 \pm 836 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Sb para as estirpes sensíveis e não mostra redução significativa para as estirpes resistentes em concentrações tão altas quanto 16 mmol L^{-1} de Sb. O ligante foi ativo em uma concentração mais elevada do que $100 \mu\text{mol L}^{-1}$, mas o valor não pôde ser determinado com precisão por causa da limitação da solubilidade $\text{H}_2\text{T4CMPP}$.

Como possíveis explicações para a menor atividade do complexo contra a forma amastigota intracelular, comparado para a forma promastigota, o complexo pode ser parcialmente inativado pelo macrófago, a sua captação pelos parasitas pode ser limitada devido à sua localização intracelular dentro do vacúolo parasitóforo, ou os amastigotas podem apresentar sensibilidade inferior ao fármaco em comparação com os promastigotas.

Uma vez que, apenas a complexação com antimônio resultou em um composto ativo, esse complexo e o seu ligante também foram avaliados quanto à sua citotoxicidade contra os macrófagos. Como sabemos estas são umas das células hospedeiras de mamíferos nas quais o parasita *Leishmania* reside; assim, pretende-se determinar o índice de seletividade parasita-hospedeiro para os compostos em estudo.

Quando se compara o ligante com o seu complexo de Sb(V) é observado que a complexação aumenta a citotoxicidade (Tabela 9, pág. 65). As concentrações citotóxicas (CC_{50}) foram de aproximadamente $263 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $468 \mu\text{mol L}^{-1}$ para o complexo e o ligante, respectivamente.

Foi calculado também o índice de seletividade (IS), que é a razão entre CC_{50} em macrófagos e CI_{50} nas estirpes de *Leishmania*. O IS mede o quanto um composto é ativo contra o parasita sem causar danos à viabilidade das células de mamíferos. O IS é obtido dividindo-se o CC_{50} pelo IC_{50} : quanto maior esta razão, mais seletiva é a droga sobre o parasita e, conseqüentemente, menor efeito ela tem sobre a célula hospedeira de mamífero (macrófago). O complexo apresenta IS cerca de 10 vezes e 20 vezes maior que o ligante e que o tartarato de antimônio e potássio. Esses resultados revelam que este composto possui grande potencial como um novo fármaco para o tratamento da leishmaniose.

Tabela 9. Citotoxicidade do ligante porfirina e do complexo de Sb(V) contra macrófagos peritoniais de camundongos e índice seletivo resultante.

| Composto | ^a CC ₅₀ (μmol L ⁻¹) | ^b IS (<i>L. amazonensis</i>) | ^b IS (<i>L. amazonensis</i>) |
|-----------------------------------|---|---|---|
| | macrófagos | SbS | SbR |
| H ₂ T4CMPP | 467 ± 1 | 4,98 | 8,91 |
| [Sb(V)Br ₂ (T4CMPP)]Br | 263 ± 8 | 59,35 | 213,74 |
| TA | 63 ± 1 | 0,57 | < 0,021 |

^aCC₅₀: concentração do composto que mata 50% dos macrófagos de acordo com o ensaio de MTT;

^bIS: índice seletivo, calculado como a razão entre CC₅₀ em macrófagos murinos e CI₅₀ nas estirpes de *Leishmania* ;

SbS: sensível ao sal de Sb(III);

SbR: resistente ao sal de Sb(III);

^bTA: tartarato de potássio e antimônio como fonte de Sb (III).

Posteriormente, os complexos [Sb(V)(T4MPP)BrCl]Br; [Bi(III)(T4MPP)]NO₃; [Sb(V)BrCl(T3,5DMPP)]Br; [Bi(III)(T3,5DMPP)]NO₃; [Bi(III)(APTPP)]NO₃; [Bi(III)(NPTPP)]NO₃; *cis/trans*-[Bi(III)(DAPDPP)]NO₃; *cis/trans*-[Bi(III)(DNPDP)]NO₃ (obtidos neste trabalho) e seus ligantes foram avaliados quanto à sua atividade contra as formas *Leishmania (Viannia) braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2904), *Leishmania (Leishmania) infantum* (MHOM/MA/67/ITMAP-263), *Leishmania (Viannia) guyanensis* (MHOM/BR/1975/M4147), *Leishmania (L.) infantum* (syn. *L. chagasi*) (MCAN/BR/2000/BH400), e *Leishmani amazonensis*. Porém, apenas o [Sb(V)BrCl(T4MPP)]Br mostrou atividade leishmanicida. As demais porfirinas precipitavam em concentrações maiores que 10 μmol L⁻¹. Os resultados de CI₅₀, CC₅₀ e IS se encontram no Tabela 10 (pág. 66).

Tabela 10. Concentrações inibitórias do crescimento (CI₅₀) dos ligantes e de seus complexos de SB(V) e Bi(III).

| Cepa | Porfirinas - CI ₅₀ ou CC ₅₀ (µmol L ⁻¹) - promastigotas | | | IS [Sb(V)BrCl(T4MPP)]Br | |
|--|---|----------------------|----------------------|----------------------------|-------|
| | [Bi(III)T4MPP]NO ₃ | [Sb(V)BrCl(T4MPP)]Br | H ₂ T4MPP | THP-1 | L929 |
| <i>L. major</i> Friedlin | > 10 | 0,26 (0,24-0,28) | > 10 | 7,70 | 7,70 |
| <i>L. infantum</i> Ldi 263 | > 10 | 0,88 (0,78-0,98) | > 10 | 2,27 | 2,27 |
| <i>L. chagasi</i> BH400 WT | > 10 | 0,70 (0,62-0,80) | > 10 | 2,85 | 2,85 |
| <i>L. amazonensis</i> BA199 | > 10 | 0,33 (0,29-0,37) | > 10 | 6,06 | 6,06 |
| <i>L. guyanensis</i> M4147 | > 10 | 0,15 (0,12-0,18) | > 10 | 13,33 | 13,33 |
| <i>L. braziliensis</i> M2904 | > 10 | 0,52 (0,45-0,58) | > 10 | 3,85 | 3,85 |
| <i>L. infantum</i> Ldi Sb2000.1 | > 10 | | > 10 | | |
| <i>L. chagasi</i> BH400 Sb2700.2 | | 0,94 (0,90-1,00) | | 2,17 | 2,17 |
| <i>L. amazonensis</i> BA199 Sb2700.3 | > 10 | 0,12 (0,11-0,14) | > 10 | 16,66 | 16,66 |
| <i>L. guyanensis</i> M4147 Sb650.4 | > 10 | 0,18 (0,16-0,20) | > 10 | 11,11 | 11,11 |
| <i>L. braziliensis</i> M2904 Sb640.2 | > 10 | 0,85 (0,78-0,91) | > 10 | 2,38 | 2,38 |
| <i>L. guyanensis</i> M4147 Sb650.4 | - | 0,23 (0,18-0,29) | | 8,70 | 8,70 |
| <i>L. infantum</i> Ldi263 (amastigotas) | > 10 | 0,016 (0,01-0,02) | > 10 | 125 | 125 |
| THP-1 | > 25 | 2 (1,76-2,24) | > 25 | | |
| L929 | > 25 | 2 (1,54-2,58) | > 25 | | |

CI₅₀: concentração que inibe em 50% o crescimento dos parasitas;

CC₅₀: concentração que reduz em 50% a viabilidade de macrófagos (THP-1 e L929)

IS: índice seletivo

Os complexos [Sb(V)BrCl(T4MPP)]Br; [Bi(III)(T4MPP)]NO₃; [Sb(V)BrCl(T3,5DMPP)]Br; [Bi(III)(T3,5DMPP)]NO₃; [Bi(III)(APTPP)]NO₃; [Bi(III)(NPTPP)]NO₃; *cis/trans*-[Bi(III)(DAPDPP)]NO₃; *cis/trans*-[Bi(III)(DNPDPP)]NO₃ foram testados, mas apenas o [Sb(V)BrCl(T4MPP)]Br apresentou significativa atividade leishmanicida (Tabela 10), com valores de CI₅₀ variando de 0,12 µmol L⁻¹ para a espécie *L. amazonensis* BA199 Sb2700.3 até 0,94 µmol L⁻¹ para *L. chagasi* BH400 Sb2700.2.

Os demais complexos apresentaram CI₅₀ maiores que 10 µmol L⁻¹, e a partir dessa concentração não foi mais possível medir a atividade leishmanicida, pois eles precipitavam e coloriam o meio de cultura.

Devido ao bom desempenho do [Sb(V)BrCl(T4MPP)]Br contra a forma promastigota, este composto foi também testado contra amastigotas intracelulares no modelo macrófago-infectado, o qual reproduz de forma mais próxima a condição de infecção no hospedeiro mamífero. A cepa utilizada foi a *L. infantum* Ldi 263. O complexo apresentou um valor de

CI₅₀ igual a 0,016 $\mu\text{mol L}^{-1}$, ou seja, menor que os demais valores para promastigotas. Além disso, o seu índice de seletividade também foi maior que para as formas promastigotas, apresentando um valor de IS = 125 (Tabela 10, pág. 66). Isso faz desse complexo um composto ativo contra o parasito sem causar grandes danos à viabilidade dos macrófagos.

5. Capítulo 5. Avaliação da inibição da biossíntese de ergosterol

5.1. Procedimento experimental

5.1.1. Avaliação da inibição da biossíntese de ergosterol por CCD

Extração dos lipídeos

Os lipídios neutros de promastigotas *L. amazonensis* foram extraídos tal como descrito por Andrade-Neto e colaboradores [63]. Os promastigotas *L. amazonensis* (1×10^6 parasitas mL^{-1}) foram incubados a 26°C em meio α -MEM na presença do complexo $[\text{Sb(V)Br}_2(\text{T4CMPP})]\text{Br}$, concentração $\text{CI}_{50} = 4,4 \mu\text{mol L}^{-1}$. Após 72 h, a amostra foi centrifugada e lavada três vezes com um grande volume de PBS. Ao sedimento resultante foi adicionado uma mistura de metanol:clorofórmio:água (10:5:4), que ficou em repouso durante 1 hora. A amostra foi então centrifugada durante 20 minutos a 3000 rpm, e o sobrenadante contendo os lípidos foi coletado e adicionado à 3 mL de uma mistura água:clorofórmio (1:1). Após 40 segundos de agitação no vórtex, o material foi centrifugado (3000 rpm/30 min). A fase lipídica foi então separada, e o solvente foi evaporado [63].

Análise do perfil de esteróis por CCD

Os lípidos obtidos foram dissolvidos em clorofórmio e separados por CCD em placa de sílica (Silica Gel). A CCD foi executada em duas etapas: na primeira etapa, a fase móvel constituída de hexano:éter:ácido acético (60:40:1) subiu até metade da placa. Posteriormente, após a secagem da placa, usou-se uma segunda fase móvel com hexano:clorofórmio:ácido acético (80:20:1). A placa de CCD foi revelada com vapor de iodo [63].

5.1.2. Avaliação da inibição da biossíntese de ergosterol por Cromatografia a Gás Acoplada a Espectrometria de massas (GC/MS)

Os ensaios de avaliação da inibição da biossíntese de ergosterol foram realizados em colaboração com os pesquisadores Dr. Rubens Lima do Monte Neto, do Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR/FIOCRUZ) e Dr. Valter Viana de Andrade Neto (FIOCRUZ/RJ).

Extração dos lipídeos

Promastigotas de *L. infantum* foram incubados: na ausência ou presença de $4 \mu\text{mol L}^{-1}$ de miconazol, $0,2 \mu\text{mol L}^{-1}$ do complexo $[\text{Sb(V)BrCl(T4MPP)}]\text{Br}$, $0,2 \mu\text{mol L}^{-1}$ do complexo $[\text{Bi(III)T4MPP}]\text{NO}_3$, em 20 mL de meio de cultura por 72 horas. Após esse período, as culturas foram lavadas três vezes em tampão PBS e os esteróis foram extraídos usando o método de Bligh e Dyer [65]. Foram adicionados as amostras metanol, clorofórmio e água (2:1:0,5 v/v). Após a agitação da mistura de 5 em 5 minutos por 1 hora, a solução foi centrifugada por 20 minutos a 3.000 rpm e o sobrenadante, contendo os lipídeos, foi separado do precipitado. O precipitado foi submetido a uma segunda extração, tendo sido adicionados os mesmos solventes como descrito acima, seguindo-se agitação de 5 em 5 minutos por 1 hora, e nova centrifugação. Os sobrenadantes foram unificados e a eles adicionados água destilada e clorofórmio (1:1 v/v). Após 40 segundos de agitação, o material foi novamente centrifugado (3.000 rpm/30 min). A fase inferior (orgânica), contendo os lipídeos, foi então separada com o auxílio de seringa de vidro e transferida para tubos de vidro. O solvente foi evaporado por arraste de nitrogênio gasoso (N_2) e os lipídeos analisados por cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas (GC/MS), conforme descrito a seguir [63, 66].

Análise do perfil de esteróis por Cromatografia a Gás Acoplada à Espectrometria de massas (GC/MS)

Para a separação e identificação dos esteróis foi utilizada a cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas (GC/MS). As amostras foram injetadas no equipamento CG-EM. Após a injeção, a temperatura da coluna foi mantida a 50°C por 1 minuto e então aumentada para 270°C na razão de $10^\circ\text{C}/\text{min}$ e finalmente para 300°C na razão de $1^\circ\text{C}/\text{min}$. O fluxo do gás (He) foi mantido constante a $1,1 \text{ mL}/\text{min}$. Foi utilizada coluna HP-ULTRA 2 (comprimento = 25 m; diâmetro = 0,200 mm; espessura do filme = 0,33 micrometros). As temperaturas do injetor e do detector foram de 250°C e 280°C , respectivamente [66, 67].

5.2. Resultados e discussão

5.2.1. Avaliação da inibição da biossíntese de ergosterol

O desenvolvimento de novos fármacos contra leishmaniose é uma área de pesquisa prioritária. Assim, a identificação de novos alvos no parasita é uma estratégia muito importante. O fato de que tripanosomatídeos sintetizem derivados de ergosterol em vez de colesterol sugere que esta via é um bom alvo para fármacos com atividade leishmanicida. Na realidade, todos os inibidores da biossíntese de esterol conhecidos exibem potente atividade tripanocida e leishmanicida *in vitro* [63].

O ergosterol é o principal esterol da membrana de *Leishmania* e fungos patogênicos e a sua síntese e incorporação em membranas celulares são essenciais para o crescimento e replicação. O grupo de compostos antifúngicos azólicos inibe a enzima C14 α -desmetilase, que é responsável pela conversão de lanosterol para o ergosterol. O fluconazol é um triazol eficaz no tratamento de leishmaniose, e o cetoconazol é um imidazol que tem se mostrado ativo contra variadas espécies de *Leishmania* [69].

5.2.2. Análise do perfil de esteróis de por CCD

Estirpes sensíveis de promastigotas *L. amazonensis* foram tratadas com [Sb(V)Br₂(T4CMPP)]Br na concentração 4,4 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (CI₅₀) durante 72 h (Tabela 8, pág. 63), e o seu teor de esterol foi analisado qualitativamente por CCD.

Como esperado, quando os promastigotas foram tratados com a droga nessa concentração, foi inibido 50% do seu crescimento. A Figura 49a (pág. 71) representa a placa de sílica após a separação dos lipídios e a revelação com iodo. A separação foi feita para o controle (parasitas não tratados) e para os parasitas tratados com o complexo [Sb(V)Br₂(T4CMPP)]Br. A Figura 49b (pag. 71) retrata uma separação de lipídios de acordo com a literatura para comparação [63].

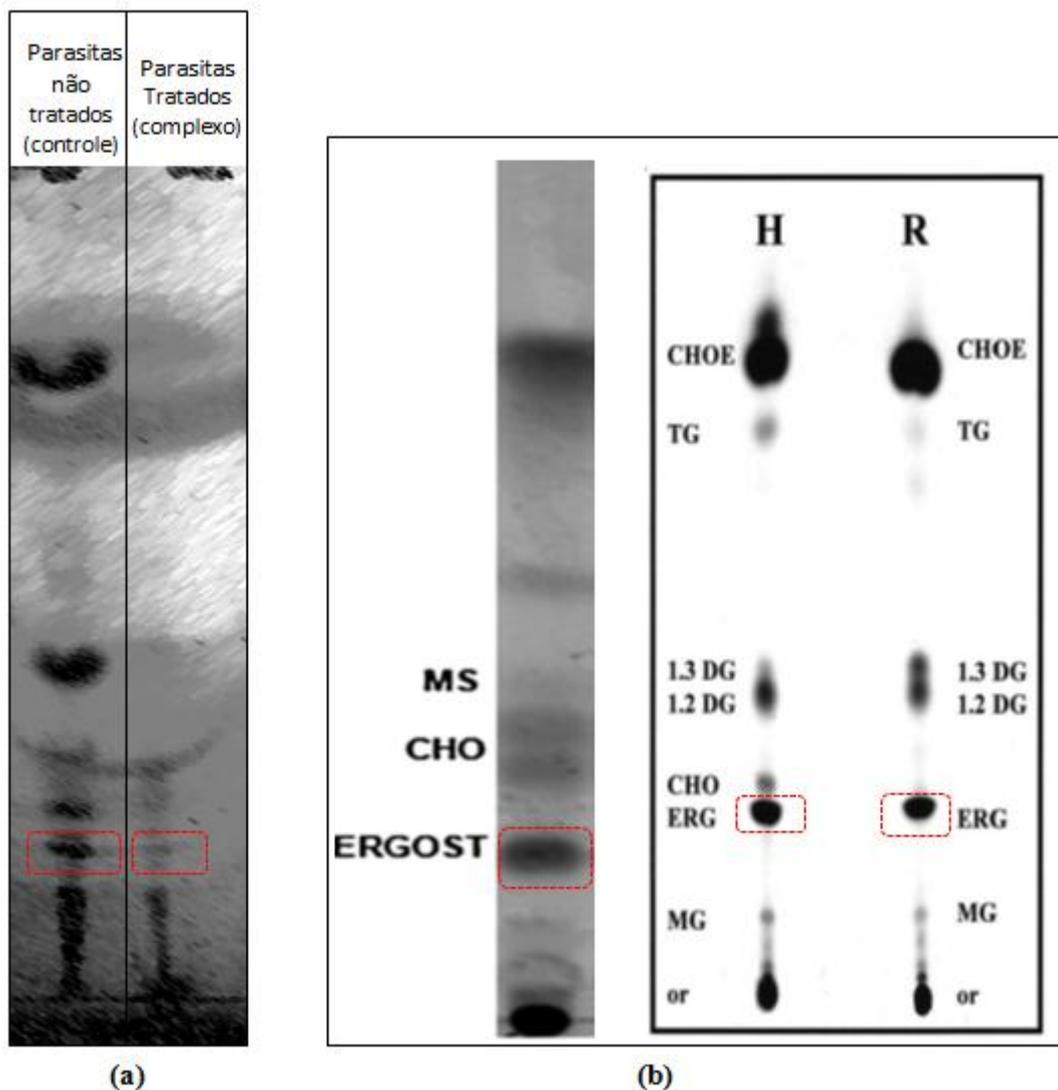


Figura 49. (a) A placa de sílica após a separação dos lipídios, para os parasitas tratados com o complexo e para os não tratados; (b) duas placas de sílica que retratam separações de lipídios de acordo com a literatura. As manchas destacadas em vermelho nas placas correspondem ao ergosterol. CHO – colesterol; ERGOST/ERG – ergosterol; MS – esteróis metilados; DG – diacilglicerol; CHOE – colesterol esterificado; TG - triglicerídeos [63, 64]. Fonte: Andrade-Neto *et al.*, 2011.

Pela análise da Figura 49(a), percebe-se uma diminuição significativa da mancha correspondente ao ergosterol nos parasitas tratados com o composto $[Sb(V)Br_2(T4CMPP)]Br$ em relação ao controle.

Tendo em vista esses resultados, o composto citado mostra potencial para ser um novo candidato a fármaco leishmanicida, cujo mecanismo de ação pode ser a inibição da biossíntese do ergosterol, que é o principal esterol de membrana de *Leishmania*.

5.2.3. Análise do perfil de esteróis por Cromatografia a Gás Acoplada à Espectrometria de massas (GC/MS)

Conforme descrito anteriormente, o ergosterol é o principal esteroide de membrana de *Leishmania* e fungos e são essenciais para o seu crescimento.

Os lipídeos foram extraídos dos promastigotas de *L. infantum* não tratados (controle) e daqueles tratados com miconazol ($4 \mu\text{mol L}^{-1}$), $[\text{Sb(V)BrCl(T4MPP)}]\text{Br}$ ($0,2 \mu\text{mol L}^{-1}$) e $[\text{Bi(III)T4MPP}]\text{NO}_3$ ($0,2 \mu\text{mol L}^{-1}$). Após análise por cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas (CG/EM), foram obtidos os cromatogramas representados nas Figuras 50 a 53 (pág. 72 e 73). Os números acima de cada pico são identificados na Tabela 11 (pág.74).

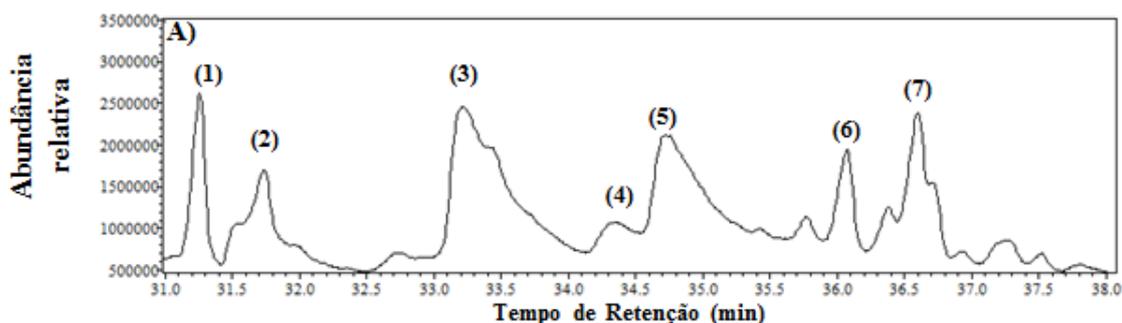


Figura 50. Cromatograma dos lipídeos extraídos dos promastigotas de *L. infantum* não tratados (controle).

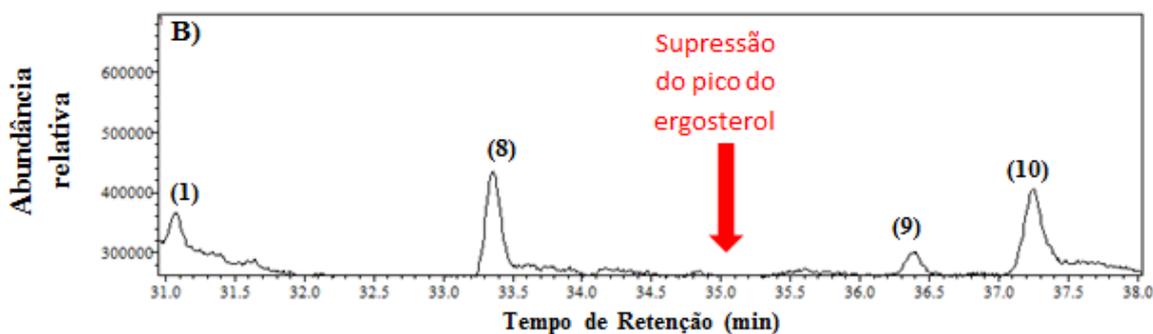


Figura 51. Cromatograma dos lipídeos extraídos dos promastigotas de *L. infantum* tratados com miconazol ($4 \mu\text{mol L}^{-1}$).

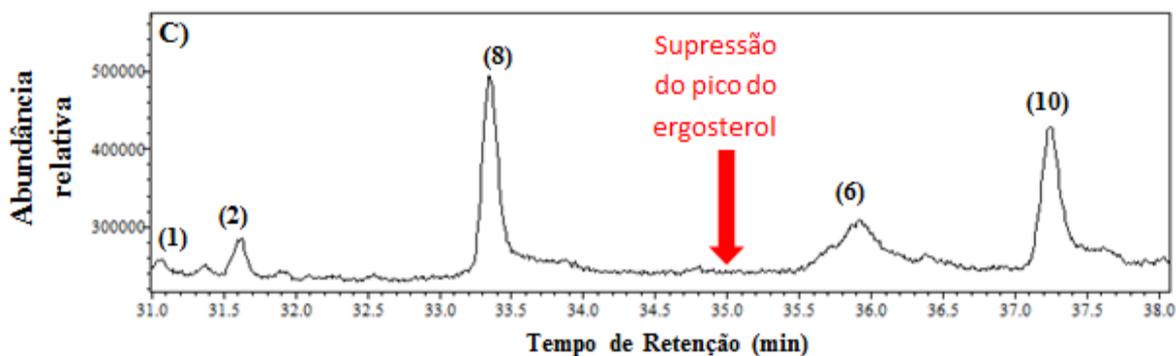


Figura 52. Cromatograma dos lipídeos extraídos dos promastigotas de *L. infantum* tratados com $[\text{Sb(V)BrCl(T4MPP)}]\text{Br}$ ($0,2 \mu\text{mol L}^{-1}$).

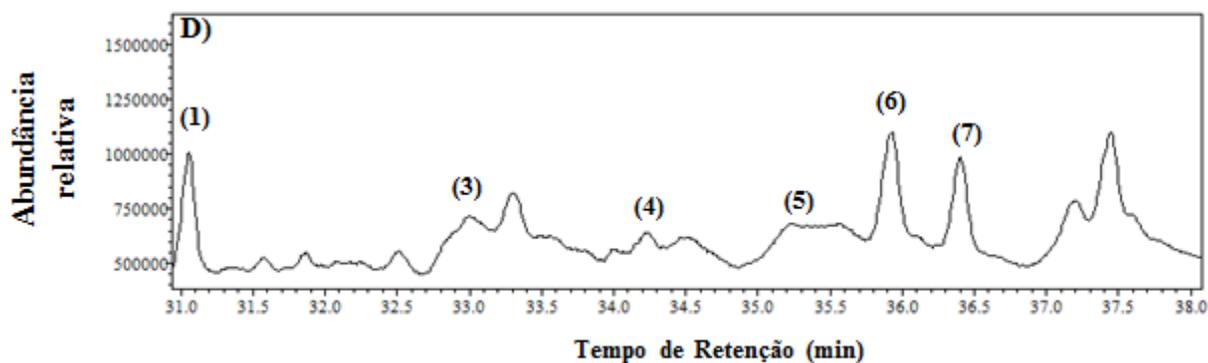
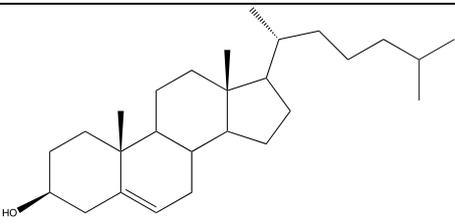
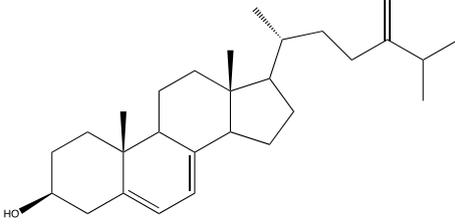
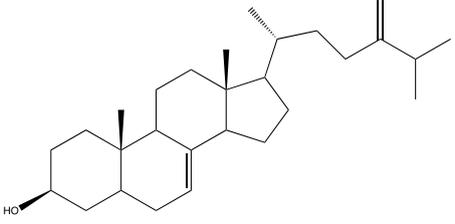
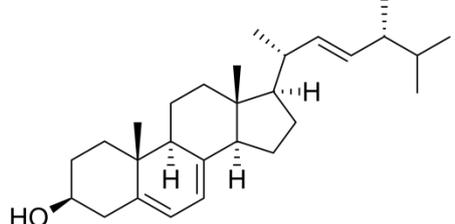


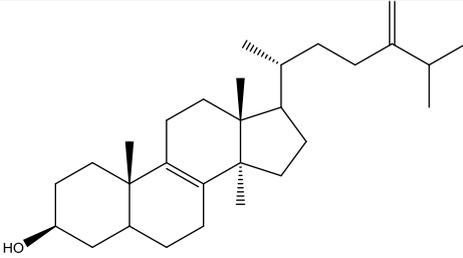
Figura 53. Cromatograma dos lipídeos extraídos dos promastigotas de *L. infantum* tratados com $[\text{Bi(III)T4MPP}]\text{NO}_3$ ($0,2 \mu\text{mol L}^{-1}$).

A partir da análise dos cromatogramas (Figuras 50 a 53), percebe-se que há acúmulo de intermediários lipídicos e desaparecimento do pico do ergosterol em *L. infantum* na presença de miconazol e do $[\text{Sb(V)BrCl(T4MPP)}]\text{Br}$. Isso não foi observado para o controle (não tratado) e nem com a $[\text{Bi(III)T4MPP}]\text{NO}_3$.

Na Tabela 11 (pág. 74) tem-se o efeito dos complexos $[\text{Sb(V)BrCl(T4MPP)}]\text{Br}$ e $[\text{Bi(III)T4MPP}]\text{NO}_3$, do miconazol e do controle não tratado sobre a composição de esteróis de promastigotas de *L. infantum*.

Tabela 11. Efeito do miconazol (1) e dos complexos [Sb(V)BrCl(T4MPP)]Br (2) e [Bi(III)(T4MPP)]NO₃ (3) sobre a composição de esteróis de promastigotas de *L. infantum*.

| Esteróis | M (g mol ⁻¹) | CTR | 1 | 2 | 3 |
|---|--------------------------|------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|
| | | 4 μmol L ⁻¹ | 0,2 μmol L ⁻¹ | 0,2 μmol L ⁻¹ | Quantidade Relativa (%) |
|  <p>(1) Cholesterol (exogenous)</p> | 386 | 11,74 | 9,57 | 1,22 | 20,03 |
| (2) Esterol não identificado (ND) | - | 10,31 | - | 6,39 | - |
|  <p>(3) Ergosta-5,7,24-trien-3β-ol (desidroepisterol)</p> | 396 | 35,44 | - | - | 13,92 |
|  <p>(4) Ergosta-7,24-dien-3β-ol (Episterol)</p> | 398 | 2,51 | - | - | 3,18 |
|  <p>(5) Ergosterol (ergosta-5,7,22-trien-3β-ol)</p> | 396 | 19,08 | - | - | 25,5 |

| Esteróis | M (g mol ⁻¹) | CTR | 1 | 2 | 3 |
|---|--------------------------|-------|------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | | | 4 μmol L ⁻¹ | 0,2 μmol L ⁻¹ | 0,2 μmol L ⁻¹ |
| Quantidade Relativa (%) | | | | | |
| (6) Esterol não identificado (ND) | - | 7,44 | - | 18,55 | 19,09 |
| (7) Esterol não identificado (ND) | - | 13,48 | - | - | 18,19 |
|  (8) 14α-metilergosta-8,24 (24 ¹)- dieno-3β-ol | 412 | - | 43,21 | 40,42 | - |
| (9) Esterol não identificado (ND) | - | - | 8 | - | - |
| (10) Esterol não identificado (ND) | - | - | 39,22 | 33,47 | - |

M – Massa molar do esterol.

CTR – Controle não tratado com o complexo

Quantidade relativa (%) – O programa de análise dos picos dos cromatogramas calcula a área sob a curva de cada pico. A soma das áreas de todos os picos equivale a 100%.

Comparando-se o comportamento apresentado pelo miconazol com aquele do complexo [Sb(V)BrCl(T4MPP)]Br, podemos inferir que este também pode estar agindo como um inibidor da enzima C-14 desmetilase na biossíntese do ergosterol.

Esses resultados também indicaram o potencial dos complexos na inibição da biossíntese de ergosterol.

6. Capítulo 6. Interação com *calif-thymus* DNA (CT-DNA)

6.1. Procedimento experimental

As análises foram feitas utilizando-se espectroscopia de absorção na região do UV-vis. A solução estoque de CT-DNA foi preparada em tampão universal e sua concentração foi determinada por espectroscopia UV-vis. Os cálculos foram feitos baseando-se na lei de Beer, que relaciona a absorvidade molar (ϵ) com a concentração. Para o CT-DNA, quando $\lambda = 260$ nm, ϵ é igual a $6.600 \text{ mol L}^{-1} \text{cm}^{-1}$ [70, 71].

A solução estoque de DNA foi preparada por solubilização de CT-DNA no tampão universal. Após a solubilização, a solução foi mantida em geladeira [70].

As soluções estoque das metaloporfirinas foram preparadas em DMF e posteriormente diluídas em tampão universal até a concentração ideal para a realização do estudo visando determinar as possíveis interações com o CT-DNA.

Na cubeta, foram adicionados 2 mL da solução de tampão universal e uma alíquota da solução estoque de cada complexo, conforme indicado na Tabela 12.

Tabela 12. Dados experimentais da interação com CT-DNA.

| Complexo | Concentração da solução estoque em DMF (mmol L^{-1}) | Concentração do complexo na cubeta (mmol L^{-1}) |
|-----------------------------------|---|---|
| [Bi(III)(APTPP)]NO ₃ | 1,16 | 0,017 |
| [Sb(V)BrCl(T4MPP)]Br | 3,81 | 0,015 |
| [Sb(V)Br ₂ (T4CMPP)]Br | 2,85 | 0,056 |

As soluções dos complexos foram tituladas com a solução estoque do CT-DNA. Na Tabela 13 (pág. 77), estão listados os volumes da solução de CT-DNA adicionados e as concentrações dos complexos após cada adição de DNA.

Tabela 13. Alíquotas da solução de CT-DNA adicionadas e concentração dos complexos na cubeta.

| Complexo | Adições de alíquotas de DNA (μL)/ concentração dos complexos na cubeta (mmol/L) | | | | | |
|-----------------------------------|--|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| | 1 ^a | 2 ^a | 3 ^a | 4 ^a | 5 ^a | 6 ^a |
| [Bi(III)(APTPP)]NO ₃ | 50/ 0,0167 | 20/ 0,0166 | 20/ 0,0164 | 20/ 0,0163 | 20/ 0,0161 | 50/ 0,0157 |
| [Sb(V)BrCl(T4MPP)]Br | 10/ 0,0151 | 10/ 0,0150 | 10/ 0,0149 | 10/ 0,01485 | 10/ 0,01481 | - |
| [Sb(V)Br ₂ (T4CMPP)]Br | 10/ 0,0556 | 10/ 0,0553 | 10/ 0,0551 | 10/ 0,0548 | 10/ 0,0545 | - |

Foi adotado um período de incubação de 30 minutos e a varredura foi realizada na região de 200 a 800 nm. Os espectros obtidos foram ajustados à equação de Scatchard (Equação 1, pág. 79), para se determinar as constantes de ligação (K_b).

6.2. Resultados e discussão

O DNA (Figura 54, pág. 78) é uma macromolécula formada por uma fita dupla, composta por blocos repetitivos, cada um deles contendo uma base nitrogenada, um grupo fosfato e uma molécula do açúcar 2'-desoxi-D-ribose. As bases nitrogenadas são comumente as bases as pirimídicas citosina (C) e timina (T), e púricas adenina (A) e guanina (G). A estrutura de dupla hélice apresentada pelo DNA é mantida unida por ligações de hidrogênio entre bases nitrogenadas [72].

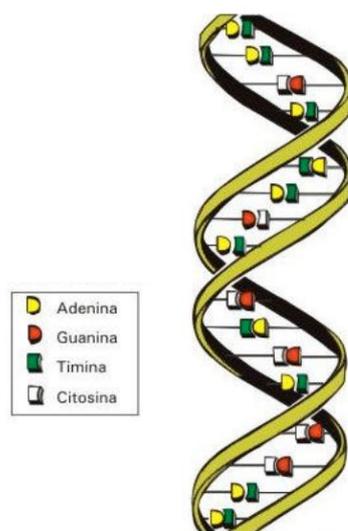


Figura 54. Estrutura em dupla hélice do DNA [73]. Fonte: Árias, G., 2004.

O Ácido Desoxirribonucléico (DNA) transporta todas as informações genéticas de um organismo, o que o torna um alvo interessante de diversos medicamentos [74]. Essa interação entre o fármaco e o DNA pode ocorrer de diferentes modos: de forma covalente, ocorrendo ligação direta do complexo ao DNA; ou de forma não-covalente por meio de interações eletrostáticas, interações hidrofóbicas, ou por meio da intercalação. A Figura 55 ilustra esquematicamente esses tipos de interações [74].

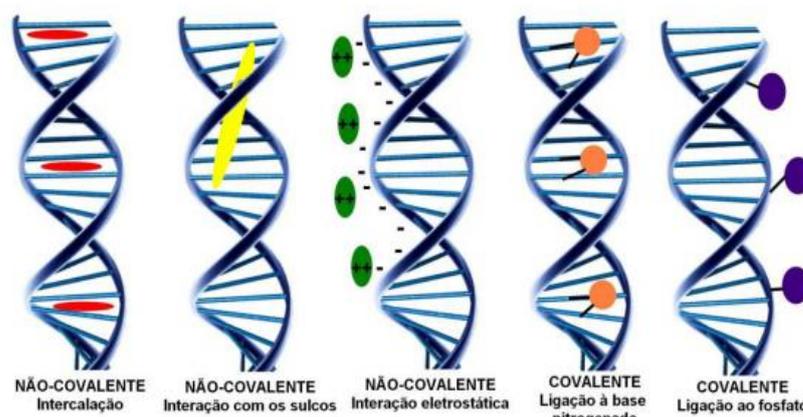


Figura 55. Tipos de interações do DNA: covalentes e não covalentes [74]. Fonte: Barra, C. V.; Netto, A. V. G., 2015.

Algumas características dos ligantes presentes no complexo metálico são essenciais para se determinar o tipo de interação observada. Por exemplo, ligantes planos e rígidos ricos em elétrons π , favorecem a interação por meio da intercalação [74].

A concentração do CT-DNA na solução estoque foi determinada por espectroscopia de absorção na região do UV-vis, conforme relatado anteriormente, e o valor encontrado foi de $3,717 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. As absorvâncias foram medidas nos λ correspondentes à banda Soret.

Após sucessivas adições da solução de CT-DNA à solução de cada complexo estudado, observou-se um deslocamento hipocrômico da banda característica de cada complexo, isto é, uma diminuição da intensidade da absorvância [70, 71, 74].

Os espectros obtidos foram ajustados à equação de Scatchard (Equação 1) para se determinar a constante de ligação (K_b). Essa constante é uma ferramenta importante pois permite avaliar a magnitude da força de ligação de um composto com o CT-DNA.

$$\frac{[\text{DNA}]}{(\epsilon_a - \epsilon_f)} = \frac{[\text{DNA}]}{(\epsilon_b - \epsilon_f)} + \frac{1}{K_b(\epsilon_b - \epsilon_f)} \quad (\text{Equação 1})$$

em que:

$[\text{DNA}]$ = concentração do DNA na cubeta

ϵ_a = coeficiente de extinção aparente, que é razão entre a absorvância medida e a concentração do composto = $A_{\text{obs}}/[\text{complexo}]$

ϵ_f = coeficiente de extinção do composto livre em solução = A_{obs} (antes de adicionar o DNA)/[complexo]

ϵ_b = coeficiente de extinção do composto ligado ao DNA

Assim, a constante K_b (Tabela 14, pág. 81) é a razão entre os coeficientes angular e linear do gráfico $[\text{DNA}]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$ versus $[\text{DNA}]$.

As Figuras 56 a 58 abaixo mostram os espectros de absorção UV-vis dos complexos nas concentrações crescentes de DNA. Cada linha do gráfico representa quantidades diferentes de DNA adicionado.

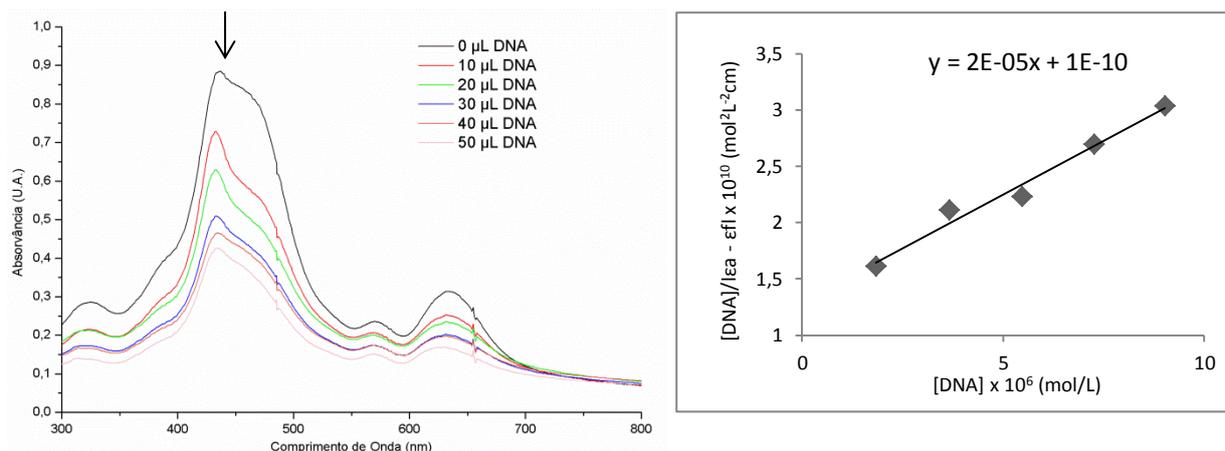


Figura 56. Espectros de absorção na região do UV-vis para a titulação da solução do complexo $[\text{Sb}(\text{V})\text{BrCl}(\text{T4MPP})]\text{Br}$ com a solução de CT-DNA (temperatura de 25°C e tempo de incubação de 30 minutos após cada adição de CT-DNA). (b) Representação da relação $[\text{DNA}]/(\epsilon a - \epsilon f)$ versus $[\text{DNA}]$ considerando a equação de Scatchard. $[\text{Sb}(\text{V})\text{BrCl}(\text{T4MPP})]\text{Br} = 1,52 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

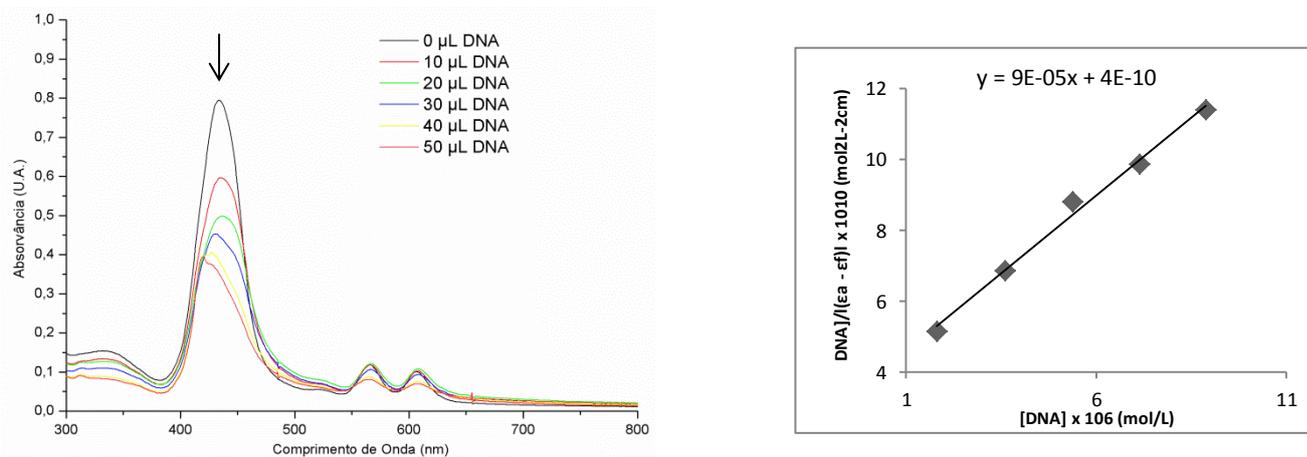


Figura 57. Espectros de absorção na região do UV-vis para a titulação da solução do complexo $[\text{Sb}(\text{V})\text{Br}_2(\text{T4CMPP})]\text{Br}$ com a solução de CT-DNA (temperatura de 25°C e tempo de incubação de 30 minutos após cada adição de CT-DNA). (b) Representação da relação $[\text{DNA}]/(\epsilon a - \epsilon f)$ versus $[\text{DNA}]$ considerando a equação de Scatchard. $[\text{Sb}(\text{V})\text{Br}_2(\text{T4CMPP})]\text{Br} = 5,59 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

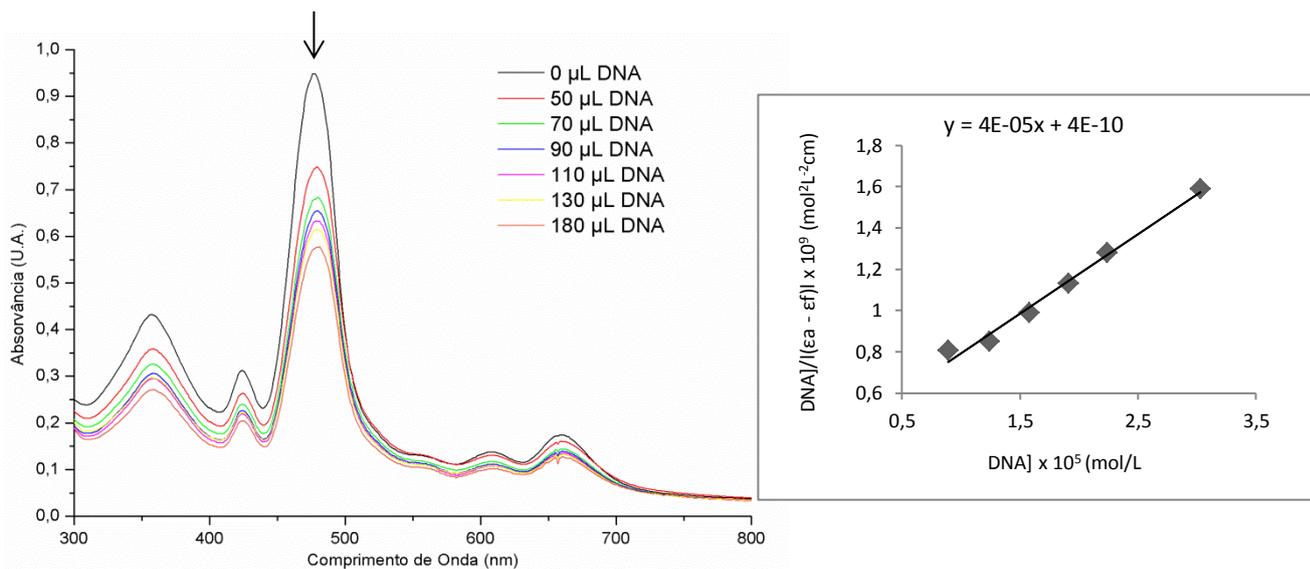


Figura 58. Espectros de absorção na região do UV-vis para a titulação da solução do complexo [Bi(III)(APTPP)]NO₃ com a solução de CT-DNA (temperatura de 25°C e tempo de incubação de 30 minutos após cada adição de CT-DNA). (b) Representação da relação [DNA]/(εa - εf) versus [DNA] considerando a equação de Scatchard. [[Bi(III)(APTPP)]NO₃]= 1,71 × 10⁻⁵ mol L⁻¹.

Tabela 14. Valores das constantes de ligação K_b para os complexos estudados.

| Complexo | K _b |
|-----------------------------------|-----------------------|
| [Bi(III)(APTPP)]NO ₃ | 1,0 × 10 ⁵ |
| [Sb(V)(T4MPP)BrCl]Br | 2,0 × 10 ⁵ |
| [Sb(V)(T4CMPP)Br ₂]Br | 2,2 × 10 ⁵ |

Os valores de K_b na ordem de 10⁵ indicam uma interação relativamente forte com DNA [73]. A interação pode estar ocorrendo por meio de intercalação ou de interação eletrostática. Outros experimentos – tais como a fluorescência e o dicroísmo circular – deverão ser feitos para confirmar o tipo de interação.

Apesar de os valores de K_b da ordem de 10⁵ indicarem que ocorre a interação com CT-DNA, acreditamos que o mecanismo de ação mais provável para esses compostos seja a inibição da biossíntese do ergosterol.

7. Capítulo 7. Conclusões

Neste trabalho, foram obtidas oito porfirinas inéditas, sendo seis contendo o íon metálico Bi(III) e duas contendo o Sb(V).

O grande interesse nas porfirinas de bismuto e antimônio reside no fato de que esses metais têm sido amplamente estudados nos últimos anos devido a sua ampla aplicação na medicina, como por exemplo, no tratamento de doenças parasitárias.

Os complexos foram caracterizados por análise elementar (CHN), espectroscopias de absorção na região do ultravioleta/visível (UV-vis), ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H) e espectrometria de massas.

Todos os complexos (obtidos nesse trabalho e durante o período de mestrado) foram testados contra parasitas de Leishmania. Nestes ensaios, os complexos $[\text{Sb(V)Br}_2(\text{T4CMPP})]\text{Br}$ e $[\text{Sb(V)BrCl}(\text{T4MPP})]\text{Br}$ apresentaram alta atividade leishmanicida, tanto contra as formas promastigotas quanto contra amastigotas intracelulares no modelo macrófago-infectado.

Na investigação dos possíveis mecanismos de ação dos complexos $[\text{Sb(V)Br}_2(\text{T4CMPP})]\text{Br}$ e $[\text{Sb(V)BrCl}(\text{T4MPP})]\text{Br}$, podemos concluir que eles podem estar agindo como inibidores da enzima C-14 desmetilase na biossíntese do ergosterol. Portanto, esses dois complexos surgem como novos candidatos a fármacos leishmanicidas cujo mecanismo de ação pode ser a inibição da biossíntese do ergosterol.

É importante ressaltar que todos os resultados obtidos foram satisfatórios e, portanto, pretendo continuar os estudos. Em relação às porfirinas de antimônio $[\text{Sb(V)Br}_2(\text{T4CMPP})]\text{Br}$ e $[\text{Sb(V)BrCl}(\text{T4MPP})]\text{Br}$, as quais tiveram excelentes atividades leishmanicidas, estão em andamento os testes de eficácia in vivo contra esses parasitas. Pretende-se também testá-la contra outros parasitas, como o *Trypanosoma cruzi*, o agente causador da doença de Chagas. Estudos preliminares já mostraram que essas metaloporfirinas apresentam atividade também contra esse parasita. Em relação às porfirinas de bismuto, as quais não mostraram atividade significativa contra a Leishmania, pretendo testá-las contra células tumorais.

Referências bibliográficas

1. BIESAGA, M.; PYRZYNSKA, K.; TROJANOWICZ, M., *Talanta*, 51, 209-224, (2000).
2. BUCHLER, J. W. In: DOLPHIN, D., *The Porphyrins*. New York: Academic Press, vol. 1, 390-439, (1978).
3. VOLLHARDT, K. P. C.; SCHORE, N. E., *Química Orgânica: Estrutura e função*, 4 ed., Bookman: Porto Alegre, (2004).
4. DOLPHIN, D.; TRAYLOR, T. G., XIE, L. Y., *Accounts of Chemical Research.*, 30, 251-259, (1997).
5. TRAYLOR, T. G.; TSUCHIYA, S., *Inorganic Chemistry*, 26, 1338-1339, (1987).
6. WIJESKERA, T. P.; DOLPHIN, D., *Synthetic Aspects of Porphyrin and Metalloporphyrin Chemistry*. Ed. R. A. Sheldon. Metalloporphyrins in Catalytic Oxidations. New York: Marcel Dekker, Inc., 193-239, (1994).
7. ALVAREZA, M. G.; VITTAR, N. B. R.; PRINCIPEA, F.; BERGESSEA, J.; ROMANINIB, M. C.; ROMANINIC, S; BERTUZZIA, M; DURANTINI, E. N.; RIVAROLA, V., *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 1, 335—344, (2004).
8. ABADA, Z.; COJEAN, S.; POMEL, S.; FERRIÉ, L.; AKAGAH, B.; LORMIER, A. T.; LOISEAU, P. M.; FIGADÈRE, B., *European Journal of Medicinal Chemistry*, 67, 158-165, (2013).
9. BASTOS, M. M.; GOMES, A. T. P. C.; NEVES, M. G. P. M. S.; SILVA, A. M. S.; SANTOS-FILHO, O. A.; BOECHAT, N; CAVALEIRO, J. A. S., *European Journal of Organic Chemistry*, 1485-1493,(2013).
10. OHLWEILER, A., *Química Inorgânica*, vol. 1, Edgard Blücher: São Paulo, (1973).
11. SHRIVER, D. F., *Química Inorgânica*, 4 ed., Bookman: Porto Alegre, (2008).
12. TREIBS, A., *Justus Liebigs Annalen de Chemie.*, 728, 115-48, (1969).
13. BOITREL, B.; BREEDE, M.; BROTHERS, P. J.; HODGSON, M.; MICHAUDET, L.; RICKARD, C. E. F.; SALIM, N. A., *Dalton transactions*, 1803-1807, (2003).
14. BARBOUR, T.; BELCHER, W. J.; BROTHERS, P. J.; RICKARD, C. E. F.; WARE, D. C., *Inorganic Chemistry*, 31, 746-754, (1992).
15. MICHAUDET, L.; RICHARD, P.; BOITREL, B., *Chemical Communications*, 1589-1590, (2000).
16. BOITREL, B.; HALIME, Z.; MICHAUDET, L.; LACHKAR, M.; TOUPET, L., *Chemical Communications*, 2670-2671, (2003).

17. HALIME, Z.; MICHAUDET, L.; LACHKAR, M.; BROSSIER, P.; BOITREL, B., *Bioconjugate Chemistry*, 15, 1193-1200, (2004).
18. HALIME, Z.; LACHKAR, M.; FURET, E.; HALET, J.; BOITREL, B., *Inorganic Chemistry*, 45, 10661-10669, (2006).
19. MICHAUDET, L.; HALIME, Z.; LACHKAR, M.; BOITREL, B., *Letters in Organic Chemistry*, 3, 753-758, (2006).
20. BOITREL, B.; HALIME, Z.; BALIEU, S.; LACHKAR, M., *Comptes Rendus Chimie*, 10, 583-589, (2007).
21. SAYER, P.; GOUTERMAN, M.; CONNELL, C. R., *Accounts of Chemical Research*, 15, 73-79, (1982).
22. KNÖR, G.; VOGLER, A., *Inorganic Chemistry*, 33, 314-318, (1994).
23. LUCIA, L. A.; YUI, T.; SASAI, R.; TAKAGI, S.; TAKAGI, K.; YOSHIDA, H.; WHITTEN, D. G.; INOUE, H., *Journal of Physical Chemistry B*, 107, 3789-3797, (2003).
24. KNOR, V., *Inorganic Chemistry Communications*, 3, 505-507, (2000).
25. LIU, J.; ISHIZUKA, T.; OSUKA, A.; FURUTA, H., *Chemical Communications*, 1908-1909, (2003).
26. SHIRAGAMI, T.; ANDOU, Y.; HAMASUNA, Y.; YAMAGUCHI, F.; SHIMA, K.; YASUDA, M., *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 75, 1577-1582, (2002).
27. AKIBA, K.; ONZUKA, Y.; ITAGAKI, M.; HIROTA, H.; YOHSUKE YAMAMOTOT, Y., *Organometallics*, 13, 2800-2803, (1994).
28. KADISH, K. M.; AUTRET, M.; OU, Z.; AKIBA, K.; MASUMOTO, S.; WADA, R.; YAMAMOTO, Y., *Inorganic Chemistry*, 35, 5564-5569, (1996).
29. LIU, C.; CHEN, J.; WANG, S.; WANG, J., *Polyhedron*, 15: 22, 3947-3954, (1996).
30. DEHGHANI, H.; SARDROOD, A. R. A., *Polyhedron*, 26, 4263-4268, (2007).
31. SHIRAGAMI, T.; MATSUMOTO, J.; INOUE, H.; YASUD, M., *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*, 6, 227-248, (2005).
32. SALVADOR, J. A. R.; PINTO, R. M. A.; SILVESTRE, S. M., *Current Organic Synthesis*, 6, 426-470, (2009).
33. SADLER, P. J.; LI, H.; SUN, H., *Coordination Chemistry Reviews*, 185-186, 689-709, (1999).
34. MICHAUDET, L.; FASSEUR, D.; GUILARD, R.; OU, Z.; KADISH, K. M.; DAHAOIU, S.; LECOMTE, C., *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, 4, 261-270, (2000).

35. HALIME, Z.; MICHAUDET, L.; RAZAVET, M.; RUZIÉ, C.; BOITREL, B., *Dalton Transactions*, 4250-4254, (2003).
36. BHARTI, S. K.; SINGH, S. K., *Der Pharmacia Lettre*, 1:2, 39-51, (2009).
37. KEOGAN, D. M.; GRIFFITH, D. M., *Molecules*, 19, 15258-15297, (2014).
38. PELISSARI, D. M.; CECHINEL, M. P.; SOUZA-GOMES, M. L.; JÚNIOR, F. E. F. L., *Epidemiologia e serviços de saúde pública*, Brasília, 20:1, 107-110, (2011).
39. DORVAL M. E. M. C.; OSHIRO, E. T.; CUPOLLILO, E.; CASTRO, A. C. C.; ALVES, T. P., *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 39:1, 43-46, (2006).
40. *Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. 2ª edição. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, (2010).*
41. GONTIJO, C.M. F.; MELO, M.N., *Revista Brasileira de Epidemiologia*, 7:3, 338-349, (2004).
42. *Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. 1ª edição. Brasília: Ministério da Saúde, (2014).*
43. *Cadernos Temáticos De Química Nova Na Escola Antimônio No Tratamento De Zoonoses*, N° 6, (2005).
44. SOARES-BEZERRA, R. J.; LEON, L.; GENESTRA, M.; *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 40:2, (2004).
45. SALAÜN, P.; FRÉZARD, F., *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405, 5201–5214, (2013).
46. RATH, S. TRIVELIN, L. A.; IMBRUNITO, T. R.; TOMAZELA, D. M.; JESÚS, M. N.; MARZAL, P. C.; JÚNIOR, H. F. A.; TEMPONE, A. G., *Química Nova*, 26:4, 550-555, (2003).
47. FRÉZARD, F.; MARTINS, P. S.; BARBOSA, M. C. M. et al., *Journal of Inorganic Biochemistry*, 102: 4, 656-665, (2008).
48. SOARES-BEZERRA, R. J.; LEON, L.; GENESTRA, M., *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 40: 2, 139-149, (2004).
49. MACEDO-SILVA, S. T.; VISBAL, G.; URBINA, J. A.; SOUZA, W.; J. C. F. RODRIGUES, J. C. F., *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59:10, 6402-6418, (2015).

-
50. MATHUR, R.; DAS, R. P.; RANJAN, A.; SHAHA, C., *Research Communication*, 29, (2015).
 51. da SILVA, V. S.; TEIXEIRA, L. I.; NASCIMENTO, E.; IDEMORI, Y. M.; DEFREITAS-SILVA, G., *Applied Catalysis A: General*, 469, 124-131, (2014).
 52. da SILVA, V. S.; IDEMORI, Y. M.; DEFREITAS-SILVA, G., *Applied Catalysis A: General*, 498, 54-62, (2015).
 53. SILVA, V. S.; NAKAGAKI, S.; UCOSKI, G. M.; IDEMORI, Y. M.; FREITAS-SILVA, G., *Rsc Advances*, 5, 106589-106598, (2015).
 54. PERRIN, D. D.; DEMPSEY, B., *Buffers for pH and Metal Ion Control*, 48-49, (1974).
 55. KOS, I.; REBOUÇAS, J. S.; DEFREITAS-SILVA, G.; SALVEMINI, D.; VUJASKOVIC, Z.; DEWHIRST, M. W.; SPASOJEVIĆ, I.; BATINIĆ-HABERLE, I., *Free Radical Biology and Medicine*, 47:1, 72-78, (2009).
 56. TOVMASYAN, A.; WEITNER, T.; SHENG, H.; LU, M.; RAJIC, Z.; WARNER, D.; SPASOJEVIC, I.; REBOUCAS, J.; BENOVA, L.; BATINIC-HABERLE, I., *Inorganic Chemistry*, 52, 5677-5691, (2013).
 57. GOMES, M. L., *Porfirinas de Bismuto e Antimônio: Obtenção e Caracterização, dissertação de mestrado*, UFMG, Belo Horizonte, (2011).
 58. GOUTERMAN, M., In: DOLPHIN, D., *The Porphyrins*. New York: Academic Press, volume 3, 45-61, (1978).
 59. GOTTLIEB, H. E.; KOTLYAR, V.; NUDELMAN, A., *Journal of Organic Chemistry*, 62, 7512-7515, (1997).
 60. MOSMANN, T. J., *Journal of Immunological Methods*, 65, 55-63, (1983).
 61. LIZARAZO-JAIMES, E. H.; MONTE-NETO, R. L.; REIS, P. G.; FERNANDES, N. L.; SPEZIALI, M. N.; MELO, M. N.; FRÉZARD, F.; DEMICHELI, C., *Molecules*, 17, 12622-12635, (2012).
 62. MARZOCHI, M. C.; MARZOCHI, K. B., *Cadernos de Saúde Pública*, 10:2, 359-375, (1994).
 63. ANDRADE-NETO, V. V, CICCO, N. N. T.; CUNHA-JUNIOR, E. F.; CANTO-CAVALHEIRO, M. M.; ATELLA, G. C.; TORRES-SANTOS, E. C., *Acta Tropica*, 119, 194-198, (2011).
 64. CUNHA-E-SILVA, N. L.; ATELLA, G. C.; PORTO-CARREIRO, I. A.; MORGADO-DIAZ, J. A.; PEREIRA, M. G.; SOUZA, W., *FEMS Microbiology Letters*, 214, 7-12, (2002).

-
65. BLIGH, E. G.; DRYER, M. J., *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37:8, 911-913, (1959).
 66. ANDRADE-NETO, V. V.; PEREIRA, T. M.; CANTO-CAVALHEIRO, M.; TORRES-SANTOS, E. C., *Parasites & Vectors*, 9:183, (2016).
 67. TORRES-SANTOS, E. C.; SAMPAIO-SANTOS, M. I.; BUCKNER, F. S.; YOKOYAMA, K; GELB, M.; URBINA, J. A.; ROSSI-BERGMANN, B., *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 63, 469-472, (2009).
 68. KULKARNI, M. M.; REDDY, N.; GUDE, T.; MCGWIRE, B. S., *Parasitology Research*, 112, 2095-2099, (2013).
 69. TARUSHI, A. PSOMAS, G.; RAPTOPOULOU, C. P.; PSYCHARIS, V.; KESSISSOGLU, D. P., *Polyhedron*, 28, 3272-3278, (2009).
 70. FIRDAUS, F.; FATMA, K.; AZAM, M.; KHAN, S. N.; KHAN, A. U.; SHAKIR, M., *Transition Metal Chemistry*, 33, 467-473, (2008).
 71. FONTES, A. P. S.; ALMEIDA, S. G.; NADER, L. A., *Química Nova*, 20:4, 399,(1997).
 72. ÁRIAS, G., *Em 1953 foi descoberta a estrutura do DNA*, Passo Fundo, Embrapa Trigo, (2004).
 73. BARRA, C. V.; NETTO, A. V. G., *Revista Virtual de Química*, 7:6, 1998-2016, (2015).

Anexos

Neste anexo são apresentados os espectros de RMN ^1H das metaloporfirinas $[\text{Bi(III)}(\text{APTPP})]\text{NO}_3$, $[\text{Bi(III)}(\text{NPTPP})]\text{NO}_3$, *cis/trans*- $[\text{Bi(III)}(\text{DAPDPP})]\text{NO}_3$, *cis/trans*- $[\text{Bi(III)}(\text{DNPDP})]\text{NO}_3$, $[\text{Sb(V)}\text{BrCl}(\text{T4MPP})]\text{Br}$ e $[\text{Sb(V)}\text{BrCl}(\text{T3,5DMPP})]\text{Br}$. Para esses compostos os sinais referentes aos átomos de hidrogênio dos grupos arila tiveram intensidade muito baixa.

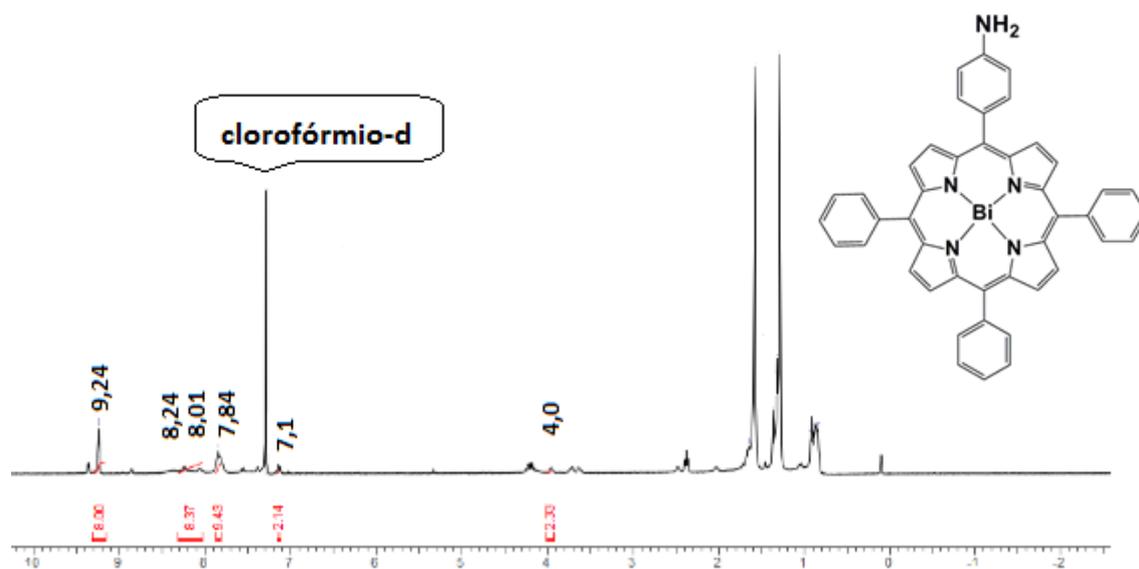


Figura 59. Espectro de RMN ^1H da $[\text{Bi(III)}(\text{APTPP})]\text{NO}_3$ em aparelho de 200 MHz em CDCl_3 (25°C). δ 9,24 (m, 8H, β -pirrólico), 8,24 (d, 6H, orto fenil), 8,01 (s, 2H, aminofenil), 7,84 (m, 9H, meta/para fenis), 7,1 (s, 2 H, aminofenil), 4 (2H, amino).

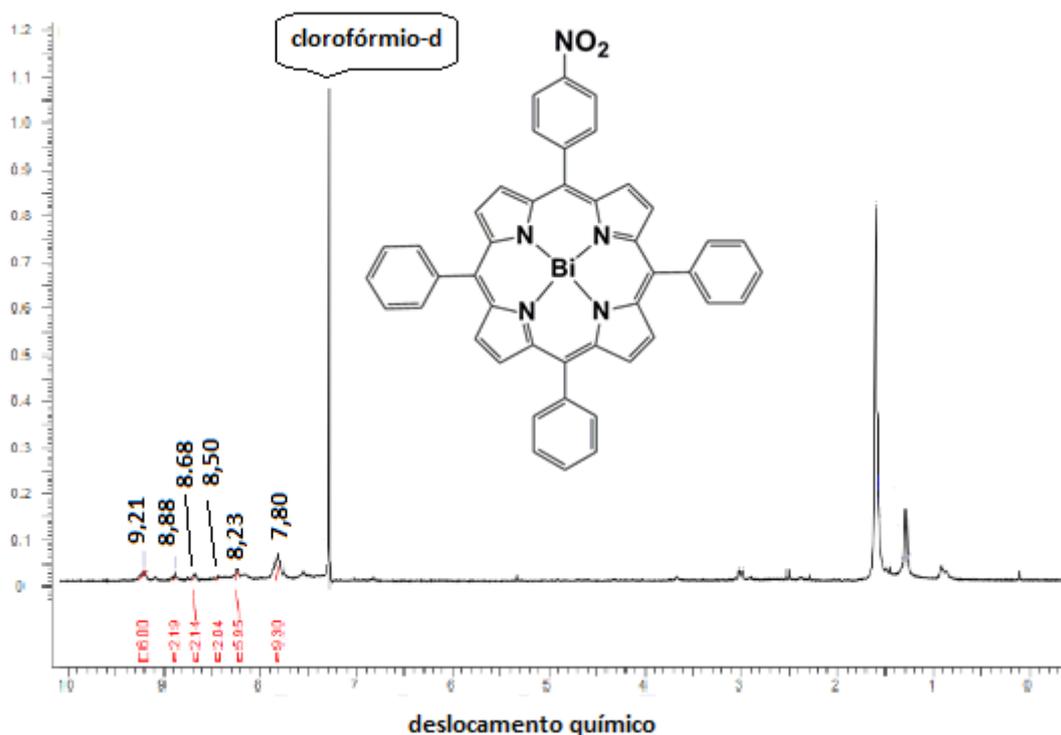


Figura 60. Espectro de RMN ^1H da $[\text{Bi(III)(NPTTPP)}]\text{NO}_3$ em aparelho de 200 MHz em CDCl_3 (25°C). δ 9,21 (m, 6 H, β -pirrólico), 8,88 (d, 2 H, β -pirrólico), 8,68 (d, 2 H, nitrofenil), 8,50 (d, 2 H, nitrofenil), 8,23 (m, 6 H, orto arila), 7,80 (m, 9 H, meta/para arila).

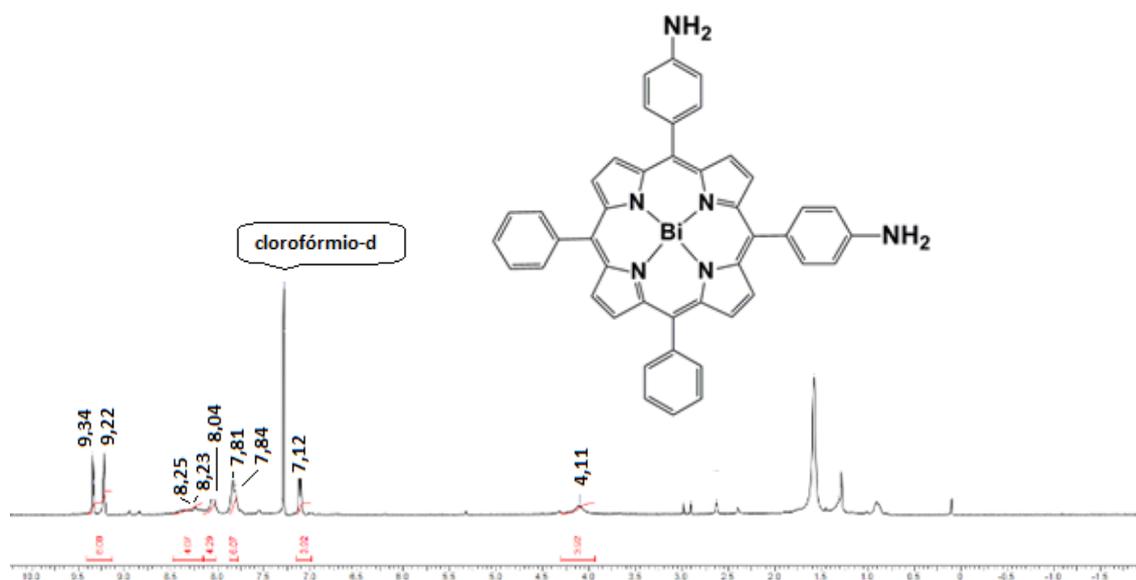


Figura 61. Espectro de RMN ^1H da $\text{cis/trans-}[\text{Bi(III)DAPDPP}]\text{NO}_3$ em aparelho de 200 MHz em CDCl_3 (25°C). δ 9,34 (s, 4H, β -pirrólico), 9,22 (s, 4H, β -pirrólico), 8,23-8,25 (m, 4H, ortofenil), 8,04 (s, 4H, aminofenil), 7,81-7,84 (m, 6H, meta/para fenis), 7,12 (s, 4H, aminofenil), 4,11 (4H, amino).

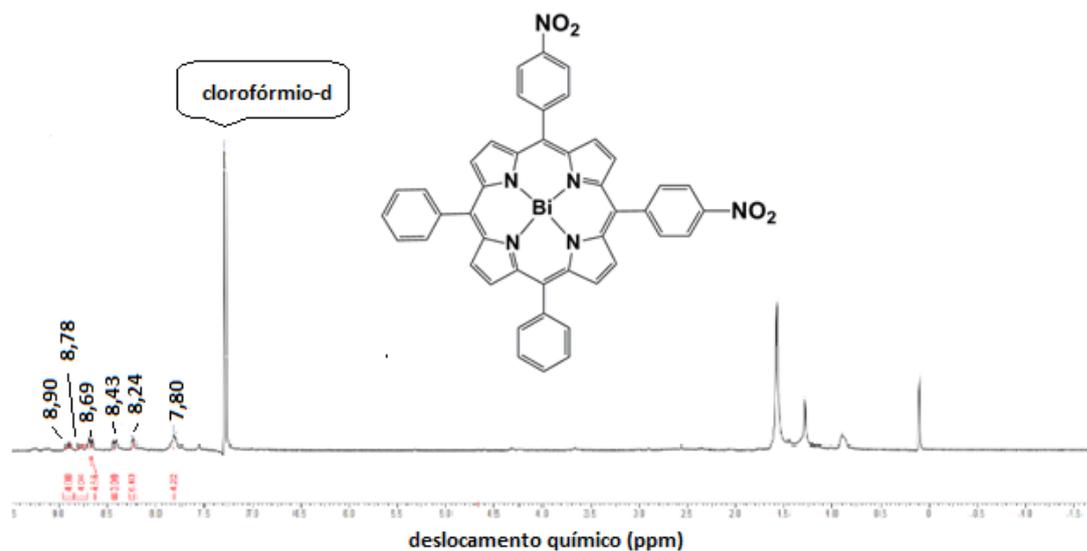


Figura 62. Espectro de RMN de ^1H da *cis/trans*-[Bi(III)(DNPDP)]NO₃ em aparelho de 200 MHz em CDCl₃ (25°C). δ 8,90 (m, 4H, β -pirrólico), 8,78 (d, 4H, β -pirrólico), 8,69 (d, 4H, nitrofenil), 8,43 (d, 4H, nitrofenil), 8,24(m, 6H, orto fenil), 7,80 (m, 6 H, meta/para fenil).

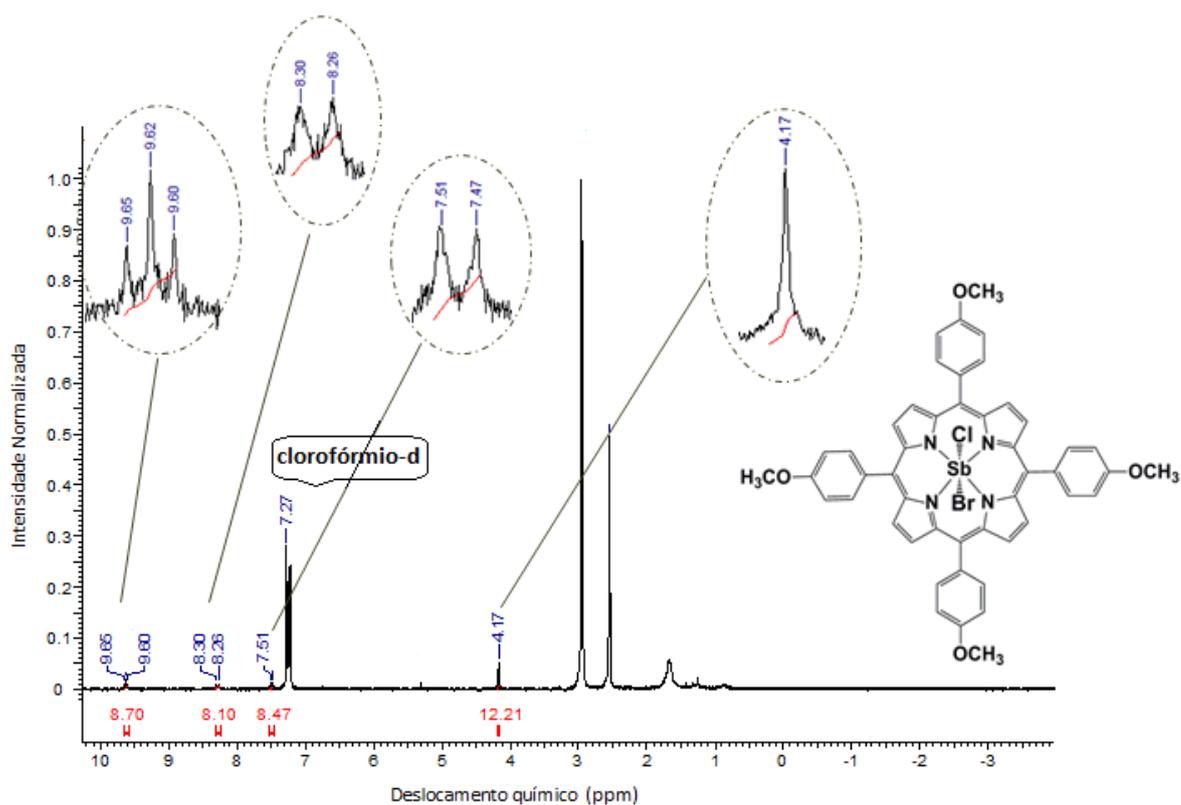


Figura 63. Espectro RMN ^1H da [Sb(V)BrCl(T4MPP)]Br em CDCl₃ (25 °C): δ = 4,17 (12 H, s, metílicos); δ = 7,47 – 7,51 (8 H, m, o-arálicos); δ = 8,26 – 8,30 (8 H, m, m-arálicos); δ = 9,60 – 9,65 (8H, m, β -pirrólicos).

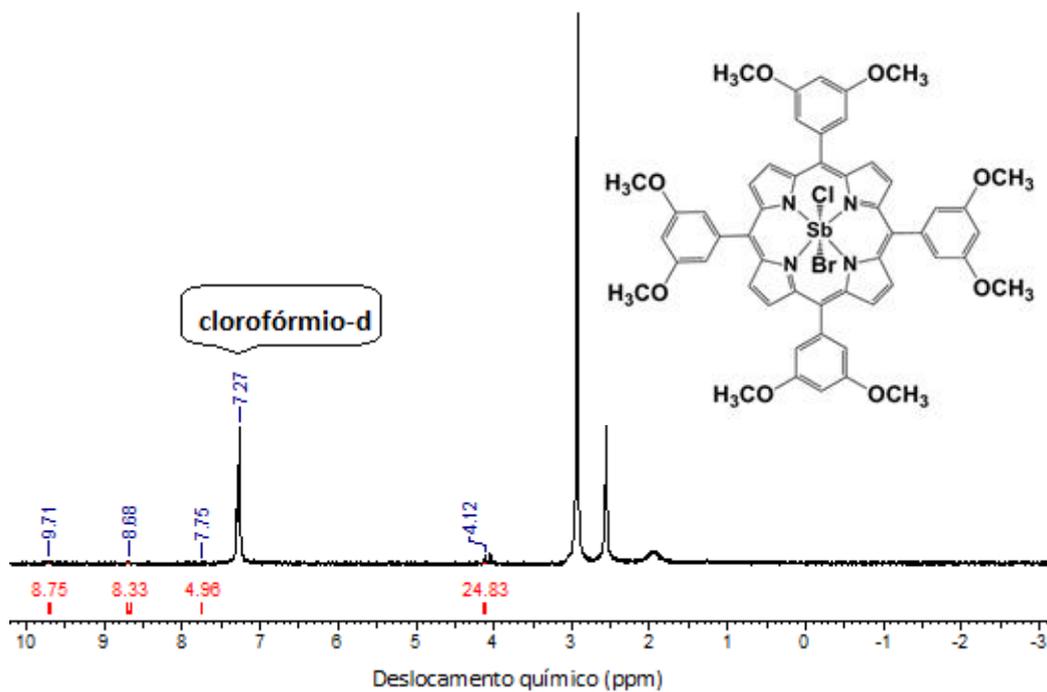


Figura 64. Espectro RMN ^1H da $[\text{Sb}(\text{V})\text{BrCl}(\text{T3,5DMPP})]\text{Br}$ em CDCl_3 ($25\text{ }^\circ\text{C}$): $\delta = 4,12$ (24 H, s, metílicos); $\delta = 7,75$ (4 H, m, p-arílicos); $\delta = 8,68$ (8 H, m, o-arílicos); $\delta = 9,71$ (8H, s, β -pirrólicos).