Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

# Corantes esquarílicos com potencial utilização em terapia fotodinâmica do cancro

**Dissertação de Mestrado em Bioquímica**

**Sandra Isabel Gonçalves Fagundes**

Orientador(a): Profª Doutora Lucinda Vaz Reis

Coorientador(a): Profª Doutora Amélia M. Lopes Dias da Silva

Vila Real, 2014

Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

# Corantes esquarílicos com potencial utilização em terapia fotodinâmica do cancro

Dissertação de Mestrado em Bioquímica

**Sandra Isabel Gonçalves Fagundes**

Orientador(a): Profª Doutora Lucinda Vaz Reis

Coorientador(a): Profª Doutora Amélia M. Lopes Dias da Silva

Composição do Júri:

_____

_____

_____

_____

Vila Real, 2014

# Declaração

Eu, Sandra Isabel Gonçalves Fagundes, declaro sob compromisso de honra que este trabalho é original e que todas as contribuições não originais, foram devidamente referênciadas com identificação da fonte.

Vila Real, 10 de Janeiro de 2014

_____

(Assinatura)

**Agradecimentos**

Ao longo do meu Mestrado em Bioquímica, foram muitas as pessoas que me ajudaram, directa ou indiretamente, a cumprir os meus objetivos e a realizar mais esta importante etapa da minha formação académica. Desta forma deixo aqui algumas palavras, que certamente não são suficientes para agradecer como deveria, mas que contêm nelas, um grande sentimento de reconhecimento, agradecimento e carinho.

À diretora do Mestrado em Bioquímica, Profª Doutora Maria Manuel Oliveira, agradeço todas as oportunidades de aprendizagem que me ofereceu e o privilégio que tive em frequentar este Mestrado, que em muito contribuiu para enriquecer a minha formação académica e científica.

À minha orientadora Profª Doutora Lucinda Vaz Reis e Co-orientadora Profª Doutora Amélia Lopes da Silva a quem expresso o meu profundo agradecimento pela orientação e apoio incondicionais que muito enriqueceram os meus conhecimentos científicos e sem dúvida, muito estimularam o meu desejo de querer, sempre, saber e aprender mais e a vontade constante de querer fazer melhor. Agradeço também a oportunidade que me deram de me integrar no vossogrupo de investigação e reconheço, com gratidão, não só a confiança que em mim depositaram, desde o início, mas também, o sentido de responsabilidade que me incutiram em todas as fases do trabalho.

Ao Prof. Doutor José Ramiro Fernandes, pelo tempo que dispensou a idealizar e a construir, o sistema de irradiação que permitiu que este trabalho fosse tão bem sucedido. Agradeço também, todo o ensinamento que me transmitiu e que foi fundamental para o enriquecimento dos meus conhecimentos científicos.

Ao Prof. Doutor Renato Boto e Prof. Paulo Almeida, da Universidade da Beira-Interior e ao Professor Doutor Luis Filipe Vieira Ferreira do Centro de Química-Física Molecular, do Instituto Superior Técnico, Universidade Técnica de Lisboa pela amabilidade prestada e pela disponibilidade e rapidez em ler as minhas amostras.

Às minhas colegas de laboratório, Vânia, Céu e Slávka, muito obrigada pela vossa ajuda, por serem sempre prestáveis e por me animarem quando os dias no laboratório não corriam tão bem.

Ao Prof. Doutor Paulo Coelho, por estar sempre disponível para qualquer dúvida e por perguntar sempre pelos meus corantes.

Ao Félix, por me ajudar com a sua sabedoria informática e por estar sempre disponível.

Aos meus amigos, em especial à Luciana, Rui, Inês, Irene, Prof.João Coutinho, Marta, Susana, à Daniela e ao Fernando, pelotempo que perderam a ouvir os meus desabafos, pelo apoio, carinho, conforto, amizade, pelos bons concelhos e por todos os bons e maus momentos que partilhamos.

Ao meu namorado, Nuno, pela amizade, amor, conforto, confiança, coragem, por ouvir atentamente e me aconselhar sobre as minhas dúvidas, inquietações, desânimos e sucessos, pelo apoio, pela valorização, enfim… por tudo. Obrigada por existires ☺.

À minha família, em especial à minha mãe, ao meu irmão e à minha irmãum obrigado do tamanho do Mundo, por acreditarem sempre em mim e naquilo que faço e por me ensinarem a viver. Espero que esta etapa, que agora termino, possa, de alguma forma, retribuir e compensar todo o carinho, apoio e dedicação que, constantemente, me oferecem.

E por fim, a ti Lúcia, que sei que estás no Céu a olhar por mim e a apoiar-me como sempre fizeste. Que lutas-te por ti e por todos os que te rodeavam até ao fim e que de uma forma tão ingrata esta doença te levou de todos nós. Terás para sempre um lugar no meu coração que, está preenchido com todo o teu carinho e amizade e a ti te dedico toda a investigação científica que realizei numa tentativa de encontrar uma esperança, para vencedores como tu.

# Resumo

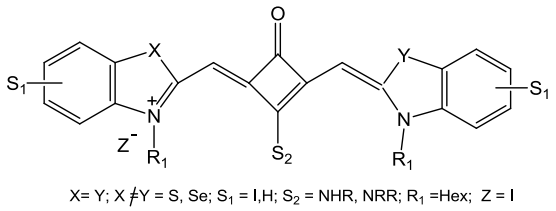

O principal objectivo deste trabalho foi a síntese e caracterização estrutural de corantes cianínicos esquarílicos e a avaliação da sua citotoxicidade *in vitro*, no escuro e sob irradiação a um comprimento de onda adequado nas linhas celulares HepG2 e Caco-2, com a finalidade de estudar o seu potencial como agentes fotossensibilizadores para a Terapia Fotodinâmica (PDT) do cancro.

Esta dissertação divide-se em três partes. Na primeira parte é apresentada uma revisão bibliográfica sobre os corantes esquarílicos: estrutura, métodos de síntese, aplicação em PDT e a sua acção biológica.

Seguidamente são apresentados e discutidos os resultados experimentais obtidos sobre a síntese e caracterização estrutural de corantes cianínicos esquarílicos simétricos e de novos corantes cianínicos esquarílicos assimétricos (Figura 1). Os novos compostos foram caracterizados pelas técnicas: ponto de fusão, infravermelho, Ultravioleta-Visivel, Ressonância magnética nuclear de protão e de carbono ($^{1}$H-RMNe $^{13}$C-RMN), "Distortionless Enhancement by Polarization" (DEPT) e Espectrometria de massa por electrospray (EMAR-ESI-TOF). Também para estes compostos, são apresentados os valores de rendimento quântico de oxigénio singuleto, tendo-se verificado que a introdução de átomos pesados, tal como o átomo de iodo, aumenta esse valor. Ainda nesta segunda parte, são apresentados e discutidos os resultados da avaliação da sua citotoxicidade após irradiação nas células incubadas com os corantes, sob as condições: não irradiada, irradiada 7 minutos e irradiada 14 minutos com LED's centrados a 660 nm. Deste estudo salientam-se os resultados obtidos para os compostos zwiteriónicos ($S_2$ = $O^-$) e para o composto aminoesquarílico que possui o grupo $NH_2$ (X=Se, Y=S, $S_1$=I, $S_2$=$NH_2$) que, pode ser considerados como potenciais fotossensibilizadores para PDT do cancro.

Na terceira parte desta dissertação são apresentados os métodos experimentais da síntese dos compostos obtidos bem como a sua caraterização espetroscópica detalhada. São ainda apresentadas detalhadamente as técnicas usadas no estudo do efeito dos compostos sintetizados nas linhas celulares HepG2 e Caco-2.

Tendo em conta os resultados gerais do trabalho, os compostos **4**, **19**, **21** e **27** apresentam potencial para serem utilizados como eficientes fotossensibilizadores do cancro no futuro, sendo a ordem de potência **19**> **4**> **27**> **21.**


X= Y; X ≠Y = S, Se; $S_1$ = I,H; $S_2$ = NHR, NRR; $R_1$ =Hex; Z = I

**Figura 1.** Fórmula geral dos corantes cianínicos esquarílicos sintetizados.


**Palavras-Chave:** Cianínas, corantes esquarílicos, oxigénio singuleto, PDT, HepG2, Caco-2.

# Abstract

The main purpose of this work was the synthesis and structural characterization of squarylium cyanine dyes and evaluation of their in vitro cytotoxicity in the dark and under irradiation at a suitable wavelength in HepG2 and Caco-2cell lines, with the purpose of studying its potential as photosensitizer's agents for photodynamic therapy (PDT) of cancer.

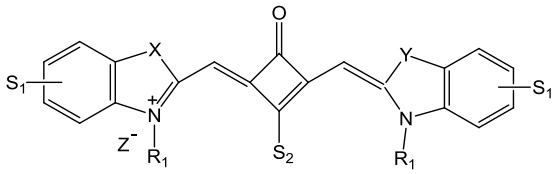
This dissertation is divided into three parts. The first part presents a literature review on the squarylium dyes structure, synthesis methods, application in PDT and its biological action.

Below are presented and discussed the experimental results obtained in the synthesis and structural characterization of symmetric squarylium cyanine dyes and new asymmetric squarylium cyanine dyes (Figure 1). The new compounds were characterized by the melting point, Infra-Red, ultraviolet-Visible (UV/Vis), proton and carbon nuclear magnetic resonance ($^{1}$H-NMR,$^{13}$C-NMR), Distortionless enhancement by polarization (DEPT) and Electrospray TOF mass spectrometer (HRMS-ESI-TOF) techniques.

Also for these compounds are shown the values of quantum yield of singlet oxygen, and it was found that the introduction of heavy atoms such as iodine increases this value. In this second part, are also presented and discussed the results of the evaluation of their cytotoxicity, after irradiation in cells incubated with the dyes under the conditions: non-irradiated, irradiated 7 minutes and irradiated 14 minutes, with LEDs centered at 660 nm. In this study were emphasize the results obtained for the zwitterionic compounds ($S_2$= $O^-$) and for the aminosquarylium dye that have the $NH_2$ group (X = Se, Y = S, $S_1$ = I; $S_2$ = $NH_2$) whichcan be considered as potential photosensitizers for PDT of cancer.

The third part of this dissertation presents the experimental methods of synthesis of compounds obtained as well as its detailed spectroscopic characterization. They are also presented in detail the techniques used to study the effect of the compounds synthesized, in the HepG2 and Caco-2cell lines.

Given the overall results of the study, the compounds 4, 19, 21:27 have potential to be used as efficient photosensitizers of cancer in the future, with an order of potency 4> 19> 27> 21.


X= Y; X ≠Y = S, Se; $S_1$ = I,H; $S_2$ = NHR, NRR; $R_1$ =Hex; Z = I

**Figure 1.** General formula of the squarylium cyanine dyes synthesized.


**Key-Words:** Cyanines, squarylium dyes, singlet oxygen, PDT, HepG2, Caco-2.

# Índice Geral

**Índice de Figuras**……..... xiv

**Índice de Esquemas**……... xviii

**Índice de Tabelas**……... xix

**Lista de abreviaturas, siglas e símbolos**……... xx

**1 Introdução**……... 1

1.1 Terapia Fotodinâmica……... 2

1.1.1 Ação da terapia fotodinâmica em sistemas biológicos…… 4

1.1.2 Aplicações da terapia fotodinâmica…….. 8

1.1.3 Tipos de fotossensibilizadores utilizados na PDT e suas características….. 8

1.1.4 Parâmetros para a eficiência de um fotossensibilizador……..... 10

1.1.4.1 Pureza…….. 10

1.1.4.2 Toxicidade e estabilidade…… 10

1.1.4.3 Parâmetros fotofísicos……. 10

1.1.4.4 Absorção da luz pelo FS e emissores de luz……..... 15

1.1.4.5 Hidrofilicidade e Lipofilicidade…….. 15

1.1.5 Estudo da Terapia fotodinâmica *in vitro* e *in vivo*..... 16

1.2 Corantes……..... 19

1.2.1. Cianínas……..... 20

1.2.1.1. Cianínas esquarílicas…….. 21

1.2.2 Síntese de cianínas esquarílicas…… 24

1.2.3. Aplicação das cianínas esquarílicas em estudos *in vitro* e *in vivo*……... 27

1.3 Avaliação da citotoxicidade em culturas de células……. 28

1.3.1 Indicadores de viabilidade celular: Alamar Blue…….. 28

**2 Discussão dos Resultados**..... 29

2.1. Preâmbulo……..... 30

2.2. Síntese dos corantes cianínico esquarílicos simétricos……..... 31

2.2.1 Síntese prévia……..... 31

2.2.1.1 Síntese do iodeto de 3-hexil-2-metilbenzoselenazólio (**2**)……... 31

2.2.2 Síntese dos corantes cianínico aminoesquarílicos simétricos…….... 32

2.3. Espectros UV-Vis dos corantes cianínico esquarílicos simétricos **4**-**9**……..... 35

2.4 Síntese dos corantes cianínicos esquarílicos assimétricos……..... 37

2.4.1 Sínteses prévias……. 38

2.4.1.1 Síntese do 2-metil-6-nitro-benzotiazol (**11**)……... 38

2.4.1.2. Sintese do 6-amino-2-metilbenzotiaol (**12**)…….. 39

2.4.1.3 Sintese do 6-iodo-2-metilbenzotiaol (**13**)…….. 40

2.4.1.4. Síntese do iodeto de 3-hexil-6-iodo-2-metilbenzotiazol-3-io (**14**)..... 41

2.4.1.5. Síntese do 3,4-dibutoxi-3-ciclobuteno-1,2-diona (**15**)……..... 43

2.4.1.6 Tentativa de síntese do 6-iodo-3-butoxi-4-[(3-hexilbenzotiazol-2(3H)-ilideno)metil]-3-ciclobuteno-1,2-diona (**16**)…… 43

2.4.1.7 Síntese do 3-butoxi-4-[(3-hexilbenzoselenazol-2(3H)-ilideno)metil]-3-ciclobuten-1,2-diona (**17**)……. 44

2.4.1.8 Síntese do 3-[3-(Hexilbenzoselenazol-2(3H)-ilideno)metil]-4-hidroxi-3-ciclobuten-1,2-diona (**18**)……. 47

2.4.1.9 Síntese do 4-[(3-hexilbenzoselenazol-3-io-2-il)metilideno]-2-[3-(3-hexil-6-iodo-3H-benzotiazol-2-ilidenometil]-3-oxo-ciclobut-1-en-1-olato (**19**)…….. 48

2.4.1.10 Síntese do trifluorossulfonato de 3-hexil-2-[3-(3-hexil-6-iodo-3H-benzotiazol-2-ilidenometil)-2-metoxi-4-oxociclobut-2-enilidenometil]benzoselenazol-3-io (**20**)……... 49

2.4.2 Síntese dos corantes cianínicos aminoesquarílicos assimétricos…….. 52

2.4.2.1 Síntese do iodeto de 2-[-2-amino-3-(3-hexil-6-iodo-3H-benzotiazol-2-ilidenometil)-4-oxociclobut-2-enilidenometil]-3-hexilbenzoselenazol-3-io (**21**)……..... 52

2.4.2.2 Síntese do iodeto de 3-hexil-2-[3-(3-hexil-6-iodo-3H-benzotiazol-2-ilideno- metil)-2-metilamino-4-oxo-ciclobut-2-enilidenometil]-3-benzoselenazol-3-io (**22**)……..... 53

2.4.2.3 Síntese do iodeto de 2-[2-fenilamino-3-(3-hexil-6-iodo-3H-benzotiazol-2-ilidenometil)-4-oxo-ciclobut-2-enilidenometil]-3-hexilbenzoselenazol-3-io (**23**)……..... 56

2.4.2.4. Síntese do iodeto de 2-[2-(3-iodofenilamino)-3-(3-hexil-6-iodo-3H-benzotiazol-2-ilidenometil)-4-oxociclobut-2-enilidenometil]-3-hexilbenzoselenazol-3-io (**24**)……..... 58

2.4.2.5 Síntese do sal interno de 3-hexil-2-[3-(3-hexil-6-iodo-3H-benzotiazol-2-ilidenometil)-4-oxo-2-(2-sulfato-etilamino)ciclobut-2-enilidenometil]-3-benzoselenazol-3-io (**25**)……..... 60

2.4.2.6. Síntese do 4-[(3-hexilbenzoselenazol-3-io-2-il)metililideno]-2-[(3-hexil-3H-benzotiazol-2-ilidenometil]-3-oxociclobut-1-en-1-olato (**27**)……... 62

2.5 Espectros no UV/Vis dos corantes esquarílicos assimétricos……... 67

2.6 Avaliação da capacidade de formação de oxigénio singuleto ($^1O_2$) por parte dos corantes cianínicos esquarílicos assimétricos sintetizados…….. 69

2.7 Efeito citotóxico dos corantes esquarílicos simétricos nas linhas celulares Caco-2 e HepG2……. 70

2.7.1 Efeito da irradiação em células não expostas aos corantes esquarílicos simétricos e assimétricos…….. 70

2.7.2 Efeito citotóxico dos corantes esquarílicos na linha celular Caco-2 e HepG2……... 71

2.7.2.1 Efeito do tempo de espera até lavagem dos compostos, após irradiação……. 71

2.7.2.2 Análise do efeito citotóxico dos corantes esquarílicos simétricos e do efeito do tempo de irradiação nas linhas celulares HepG2 e Caco-2…….. 74

2.7.2.2.1 Composto **4**..... 74

2.7.2.2.2 Composto **6**..... 76

2.7.2.2.3 Composto **7**…… 77

2.7.2.2.4 Composto **8**…… 79

2.7.2.2.5 Composto **9**…… 80

2.7.2.3 Análise do efeito citotóxico dos corantes esquarílicos assimétricos e do efeito do tempo de irradiação nas linhas celulares HepG2 e Caco-2…….. 82

2.7.2.3.1 Composto **19**…….. 82

2.7.2.3.2 Composto **20**…….. 84

2.7.2.3.3 Composto **21**…….. 85

2.7.2.3.4 Composto **22**…….. 87

2.7.2.3.5 Composto **23**…….. 88

2.7.2.3.6 Composto **24**…….. 90

2.7.2.3.7 Composto **25**…….. 91

2.7.2.3.8 Composto **27**…….. 93

2.8 Conclusões……..... 95

**3 Resultados Experimentais**…….. 100

3.1. Reagentes e Equipamentos…….. 101

3.2 Síntese dos corantes esquarílicos simétricos…… 103

3.2.1 Síntese Prévia……..... 103

3.2.1.1 Síntese do iodeto de 3-hexil-2-metilbenzoselenazólio (**2**)…….... 103

3.2.1.2 Síntese do 4-[(3-hexilbenzoselenazol-3-io-2-il)metilideno]-2-[(3-hexil-3H- -benzoselenazol-2-ilideno)metil]-3-oxociclobut-1-en-1-olato(**4**)…….... 104

3.2.1.3 Síntese do trifluorometanossulfonato de 3-hexil-2-[3-(3-hexil-3H-benzoselenazol-2-ilidenometil)-2-metoxi-4-oxociclobut-2-enilidenometilbenzoselenazol-3-io (**5**)……... 104

3.2.2 Síntese dos corantes aminoesquarílicos simétricos……... 105

3.2.2.1 Síntese do iodeto de 2-[2-amino-3-(3-hexil-3H-benzoselenazol-2-ilidenometil)-4-oxo-ciclobut-2-enilidenometil]-3-hexilbenzoselenazol-3-io (**6**)……. 105

3.2.2.2 Síntese do iodeto de 3-hexil-2-[3-(3-hexil-3H-benzoselenazol-2-ilidenometil)-2-metilamino-4-oxo-ciclobut-2-enilidenometil]benzoselenazol-3-io (**7**)……. 106

3.2.2.3 Síntese do iodeto de 2-[2-fenilamino-3-(3-hexil-3H-benzoselenazol-2-ilidenometil)-4-oxociclobut-2-enilidenometil]-3-hexilbenzoselenazol-3-io (**8**)……. 107

3.2.2.4 Síntese do iodeto de 2-[2-(3-iodofenilamino)-3-(3-hexil-3H-benzoselenazol-2-ilidenometil)-4-oxo-ciclobut-2-enilidenometil]-3-hexilbenzoselenazol-3-io (**9**)…….. 108

3.3 Síntese dos corantes esquarílicos assimétricos……..... 109

3.3.1 Sínteses prévias……. 109

3.3.1.1 Síntese do 2-metil-6-nitro-benzotiazol (**11**)……... 109

3.3.1.2. Síntese do 6-amino-2-metil-benzotiazol (**12**)……. 109

3.3.1.2.1 Método A…… 109

3.3.1.2.2 Método B…….... 110

3.3.1.3 Síntese do 6-iodo-2-metil-benzotiazol (**13**)……. 111

3.3.1.3.1 Método A…….... 111

3.3.1.3.2 Método B…….... 111

3.3.1.4 Síntese do iodeto de 3-hexil-6-iodo-2-metilbenzotiazol-3-io (**14**)…….. 112

3.3.1.5 Síntese de 3,4-dibutoxi-3-ciclobuteno-1,2-diona (**15**)……. 113

3.3.1.6 Tentativa de síntese do 6-iodo-3-butoxi-4-[(3-hexilbenzotiazol-2(3H)-ilideno)metil]-3-ciclobuteno-1,2-diona (**16**)…… 113

3.3.1.7 Síntese de 3-butoxi-4-[(3-hexilbenzoselenazol-2(3H)-ilideno)metil]-3-ciclobuten-1,2-diona (**17**)……. 114

3.3.1.8 Síntese do 3-[(3-hexilbenzoselenazol-2(3H)-ilideno)metil]-4-hidroxi-3-ciclobuteno-1,2-diona (**18**)…….. 115

3.3.1.9 Síntese do 4-[(3-hexilbenzoselenazol-3-io-2-il)metilideno]-2-[3-(3-hexil-6-iodo-3H-benzotiazol-2-ilidenometil]-3-oxo-ciclobut-1-en-1-olato (**19**)…….. 115

3.3.1.10 Síntese do trifluorossulfonato de 3-hexil-2-[3-(3-hexil-6-iodo-3H-benzotiazol-2-ilidenometil)-2-metoxi-4-oxociclobut-2-enilidenometil]benzoselenazol-3-io (**20**)…….**.....** 116

3.3.2 Síntese dos corantes aminoesquarílicos assimétricos…….**.....** 118

3.3.2.1 Síntese do iodeto de 2-[-2-amino-3-(3-hexil-6-iodo-3H-benzotiazol-2-ilidenometil)-4-oxociclobut-2-enilidenometil]-3-hexilbenzoselenazol-3-io (**21**)…….**.....** 118

3.3.2.2 Síntese do iodeto de 3-hexil-2-[3-(3-hexil-6-iodo-3H-benzotiazol-2-ilidenometil)-2-metilamino-4-oxo-ciclobut-2-enilidenometil]-3-3-benzoselenazol-3-io (**22**)…….**.....** 119

3.3.2.3 Sintese do iodeto de 2-[2-fenilamino-3-(3-hexil-6-iodo-3H-benzotiazol-2-ilidenometil)-4-oxo-ciclobut-2-enilidenometil]-3-hexilbenzoselenazol-3-io (**23**)…….**.....** 120

3.3.2.4 Síntese do iodeto de 2-[2-(3-iodofenilamino)-3-(3-hexil-6-iodo-3H-benzotiazol-2-ilidenometil)-4-oxociclobut-2-enilidenometil]-3-hexilbenzoselenazol-3-io (**24**)…….**.....** 121

3.3.2.5 Síntese do iodeto de 3-hexil-2-(3-(3-hexil-6-iodo-3H-benzotiazol-2-ilidenometil)-4-oxo-2-(2-sulfo-etilamino)ciclobut-2-enilidenometil]-3-benzoselenazol-3-io (**25**)…….**.** 123

3.3.2.6 Síntese prévia…….. 124

3.3.2.6.1 Síntese do 3-hexil-2-metilbenzotiazólio (**26**)…….**.....** 124

3.3.2.7 Síntese do 4-[(3-hexilbenzoselenazol-3-io-2-il)metililideno]-2-[(3-3H-benzotiazol-2-ilidenometil]-3-oxociclobut-1-en-1-olato (**27**)……. 125

3.4 Aplicação dos corantes esquarílicos em linhas celulares Caco-2 e HepG2…….. 126

3.4.1 Preparação do meio de cultura…….. 126

3.4.2 Culturas celulares e sua manutenção…… 126

3.4.3 Contagem de células……. 127

3.4.4 Plantação das células e aplicação dos corantes esquarílicos……. 128

3.4.4.1 Preparação das soluções dos corantes a serem testados nas células..... 129

3.4.4.2 Aplicação dos corantes às células…….... 129

3.4.5 Irradiação das células…….... 130

3.4.6 Determinação da viabilidade celular……. 130

3.4.7 Análise e apresentação dos resultados…….. 131

**4 Referências Bibliográficas**..... 132

# Índice de Figuras

**Figura 1.1** Representação esquemática das várias etapas envolvidas na terapia fotodinâmica……... 3

**Figura 1.2** Representação dos mecanismos tipo I e II de geração de ROS por combinação de um fotossensibilizador (PS) e oxigénio no estado fundamental ($^3O_2$)….. 4

**Figura 1.3** Representação das vias de morte celular em Terapia Fotodinâmica do cancro……..... 6

**Figura 1.4** Representação da estrutura molecular do fotossensibilizador anfifílico ATX-S10 (Na)…… 7

**Figura 1.5** Diagrama de Jablonski…… 11

**Figura 1.6** Representação do diagrama de energia para o estado de menor excitação do oxigénio…….... 12

**Figura 1.7** Representação da estrutura de dois corantes esquarílicos utilizados para a determinação do Oxigénio singuleto ……..... 13

**Figura 1.8** Representação da evolução do espectro de UV do DPBF e dos corantes (1'e 2') em solução de acetonitrilo, ao longo do tempo…… 14

**Figura 1.9** Evolução do espectro no UV/Vis do DPBF e do corante (1d) numa solução de $CH_2Cl_2$, ao longo do tempo (A). Estudo comparativo da geração de oxigénio singuleto dos vários corantes esquarílicos sintetizados, numa solução de $CH_2Cl_2$ (B)..... 14

**Figura 1.10** Estrutura química do composto BAM-SiPc …….. 16

**Figura 1.11** Estrutura química do composto DCH-P-Na(I)…….. 17

**Figura 1.12** Estrutura química da Hipericina…… 17

**Figura 1.13** Estrutura química do FS Pheophorbide a (PhA)…….. 18

**Figura 1.14** Estrutura química do BPD-MA (Benzoporfirina derivada de monoácido)……. 18

**Figura 1.15** Estrutura e classificação geral das cianínas……... 20

**Figura 1.16** Representação da estrutura química de três cianínas. (a) Rhodacianína, (b) Indocianína 2 e (c) Indocianína 4……..... 21

**Figura 1.17** Estrutura geral das cianínas esquarílicas……... 22

**Figura 1.18** Estrutura de um corante esquarílico, com substituição do átomo de oxigénio do anel esquarílico por um átomo de enxofre……..... 23

**Figura 1.19** Representação comparativa da estrutura de três corantes esquarílicos (A) e dos respectivos espectros de absorção (B)……. 24

**Figura 1.20** Fórmula geral de cianínas esquarílicas…… 26

**Figura 1.21** Corante cianínico esquarílico……..... 26

**Figura 1.22** Corante cianínico aminoesquarílicos……. 27

**Figura 1.23** Representação da oxidação-redução do Alamar Blue…… 28

**Figura 2.1** Espectros de absorção no UV/Vis dos compostos simétricos em MeOH/$CH_2Cl_2$ (99:1)…….. 35

**Figura 2.2** Espectros de absorção no UV/Vis dos compostos simétricos em DMSO….. 36

**Figura 2.3** Espectros de absorção no UV/Vis dos compostos simétricos em DMEM (meio de cultura, sem soro)…… 37

**Figura 2.4** Espectro parcial de $^1$H-RMN do composto 22 em DMSO: a) T = 25ºC, b) T= 60ºC…….. 55

**Figura 2.5** Espectros de absorção no UV/Vis dos compostos assimétricos em DMSO... 67

**Figura 2.6** Espectros de absorção no UV/Vis dos compostos assimétricos em DMEM (meio base de cultura, sem soro)…… 68

**Figura 2.7** Efeito da irradiação em células HeG2 (A e C) e Caco2 (B e D) não expostas aos corantes esquarílicos simétricos, ao fim de 1 h de incubação (A e C) e ao fim de 24 h de incubação (B e D)……. 71

**Figura 2.8** Efeito do tempo de exposição das células HepG2 (A) e Caco-2 (B) ao corante após irradiação…….. 72

**Figura 2.9** Efeito do tempo de exposição das células HepG2 (A) e Caco-2 (B) ao corante após irradiação…….. 73

**Figura 2.10** Efeito citotóxico do corante esquarílico 4 nas linhas celular HepG2 (A, B, C) e Caco-2 (D, E, F), em função da concentração e do tempo de irradiação…….. 75

**Figura 2.11** Efeito citotóxico do corante esquarílico 6 nas linhas celular HepG2 (A,B, C) e Caco-2 (D, E, F), em função da concentração e do tempo de irradiação…….. 77

**Figura 2.12** Efeito citotóxico do corante esquarílico 7 nas linhas celular HepG2 (A, B, C) e Caco-2 (D, E, F), em função da concentração e do tempo de irradiação…….. 78

**Figura 2.13** Efeito citotóxico do corante esquarílico 8 nas linhas celular HepG2 (A, B, C) e Caco-2 (D, E, F), em função da concentração e do tempo de irradiação…….. 80

**Figura 2.14** Efeito citotóxico do corante esquarílico 9 nas linhas celular HepG2 (A, B, C) e Caco-2 (D, E, F), em função da concentração e do tempo de irradiação…….. 82

**Figura 2.15** Efeito citotóxico do corante esquarílico 19 nas linhas celular HepG2 (A, B, C) e Caco-2 (D, E, F), em função da concentração e do tempo de irradiação…… 83

**Figura 2.16** Efeito citotóxico do corante esquarílico 20 nas linhas celular HepG2 (A, B, C) e Caco-2 (D, E, F), em função da concentração e do tempo de irradiação…… 85

**Figura 2.17** Efeito citotóxico do corante esquarílico 21 nas linhas celular HepG2 (A, B, C) e Caco-2 (D, E, F), em função da concentração e do tempo de irradiação…… 86

**Figura 2.18** Efeito citotóxico do corante esquarílico 22 nas linhas celular HepG2 (A, B, C) e Caco-2 (D, E, F), em função da concentração e do tempo de irradiação…… 88

**Figura 2.19** Efeito citotóxico do corante esquarílico 23 nas linhas celular HepG2 (A, B, C) e Caco-2 (D, E, F), em função da concentração e do tempo de irradiação…… 89

**Figura 2.20** Efeito citotóxico do corante esquarílico24 nas linhas celular HepG2 (A, B, C) e Caco-2 (D, E, F), em função da concentração e do tempo de irradiação…… 91

**Figura 2.21** Efeito citotóxico do corante esquarílico 25 nas linhas celular HepG2 (A, B, C) e Caco-2 (D, E, F), em função da concentração e do tempo de irradiação…… 92

**Figura 2.22** Efeito citotóxico do corante esquarílico 27 nas linhas celular HepG2 (A, B, C) e Caco-2 (D, E, F), em função da concentração e do tempo de irradiação…… 93

**Figura 3.1** Imagem das células Caco2 (A) e HepG2 (B) ……. 126

**Figura 3.2** Processo de contagem das células A. Deposição no hemocitómetro ou nas câmaras do contador automático B…… 128

**Figura 3.3** Placa de cultura 24 horas após a adição de AB e Espetrofotómetro de leitura de placas de 96 poços…….. 131

# Índice de Esquemas

**Esquema 1.1** Representação da síntese de uma cianina esquarílica……... 25

**Esquema 1.2** Esquema representativo da síntese de uma cianína aminoesquarílica….. 25

**Esquema 2.1**Síntese do composto **2**..... 31

**Esquema 2.2**Síntese dos vários corantes cianínicos esquarílicos simétricos…… 33

**Esquema 2.3** Esquema geral da síntese dos corantes cianínicos esquarílicos assimétricos……..... 37

**Esquema 2.4** Síntese do composto **11**…… 38

**Esquema 2.5** Síntese do composto **12**, através de dois métodos diferentes……... 39

**Esquema 2.6** Síntese do composto **13**, através de dois métodos diferentes……... 41

**Esquema 2.7** Síntese do composto **14**…… 42

**Esquema 2.8** Síntese do composto **15**…… 43

**Esquema 2.9** Síntese do composto **16**…… 43

**Esquema 2.10** Síntese do composto **17**…….. 45

**Esquema 2.11**Síntese do composto **18**…….. 47

**Esquema 2.12** Síntese do corante esquarílico **19**……... 48

**Esquema 2.13** Síntese do corante esquarílico **20**……... 49

**Esquema 2.14** Síntese do corante aminoesquarílico **21**……. 52

**Esquema 2.15** Síntese do corante aminoesquarílico **22**……. 54

**Esquema 2.16** Síntese do corante aminoesquarílico **23**……. 57

**Esquema 2.17** Síntese do corante aminoesquarílico **24**……. 59

**Esquema 2.18** Síntese do corante aminoesquarílico **25**……. 60

**Esquema 2.19** Síntese do corante esaquarílico **27**…….. 62

# Índice de Tabelas

**Tabela 1.1** Lista de fotossensibilizadores atualmente existentes no mercado…… 9

**Tabela 2.1** Ponto de fusão e espectro IV do sal quaternário de amónio (**3**)…….... 32

**Tabela 2.2** Pontos de fusão e bandas características dos espectros no IV dos compostos **4**-**9**..... 34

**Tabela 2.3** Ponto de fusão e bandas características do espectro no IV do 2-metil-6-nitro-benzotiazole (**11**)…… 39

**Tabela 2.4** Ponto de fusão e espectro no IV do 6-amino-2-metilbenzotiaole (**12**)…… 40

**Tabela 2.5** Ponto de fusão e espectro no IV do 6-iodo-2-metilbenzotiazole (**13**)……. 41

**Tabela 2.6** Ponto de fusão e espectro no IV do iodeto de 3-hexil-6-iodo-2-metilbenzotiazole-3-io (**14**)……. 42

**Tabela 2.7** Dados físicos e espectroscópicos do 3-butoxi-4-[(3-hexilbenzoselenazole-2(3H)-ilideno)metil]-3-ciclobuten-1,2-diona (**17**)……... 46

**Tabela 2.8** Dados físicos e espectroscópicos dos compostos **19** e **20**…….. 51

**Tabela 2.9** Dados físicos e espectroscópicos dos compostos **21**-**27**..... 64

**Tabela 2.10** Rendimentos quânticos na formação do oxigénio singuleto, por parte dos novos corantes cianínicos esquarílicos assimétricos sintetizados…… 69

**Tabela 3.1** Esquema da plantação das células nas placas de cultura de 96 poços…….. 128

**Tabela 3.2** Esquema da disposição da aplicação dos corantes nas placas de cultura de 96 poços……... 129

## Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

**A552** - linha celular de proveniente do ovário do hamster chinês

**AB** - corante alamar blue

**ADN** - ácido desoxirribonucleico

**AIF** - fator indutor de apoptose

**5-ALA** - ácido 5-aminolevulinico

***alif.*** - alifática

**ANT**- translocador de nucleótido adenina

**Ar** - aromático

**ATCC** - "american type culture collection"

**ATP** - adenosina trifosfato

**ATP-ase** - ATP hidrolase

**Bad** - "Bcl-2 associated death promoter"

**Bax** - "Bcl-2 associated X protein"

**Bcl-2** - proteína antiapóptotica (B-cell lymphoma 2)

**Bid** - "$BH_3$ interacting-domain death agonist"

**BSA** - Albumina do soro bovino

**$^{o}$C** - graus centigrados

**Caco-2** - linha celular derivada de adenocarcinoma colorectal

**Calc.** - calculado

**c.c.f.**- cromatografia em camada fina

**CD´s** - ciclodextrinas

**c.d.o.**- comprimento de onda

**Cit c** - citocromo c

**cm** - centímetros

**$cm^2$** - centímetro quadrado

**Cont.** - continuação

**$^{13}$C-RMN** - ressonância magnética nuclear de carbono

***d*** - dupleto

**dec.** - decomposição

**DEPT 90** - "distortionless enhancement by polarization, 90º"

**DEPT 135** - "distortionless enhancement by polarization, 135º"

**DMBA** - 7,12-Dimethylbenz(a)anthracene

**DMSO** - dimetilsulfóxido

**DNA** - ácido desoxirribonucleico

**DPBF** - 1,3-difenilisobenzofurano

**$dm^3$**- decímetro cúbico

**4-DMAP** – 4,4-N-dimetilaminopiridina

**DMEM** - "dulbecco's modified eagle medium"

**Eq.** - equivalente molar

**EMAR-ESI-TOF** - espectrometria de massa de alta resolução por "electrospray ionization time of fligth-mass"

**ESR** - ressonância de spin electrónico

**EtOH** - etanol

**f** - forte

**fr** - fraca

**FS** - fotossensibilizador

**g** - grama

**h** - hora

**HDL** - high-density lipoprotein

**HL-60** - células de leucemia promielocitica humana

**HpD** - derivado de Hematoporfirina

**HepG2** - linha celular derivada do carcinoma hepatocelular hepático

**$^{1}$H-RMN** - ressonância magnética nuclear de protão

**Hz** - hertz

**$IC_{50}$** - concentração inibitória para 50% das células

**ICLAS** - espectroscopia de absorção a laser intracavitária rápido

**$ID_{50}$** - dose média letal para 50% das células

**ISC**- transição intersistema

**IV**- infravermelho

***J*** - constante de acoplamento

**J** - joules

**Kg** - quilograma

**KTP** - corante potássio-titânio-fosfato

**L** - litro

**l** - largo

**L5178Y** - linha celular proveniente de linfoma de rato

**LDL** - low-density lipoprotein

**LED** - laser de díodo

**lit.** - literature

**M** - molaridade

**m** - media

**[$M^+$]** - ião molecular

**m** - multipleto

**MCF-7** - "human breast adenocarcinoma cell line"

**MeOH** - metanol

**mg** - miligrama

**mL** - mililitro

**mmol** - milimole

**min.** - minuto

***m*RNA** - RNA mitocondrial

**mW** - mili watts

**m/z** - relação massa/carga (espectrometria de massa)

**NIR** - "near infra red"

**nm** - nanómetro

**$O_2$** - oxigénio molecular

**$^3O_2$** - oxigénio no estado fundamental

**$^1O^{\cdot}_2$**- oxigénio singuleto

**$^3O^{\cdot}_2$** - radical superóxido

**p.a**. - pró analise

**PBS** - tampão fosfato-salino

**Pc-4** - ftalocianina 4

**PDT** - "photodynamic therapy"

**p.f**.- ponto de fusão

**pH** - potencial de hidrogénio

**$PO_2$** - pressão de oxigénio

**ppm** - parte por milhão

***p*-TSOH** - ácido p-toluenosulfónico

**p/v** - percentagem peso por volume

**REMPI** - ressonância de alta ionização multifotónica

**Rf** - fator de retardação

**ROS** - "reactive oxigen species"

**RMN** - ressonância magnética nuclear

**$^3S_1$*** - estado tripleto excitado

**$S_0$** - fotossensibilizador no estado fundamental

**$S_1$** - fotossensibilizador no estado singuleto excitado

**S.D**.- desvio padrão

**SEM** - desvio padrão médio

**Smac/Diablo** - (Smac- segundo activador mitocondrial de caspases); Diablo (proteína de ligação-IAP directa com baixo pl).

**$S_{N2}$** - reacção de substituição nucleofílica bimolecular

**T1** - fotossensibilizador no estado excitado

**t.a.** - temperatura ambiente

**t-Bid** - truncated Bid

**THF** - tetra-hidrofurano

**TNFR** - "tumor necrosis factor receptor"

**TPP** - padrão meso-tetra-fenil-porfirina

**Tt** - tempo de vida

**UV**- ultravioleta

**UV-Vis** - região do espectro de absorção ultravioleta-visível

**v/v** - percentagem volume por volume

**VDAC**- canais aniónicos dependentes de voltagem

**W**- watts

**ε** - coeficiente de absortividade molar

**λ** - comprimento de onda

$\lambda_{máx}$- comprimento de onda máximo de uma banda de absorção no UV (nm)

**δ** - desvio químico

**Δ** - aquecimento

$^{1}\Delta_{g}$ - estado singuleto

**π** - ligação pi

$\nu_{máx}$- número de onda no máximo de uma banda de absorção no IV( cm-1)

$^{3}\Sigma_{g}^{+}$- oxigénio molecular

**µM** – micramolar

**µL**- microlitro

**%** - percentagem

**$\Delta\Psi_m$**- potencial membranar

**η**- rendimento

**φΔ**-rendimento quântico na formação de oxigénio singuleto

# Capítulo 1.

## INTRODUÇÃO

## 1.1 Terapia Fotodinâmica

A terapia fotodinâmica (PDT- *photodynamic therapy*) é uma opção de tratamento não evasiva, relativamente recente e com inúmeras aplicações. Consiste na administração tópica, local ou sistémica de um fármaco não tóxico ou um corante, designado por fotossensibilizador (FS), que vai atingir a lesão do paciente, seguida de irradiação com luz de comprimento de onda (λ) adequado (geralmente na região do visível ou infravermelho próximo). Na presença de oxigénio e sob irradiação o FS gera espécies citotóxicas capazes de provocar a morte celular, seguida de destruição do tecido afectado (Hambling e Mroz, 2008).

Existem várias fases de tratamento e o procedimento pode ser repetido as vezes que for necessário, uma vez que não ocorrem efeitos de toxicidade cumulativa tratando-se de um tratamento não evasivo e de baixo risco, tornando possível o seu uso em pessoas idosas e debilitadas. A sua principal adversidade prende-se com o facto de provocar fotossensibilidade no paciente, efeito que pode ser contornado evitando a exposição à luz solar e artificial muito intensa por um período de aproximadamente seis semanas, dependendo do FS utilizado (Avirah *et al.*, 2008; Perussi, 2007).

A Figura 1.1 ilustra as principais fases da PDT. Numa primeira fase o FS é administrado, entrando na corrente sanguínea e dependendo do tipo de corante, é absorvido por todas as células do corpo (Avirah *et al.*, 2008; Perussi, 2007). Na segunda fase, após decorrido o tempo adequado de incubação, o FS acumula-se preferencialmente nas células tumorais (Avirah *et al.*, 2008), sendo essencial que o FS escolhido apresente uma farmacocinética que favoreça a sua permanência nas células tumorais durante mais tempo que nas células saudáveis (Perussi, 2007). Durante a terceira fase, já no tecido alvo, o FS vai ser irradiado e excitado com luz de λ adequado, que vai servir de estímulo para a produção de espécies citotóxicas, as espécies reactivas de oxigénio (ROS- *Reactive Oxigen Species*), que vão reagir com moléculas biológicas como proteínas, ácidos nucleicos, lípidos, entre outros, afectando a fisiologia da célula e levando à sua morte (Avirah *et al.*, 2008; Perussi, 2007).

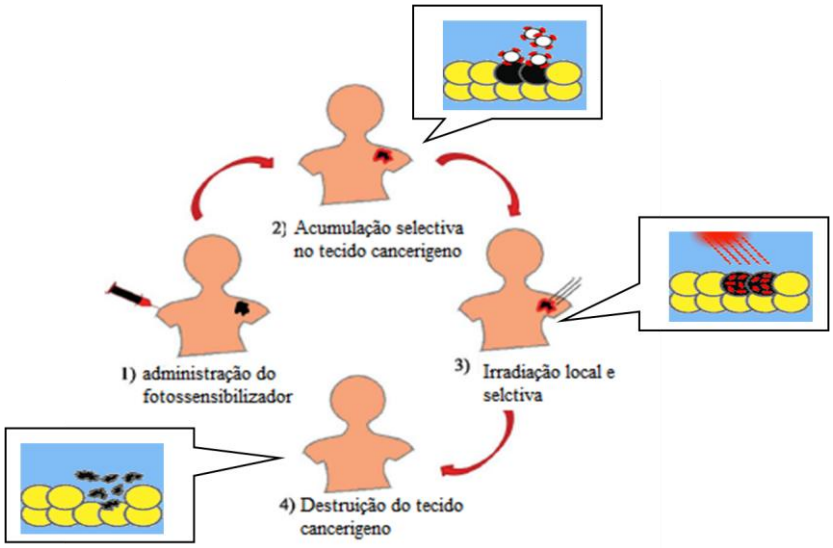



**Figura 1.1** Representação esquemática das várias etapas envolvidas na terapia fotodinâmica (figura adaptada de Avirah *et al*., 2012)

Para a geração das ROS, dois mecanismos de acção têm sido discutidos, no processo da PDT (Figura 1.2).

O mecanismo tipo I, também referido por mecanismo radicalar, pode ocorrer por transferência de electrões, abstracção de átomos como o hidrogénio ou por fotoadição (Redmond, 2008). De uma forma geral o FS no estado excitado vai sofrer uma transferência intersistema, para dar origem a um estado tripleto excitado, que reage directamente com as biomoléculas que o rodeiam, produzindo radicais intermediários (Arunkumar *et al*., 2006; Avirah *et al*., 2008; Ramaiah *et al*., 2002; Redmond, 2008).

O mecanismo tipo II, a reacção mais comum, envolve a transferência de energia do FS no estado tripleto excitado ($^3S_1^*$) para o oxigénio no seu estado fundamental, produzindo oxigénio singuleto ($^1O_2$) (Arunkumar *et al*., 2006; Avirah *et al*., 2008; Redmond, 2008). Em ambos os mecanismos de acção, pode ocorrer dano celular ao nível do seus constituíntes (lípidos, proteínas e DNA) podendo levar à morte celular (Agostinis *et al.* 2002; Arunkumar *et al*., 2006).

As ROS como radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), produzidas pela PDT, provocam então uma sequência de eventos oxidativos capazes de induzir alterações na fisiologia celular e posteriormente a sua morte por necrose ou apoptose, seguindo-se eventualmente o desaparecimento do tumor (Ribeiro *et al*., 2004).

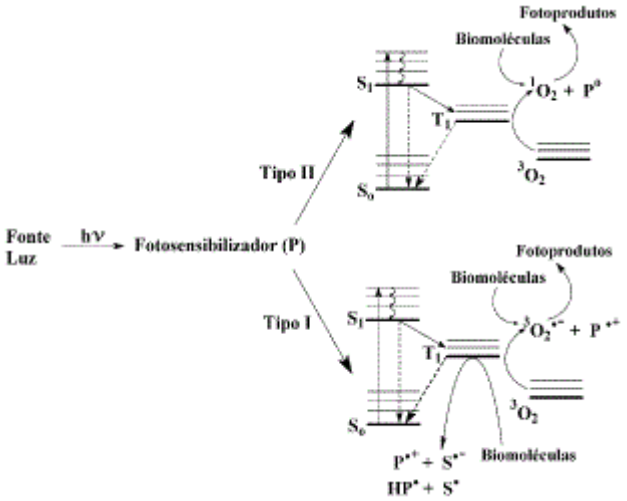



**Figura 1.2** Representação dos mecanismos tipo I e II de geração de ROS por combinação de um FS e oxigénio no estado fundamental ($^3O_2$). (figura adaptada de Ribeiro *et al*., 2004)

### 1.1.1 Acção da terapia fotodinâmica em sistemas biológicos

Quando o FS é injectado directamente na corrente sanguínea, inicialmente liga-se a proteínas séricas (Robertson *et al*., 2009). Segundo Lukśiene (2003), os FS mais hidrofóbicos podem ligar-se à HDL ("High Density Lipoprotein") e LDL ("Low Density Lipoprotein") séricas, o que se revela bastante útil, uma vez que as células neoplásicas expressam um elevado número de receptores membranares destas proteínas. Depois de se ligar às proteínas séricas, o FS é transferido para as células endoteliais e posteriormente para os vasos adventícios podendo permanecer na matriz extracelular ou permear a membrana plasmática, acumulando-se preferencialmente no interior das células alvo (Robertson *et al.*, 2009).
Finalmente ocorre a sua depuração do local de acção, através dos vasos linfáticos ou sanguíneos e excreção via renal ou hepática (Robertson *et al.*, 2009).

A resposta celular à terapia fotodinâmica, *in vivo*, é influenciada por uma complexidade de sistemas biológicos. Um determinado número de organelos celulares pode ser atacado durante este tratamento, incluindo mitocôndrias, lisossomas, membranas nucleares e plasmática e é o organelo atingido que vai determinar se a morte celular ocorre por necrose ou por apoptose (Sharman *et al.*, 1999). Vários estudos realizados nas últimas décadas, demonstraram que o mecanismo de destruição do tumor induzido pela PDT depende de vários factores, nomeadamente: o tipo de célula alvo, a presença de um sistema apoptótico funcional,

a estrutura e localização subcelular do FS utilizado, as condições de tratamento, a dose de luz aplicada e a $PO_2$ (pressão de oxigénio) (Mroz *et al*, 2011; Robertson *et al*., 2009; Sharman *et al*., 1999).

No que diz respeito aos FS, os factores mais importantes a nível celular são: a carga iónica, o grau de hidrofobicidade e o grau de assimetria da molécula, assim sendo os FS's mais hidrofóbicos que possuam duas ou menos cargas negativas difundem na membrana plasmática, podendo posteriormente permear as membranas intracelulares, enquanto os FS's menos hidrofóbicos tendem a ser demasiado polares para permear a membrana e por isso entram na célula através de mecanismos de endocitose (Robertson *et al*., 2009).

O dano causado durante a PDT, a nível da membrana plasmática, pode ser observado poucos minutos após irradiação. De uma forma geral, este tipo de dano manifesta-se pela turgescência da célula, lise e libertação de enzimas marcadoras da membrana plasmática, enzimas citossólicas e lisossomais, redução do transporte activo, despolarização da membrana plasmática, inibição da actividade membranar nomeadamente da actividade da $Ca^{2+}$ATP-ase e aumento da concentração de $Ca^{2+}$ intracelular. Podendo ainda ocorrer mecanismos de peroxidação lipídica, havendo oxidação dos resíduos de ácidos gordos insaturados e colesterol, ao nível das membranas plasmática, mitocondrial e nuclear (Lukśiene, 2003).

A apoptose é um mecanismo de morte celular programada, genéticamente codificada em cada célula do corpo, tratando-se de um processo complexo e que ocorre em vários passos (Figura 1.3) (Mroz *et al*., 2011), sendo desencadeada como resposta a situações que induzam o stresse celular (Ribeiro *et al*, 2004). A apoptose pode ocorrer por duas vias, a primeira via, intrínseca, inicia-se com a activação do TNFR ("Tumor Necrosis Factor Receptor"). Ocorre então a libertação do mediador de stresse, o Cit c, pela mitocôndria resultando na formação de um apoptossoma. Este por sua vez vai activar a caspase iniciadora 9 e esta a caspase 3. Em resposta ao estímulo apóptotico, ocorre a activação dos membros pró-apoptótico da família das proteínas Bcl-2 (Bax e Bak) que actuam sobre a libertação de Cit c. Outras proteínas pró-apoptóticas como Smac/Diablo (Smac- "second mitochondrial-derived activator of caspases"; DIABLO- "Direct IAP-binding protein with low isoelectric point") e AIF ("Apoptosis Inducing Factor") são também libertadas. A via extrínseca ocorre através da clivagem da proteína pró-apoptotica Bid por parte da caspase 8, tornando-o na sua forma activa t-Bid. As ROS ("Reactive Oxgen Species") tais como aniões superóxido ($O_2^-$), peróxido de hidrogénio ($H_2O_2$), radicais hidróxido livres ($OH^-$) e óxido nítrico (NO) provocam danos ao nível mitocondrial, proteínas e lípidos e a nível membranar activando a cascata das caspases e

facilitando a libertação de factores apoptóticos. A necrose pode ser activada quando a via autofágica e morte por via mitocondrial (libertação de $Ca^{2+}$) são activados, estando associada ao aumento dos níveis de ROS que levam à diminuição do potencial de membrana ($\Delta\Psi_m$), à diminuição dos níveis de ATP e aumento dos níveis de $Ca^{2+}$ no reticulo endoplasmático e (Mroz *et al.*, 2011; Portt *et al.*, 2011; Ribeiro *et al,* 2004).

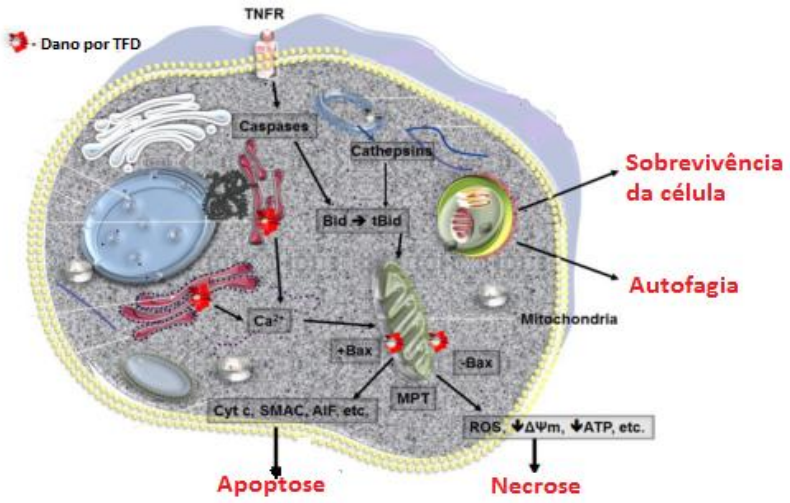



**Figura 1.3** Representação das vias de morte celular em Terapia Fotodinâmica do cancro (Figura adaptada de Mroz *et al.*, 2011)

Em 1999, Zhuang e a sua equipa, demonstraram que o oxigénio singuleto gerado durante a PDT, utilizando o rosa de bengala como FS, irradiado com luz visível, induzia a apoptose em células HL-60 (linha celular de leucemia promielocítica humana), ocorrendo libertação de Cit c e activação das caspases 8 e 3.

Em 2001, Xue e os seus colaboradores utilizando o FS Pc-4 (ftalocianina-4) e luz visível, verificaram a fotodestruição da proteína anti-apóptotica Bcl-2 em células MCF-7. Porém este efeito podia ser prevenido utilizando L-Histidina (remove o $^1O_2$). Neste trabalho não se verificou dano fotoquímico nas proteínas Bcl-x, Bax, Bad, VDAC ("Voltage-Dependent Anion Channels") ou no ANT ("Adenine Nucleotid Translocator").

Em 2001, Chiu e Olenick, demonstraram que o tratamento de células Ly-R com Pc-4 utilizando a PDT, resultava na libertação de Cit c para o citoplasma após 15 minutos de tratamento e verificaram também uma perda do potencial membranar ($\Delta\Psi_m$).

Em 2002, Usuada e os seus colaboradores, concluíram que a Smac/Diablo promovia a apoptose após tratamento com PDT utilizando como fotossensibilizador a Pc-4 em células de adenocarcinoma de pulmão humano.

Outro estudo, demonstrou que células humanas de adenocarcinoma do cólon (HT 29) quando submetidas à PDT, sofriam uma variação em vários genes e proteínas, incluindo a desrregulação da Bcl-2 e Bax (Shen *et al.*, 2005).

Demontrou-se que o processo apoptótico, desencadeado pelo ácido 5-aminolevulínico (5-ALA) envolvia a supressão do mRNA da Bcl-2 e aumento do mRNA da Bax, em células de cancro cervical e cancro do esófago (He *et al.*, 2009; He *et al.*, 2011).

Durante o processo de apoptose, o citocromo c é libertado da mitocôndria para o citossol, sendo esta controlada pela proteína Bcl-2 (Mroz *et al.*, 2011). O importante papel do Cit c na apoptose foi demonstrado por Vantieghem e colaboradores (2001), verificando-se que a sobre-expressão da Bcl-2 em células T, Pc60R1R2 de hibridoma de rato, após tratamento com PDT utilizando a hipericina como FS, reduzia a libertação do Cit c e consequentemente da apoptose.

Nagata e a sua equipa de investigação (2003), usaram o FS anfifilico ATX-S10 (Na) (Figura 1.4), em células de melanoma maligno humano e verificaram que doses menores de PS aplicadas, levavam a menos de 70% de citotoxicidade induzida por apoptose, enquanto que a maioria das células seguiram a necrose utilizando doses que induziam 99% de citotoxicidade.

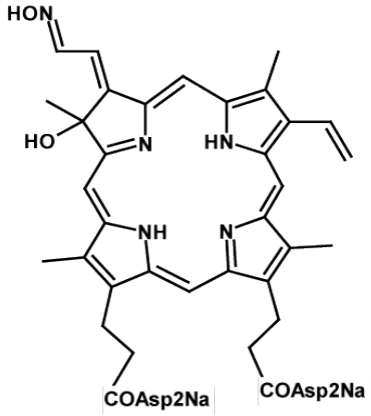



**Figura 1.4** Representação da estrutura molecular do fotossensibilizador anfifilico ATX-S10 (Na) (Yumita *et al.*, 2011)

### 1.1.2 Aplicações da PDT

Como anteriormente referido, a PDT é um procedimento minimamente evasivo, que envolve a destruição de células malignas pela combinação de luz e de um FS (Devi *et al*., 2008). Este pode ser utilizado não só em doenças de carácter neoplásico mas também não neoplásico (Ramaiah *et al*. 2002)

A PDT teve um rápido desenvolvimento ao longo dos últimos anos, não só no que diz respeito ao seu potencial no tratamento de doenças oncológicas mas também cardiovasculares, doenças dermatológicas (ex. psoríase e doenças oftalmológico (ex. degeneração macular associada à idade) e doenças bacterianas) (Devi *et al*., 2008; Ribeiro *et al*., 2004). A elevada selectividade na destruição de células tumorais em relação a células normais, tem feito desta técnica, uma alternativa bastante atractiva às terapias tradicionais de cancro (Arunkumar *et al*., 2006; Delaey *et al*., 2000). Patologias oncológicas tais como carcinomas peritoneais, cancro do pulmão, cancros e condições pré-malignas do trato aerodigestivo superior e cancro da prostata têm sido alvo experimental e clínico desta técnica (Devi *et al*., 2008).

### 1.1.3 Tipos de FS's utilizados na PDT e suas características

Vários compostos, desde aromáticos simples a macrociclos mais complexos têm sido apontados para possível utilização como FS's na PDT (Avirah *et al*., 2012).

Os primeiros FS's a serem investigados clinicamente foram os derivados de Hematoporfirina (HpD) e a sua forma comercializada, Photofrin® (Avirah *et al*., 2012; Ethirajan *et al*., 2008), seguiram-se as porfirinas, ftalocianinas, clorinas, bacterioclorinas, cianinas, rosa de bengala, azul-de-metileno, ácido aminolevulínico e seus derivados (Avirah *et al*., 2012). Algumas formas comerciais de FS, derivadas destas moléculas encontram-se listadas na Tabela 1.1. No entanto assim como grande parte dos FS's aprovados, estes possuem um mecanismo degradativo bastante lento, provocam elevada fotossensibilidade e fototoxicidade cutânea quando utilizados a longo prazo, para além de serem activados com luz de comprimento de onda próximo de 700 nm, o que não permite a penetração de mais do que alguns milímetros na pele (Avirah*et al*., 2012; Ethirajan *et al*., 2008).

**Tabela 1.1** Lista de FS's atualmente existentes no mercado (tabela adaptada de Ethirajan *et al*., 2008)

| Fotossensibilizador | Empresa de comercialização | Estrutura básica | λ ($\lambda_{máx}$) | Metal de coordenação |
|---|---|---|---|---|
| Photofrin® | Pinnacle Biologics, Inc. | Porfirina | 630 | |
| Hematoporphyrin IX | SIGMA-ALDRICH corporation | Porfirina | 630 | |
| Levulan® | DUSA Pharmaceuticals, Inc. | Ácido aminolevulínico | 635 | |
| Metvix® | Penn Pharmaceutical Services Ltd. | Ácido aminolevulínico | 635 | |
| Visudyne® | Novartis Farma - Produtos Farmacêuticos, S.A. | Benzoporfirina | 689 | |
| Talaforfin® | Roswell Park Cancer Institute (RPCI) | Clorina | 664 | |
| Purpurinimide 277 | Roswell Park Cancer Institute (RPCI) | Clorina | 700 | |
| TOOKAD® | Steba Biotech S.A. | Bacteriociclina | 763 | Paládio |
| Lutex® | Pharmacyclics, Sunnyvale, CA | Texapirina | 732 | Lutécio |
| PC4® | SIGMA-ALDRICH corporation | Ftalocianina | 680 | Silício |
| Photosense® | SIGMA-ALDRICH corporation | Ftalocianina | 670 | Alumínio |

Devido a tais razões, nos últimos anos têm vindo a crescer o interesse no desenvolvimento de uma segunda geração de FS's, nas quais são inseridos os corantes crocónicos (Avirah *et al*., 2007), compostos esquarílicos como bis(3,5-di-iodo-2,4,6-tri-hidroxifenil)esquarílico (Alex *et al*., 2007; Devi *et al*., 2008), hipericina (Agostinis *et al*., 2002; Boiy *et al*., 2011; Chen *et al*., 2002), cianinas esquarílicas, as quais ainda se encontram em estudo quanto à avaliação do seu potencial na PDT (Santos *et al*., 2003; Panigrahi *et al*., 2012) entre outros, que possuem uma zona de absorção preferencialmente na região entre o visível e o infravermelho-próximo (Avirah *et al*., 2012; Ethirajan *et al*., 2008).

Vários parâmetros têm sido descritos para aumentar o sucesso dos compostos utilizados como agentes FS's, sendo que este depende largamente não só das suas características fotofísicas mas também fotoquímicas (Santos *et al*., 2003). Estes parâmetros foram estabelecidos não só para melhorar as propriedades de absorção e os rendimentos quânticos

na formação do sensibilizador no estado tripleto excitado e geração do oxigénio singuleto, mas também para melhorar a sua farmacocinética (Avirah *et al*., 2012).

### 1.1.4 Parâmetros para a eficiência de um FS

#### 1.1.4.1 Pureza

O composto deve ser quimicamente puro (Ethirajan *et al*., 2008) principalmente para simplificar a interpretação da relação dose-resposta (Bonnett, 2000).

#### 1.1.4.2 Toxicidade e estabilidade

O FS deve apresentar toxicidade mínima no escuro e apenas ser citotóxico na presença de luz (Avirah *et al*., 2012; Ethirajan *et al*., 2008). Este deve também ser estável e ter uma elevada selectividade para se acumular rápida e preferencialmente nos tecidos alvo e também ter uma eliminação rápida e eficaz, de modo a minimizar a fototoxicidade na pele (Ethirajan *et al*., 2008).

#### 1.1.4.3 Parâmetros fotofísicos

Para utilizações terapêuticas, os parâmetros fotofisicos utilizados são, o rendimento quântico ($\varphi_T$), o tempo de vida ($\tau_T$) e a energia do estado tripleto. Sendo assim o FS deve apresentar um elevado rendimento quântico na formação dos componentes no estado tripleto e oxigénio singuleto, combinado com um elevado tempo de vida (Avirah *et al*. 2012; Santos *et al*., 2003).

Para iniciar o processo fotodinâmico, o corante ou outro agente fotossensibilizador, deve absorver no comprimento de onda de luz sobre ele irradiado de acordo com a primeira lei da fotoquímica. Depois os fotões devem ter energia suficiente para ocorrer uma excitação electrónica na molécula, o que requer energia na zona do Ultravioleta (UV), Visível (Vis) ou nas zonas espectrais do infravermelho próximo (NIR- Near Infra Red) (Redmond, 2008).

Nos FS's, a absorção de um fotão de $\lambda$ adequado produz um estado singuleto excitado ($S_1$). O estado singuleto de menor excitação ($S_2$), tem um tempo de vida maior que os estados mais excitados, devido à larga separação de energia que existe entre o estado fundamental ($S_0$)

e os estados singuleto mais excitados. Ao relaxamento entre os dois estados dá-se o nome de fluorescência. Os FS utilizados na PDT devem possuir uma elevada fluorescência, ($10^{-9}$ a $10^{-7}$s entre excitação e relaxamento) fazendo destes uma ferramenta útil para imagiologia de tumores, determinação da farmacocinética de drogas e avaliação da dosimetria (Redmond, 2008). Tais processos são explicados por um diagrama que demonstra os níveis de energias da molécula e dão uma perspectiva das transições envolvidas tanto nos processos de absorção como de relaxação (Figura1.5) (Jablonski, 1993).

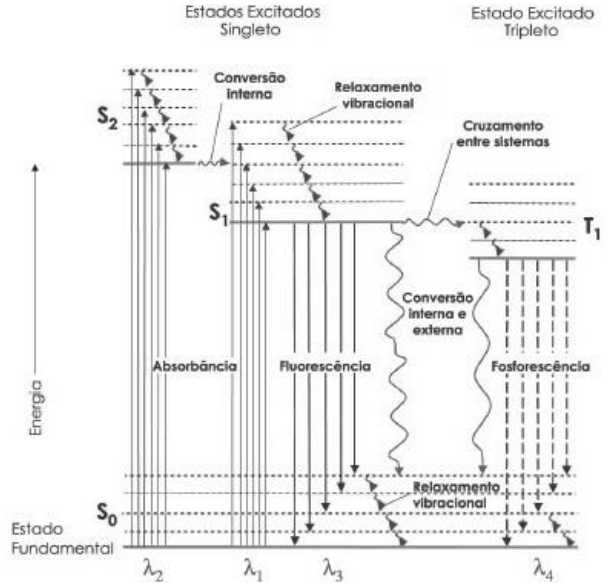



**Figura 1.5** Diagrama de Jablonski (figura adaptada de Sotomayor *et al.,* 2008)

Outro parâmetro determinante do potencial do FS é a sua eficácia em produzir oxigénio singuleto eficientemente (Ethirajan *et al*., 2008).

O oxigénio molecular no estado singuleto ($^1O_2$) é o principal mediador do dano fotodinâmico em sistemas vivos, sendo que este pode ser qualificado e quantificado por uma variedade de métodos espectroscópicos, químicos e biológicos (Redmond, 2008). Têm sido aplicados métodos como espectroscopia de emissão, espectroscopia de absorção com laser de díodo regulável, espectroscopia Raman, espectroscopia de absorção a laser intracavitária (ICLAS), ressonância de spin eletrónico (ESR), ressonância de alta ionização multifotónica (REMPI), métodos calorimétricos como calorimetria acústica induzida por laser e lentes térmicas com resolução de tempo (Gupta *et al*., 2004; Mathai *et al*., 2007). As espectroscopias

de emissão e de absorção podem ser úteis no que toca ao estudo das propriedades fotofísicas e fotoquímicas do FS (Redmond, 2008).

Os FS's utilizados em PDT, com estruturas tendo como base o anel tetrapirrólico (porfirinas, clorinas, ftalocianinas, etc.) são bastante susceptíveis à agregação e a fluorescência dos FS's nos tecidos pode constituir um guia importante para a actividade fotodinâmica, uma vez que a agregação tende a extinguir essa fluorescência levando a uma diminuição da absorção (Redmond, 2008).

A transferência de energia do estado $T_1$ (estado fundamental) para o oxigénio, formando $^1O_2$ (oxigénio no estado singuleto) pode também ser observada de forma a obter informações mecanísticas (Redmond, 2008).

No que diz respeito aos métodos espectroscópicos existem dois métodos principais, para detecção do $^1O_2$ que se forma, baseados em estados de transição. Como demonstrado na Figura 1.6, na primeira transição detecta-se a emissão fluorescente de baixa intensidade acompanhada do relaxamento do estado $^1O_2$ para o estado fundamental e na segunda transição mede-se a absorção correspondente à passagem de $^1O_2$ para $T_1$ (Redmond, 2008).

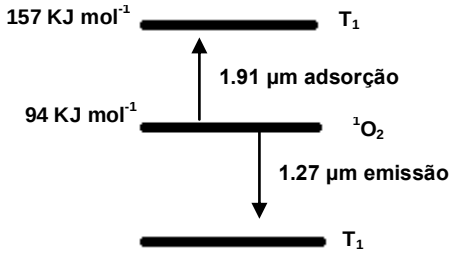
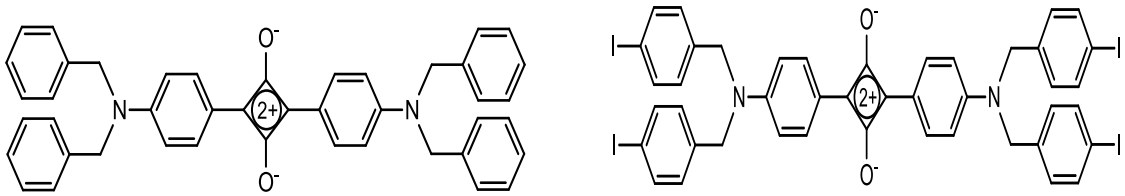



**Figura 1.6** Representação do diagrama de energia para o estado de menor excitação do oxigénio, no qual $^1O_2$ designa o estado singuleto e $T_1$ o estado fundamental (Redmond, 2008)

A detecção de $^1O_2$ nos tecidos também se pode revelar bastante útil para a avaliação de mecanismos em PDT, sendo que a monitorização contínua da luminescência, pode determinar os níveis relativos gerados de $^1O_2$ e realçar os factores adversos, como a elevada taxa de consumo de oxigénio induzida e a fotodegradação do corante nos tecidos (Redmond, 2008).

O método comparativo tem sido apontado por vários autores, como um método eficaz para avaliação da capacidade de produção de oxigénio singuleto pelo corante com potencial

uso como FS em PDT. Em 2006, Arunkumar e a sua esquipa de investigação determinaram a capacidade de dois corantes esquarílicos (Figura 1.7) na produção de $^1O_2$, em dois solventes distintos (acetonitrilo e tetra-hidrofurano-hidratado) a formação de $^1O_2$ foi detectado pelo aprisionamento do composto a 1,3-difenil-iso-benzofurano (DPBF, com $\lambda_{máx}$ de absorção de 415 nm) formando um produto na forma de endoperóxido sem coloração, quando reage com o oxigénio singuleto. Neste estudo concluíram que a introdução de átomos de iodo (composto iodado **2'**), induzia a uma maior capacidade de produção de $^1O_2$, relativamente ao composto sem átomos de iodo.




**1'** **2'**

**Figura 1.7** Representação da estrutura de dois corantes esquarilicos utilizados para a determinação do Oxigénio singuleto por Arunkumar e os seus colaboradores em 2006

Estes autores verificaram (Figura 1.8), que quando os corantes estavam mono dispersos, a banda do DPBF era extinta em tempos distintos, ao fim de um tempo de meia vida de 600 s e 100 s, para o corante **1**' o corante **2**' (iodado), respectivamente, comprovando que os corantes que possuam átomos de iodo na sua constituição, são FS´s com maior capacidade de produção de oxigénio singuleto, uma vez que os átomos pesados de iodo, promovem os estados de excitação intersistemas (Arunkumar *et al*. 2006).

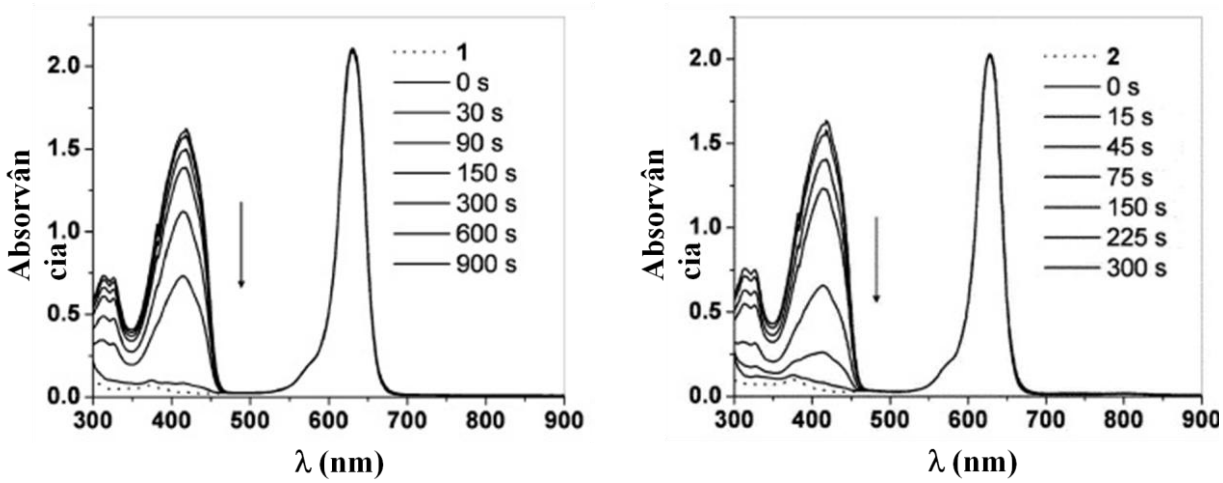



**Figura 1.8** Representação da evolução do espectro de UV do DPBF e dos corantes (**1**' e **2**') em solução de acetonitrilo, ao longo do tempo (figura adaptada de Arunkumar *et al*., 2006)

Beverina e os seus colaboradores em 2005, compararam a capacidade de geração de $^1O_2$ de compostos esquarílicos, formados a partir da condensação de ácido esquárico com um derivado de 2-pirrolil substituído, utilizando como solvente, DPBF em $CH_2Cl_2$ e comparando-o com o padrão TPP (meso-tetra-fenilporfirina). Através dos gráficos da Figura 1.9, pode verificar-se que os compostos formados apresentavam não só uma banda de absorção na janela fototerapêutica, entre 700 e 850 nm, mas também uma elevada capacidade de gerar oxigénio singuleto e boa solubilidade em água.

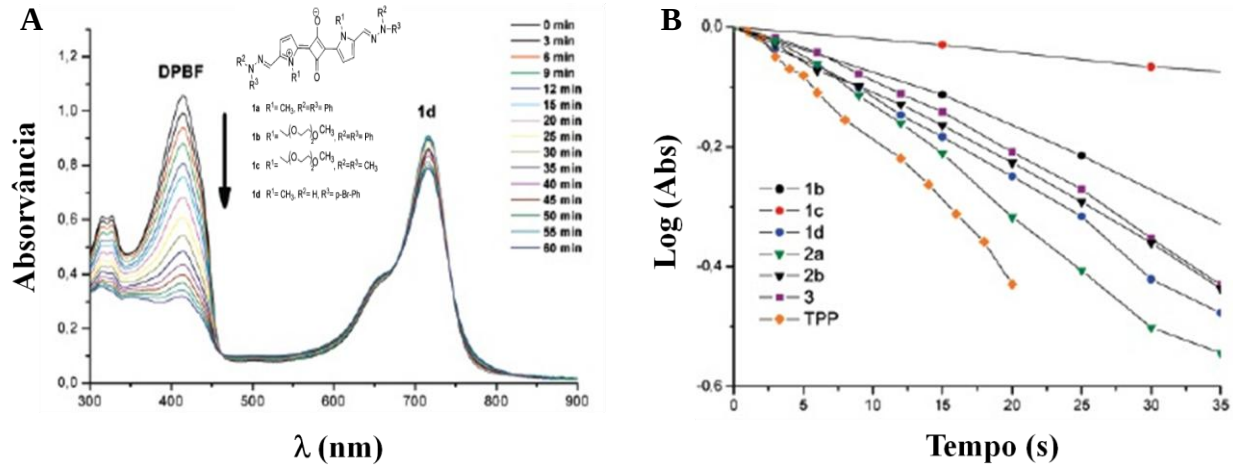



**Figura 1.9** Evolução do espectro no UV/Vis do DPBF e do corante (1d) numa solução de $CH_2Cl_2$, ao longo do tempo (**A**). Estudo comparativo da geração de $^1O_2$ dos vários corantes esquarílicos sintetizados, numa solução de $CH_2Cl_2$ (**B**) (figura adaptada de Beverina *et al*., 2005)

#### 1.1.4.4 Absorção da luz pelo FS e emissores de luz

A absorção e dispersão de luz nos tecidos variam consoante o λ de radiação utilizado, pelo que o FS desejável deve apresentar um elevado coeficiente de absortividade (ε) e um $\lambda_{máx}$ de absorção na região entre os 600 e 850 nm, conhecida como "janela fototerapêutica", onde a dispersão nos tecidos é baixa e possui uma penetração em elevada profundidade (Avirah *et al*., 2012; Ethirajan *et al*., 2008; Santos *et al*, 2003).

A absorção electrónica é também influenciada pela natureza dos grupos substituintes (dador ou atrator de electrões), posicionados nas posições periféricas das moléculas (Ethirajan *et al*., 2008).

As fontes de luz mais utilizadas em PDT, para excitação do FS são os lasers (Pervaiz e Olivo, 2006; Weersink *et al*., 2008). Estes são escolhidos pela sua emissão (a λ definidos), próximo do $\lambda_{máx}$ de absorção do FS (Weersink *et al*., 2008). Lasers como corante de árgon, corante de potássio-titânio-fosfato (KTP), de vapores metálico e mais recentemente lasers de díodo (LED) têm sido utilizados para a PDT em todo o mundo (Pervaiz e Olivo, 2006). Os LED's têm a vantagem de poderem gerar uma elevada energia nos comprimentos de onda desejados, de poderem ser montados numa variedade de geometrias e tamanhos (Pervaiz e Olivo, 2006) assim como de oferecerem uma distribuição de luz mais uniforme (Weersink *et al*., 2008).

As lâmpadas mais convencionais (fluorescentes, incandescentes, de halogénio e de vapor) possuem a desvantagem de proporcionarem um efeito térmico significativo assim como uma baixa intensidade de radiação e dificuldade de doseamento de luz (Avirah *et al*., 2012; Pervaiz e Olivo, 2006; Weersink *et al*., 2008).

Na PDT de aplicação tópica são utilizadas as tradicionais lâmpadas fluorescentes, incandescentes e de vapor, assim como os LED´s, já nas aplicações internas (órgãos internos) são necessárias fibras ópticas com lasers incorporados (Peng *et al*., 2008; Pervaiz e Olivo, 2006).

#### 1.1.4.5 Hidrofilicidade e Lipofilicidade

A distribuição do FS é um dos factores mais importantes no tratamento em PDT, sendo esta bastante influênciada pela sua estrutura química. O composto deve apresentar não só bastante anfilicidade, sendo solúvel em água, mas também conter uma matriz hidrofóbica, que

facilite a sua afinidade pelas membranas biológicas. Este deve também apresentar estabilidade e solubilidade em solventes injectáveis, mas depois da sua administração, os seus componentes devem apresentar uma rápida depuração no organismo (Ethirajan *et al.*, 2008).

A introdução de vários grupos substituintes como carboxilos, hidroxilos e sais de amónio tem sido feita, a fim de conferir um maior grau de seletividade e anfilicidade (Bonnett, 1995) e a introdução de cadeias de trietilenoglicol em compostos esquarílicos, conseguiram aumentar e melhorar significativamente a sua solubilidade em água (Beverina *et al.*, 2005)

Compostos como albumina do soro bovino (BSA) e ciclodextrinas (CD´s) têm sido introduzidas para optimizar o sistema de transporte *in vivo* de vários FS's nomeadamente de corantes esquarílicos (Avirah *et al*., 2012; Arun *et al*., 2011).

### 1.1.5 Estudo da Terapia fotodinâmica *in vitro e in vivo*

Em 2006, Lai e os seus colaboradores, testaram a actividade fotodinâmica de uma ftalocianina bis amino assimétrica ($SiPc[C_3H_5(NMe_2)_{20}](OMe)$ (BAM-SiPc) (Figura 1.10) em células HepG2, em várias concentrações, irradiando-as com lâmpadas de halogénio com uma potência de 24 J/cm$^2$ centradas a 610 nm, segundo o $\lambda_{máx}$ de absorção do composto.

Verificaram que para concentrações abaixo dos 0,1 µM e na ausência de luz, o composto não demonstrou citotoxicidade, que o $IC_{50}$ do composto era de 0,035 µM e que entre as concentrações 0,020 e 0,100 µM a geração de oxigénio singuleto em relação ao controlo aumentou para cerca do triplo.

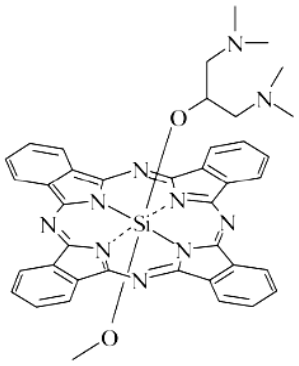



**Figura 1.10** Estrutura química do BAM-SiPc (Lai *et al.*, 2006)

Em 2007, Hachimíne e a sua equipa de investigação testaram o efeito citotóxico de um derivado de porfirina (DCPH-p-Na(I)) representado na Figura 1.11, em células MKN (linha

celular derivada do cancro gástrico humano). Incubaram as células com o composto a uma concentração de 5 μM e irradiaram com uma lâmpada de halogéneo de 100W, durante 10 minutos, ao $\lambda_{máx}$ de absorção do composto (656 nm). No entanto em relação aos grupos controlo, irradiados e não irradiados, este composto apenas apresentou uma redução de cerca de 15% na viabilidade celular.

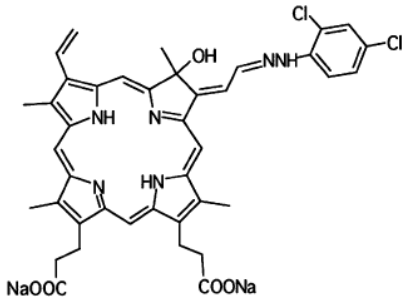



**Figura 1.11** Estrutura química do composto DCH-P-Na (I) (Hachimíne *et al*., 2007).

Em 2007, Ritz e os seus colaboradores testaram a citotoxicidade da Hipericina (Figura 1.12) em várias linhas celulares derivadas de glioblastoma humano (U373MG, LN229 e T986). Para as três linhas celulares o composto não demonstrou citotoxicidade no escuro para concentrações acima dos 5 μM. Quando irradiado com laser de árgon a um $\lambda_{máx}$ de absorção de 595 nm, este composto demonstrava elevada fototoxicidade apresentando $ID_{50}$ aos valores entre 0,15 e 0,22 J/cm$^2$. A linha celular U373 MG demonstrou ser a mais sensível a este composto.

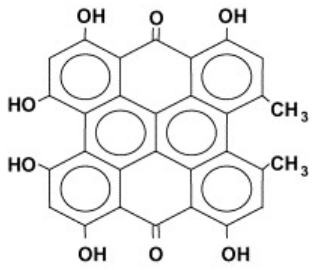



**Figura 1.12** Estrutura química da Hipericina (Agostinis *et al*., 2002)

Em 2013, Xua e a sua equipa de investigadores, estudaram o efeito citotóxico do FS *Pheophorbide a* (PhA) (Figura 1.13), em células PC-3 (células derivadas do cancro da próstata). Testaram o efeito de várias concentrações e doses de luz. Para irradiação das células incubadas com o FS, utilizaram LED's centrados a 630 nm com uma potência de 105 W/cm$^2$

e verificaram um efeito citotóxico dependente da concentração e dose de luz aplicada, que os valores de $IC_{50}$ correspondentes às 24horas após tratamento com PDT, eram de 2,113; 1,295; 0,980; 0,423 e 0,210 µM para as doses de luz 0,5; 1,2; 4 e 8 J/cm$^2$ respectivamente.

Verificaram também que a morte celular, era dependente da dose de composto e luz aplicada, sendo que à concentração de 4,8 µM e uma dose de luz de 8 J/cm$^2$ ocorria lise celular e a uma concentração de 0,2 µM e com a mesma dose de luz a morte celular ocorria por autofagia.

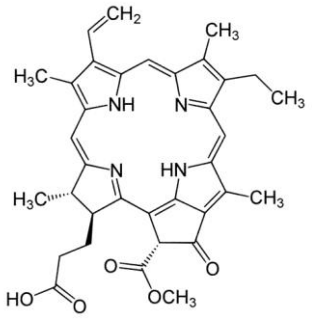



**Figura1.13** Estrutura química do FS Pheophorbide a (PhA)
(*http://www.trivenichemicals.com/tetrapyrroles.html, acedido a 23 de Outubro de 2013*)

Para avaliação da citotoxicidade, a viabilidade celular é um dos parâmetros mais importantes (Miret *et al*., 2006).

Em 2006, Bisland e Burch testaram a capacidade fotodinâmica do composto BPD-MA (Benzoporfirina derivada de monoácido) (Figura 1.14), em sete cães de raça aleatória com tumores primários nos ossos. Utilizaram a concentração de 0,4 mg/kg, a irradiação foi realizada directamente no tumor, utilizando fibra óptica, com luz a um comprimento de onda de 690 ± 5 nm, com uma taxa de irradiação de 200 mW/cm$^2$, durante 10 minutos. Verificaram uma redução significativa dos tumores e metástases existentes na região femural e vertebras lombares. Verificaram também uma penetração de cerca de 0,16 cm quando atingida uma taxa de irradaiação de 4,3 mW/cm$^2$.

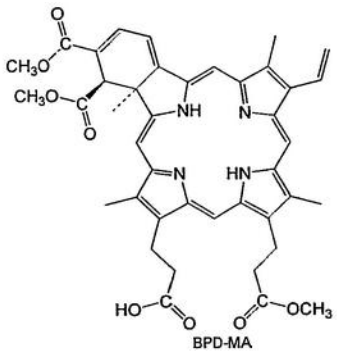



**Figura 1.14** Estrutura química do BPD-MA (Boch *et al*., 2008)

Em 2013, Kashef e os seus colaboradores, testaram a citotoxicidade da Hipericina, em bactérias *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterrococcus faecalis* e *Pseudomonas aeruginosa*. Para testar a actividade fotodinâmica, diluíram a Hipericina em dimetilsulfóxido (DMSO), incubaram as diferentes culturas bacterianas com diferentes concentrações de composto: 0,1; 0,3; 0,6 e 1 µg/mL, e posteriormente irradiaram com LED's centrados a 590 nm, com potência de 30 mV, durante os tempos de 3; 5 e 10 minutos. Verificaram que a melhor concentração utilizada tinha sido a de 1 µg/mL, sendo que ocorreu uma quebra na viabilidade celular de 6,3 $\log_{10}$ para a espécie *S.aureus*, 6,5 $\log_{10}$ para a espécie *E.faecalis*, 6,2 $\log_{10}$ para a espécie *E.coli* e 0,7 $\log_{10}$ para a espécie *P.aeruginosa* quando irradiados com uma taxa de luz de 48 J/cm$^2$.

## 1.2 Corantes

Desde a descoberta acidental, da primeira via sintética do corante Mauveína, por William Perkin, em meados do século XIX, que se tem questionado sobre a relação entre a cor e a estrutura molecular do corante (Christie, 2001).

A estrutura molecular dos corantes é bastante complexa quando comparada com a maioria dos compostos orgânicos. É caracterizada pela presença de um determinado número de anéis aromáticos como o benzeno ou o naftaleno, ligados a um sistema conjugado totalmente preenchido, sendo esta unidade formada designada por grupo cromóforo ou unidade responsável pela coloração. Os cromóforos mais importantes são os azo (-N=N-), grupos carbonilo (C=O), grupos metino (-CH=) e nitro ($NO_2$). O sistema conjugado acarreta uma extensa deslocalização de electrões π, provenientes das ligações duplas e é responsável pelas pequenas diferenças de energia entre orbitais ocupadas e desocupadas desses electrões. Por fim o corante deve apresentar 5 ou 6 ligações duplas conjugadas na sua estrutura molecular, para possuir coloração (Broadbente, 2001; Christie, 2001).

Existem dois tipos de agentes de coloração, os corantes e os pigmentos. Os corantes são compostos solúveis em matrizes aquosas, enquanto os pigmentos para além, de possuírem um tamanho molecular maior, são compostos insolúveis, tendo por isso de ser incorporados na matriz a partir de processos de dispersão (suspensões) (Christie, 2001).

A cor dos corantes e pigmentos orgânicos é resultado de uma transição electrónica do estado fundamental ($S_0$) para o primeiro estado excitado ($S_1$) após absorção de radiação na zona do visível. Sob a influência de luz natural ou artificial, assim como outros factores de

stress (luz UV, calor, $O_2$, etc.), as propriedades dos corantes orgânicos são alteradas, resultando quer no seu desvanecimento, quer na sua mudança de cor (Haillant, 2009).

Várias têm sido as aplicações dos corantes, electrónicas (lasers, células fotovoltaicas), destacando-se as biológicas e médicas (PDT), Química da cor (Termocromismo, Fotocromismo, etc.) (Christie, 2001).

### 1.2.1 Cianínas

As cianínas têm sido alvo de vários estudos ao longo de vários anos, devido à sua potencial utilização na PDT, sendo que o seu interesse económico deve-se à elevada efectividade como FS e ao facto de um grande número dos seus materiais de partida, estarem disponíveis no mercado (Delay *et al*., 2000).

As cianínas pertencem à classe dos corantes polimetínicos. São moléculas planares conjugadas, com átomos de carbono com hibridação $sp^2$ e um número de grupos metino variável (Figura 1.15).

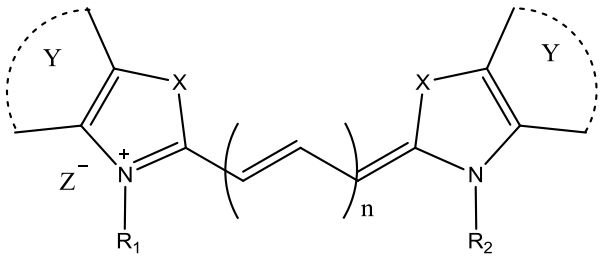



**Figura 1.15** Estrutura e classificação geral das cianinas, sendo n = 0 (cianina); n = 1 (carbocinanina); n = 2 (dicarbocianina) e n = 3 (tricarbocianina); X = S, Se, O, N, $C(CH_3)_2$….; Y = Grupos heterocíclicos terminais; $R_1$ e $R_2$ = $CH_3$, $C_2H_5$, $C_3H_7$, $C_6H_{13}$, $C_{10}H_{21}$... e $Z^-$ = $Cl^-$, $I^-$… (Torres, 2010).

A ressonância entre os sistemas de anéis, origina cromóforos que absorvem na região do visível, com um elevado coeficiente de absortividade molar. Estes podem existir quer como corantes catiónicos, sendo retido no meio interno mitocondrial com uma elevada concentração ou podem existir na forma aniónica como o *N,N'*-bis(2-etil-1,3-dioxolano)criptocianina sendo preferencialmente retidos *in vivo* e *in vitro* em elevada extensão, nas mitocôndrias de células de carcinoma e melanoma. Análogos como as cianínas sulfonadas, derivados da oxacianina e

indocianina verde (Figura 1.16) têm também sido introduzidas no tratamento com PDT (Delaey *et al*., 2000).

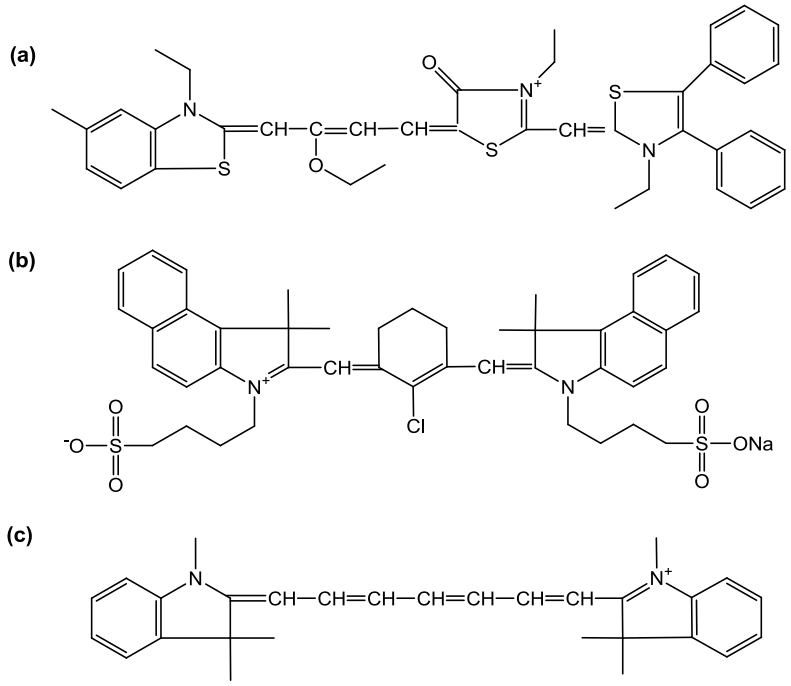



**Figura 1.16** Representação da estrutura química de três cianinas. (a) Rhodacianina, (b) Indocianina 2 e (c) Indocianina 4 (Delaey *et al*, 2000)

Apesar destes compostos apresentarem várias vantagens, também têm algumas desvantagens, como a elevada propensão para a fotodegradação e a baixa estabilidade química. Tais factos levaram à necessidade de desenvolver corantes alternativos com absorção no infravermelho próximo e no infravermelho (Avirah *et al.*, 2007). Vários processos sintéticos têm sido propostos para corantes polimetínicos com diversas estruturas moleculares, desde monometinicas e tricarbocianinas a cianínas esquarílicas (Panigrahi *et al.*, 2012).

#### 1.2.1.1 Cianínas esquarílicas

As cianinas esquarílicas foram sintetizadas pela primeira em vez por Treibs e seus colaboradores (1961) e mais tarde reformuladas por Sprenguer e a sua equipa em 1968.

Caracterizam-se por serem estruturas 1,3-zwiteriónicas com um receptor central de quatro membros, o anel esquarílico, com doadores aromáticos ou anéis heterocíclicos laterais (Figura 1.17), com elevada estabilidade e comprimento de onda de absorção regulável (Avirah *et al*, 2012).

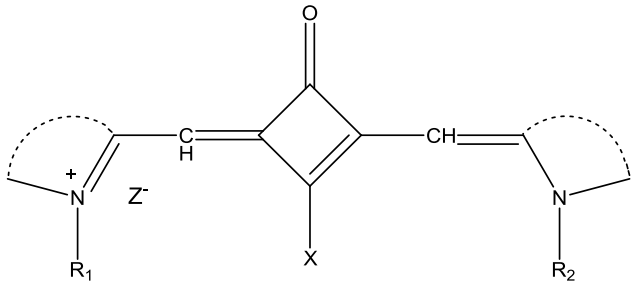



**Figura 1.17** Estrutura geral das cianínas esquarílicas sendo $R_1$ e $R_2$ = grupo alquilo,…, X = $O^-$, $OCH_3$, $NH_2$, $NHCH_3$, NH-(3-I-$C_3H_4$),…;$Z^-$ = $I^-$, $Cl^-$, $CF_3SO_3^-$ (Torres, 2010)

Estes compostos possuem bandas de absorção intensas e estreitas ($\varepsilon \approx 10^5\ M^{-1}cm^{-1}$), que se estendem desde a região do infravermelho próximo até ao infravermelho, na chamada janela fototerapêutica. Tal facto deve-se principalmente à grande quantidade de ligações π conjugadas existentes nestes compostos (Arun *et al*., 2011; Avirah *et al*., 2012; Beverina *et al.*, 2005; Devi *et al.*, 2008;) o que faz com que estas cianínas esquarílicas tenham elevado potencial como agentes fotossensibilizadores na PDT (Avirah *et al*., 2012). As propriedades fotoquímicas e fotofísicas exibidas por estes compostos permitem a sua utilização num grande número de aplicações biológicas, ex. sensores de iões metálicos, detectores de grupos tiol, marcadores fluorescentes (Avirah *et al*., 2012; Arun *et al*., 2011), utilização em electrofotografia, armazenamento de dados ópticos, células solares entre outros (Ramaiah *et al.*, 1997; Jisha *et al.*, 2006).

Quando comparadas com as cianínas, estes análogos possuem vantagens como a estabilidade acrescida, devida à rigidez imposta pela inclusão do anel de quatro membros na cadeia polimetínica (Avirah *et al.*, 2012). Mas algumas propriedades destas cianínas esquarílicas limitam o seu potencial como FS, ex. propensão para formar agregados que reduzem o tempo de vida no estado tripleto e reduzem o rendimento quântico na formação do oxigénio singuleto, a sua susceptibilidade para degradação química por parte do ataque de agentes nucleófilos biológicos (ex: glutationa e proteínas) ao anel esquarílico (Alex *et al*., 2007; Arun *et al.*, 2011; Arun *et al.*, 2005; Arunkumar *et al*., 2006; Avirah *et al.*, 2012).

A presença de grupos hidroxilo, também constitui outro factor limitante, uma vez que torna o composto facilmente desprotonado tornando o espectro de absorção dependente do pH do meio (Alex *et al.*, 2007). Têm sido desenvolvidos vários métodos para contornar tais problemas, utilizando sistemas adequados de transporte de fármacos, que permitem não só melhorar a biodisponibilidade do FS mas também fornecer a proteção necessária (Avirah *et al*., 2012).

Utilizando o método comparativo, em 2006 Arunkumar e os seus colaboradores, comprovaram que o sistema de rotaxanos esquarílicos (compostos esquarílicos internalizados em macrociclos) são mais resistentes à foto-oxidação, tornando-os mais efectivos no estado tripleto, mostrou também que a sua forma halogenada, obtida através de iodação, aumentava o potencial destes compostos na geração de $^1O_2$.

Apenas corantes esquarílicos com energia de estado tripleto acima da energia do estado tripleto do oxigénio molecular, podem actuar como sensibilizadores pelo mecanismo II, desde que o seu rendimento quântico seja elevado. Estudos no sentido de aumentar a eficácia destes compostos, centrando-se no facto de se ter de modificar a estrutura, para aumentar a eficácia da transição intersistema (ISC), aumentando assim o rendimento quântico do estado tripleto ($\varphi_T$) e oxigénio singuleto ($\varphi s$), têm sido realizados (Avirah *et al.*, 2012).

Substituindo o átomo de oxigénio do anel esquarílico, por átomos de enxofre (Figura 1.18), consegue-se obter um aumento acentuado dos rendimentos quânticos, $\varphi_T = 0{,}97 \pm 0{,}073$ e $\varphi s = 1 \pm 0{,}2$ quando comparado com o composto inicial, $\varphi_T = <0{,}01$ (Avirah *et al*., 2012).

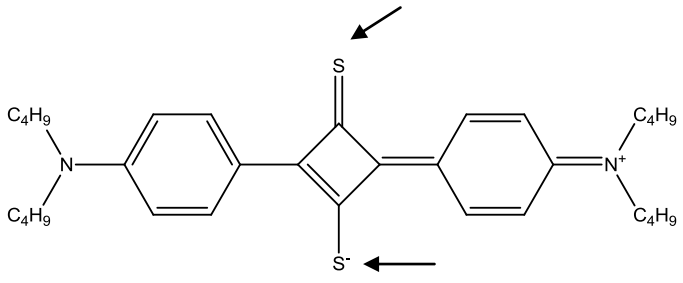



**Figura 1.18** Estrutura de um corante esquarílico, com substituição do átomo de oxigénio do anel esquarílico por um átomo de enxofre (figura adaptada de Avirah *et al*., 2012)

No floroglucinol (Figura 1.19, estrutura **1a**) substituindo os anéis aromáticos por anéis aromáticos policíclicos ou heterocíclicos, desloca-se o perfil de absorção do corante esquarílico, para a região do vermelho (Avirah *et al.*, 2012).

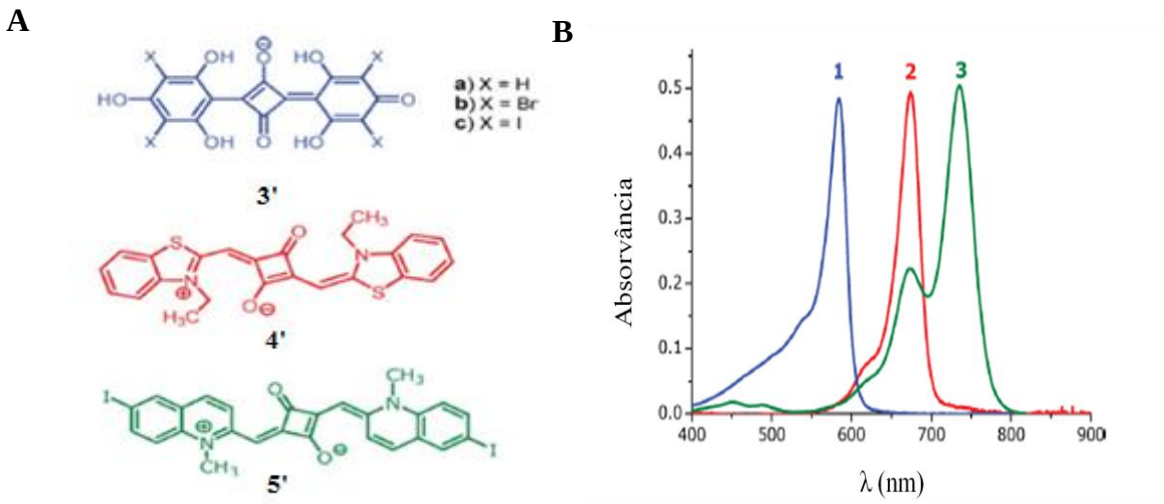
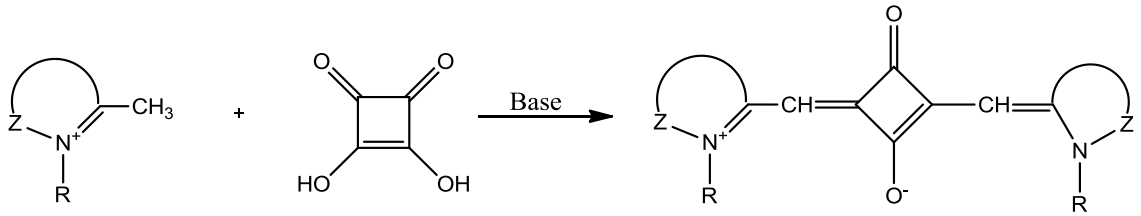



**Figura 1.19** Representação comparativa da estrutura de três corantes esquarílicos (**A**) e dos respectivos espectros de absorção (**B**) (figura adaptada de Avirah *et al.*, 2012).

Outra forma de conseguir um ISC mais eficiente é através da introdução de átomos pesados como o bromo e o iodo. No caso do floroglucinol (**3'a**) a bromação (**3'b**) e a iodação (**3'c**), podem aumentar o rendimento quântico do estado excitado tripleto ($\varphi_T$) para 0,22 e 0,5 respectivamente, assim como os respectivos tempos de vida ($\tau_T$), 132 e 36 μs. Também se obtiveram rendimentos quânticos na ordem dos 0,3 e 0,4, na geração do oxigénio singuleto (Avirah *et al.*, 2012).

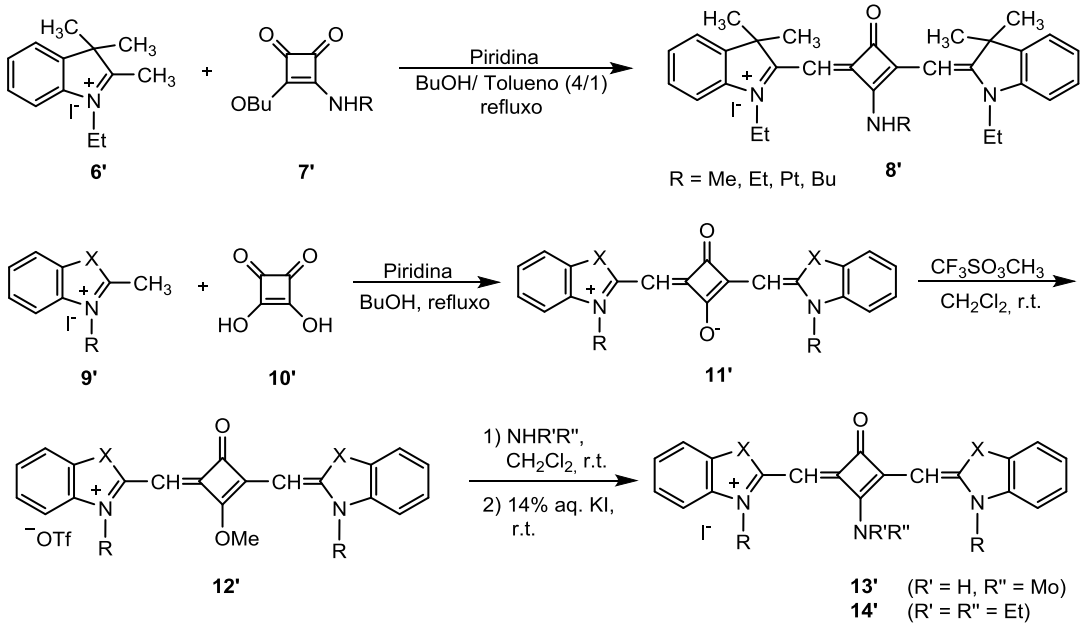
### 1.2.2 Síntese de cianínas esquarílicas

Estes compostos podem ser sintetizados a partir da condensação de um equivalente do ácido esquárico (3,4-dihidroxi-3-ciclobuten-1,2-diona) com dois equivalentes molares de heterocíclos metilénicos, como ilustrado no Esquema 1.1 (Reis *et al.*, 2002).




**Esquema 1.1** Representação da síntese de uma cianina esquarílica, sendo Z um resíduo aromático ou heteroaromático e R um grupo alquilo (figura adaptada de Reis *et al*., 2002).

Reis e colaboradores (2002), desenvolveram uma metodologia bastante versátil para a síntese de cianínas aminoesquarílicas (Esquema 1.2) e aplicaram-na na preparação de novos corantes, derivados do benzotiazole, benzoselenoazole e quinolinas




**Esquema 1.2** Esquema representativo da síntese de uma cianína aminoesquarílica (figura adaptada de Reis *et al*., 2002).

Neste método o passo chave foi a metilação do corante esquarílico **11'** e a substituição do contra-ião trifluorometanossulfonato que acompanha o corante **12'**, por iodo que permitiu facilitar a cristalização e também aumentar a capacidade de gerar oxigénio singuleto, graças à existência de um átomo pesado (Reis *et al*., 2002).

Os mesmos autores demonstraram a elevada capacidade de algumas cianínas esquarílicas de gerarem oxigénio singuleto, deslocando a região de absorção para perto dos 700 nm, podendo ser potencialmente aplicadas como agente FS em PDT (Figura 1.20).

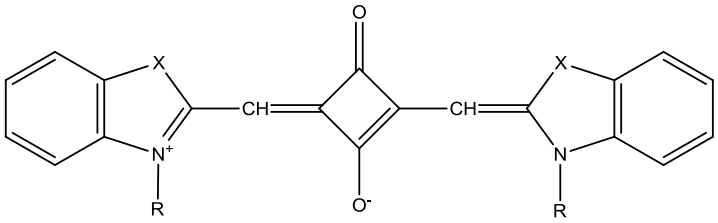
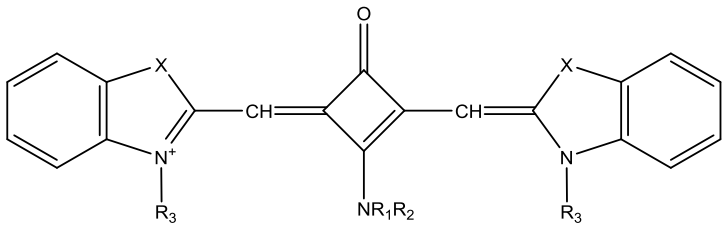


**Figura 1.20** Fórmula geral de cianínas esquarílicas, sendo R: $CH_3$,$C_2H_5$ ou n-$C_6H_{13}$ e X: S, Se ou CH=CH (Santos *et al.*, 2003)

O maior comprimento de onda de absorção foi obtido quando em X se introduziam grupos CH=CH e em R, grupos n-$C_6H_{13}$ (710 nm). O maior rendimento quântico na geração de oxigénio singuleto foi obtido quando se introduziram o átomo de Se em X e n-$C_6H_{13}$ em R (0,31) (Santos *et al*., 2003).

Santos e os seus colaboradores (2004) estudaram e sintetizaram diferentes cianínas aminoesquarílicas (Figura 1.21), com um elevado potencial na formação de oxigénio singuleto sendo o maior rendimento quântico obtido (0,68) quando, X=Se, $NR_1R_2$= $NHCH_3$ e $R_3$= n-($C_6H_{13}$) e um desvio do comprimento de absorção para a região entre 659-722, sendo a maior λ de absorção obtido quando: X= CH=CH, $NR_1R_2$= $N(C_2H_5)_2$ e $R_3$= $C_2H_5$), no entanto para este não se obteve um valor de rendimento quântico significativo na geração de oxigénio singuleto. Os corantes que possuam átomos de Se no anel de quatro membros, grupos aminas secundárias como substituintes, possuem um elevado potencial para o uso em PDT.



15' a-c ($R_1$ = H, $R_2$ = $CH_3$, $R_3$ =$C_2H_5$)
16' a-c ($R_1$ = H, $R_2$ = $CH_3$, $R_3$ = n-$C_6H_{13}$)
17' a-c ($R_1$ = $C_2H_5$, $R_2$ = $C_2H_5$, $R_3$ = $C_2H_5$)
18' a-c ($R_1$ = $C_2H_5$, $R_2$ = $C_2H_5$, $R_3$ = n-$C_6H_{13}$)

a: x=CH=CH; b: x=S; c: x=Se

**Figura 1.21** Corante cianínico esquarílico (15'-18') (figura adaptada de Santos *et al.*, 2003).

Santos e colaboradores (2005) estudaram o efeito da introdução de átomos de iodo e aminas simultaneamente em cianínas esquarilicas simétricas (Figura 1.22). O rendimento quântico na geração de oxigénio singuleto, obtido para as cianínas aminoesquarílicas substituídas sintetizadas, foi maior (0,66±0,05) quando R=$C_6H_{13}$, X=I e Y= NH-(3-I-$C_6H_4$) e o comprimento máximo de absorção (678 nm) para R=$C_6H_{13}$, X=I e Y= NH-$C_6H_5$.

Durante a síntese da cianína esquarílica substituíram um dos átomos de oxigénio por grupos como a benzilamina, anilina, 3-iodoanilina, *N*,*N*-dimetil-hidrazina e ácido 2-aminosulfónico. O resultado foi a síntese de corantes esquarílicos aza, que apresentavam uma forte absorção na região entre 651-709 nm (Reis *et al*., 2009).

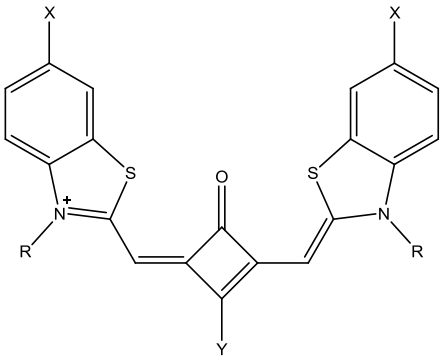



**Figura 1.22** Corante cianínicoaminoesquarílico (Santos *et al*., 2005)

### 1.2.3 Aplicação das cianínas esquarílicas em estudos *in vitro* e *in vivo*

Enquanto o número de artigos sobre síntese orgânica e sua proposta de utilização em PDT é elevada, o número de trabalhos com a sua aplicação *in vitro* e *in vivo* é escasso.

Estudos sobre a fototoxicidade do floroglucinol halogenado (estrutura baseada nos corantes esquarílicos da Figura 1.19), corantes **3'b** e **3'c,** usando como fonte de radiação uma lâmpada de halogéneo (1000 W, 337,5 kJ $m^{-2}$) que emite radiação de comprimento de onda entre 400-800 nm, permitem verificar a indução de quebras nas cadeias de ADN do bacteriófago $PM_2$, inibição da capacidade de clonagem da linha celular A552 (linha celular de ovário de "chinese hamster") e da linha celular L5178Y (linfoma de murganho L5178Y), citotoxicidade ao nível dos vários componentes celulares incluindo danos no ADN (Avirah *et al*., 2012). Em 2012, Guerra e a sua equipa de investigação utilizando várias cianínas aminoesquarílicas, reduziram a viabilidade celular de células Caco-2 e HepG2 quando irradiadas com LED´s centrados a 660 nm e apresentaram baixa citoxicidade no escuro. Em estudos *in vivo*, utilizando como modelo, o murganho (albino suíço, macho) com cancro de

pele induzido com DMBA (7,12-Dimethylbenz(a)anthracene) demonstrou-se redução significativa do volume do tumor ao fim de duas semanas de tratamento com PDT, utilizando uma irradiação com luz total de 120 $J.cm^{-2}$ e comprimento de onda entre 400-800 nm (Abraham *et al.*, 2010; Gayathri *et al.*, 2008). Verificou-se também uma reversão das enzimas marcadoras como a mieloperoxidase, hexocinase entre outras e que a foto destruição dos tumores utilizando estes corantes foi mediada por apoptose.

## 1.3 Avaliação da citotoxicidade em culturas de células

### 1.3.1 Indicador de viabilidade celular: Alamar Blue

O Alamar Blue é um corante indicador de metabolismo, bastante versátil e sensível (Voytik-Harbin *et al.*, 1998). Na forma oxidada, (resazurina) apresenta cor azul e é não fluorescente, permeia as células e é reduzido (resorufina) por células metabolicamente ativas originando um composto cor-de-rosa intenso e fluorescente (Figura 1.23). Tais formas conferem a este corante a capacidade de produzir mudanças colorimétricas e um sinal de fluorescência em resposta ao metabolismo de células vivas, sendo a viabilidade seguida por alteração da absorvância medidas a 570 nm (forma reduzida) e 620 nm (forma oxidada) (Byth *et al*., 2001; Hamid *et al*., 2004; O´Brien *et al*., 2000).

A grande vantagem do Alamar Blue é ser não-tóxico e solúvel em água.

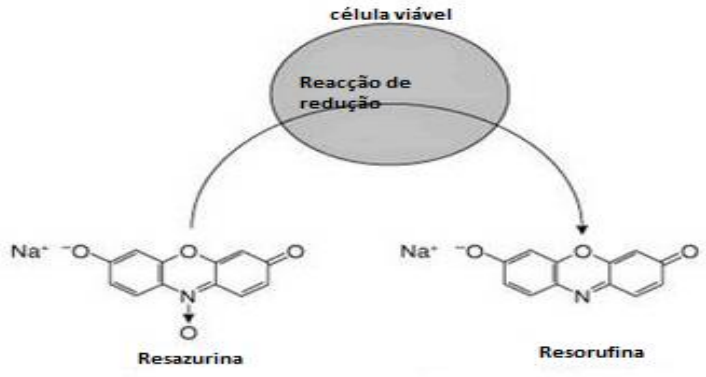



**Figura 1.23** Representação da oxidação-redução do Alamar Blue http://www.pharmacelsus.de/resazurin_assay/ (acedido a 22 julho de 2012)

# Capítulo 2.

## DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

## 2.1 Preâmbulo

Neste capítulo são apresentados e discutidos os resultados experimentais obtidos durante este trabalho, estando este dividido em duas partes. Na primeira parte são apresentados e discutidos os métodos de síntese dos sais quaternários de amónio, dos corantes cianínicos esquarílicos, do corante cianínico esquarílico *O*-metilado e finalmente dos seus derivados corantes cianínicos aminoesquarílicos pretendidos, assim como a sua caracterização espectroscópica. Para cada composto sintetizado é descrito o ponto de fusão, os espectros no Infravermelho (IV), no Ultravioleta/Visível (UV/Vis), de Ressonância Magnética Nuclear de Protão e de Carbono ($^{1}$H e $^{13}$C) e Espectrometria de massa de alta resolução (EMAR-ESI-TOF). Nem todos os compostos foram sujeitos a todas as técnicas de caracterização espectroscópica uma vez que estes já existiam descritos na literatura, sendo feita uma caracterização espectroscópica mais completa para os novos compostos. Para os novos corantes esquarílicos assimétricos sintetizados foi determinado e discutido o rendimento quântico na formação de oxigénio singuleto.

A atribuição completa de cada um dos sinais presentes nos espectros de $^{1}$H-RMN e de $^{13}$C-RMN não foi sempre possível devido à deficiente informação espectroscópica, dado que para tal deveriam ter sido realizados estudos de RMN bidimensionais.

Na segunda parte deste capítulo são discutidos e avaliados os resultados da aplicação dos corantes cianínicos esquarílicos na proliferação e viabilidade das linhas celulares HepG2 e Caco-2quando sujeito (ou não) a irradiação, com LED's de comprimento de onda adequado a cada corante.

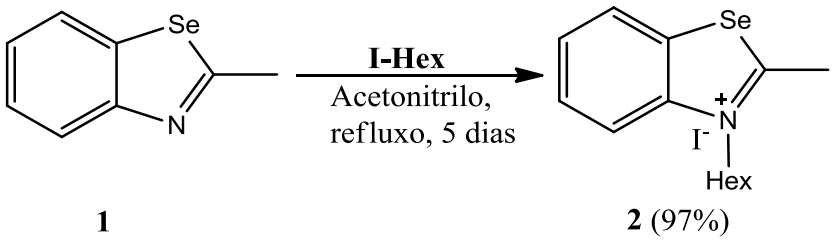
Por fim, são apresentadas as principais conclusões no que se refere á síntese e caracterização física e espectroscópica dos corantes sintetizados assim como ao potencial destes corantes como agentes fotossensibilizadores, uma vez que é necessário entender se estes compostos possuem algumas das características necessárias para a sua utilização em terapia fotodinâmica.

## 2.2 Síntese dos corantes cianínicos esquarílicos simétricos

### 2.2.1 Síntese prévia

#### 2.2.1.1 Síntese do iodeto de 3-hexil-2-metilbenzoselenazólio (2)

O sal quaternário de amónio (**2**) foi facilmente sintetizado, fazendo reagir o 2-metilbenzoselenazol (**1**) com um excesso de 1-iodo-hexano (I-Hex), tal como se ilustra no Esquema 2.1. O método de síntese foi adaptado do referido na literatura (Pardal *et al.*, 2002), tendo-se obtido cristais beges, cromatograficamente puros com rendimento muito bom (97%), valor bastante acima do referido na literatura (40%) (Pardal *et al.*, 2002). As condições reaccionais envolveram uma proporção de base heterocíclica (**1**) e de 1-iodo-hexano de 1:3, e aquecimento da mistura a refluxo em acetonitrilo.



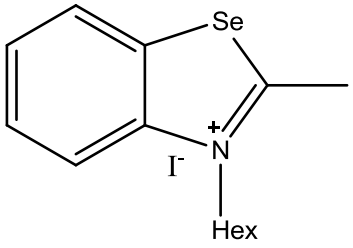

**1** **2** (97%)

**Esquema 2.1** Síntese do composto **2**

O sal foi isolado da mistura reacional por precipitação com éter dietílico e para obtenção de um melhor rendimento, procedeu-se à repetição da alquilação das águas-mães, adicionando mais um equivalente molar de iodo-hexano e deixando a mistura reacional a refluxo durante mais 5 dias.

No que diz respeito ao ponto de fusão, que se encontra no intervalo121-123 $^{o}$C, observou-se que este valor, apesar de ter um intervalo estreito, não está de acordo com o referido na literatura (Pardal *et al.*, 2002). Neste caso como o composto **2** já se encontra descrito na literatura, apenas foi traçado o seu espectro no IV (Tabela2.1), que está de acordo com o publicado na literatura (Pardal *et al.*, 2002). Salientam-se apenas a banda de absorção relativa às vibrações das ligações ArC-H a 3054cm$^{-1}$ e a 2912cm$^{-1}$a banda relativa às vibrações da ligação C-H alifáticas.

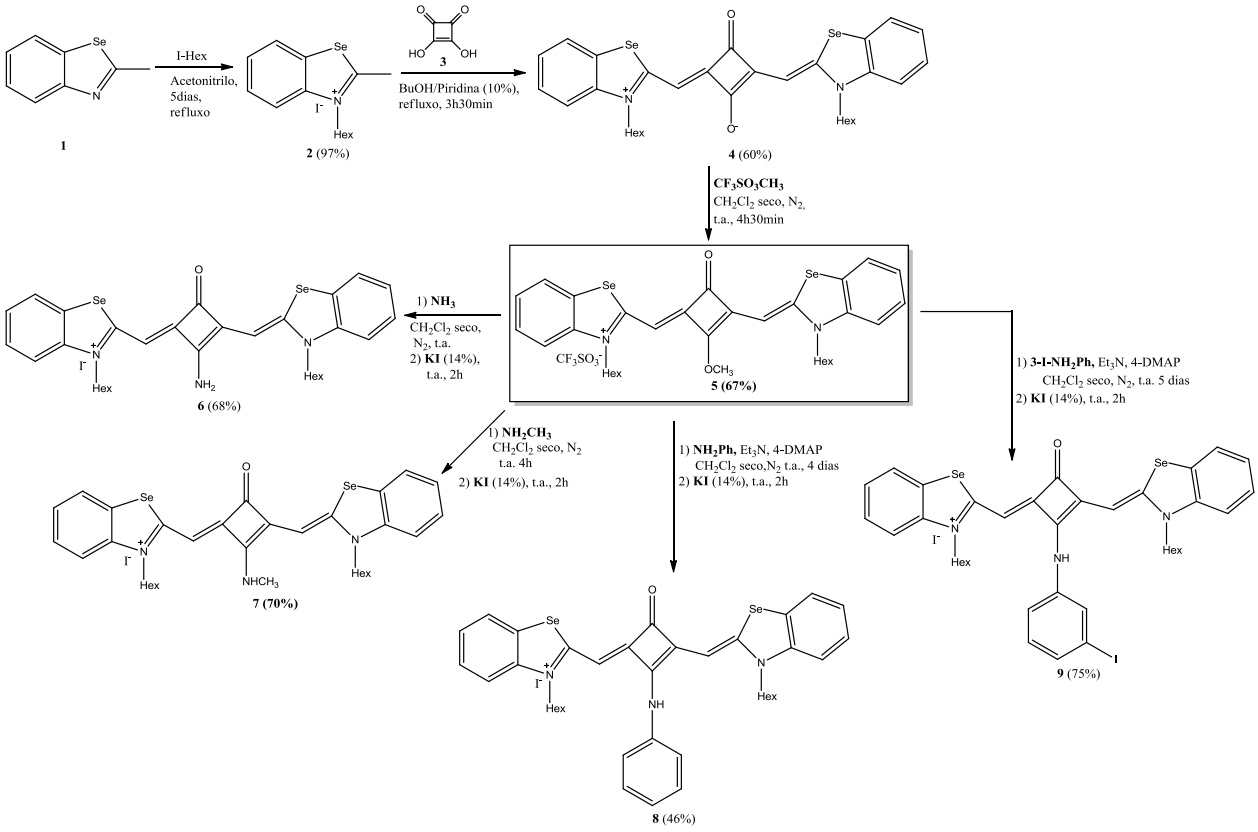
**Tabela 2.1** Ponto de fusão e espectro IV do sal quaternário de amónio (**2**)

| **Composto** |  **2** |
|---|---|
| **p.f. (ºC)** | 121-123 [132-133][a)] |
| **IV $\upsilon_{máx}$ (pastilha em KBr, $cm^{-1}$)** | 3054, ArC-H), 2912 (f, C-H*alif.*) |

a) Pardal *et al.*, 2002

### 2.2.2 Síntese dos corantes cianínicos aminoesquarílicos simétricos

Os corantes cianínicos esquarílicos simétricos (**4**-**9**) apesar de já se encontrarem publicados na literatura por este grupo de trabalho, foram novamente sintetizados para se estudar o seu efeito nas linhas celulares HepG2 e Caco-2, no sentido de poderem vir a ser utilizados como FS's em PDT. Gomes e os seus colaboradores em 2010, fizeram apenas um estudo sobre a toxicidade destes corantes na linha celular HepG2. De notar que os compostos utilizados nesse estudo tinham como contra-ião o $CF_3SO_3^-$ e os sintetizados neste trabalho possuem o átomo de iodo como contra-ião. Os corantes cianínicos esquarilicos simétricos (**4**-**9**) foram sintetizados de acordo com o Esquema 2.2. Após alquilação com 1-iodo-hexano do 2-metilbenzoselenazol (**1**), obteve-se o sal quaternário **2.** A condensação deste com ácido esquárico (**3**), na proporção de 2:1, respectivamente, originou o corante esquarílico zwiteriónico **4**, que por metilação com o agente metilante trifluorometanosulfonato de metilo permitiu a obtenção do derivado *O*-metilado **5**. Este derivado através de uma reacção de substituição nucleófila com aminas apropriadas permitiu a obtenção dos corantes aminoesquarílicos pretendidos (**6**-**9**), com rendimentos bastante razoáveis (44-74%).



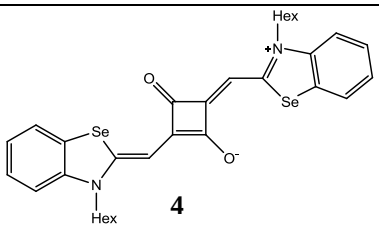
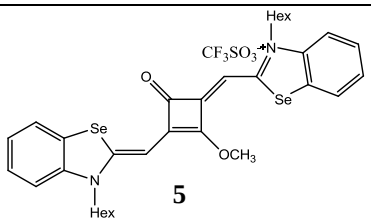
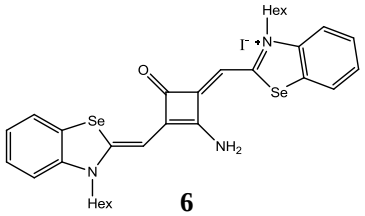
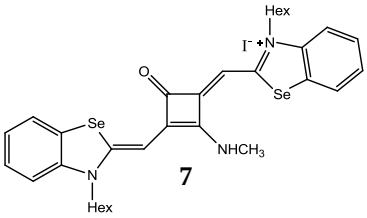
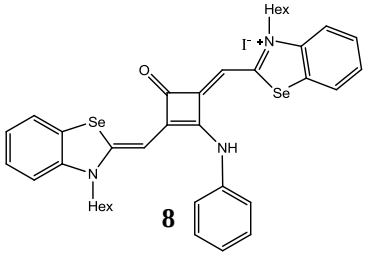
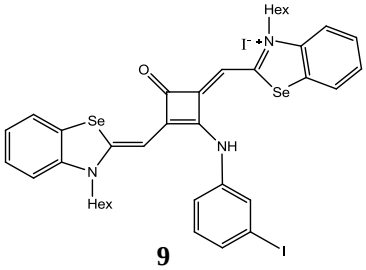

**Esquema 2.2** Síntese dos vários corantes cianínicos esquarílicos simétricos

As condições reaccionais para obtenção do derivado *O*-metilado **5**, bem como dos corantes aminoesquarílicos **6-9** foram muito semelhantes: temperatura ambiente, atmosfera de azoto e excesso de agente metilante/amina. No caso particular dos derivados **8** e **9** e porque as respectivas aminas aromáticas são menos nucleófilas do que as aminas alifáticas houve necessidade de adicionar trietilamina e 4-*N*,*N*-dimetilaminopiridina como catalisadores.

No sentido de aumentar a produção de oxigénio singuleto dos corantes aminoesquarílicos **6-9** foi trocado o contra-ião $CF_3SO_3^-$ pelo ião iodeto, dissolvendo os compostos em metanol e adicionando igual volume de uma solução aquosa de KI a 14%.

Como já foi referido anteriormente, uma vez que estes corantes simétricos já foram sintetizados e publicados por este grupo de trabalho (Gomes, 2010; Reis *et al*., 2009; Reis *et al*., 2002), são apresentados apenas os respectivos pontos de fusão, espectros no ultravioleta (ponto 2.3) e no infravermelho (Tabela 2.2), que estão de acordo com os referidos na literatura.

**Tabela 2.2** Pontos de fusãoe bandas características dos espectros no IV dos compostos **4**-**9**

| **Composto** | **p.f. (ºC)** [lit.] | **IV $\upsilon_{máx}$** (pastilha em KBr, $cm^{-1}$) |
|---|---|---|
|  **4** | 261 (dec) [262] [a)] | 3055 (fr, ArC-H), 2951 (fr, C-H*alif.*) 1587 (m, ArC=C) |
|  **5** | 248 (dec.) [249] [a)] | 3060 (fr, ArC-H), 2927 (fr, C-H*alif.*), 1643 (fr, C=O) 1579 (fr, ArC=C) |
|  **6** | 280-282(dec.) [281] [b)] | 3262 (fr, N-H), 3110 (fr, N-H), 2922 (fr, C-H*alif.*), 1630 (fr, C=O) 1501 (f, ArC=C) |
|  **7** | 240-241 (dec.) [240] [c)] | 3145 (fr, N-H), 3039 (fr, ArC-H), 2910 (fr, C-H*alif.*), 1629 (fr, C=O) 1559 (m, ArC=C) |
|  **8** | 259-260 [258-260ºC] [c)] | 3005 (fr, ArC-H), 2922 (fr, C-H*alif.*), 1619 (fr, C=O) 1536 (m, ArC=C) |
|  **9** | 252-257 [261-263] [a)] | 3149 (fr, N-H), 3054 (fr, ArC-H), 2924 (fr; C-H*alif.*), 1563 (ArC=C) |

[a)] Reis *et al.*, 2009; [b)]Gomes, 2010; [c)] Reis *et al.*, 2002

Nos espectros no IV há a salientar as bandas características da vibração das ligações C-H aromáticas que surgem como uma banda fraca entre 3060-3005 $cm^{-1}$, das ligações C-H alifáticas (2951-2910 cm-1) e a banda característica da vibração da ligação C=O que surge na forma de uma banda fraca entre 1643-1619 $cm^{-1}$, excepto para o composto **4** no qual esta banda não se observa, devido à deslocalização da carga negativa do anel de quatro membros. Curiosamente também no espectro do composto **9** não se observa essa banda. Há ainda a salientar as bandas relativas às vibrações das ligações N-H para os compostos aminoesquarílicos que surgem entre 3262-3110 $cm^{-1}$, com a excepção do composto **8** em que não se observa essa banda e as bandas relativas às vibrações das ligações ArC=C, que surgem ao desvio químico entre 1587 e 1501 $cm^{-1}$.

### 2.3 Espectros no UV/Vis dos corantes cianínicos esquarílicos simétricos 4-9

Na Figura 2.1, estão apresentados os espectros no UV/Vis para os corantes cianínicos esquarilicos simétricos **4**-**9**, numa solução de MeOH/$CH_2Cl_2$ (99:1). Neste solvente, estes compostos apresentam, valores de $\lambda_{máx}$ entre 678-667 nm com bandas estreitas e intensas semelhantes aos referidos na literatura (Gomes, 2010; Reis *et al*., 2002). Da análise da Figura 2.1 conclui-se que, em relação ao composto não substituído **4**, os compostos **6**, **8** e **9** não sofreram alterações significativas no valor do $\lambda_{máx}$ de absorção, ao contrário do que seria de esperar, uma vez que, a introdução dos grupos amino desvia os valores do comprimento de onda de absorção máximo para valores mais baixos (Reis *et al*., 2002). Já para o composto **7**, verificou-se um efeito batocrómico e para o derivado *O*-metilado (**5**) um efeito hipsocrómico em relação ao composto **4**.

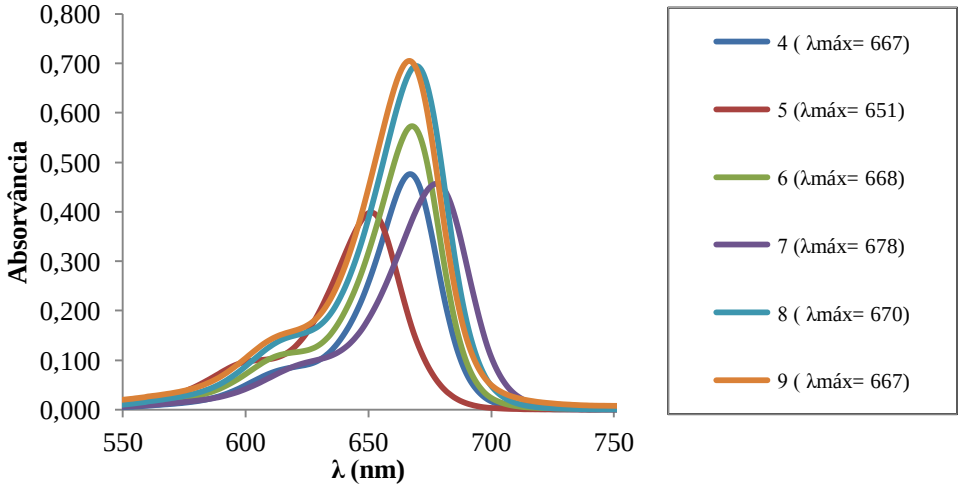



**Figura 2.1** Espectros de absorção no UV/Vis dos corantes simétricos em MeOH/$CH_2Cl_2$ (99:1)

A Figura 2.2 apresenta os espectros no UV/Vis, dos compostos sintetizados **4**-**9** em DMSO. Como se pode verificar, as bandas apresentam-se estreitas e intensas. Para os compostos **5**, **6**, **8** e **9** verificou-se um efeito hipsocrómico sendo este mais intenso para o derivado *O*-metilado (**5**). Para o composto **7**, verificou-se um efeito batocrómico pouco significativo em relação ao composto **4** não substituído.

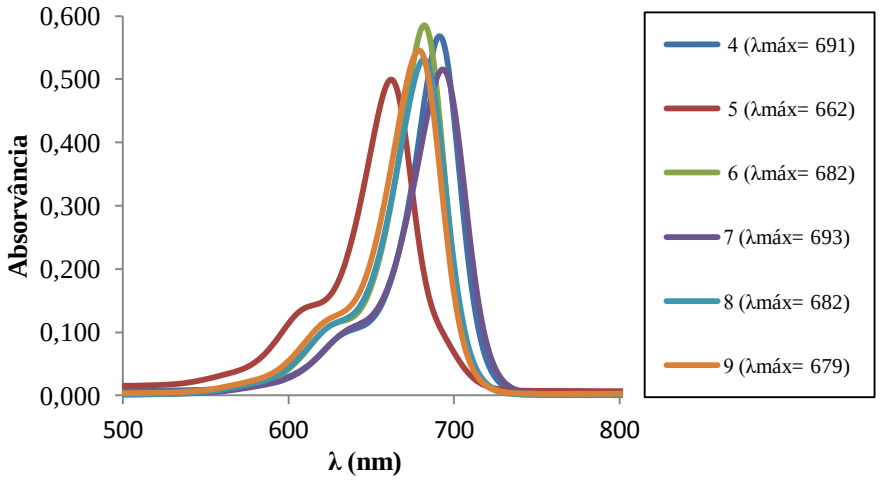



**Figura 2.2** Espectros de absorção no UV/Vis dos compostos simétricos em DMSO

Na Figura 2.3 encontram-se representados os espectros no UV/Vis, dos compostos cianínicos esquarílicos simétricos sintetizados (**4**-**9**) quando dissolvidos em DMEM. Este estudo foi feito com o objetivo de determinar o c.d.o. de absorção dos corantes neste meio e assim poder construir-se um sistema de LED's para posterior irradiação das células. O comprimento de onda escolhido foi 660 nm.

Da análise da Figura 2.3, verifica-se que as curvas não são estreitas tal como se verificava nas Figuras 2.1 e 2.2 e apresentam dois picos de absorção, devidos à possível formação de agregados na solução de DMEM. Para os compostos **5** e **6** verificou-se um ligeiro efeito hipsocrómico em relação ao composto não substituído **4**, já os compostos **7**, **8** e **9** apresentaram um ligeiro efeito batocrómico em relação ao corante não substituído

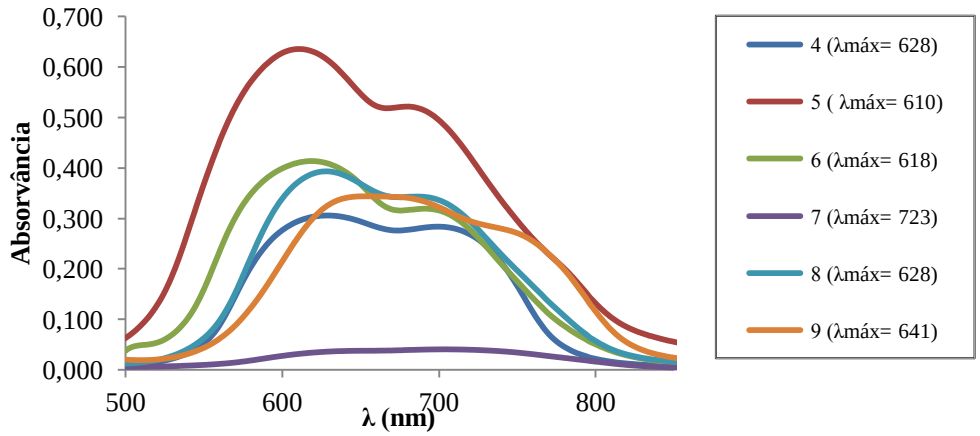
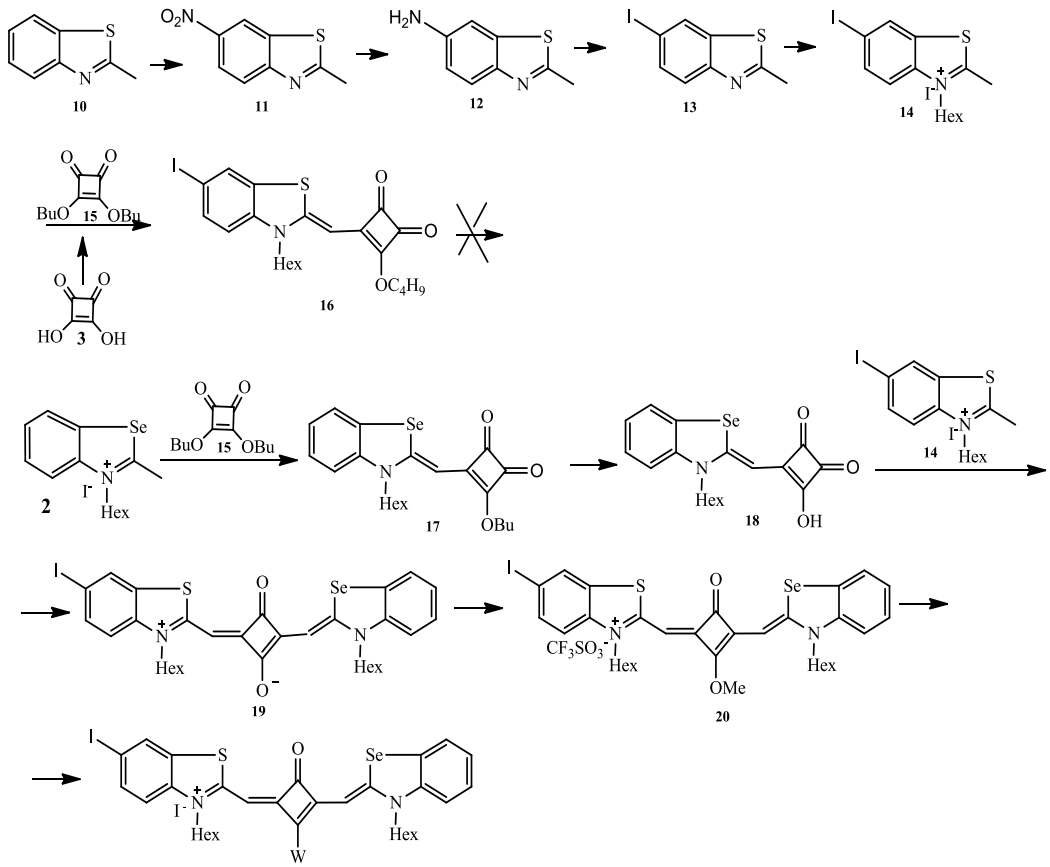



**Figura 2.3** Espectros de absorção no UV/Vis dos compostos simétricos em DMEM (meio de cultura, sem soro)

## 2.4 Síntese dos corantes cianínicos esquarílicos assimétricos

A estratégia sintética para a obtenção dos corantes cianínicos esquarílicos assimétricos encontra-se resumida no Esquema 2.3.



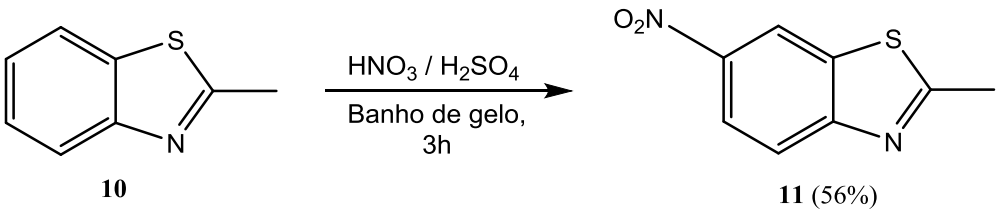
**21**: W= $NH_2$; **22:**W = $NHCH_3$; **23:** W = NHPh; **24:** W = 3-I-NHPh; **25:** W = $NHCH_2CH_2OSO_3^-$

**Esquema 2.3.** Esquema geral da síntese dos corantes cianínicos esquarílicos assimétricos

### 2.4.1 Sínteses prévias

#### 2.4.1.1 Síntese do 2-metil-6-nitro-benzotiazol (11)

Tal como se evidenciou no Esquema 2.3 o primeiro composto a ser sintetizado foi o composto 2-metil-6-nitro-benzotiazol (**11**), que foi facilmente obtido através de uma reacção de nitração do 2-metilbenzotiazol (**10**), adicionando lentamente a uma mistura deste composto e $H_2SO_4$ em banho de gelo, uma mistura de $HNO_3$ e $H_2SO_4$ (Esquema 2.4), de acordo com o método referido na literatura (Santos *et al.*, 2005). Foram obtidos cristais na forma de agulhas beges, que após recristalização com MeOH, se apresentaram cromatograficamente puros. A reacção foi efectuada utilizando diferentes quatidades de reagentes, tendo-se obtido sempre um rendimento da mesma ordem de grandeza, 56%, valor bastante próximo do apresentado na literatura (Santos *et al.*, 2005).



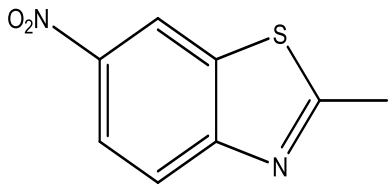

**10** **11** (56%)

**Esquema 2.4** Síntese do composto **11**

No que diz respeito ao ponto de fusão, situado no intervalo entre 168 e 172 ºC, este está de acordo com o descrito na literatura (Santos *et al.*, 2005; Tabakovik *et al.*, 1945).

Uma vez que este composto já foi sintetizado, caracterizado e publicado por este grupo de trabalho, apenas é apresentado o espectro no IV (Tabela 2.3), que está de acordo com o referido na literatura (Santos *et al.*, 2005). Neste espectro apenas há a salientar as bandas de absorção médias correspondentes à vibração das ligações ArC-H que surgem a 3078 $cm^{-1}$, a banda da vibração média da ligação ArC=C a 1603 $cm^{-1}$ e a banda da vibração da ligação N=O, a 1520 $cm^{-1}$.

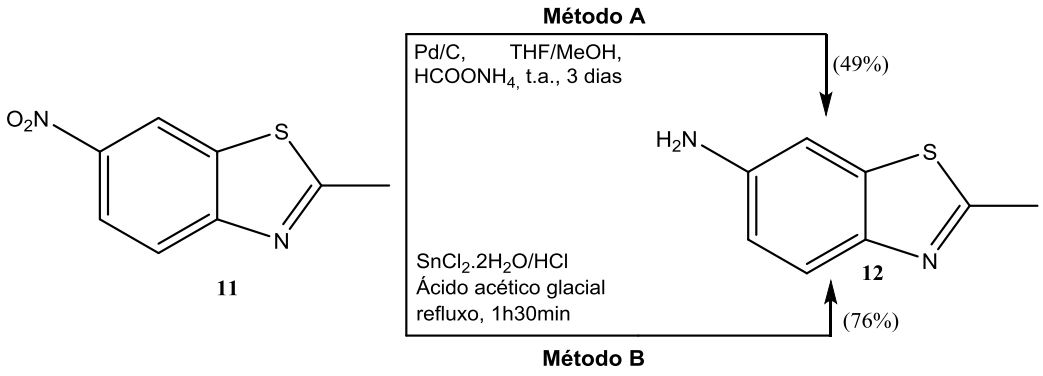
**Tabela 2.3**Ponto de fusão e bandas características do espectro no IV do 2-metil-6-nitro-benzotiazol (**11**).

| **Composto** |  **11** |
|---|---|
| **p.f. (ºC)** [lit.] | 168-172[167-168][a)] |
| **IV $\upsilon_{máx}$**(pastilha em KBr, $cm^{-1}$) | 3078 (fr, ArC-H), 1603 (m, ArC=C), 1520 (fr, N=O) |

[a)] Santos *et al*., 2005

### 2.4.1.2 Sintese do 6-amino-2-metilbenzotiazol (12)

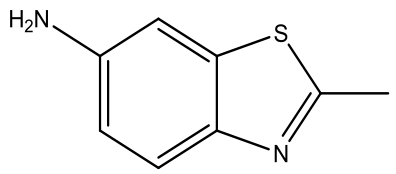
O composto 6-amino-2-metilbenzotiazol (**12**) foi sintetizado através de uma redução do grupo nitro do composto **11,** utlizando dois métodos (A e B) adaptados da literatura (Gilman *et al*., 1964; Santos *et al*., 2005) como se pode verificar no Esquema 2.5. No método A, o composto foi obtido adicionando o catalisador Pd/C e $NH_4COOH$ a uma mistura do composto **11** com THF e MeOH, tendo-se obtido cristais amarelo-alaranjados, cromatograficamente puros mas com um rendimento relativamente baixo (49%). No método B a uma solução do composto **11** e ácido acético glacial foi adicionada gota a gota uma mistura de $SnCl_2.2H_2O$ em HCl concentrado e colocou-se a refluxo durante 1 hora e 30 minutos. Por este método foi obtido o 6-amino-2-metilbenzotiazol (**12**) na forma de cristais beges, cromatograficamente puros, com um rendimento de 76%, que está de acordo com o apresentado na literatura (Gilman *et al*., 1964). Este segundo método demonstrou ser mais rápido e mais eficaz na formação do composto **12**, pretendido.




**Esquema 2.5** Síntese do composto **12**, através de dois métodos diferentes

Quanto ao ponto de fusão, este encontra-se no intervalo entre 122-124 ºC, valor concordante com os descritos na literatura (Gilman *et al*., 1964; Santos *et al*., 2005). Tal como já foi referido no ponto 2.4.1.1. e pelas mesmas razões, apenas se apresenta o espectro no IV deste composto (Tabela 2.4), o qual está de acordo com o publicado por Santos e os seus colaboradores (2005). Neste espectro há a salientar as bandas das vibrações das ligações $NH_2$, fracas a 3291 e 3195 $cm^{-1}$ e das ligações ArC=C, fortes a 1603 $cm^{-1}$.

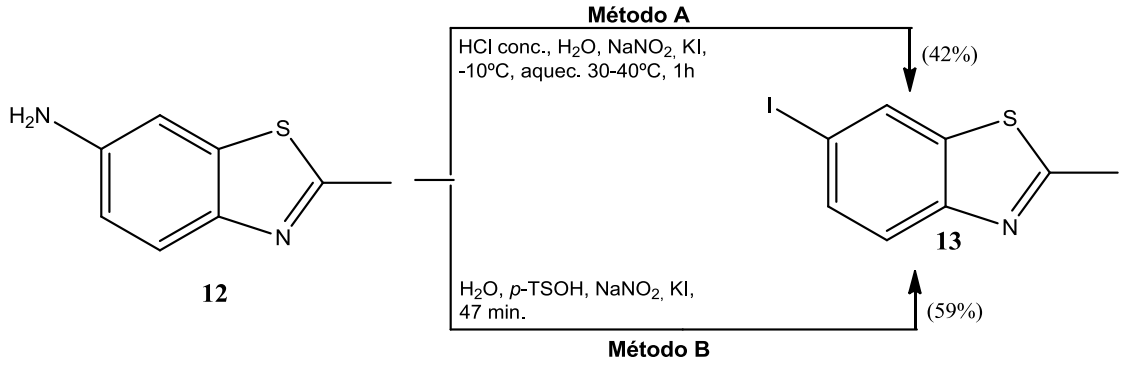
**Tabela 2.4** Ponto de fusão e espectro no IV do 6-amino-2-metilbenzotiaol (**12**)

| **Composto** |  **12** |
|---|---|
| **p.f. (ºC)**[lit.] | 122-124 [119-120][a)] |
| **IV $\upsilon_{máx}$**(pastilha em KBr, $cm^{-1}$) | 3291 (fr, $NH_2$), 3195 (fr, $NH_2$), 1603 (f, ArC=C) |

[a)]Santos *et al*., 2005

### 2.4.1.3 Sintese do 6-iodo-2-metilbenzotiazol (13)

O composto 6-iodo-2-metilbenzotiazol (**13**) foi obtido por substituição do grupo amino do anel aromático do composto (**12**) de acordo com os métodos referidos na literatura (Gorlushko *et al*., 2008; Santos *et al*., 2005) e que se encontram representados no Esquema 2.6. Em ambos os ensaios realizados o composto foi obtido com rendimento relativamente baixo, sendo o melhor (59%), obtido pelo método B, no qual se fez reagir o composto (**12**) com $H_2O$, *p*-TSOH, $NaNO_2$ e KI, por trituração sequencial dos reagentes num almofariz. Obteve-se então o composto 6-iodo-2-metilbenzotiazol (**13**), na forma de um pó laranja claro, após ser purificado com cromatografia em coluna.

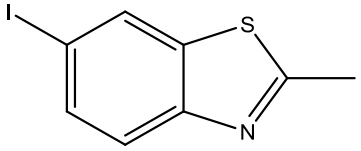



**Esquema 2.6** Síntese do composto **13**, através de dois métodos diferentes

Quanto ao ponto de fusão, este encontra-se no intervalo 139-140ºC, mas acompanhado de dec. (decomposição) e está de acordo com o valor referido na literatura (Santos *et al.*, 2005).

Também para este composto, por já se encontrar publicado na literatura (Santos *et al.*, 2005) e tal como se referiu no ponto 2.4.1.1., apenas se apresenta o espectro de IV (Tabela 2.5). Relativamente ao espectro do seu percursor, tal como seria de esperar não se observam bandas acima dos 3100 $cm^{-1}$. Há apenas a salientar a banda característica da vibração das ligações C-H alifáticas a 2912 $cm^{-1}$ e da ligação ArC=C a 1568 $cm^{-1}$. O espectro detalhado apresenta-se na parte experimental.

**Tabela 2.5** Ponto de fusão e espectro no IV do 6-iodo-2-metilbenzotiazol (**13**)

| **Composto** |  **13** |
|---|---|
| **p.f. (ºC)**[lit.] | 139-140(dec.) [140-141][a)] |
| **IV $\upsilon_{máx}$**(pastilha em KBr, $cm^{-1}$) | 2912 (fr, CH*alif.*), 1568 (fr, ArC=C) |

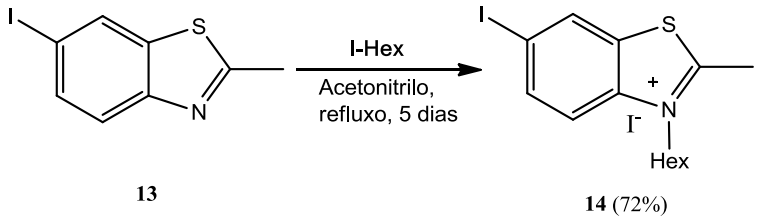
[a)]Santos *et al*., 2005

### 2.4.1.4 Síntese do iodeto de 3-hexil-6-iodo-2-metilbenzotiazol-3-io (14)

O sal quaternário de amónio (**14**) foi facilmente obtido por reação da base heterocíclica 6-iodo-2-metilbenzotiazol (**13**) com um excesso do agente alquilante, 1-iodo-hexano (I-Hex),

em acetonitrilo a refluxo (Pardal *et al*., 2002; Santos *et al*., 2005) como se pode observar no Esquema 2.7.

Para obtenção de um rendimento mais alto, foi necessária a repetição do método atrás descrito, após isolamento da primeira fracção. Obteve-se então o iodeto de 3-hexil-6-iodo-2-metilbenzotiazol-3-io (**14**), com um rendimento de 72%, superior ao encontrado na literatura (64%) (Santos *et al*., 2005), sob a forma de um pó castanho claro, cromatograficamente puro.

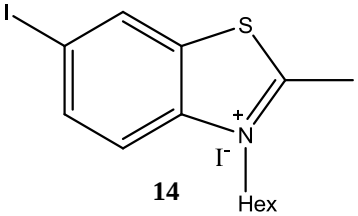



**13** **14** (72%)

**Esquema 2.7** Síntese do composto**14**

Quanto ao ponto de fusão, este encontra-se no intervalo entre 209-210ºC, valor relativamente próximo do da literatura, 202-203ºC (Santos *et al*., 2005). Tal como já foi referido no ponto anterior e por razões semelhantes, apenas se apresenta o espectro no IV deste composto (Tabela 2.6), o qual está de acordo com o publicado na literatura (Santos *et al*., 2005). Neste espectro há a salientar apenas a presença das bandas médias relativas às vibrações das ligações C-H*alif*., que surgem a 2948 $cm^{-1}$. O espectro detalhado apresenta-se na parte experimental (Ponto 3.3.1.4).

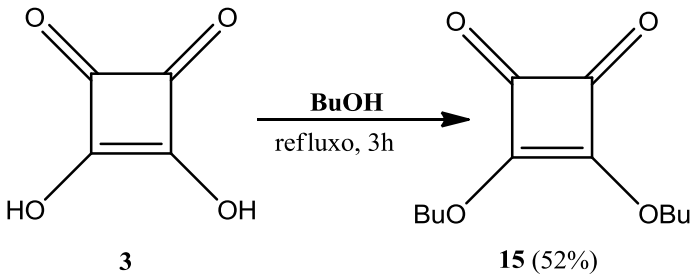
**Tabela 2.6** Ponto de fusão e espectro no IV do iodeto de 3-hexil-6-iodo-2-metilbenzotiazol-3-io (**14**)

| **Composto** |  **14** |
|---|---|
| **p.f. (ºC)**[lit.] | 209-210 [202-203][a)] |
| **IV $\upsilon_{máx}$ (**pastilha em KBr, $cm^{-1}$**)** | 2948 (fr, C-H*alif*.), |

[a)]Santos *et al*., 2005

### 2.4.1.5 Síntese do 3,4-dibutoxi-3-ciclobuten-1,2-diona (15)

O composto 3,4-dibutoxi-3-ciclobuten-1,2-diona (**15**) foi obtido por reacção do ácido esquárico (**3**) com butanol, a refluxo, durante 3 horas, de acordo com o Esquema 2.8. O composto foi obtido na forma de um óleo castanho, com rendimento de 52%, cromatograficamente puro tendo sido usado de imediato na reacção seguinte sem qualquer purificação ou caracterização posterior.

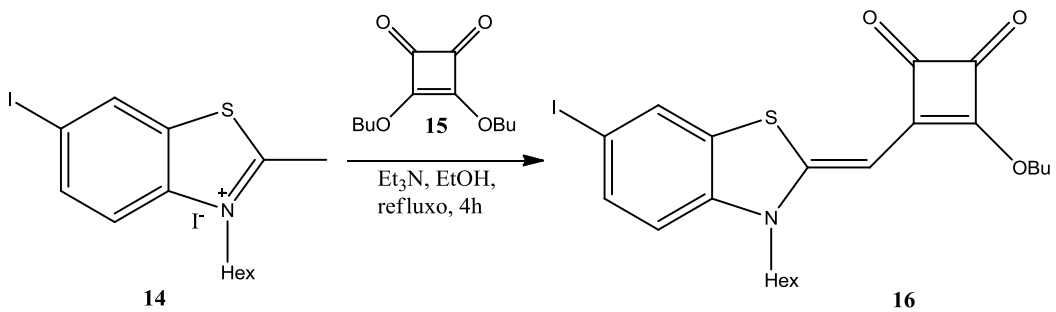



**3** **15** (52%)

**Esquema 2.8** Síntese do composto **15**

### 2.4.1.6 Tentativa de síntese do 6-iodo-3-butoxi-4-[(3-hexilbenzotiazol-2(3H)-ilideno)metil]-3-ciclobuteno-1,2-diona (16)

Tentou-se a síntese do 6-iodo-3-butoxi-4-[(3-hexilbenzotiazol-2(3H)-ilideno)metil]-3-ciclobuteno-1,2-diona (**16**) através da reacção entre o sal quaternário de amónio (**14**) e o composto 3,4-dietoxi-3-ciclobuteno-1,2-diona (**15**) na presença de trietilamina, a refluxo em etanol durante 4 horas (Esquema 2.9) de acordo com o procedimento descrito na literatura (Kim *et al*., 2010).



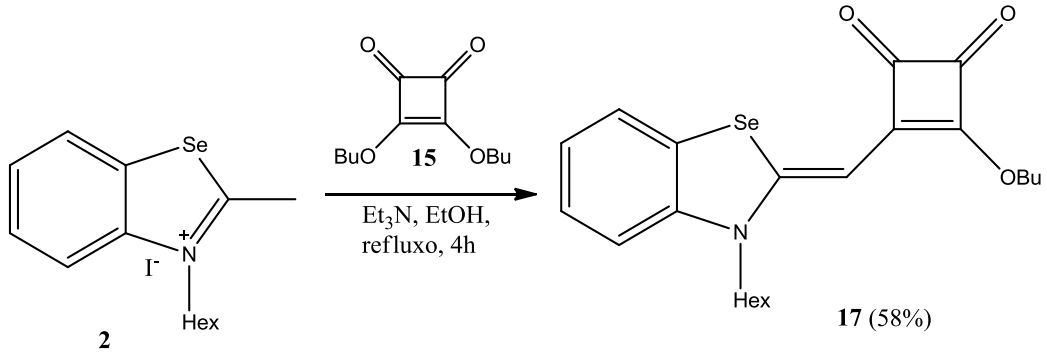

**14** **16**

**Esquema 2.9** Síntese do composto **16**

Após o término da reação e por c.c.f. (cromatografia em camada fina), verificou-se a presença de duas manchas, uma vermelha com r.f. (factor de retardação) inferior e uma mancha amarela com r.f. superior. A mistura de produtos foi precipitada do meio reacional, por adição de EtOH, obtendo-se cristais vermelho-escuros, tendo-se tentado a sua separação por cromatografia em coluna, utilizando como eluente $CH_2Cl_2$. No entanto, a separação cromatográfica não foi bem sucedida uma vez que não se conseguiram obter frações de cada um dos compostos no estado puro. As várias tentativas de recristalização da mistura dos dois compostos também não permitiram a obtenção dos compostos puros. Devido ao insucesso da purificação destes compostos, este método de síntese foi abandonado, tendo-se optado por sintetizar um composto análogo ao **16** mas em que no anel aromático não existe o átomo de iodo e a base metilénica de partida foi um derivado do benzo-selenazol. Assim sintetizou-se o composto **17** de acordo com o Esquema 2.10.

#### 2.4.1.7 Síntese do 3-butoxi-4-[(3-hexilbenzoselenazol-2(3H)-ilideno)metil]-3-ciclobuten-1,2-diona (17)

O composto 3-butoxi-4-[(3-hexilbenzoselenazol-2(3H)-ilideno)metil]-3-ciclobuten-1,2-diona (**17**) foi então sintetizado fazendo-se reagir uma mistura de iodeto de 3-hexil-2-metilbenzoselenazólio (**2**) e 3,4-dibutoxi-3-ciclobuteno-1,2-diona (**15**) (Esquema 2.10) de acordo com o método descrito em 2.4.1.6 (Kim *et al*., 2010). Este composto foi obtido, após purificação por cromatografia em coluna utilizando como eluente uma mistura de éter de petróleo/éter dietílico (1:1), sob a forma de cristais amarelos, cromatograficamente puros, com um rendimento de 58%. Na síntese de um análogo ao composto **17**, em que existe o grupo metoxilo na posição 6 e a base metilénica é derivada do benzotiazol, descrita por Kim e os seus colaboradores em 2010 é apresentado um valor de rendimento de 71%, bastante mais elevado do que o rendimento obtido neste trabalho, para o composto **17**. Isto pressupõe que o rendimento desta reação pode ser optimizado, por exemplo utilizando outro solvente para eluição da coluna de cromatografia e investindo mais tempo na purificação dos compostos através da técnica de recristalização.




**Esquema 2.10** Síntese do composto **17**

No que diz respeito ao ponto de fusão, situado entre 103 e 106ºC, este apresenta um intervalo com uma diferença de cerca de 3ºC, o que indica que o composto foi obtido com uma pureza razoável (cromatograficamente estava puro), no entanto como se trata de um composto novo, não existem na literatura dados para comparação.

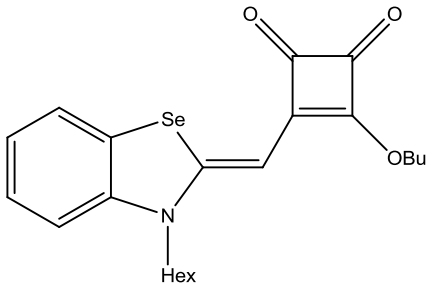
No espectro no IV salientam-se as bandas características das vibrações das ligações C-H aromáticas (fraca) a 3063 $cm^{-1}$, da vibração das ligações C-H alifáticas (fraca) a 2925 $cm^{-1}$ e da vibração das ligações C=O (média) a 1763 $cm^{-1}$.

O espectro de $^{1}$H-RMN do composto **17** apresenta os sinais esperados para a totalidade dos protões presentes no composto (Tabela 2.7).

Neste espectro salientam-se os sinais dos grupos metilo da cadeia *N*-alquílica e *O*-alquílica que surgem ao desvio químico 0,99 e 0,91 ppm sob a forma de dois tripletos de três protões cada. Observam-se dois quintetos de dois protões cada, aos desvios químicos 1,84 e 1,77 ppm que correspondem aos protões do grupo $CH_2$ das cadeias referidas anteriormente, que têm quatro protões vizinhos. Pode-se ainda verificar a presença de dois tripletos a 4,78 e 3,95 ppm de dois protões cada e que foram atribuídos aos protões dos grupos $CH_2$ ligados diretamente aos átomos de oxigénio e azoto das cadeias alquílicas. Ao desvio químico 5,66 ppm surge o sinal correspondente ao protão da cadeia polimetínica CH=C, sob a forma de um singuleto de um protão.

Na zona aromática do espectro, entre os desvios químicos 7,52 e 7,01 ppm, surgem os sinais relativos aos quatro protões aromáticos da molécula, apresentando-se como seria de esperar, na forma de dois tripletos de um protão cada e dois dupletos também de um protão cada.

**Tabela 2.7** Dados físicos e espectroscópicos do 3-butoxi-4-[(3-hexilbenzoselenazol-2(3H)-ilideno)metil]-3-ciclobuten-1,2-diona (**17**)

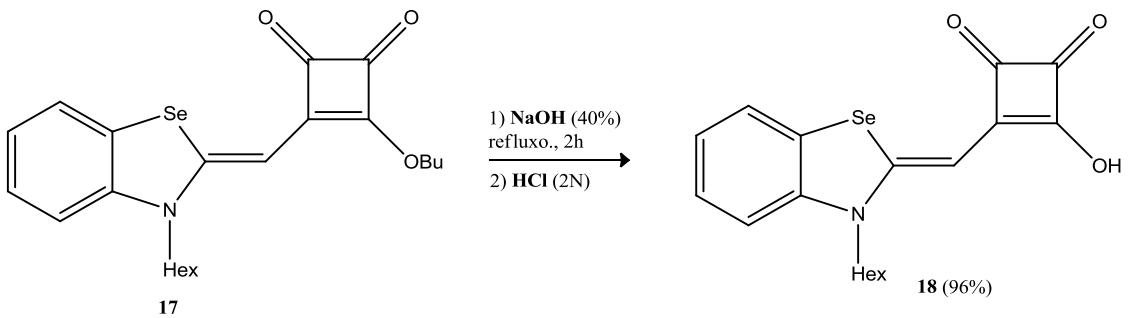
| **Composto** |  **17** |
|---|---|
| **p.f. (ºC)** | 103-106 |
| **$\lambda_{máx}$**(nm), **log ε** (DMSO) | 449; 5,87 |
| **IV $\upsilon_{máx}$**(pastilha em KBr, $cm^{-1}$) | 3063 (fr, Ar-H),<br>2925 (fr, C-H*alif.*),<br>1763 (m, C=O). |
| **$^{1}$H-NMR δ**(400 MHz, $CDCl_3$, ppm, *J* em Hz) | 0,91 (3H,*t*, *J* = 7,0; $OCH_2CH_2CH_2C\underline{H}_3$),<br>0,99 (3H,*t*, *J* =7,4; $NCH_2(CH_2)_4C\underline{H}_3$),<br>1,32-1,37 (4H, *m*,$OCH_2CH_2C\underline{H}_2CH_3$ + $N(CH_2)_4C\underline{H}_2CH_3$),<br>1,41-1,48 (4H, *m*,$NCH_2(C\underline{H}_2)_2(CH_2)_2CH_3$),<br>1,77 (2H, *quint*, $NCH_2C\underline{H}_2(CH_2)_2CH_3$),<br>1,84 (2H, *quint*, $OCH_2C\underline{H}_2CH_2CH_3$),<br>3,95 (2H, *t*, *J* = 8,0,$NC\underline{H}_2(CH_2)_4CH_3$),<br>4,78 (2H, *t*, $OC\underline{H}_2CH_2CH_2CH_3$),<br>5,66 (1H, *s*, CH=C),<br>7,01 (1H, *d*, *J* = 8,2, Ar-H),<br>7,10 (1H, *t*, *J* = 7,6, Ar-H),<br>7,33 (1H, *t*, *J* = 8,4, Ar-H),<br>7,52 (1H, *d*, *J* = 8,7, Ar-H). |
| **$^{13}$C-NMR** (600 MHz, $CDCl_3$, ppm) | 12,06 ($CH_3$), 13,35 ($CH_3$),<br>16,79 ($CH_2$), 20,30 ($CH_2$), 21,79 ($CH_2$),<br>29,39 ($CH_2$), 30,15 ($CH_2$), 44,55 ($CH_2$),<br>67,85 ($NCH_2$),70,75 ($OCH_2$),<br>81,49 (CH=C),<br>110,45 (ArC-H), 121,65 (ArC-H), 123,05 (ArC-H),<br>126,85 (ArC-H) |
| **EMAR-ESI-TOF** $[M+H]^+$ | 434,12306$[M+H]^+$ ($C_{22}H_{28}NO_3Se^+$, calc. 434,12299) |

O espectro de carbono $^{13}$C-RMN deste composto apresenta 22 sinais, correspondentes aos 22 carbonos presentes no composto. Os dois sinais correspondentes aos grupos metilo das cadeias alquílicas, encontram-se aos desvios químicos 13,35 e 12,06 ppm, observa-se a presença de oito sinais correspondentes aos oito grupos $CH_2$ das cadeias alquílicas aos desvios químicos entre 70,75-16,79 ppm, sendo os que se apresentam a campo mais baixo (70,75 e 67,85 ppm) os carbonos que estão diretamente ligados aos átomos de azoto e oxigénio. O sinal correspondente ao carbono da ligação CH=C da cadeia polimetínica encontra-se ao desvio químico de 81,49 ppm. Quatro dos seis carbonos aromáticos surgem entre os desvios químicos 126,85 e 110,45 ppm e foram atribuídos aos carbonos C-H do anel. As atribuições foram feitas com base nos espectros DEPT 90 e DEPT 135.

A massa exacta encontrada para o composto **17** está dentro dos limites aceitáveis sendo m/z = 434,12306 $[M+H]^+$ ; ($C_{22}H_{28}NO_3Se^+$; calc. 434,12299).

### 2.4.1.8 Síntese do 3-[(3-hexilbenzoselenazol-2(3H)-ilideno)metil]-4-hidroxi-3-ciclobuten-1,2-diona (18)

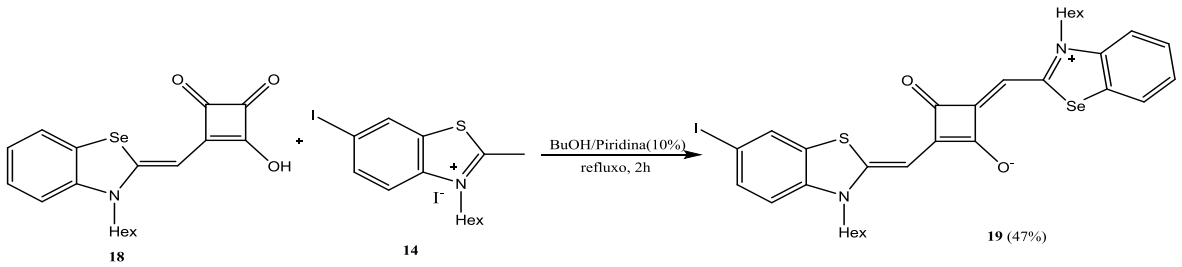
O composto 3-[(3-hexilbenzoselenazol-2(3H)-ilideno)metil]-4-hidroxi-3-ciclobuten-1,2-diona (**18**) foi sintetizado através da reacção de hidrólise descrita na literatura (Kim *et al*., 2010) e encontra-se evidenciada no Esquema 2.11. O produto obtido, sob a forma de cristais vermelho-alaranjados, com rendimento de 96 %, cromatograficamente puro foi usado na reacção seguinte sem qualquer purificação e caraterização posterior.




**Esquema 2.11**Síntese do composto **18**

### 2.4.1.9 Síntese do 4-[(3-hexilbenzoselenazol-3-io-2-il)metilideno]-2-[3-(3-hexil-6-iodo-3H-benzotiazol-2-ilidenometil]-3-oxo-ciclobut-1-en-1-olato (19)

O composto **19** foi obtido, fazendo reagir o iodeto de 3-hexil-6-iodo-2-metil-benzotiazol-3-io (**14**) com o composto **18** obtido no ponto anterior, numa mistura depiridina/butanol (10%) a refluxo durante 2 horas (Esquema 2.12). Este foi obtido, após recristalização do produto bruto com éter dietílico, sob a forma de cristais azuis arroxeados, cromatograficamente puros, com um rendimento de 47%, rendimento relativamente baixo e que se deveu ao facto de ter havido alguma dificuldade no método de recristalização utilizado. O composto **19** apresenta um intervalo de fusão entre 130 e 132 ºC, com uma diferença de cerca de 2ºC, o que indica que o composto apresenta elevada pureza, no entanto estes valores não podem ser comparados uma vez que não existem valores de referência na literatura.




**Esquema 2.12** Síntese do corante esquarílico **19**

Os dados físicos e espectroscópicos são apresentados na Tabela 2.8. No espectro no IV salientam-se, as bandas características de vibrações das ligações C-H alifáticas (fracas) aproximadamente 2924 $cm^{-1}$. De notar que no espectro deste composto, tal como se verificou no composto simétrico **4**, não se observa a banda característica da vibração da ligação C=O, ao contrário do que seria de esperar. O espectro de $^{1}$H-RMN do composto **19** apresenta os sinais esperados para a totalidade dos protões presentes na referida molécula. Os protões dos dois grupos metilo das cadeias alquílicas de seis carbonos, surgem ao desvio químico 0,93-0,90 ppm sob a forma de um tripleto largo de seis protões. Os protões $CH_2$ das cadeias alquílicas surgem na forma de vários multipletos entre 1,83-1,31 ppm, com excepção dos protões dos grupos $CH_2$ directamente ligados aos átomos de azoto que surgem ao desvio químico entre 4,08 e 3,97 ppm sob a forma de dois tripletos de dois protões cada. Deve-se ainda salientar a presença de dois sinais na forma de singuleto de um protão cada, que surgem aos desvios químicos 6,07 e 5,81 ppm e que foram atribuídos aos protões CH=C da cadeia

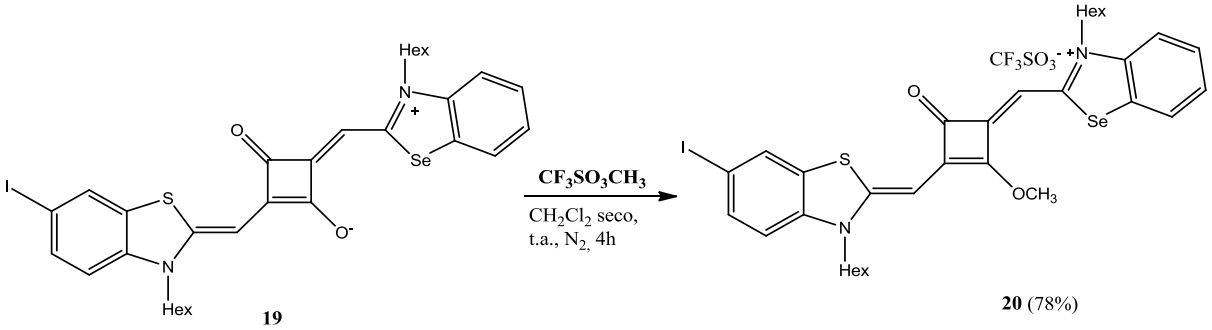
polimetínica. Na zona aromática, entre o desvio químico 7,72 e 6,79 ppm, surgem os sinais relativos aos sete protões aromáticos da molécula, sendo o singuleto de um protão que surge a 7,72 ppm atribuído ao protão da posição 7 do anel aromático que contém o átomo de iodo.

Relativamente ao espectro de carbono $^{13}$C-RMN do composto **19** os dois sinais correspondentes aos grupos metilo das cadeias alquílicas, encontra-se aos desvios químicos 15,27 e 13,99 ppm, os sinais dos dez carbonos das cadeias alquílicas correspondentes aos grupos $CH_2$, encontram-se entre os desvios químicos 47,12 e 18,45 ppm e os sinais correspondentes aos carbonos das ligações CH=C da cadeia polimetínica encontram-se aos desvios químicos 89,82 e 85,43 ppm. Na zona aromática foi possível fazer as atribuições aos sete carbonos C-H que surgem entre 135,82 e 112,65 ppm. Estas atribuições foram feitas com base nos espectros DEPT 90 e DEPT 135.

A massa exacta do corante **19** encontrada está dentro dos limites aceitáveis sendo m/z = 718,06272 $[M]^+$; ($C_{32}H_{35}IN_2O_2SSe^+$; calc. 718,06249).

#### 2.4.1.10 Síntese do trifluorossulfonato de 3-hexil-2-[3-(3-hexil-6-iodo-3H-benzotiazol-2-ilidenometil)-2-metoxi-4-oxociclobut-2-enilidenometil] benzoselenazol-3-io (20)

O trifluorossulfonato de 3-hexil-2-[3-(3-hexil-6-iodo-3H-benzotiazol-2-ilidenometil)-2-metoxi-4-oxociclobut-2-enilidenometil]benzoselenazol-3-io **(20)** foi sintetizado segundo a reacção de metilação descrita na literatura (Reis *et al*., 2009), fazendo reagir o composto **19** com o agente metilante $CF_3SO_3CH_3$, numa proporção de 1:3, respetivamente (Esquema 2.13). O composto **20** foi obtido após recristalização com éter dietílico e $CH_2Cl_2$, na forma de cristais azuis arroxeados, cromatograficamente puros, com um rendimento de 78%, o qual está de acordo com os valores encontrados na literatura para esta reacção de metilação (76%-87%) para corantes cianínicos esquarílicos simétricos (Reis *et al*., 2009).




**Esquema 2.13** Síntese do corante esquarílico **20**

O composto **20** apresentou um intervalo de ponto de fusão entre 211-215 $^{o}$C com dec. Os dados físicos e espectroscópicos deste composto estão apresentados na Tabela 2.8.

No espectro no IV salienta-se a banda característica da vibração das ligações C-H alifáticas (fracas) a 1928 $cm^{-1}$ e a banda das vibrações do grupo C=O, que é fraca, a 1654 $cm^{-1}$.

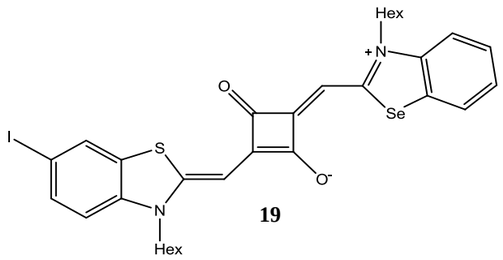
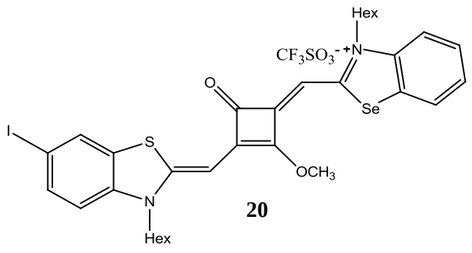
No espectro $^{1}$H-RMN do composto **20** observaram-se sinais correspondentes aos 38 protões existentes na molécula. Este espectro é muito semelhante ao espectro do seu percursor **19**, sendo a maior diferença observada pela presença do sinal do grupo metilo. Os sinais dos protões metílicos terminais das cadeias alquílicas surgem aos desvios químicos entre 0,90-0,85 ppm sob a forma de um multipleto de seis protões.

Também neste espectro se observam multipletos entre 1,74-1,35 ppm relativos aos protões dos grupos $CH_2$ das cadeias alquílicas, com excepção dos protões dos grupos $CH_2$ directamente ligados ao átomo de azoto que surge agora na forma de um multipleto de 4 protões ao desvio químico 4,40-4,30 ppm. Pode-se ainda verificar a presença de um sinal de três protões na forma de singuleto, que surge ao desvio químico 4,61 ppm, atribuído ao grupo metoxilo. Surgem ainda, outros dois sinais sob a forma de singuletos de um protão, correspondentes aos dois protões CH=C da cadeia polimetínica, aos desvios químicos de 6,13 e 6,01 ppm. Na zona aromática entre os desvios químicos 7,89 e 7,09 ppm surgem os sinais correspondentes aos sete protões aromáticos da molécula.

No que diz respeito ao espectro de $^{13}$C-RMN do composto **20**, o sinal dos carbonos dos grupos metilo aparecem ao desvio químico 14,02 e 14,00 ppm. Entre os desvios químicos 31,46 e 22,40 ppm são identificados sinais de sete dos oito carbonos dos grupos $CH_2$ da cadeia alquílica. Aos desvios químicos de 48,15 e 47,34 aparecem os sinais dos carbonos dos grupos $CH_2$ dessa cadeia que estão diretamente ligados ao átomo de azoto. O sinal do carbono do grupo metoxilo aparece ao desvio químico 61,60 ppm e o sinal dos dois carbonos da ligação CH=C da cadeia polimetínica surgem neste caso, ao mesmo desvio químico de 88,75 ppm. Tal como no espectro do seu percursor **19**, foram identificados os sete carbonos C-H aromáticos aos desvios químicos 137,16-114,92 ppm.

A massa exacta encontrada para o composto **20** está dentro dos limites aceitáveis sendo m/z = 733,08647 $[M- CF_3SO_3^-]^+$ ; ($C_{33}H_{38}IN_2O_2SSe^+$; calc. 733,08598).

**Tabela 2.8** Dados físicos e espectroscópicos dos compostos **19** e **20**.

| **Composto** | **p.f.** ($^{o}$C) | **IV υmáx** (pastilha em KBr, $cm^{-1}$) | **$^{1}$H-RMN** **δ** ($CDCl_3$, ppm, *J* em Hz)[a)] | **$^{13}$C-RMN** **δ** ($CDCl_3$, ppm, *J* em Hz)[b)] | **EMAR-ESI-TOF** Determinado (calculado) |
|---|---|---|---|---|---|
|  **19** | 130-132 | 2924 (fr, C-H*alif.*), | 0,93-0,90 (6H, *tl*, $N(CH_2)_5C\underline{H}_3$),<br>1,3 -1,31 (8H, *m*, $N(CH_2)_3(C\underline{H}_2)_2CH_3$),<br>1,45-1,40 (4H, *m*, $N(CH_2)_2C\underline{H}_2(CH_2)_2CH_3$),<br>1,74-1,83 (4H, *m*, $N(CH_2)_2C\underline{H}_2(CH_2)_2CH_3$),<br>3,97 (2H, *t*; *J*=6, $NC\underline{H}_2(CH_2)_4CH_3$),<br>4,08 (2H, *t*; *J*=6, $NC\underline{H}_2(CH_2)_4CH_3$),<br>5,81 (1H, *s*, CH=C),<br>6,07 (1H, *s*, CH=C),<br>6,79 (1H, *d*, *J*=6, Ar-H),<br>7,10 (1H, *d*, *J*=6, Ar-H),<br>7,15 (1H, *t*; *J*=6, Ar-H),<br>7,35 (1H, *t*, *J*=6, Ar-H),<br>7,58 (2H, *d*, J=6, Ar-H),<br>7,72 (1H, *s*, Ar-H) | 13,99 ($CH_3$), 15,27 ($CH_3$),<br>18,45 ($CH_2$), 22,51 ($CH_2$), 22,55 ($CH_2$),<br>26,53 ($CH_2$), 26,56 ($CH_2$), 27,14 ($CH_2$),<br>27,23 ($CH_2$), 31,45 ($CH_2$)<br>46,20 ($NCH_2$), 47,12 ($NCH_2$),<br>85,43 (CH=C), 89,82 (CH=C),<br>112,65 (ArC-H), 113,25 (ArC-H),<br>124,22 (ArC-H), 125,24 (ArC-H),<br>127,18 (ArC-H), 130,16 (ArC-H),<br>135,82 (ArC-H), | 718,06272 $[M]^{+}$<br>($C_{32}H_{35}IN_2O_2SSe^{+}$,<br>calc.718,06249). |
|  **20** | 211-215 | 1928 (fr, C-H*alif.*),<br>1654 (fr, C=O), | 0,90-0,85 (6H, *m*, $N(CH_2)_5C\underline{H}_3$),<br>1,35-1,26 (8H, *m*, $N(CH_2)_2CH_2(C\underline{H}_2)_2CH_3$),<br>1,49-1,37 (4H, *m*, $N(CH_2)_2C\underline{H}_2(CH_2)_2CH_3$),<br>1,87-1,74 (4H, *m*, $NCH_2C\underline{H}_2(CH_2)_3CH_3$),<br>4,40-4,30 (4H, *m*, $NC\underline{H}_2(CH_2)_4CH_3$),<br>4,61 (3H, *s*, $OC\underline{H}_3$),<br>6,01 (1H, *s*, CH=C),<br>6,13 (1H, s, CH=C),<br>7,09 (1H, *d*, *J*=8,7, Ar-H),<br>7,29-7,35 (2H, *m*, Ar-H),<br>7,48 (1H, *t*, *J*=8, Ar-H),<br>7,70 (1H, *d*, *J*=8, Ar-H),<br>7,74 (1H, *d*, *J*=8, Ar-H),<br>7,89 (1H, *s*, Ar-H). | 14,00 ($CH_3$), 14,02 ($CH_3$),<br>22,40 ($CH_2$), 22,50 ($CH_2$), 26,4 ($CH_2$),<br>26,60 ($CH_2$), 27,94 ($CH_2$), 27,97 ($CH_2$),<br>31,46 ($CH_2$),<br>47,34 ($NCH_2$), 48,15 ($NCH_2$),<br>61,60 ($OCH_3$),<br>88,75 (CH=C),<br>114,92 (ArC-H), 115,18 (ArC-H),<br>125,60 (ArC-H), 125,93 (ArC-H),<br>128,30 (ArC-H), 130,65 (ArC-H),<br>137,16 (ArC-H), | 733,08647 $[M\text{-}CF_3SO_3^{-}]^{+}$<br>($C_{33}H_{38}IN_2O_2SSe^{+}$,<br>calc.733,08598). |

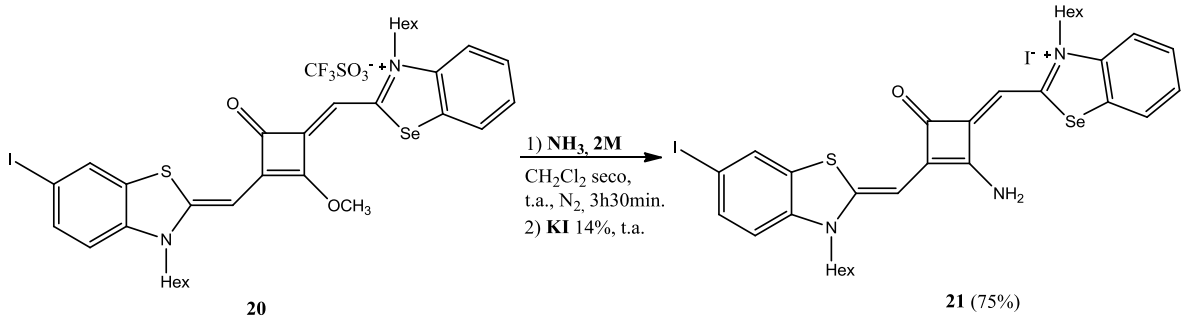
[a)] **19** em 600 MHz, **20** em 400 MHz; [b)] **19** e **20** em 600 MHz

### 2.4.2 Síntese dos corantes cianínicos aminoesquarílicos assimétricos

Os corantes cianinícos aminoesquarílicos assimétricos foram obtidos por reação do derivado *O*-metilado **20**, com aminas apropriadas.

#### 2.4.2.1 Síntese do iodeto de 2-[-2-amino-3-(3-hexil-6-iodo-3H-benzotiazol-2-ilidenometil)-4-oxociclobut-2-enilidenometil]-3-hexilbenzoselenazol-3-io (21)

O corante cianínico aminoesquarílico **21** foi obtido por reacção do corante cianínico esquarílico *O*-metilado (**20**) com uma solução de amónia (2M) em metanol.Tal como se fez para os corantes simétricos e no sentido de aumentar a produção de oxigénio singuleto, o contra-ião $CF_3SO_3^-$ dos corantes aminoesquarílicos (**21**-**25**) foi trocado pelo ião iodeto, dissolvendo o produto bruto em metanol e adicionando igual volume de uma solução aquosa de KI (14%) (Esquema 2.14). Obteve-se então o composto **21**, com um rendimento de 75%, cromatograficamente puro, em forma de cristais azuis apresentando o intervalo de ponto de fusão 297- >300 ºC .




**Esquema 2.14** Síntese do corante aminoesquarílico **21**

Os dados físicos e espectroscópicos do corante cianínico aminoesquarílicos **21** encontram-se descritos na Tabela 2.9.

No espectro no IVdeste composto, salientam-se as bandas características da vibração da ligação N-H do grupo amino ($NH_2$), fraca a 3448 $cm^{-1}$, a banda característica das ligações aromáticas C-H (fracas) a 3097 $cm^{-1}$ e a banda característica das vibrações das ligações C-H alifáticas a 2925 $cm^{-1}$. Apresenta ainda a banda característica das vibrações do grupo C=O a 1631 $cm^{-1}$ sob a forma de uma banda fraca.

No espectro de $^{1}$H-RMN observam-se sinais correspondentes aos trinta e sete protões existentes na molécula. Os sinais dos protões da cadeia alquílica correspondentes aos dois grupos metilo terminais surgem ao desvio químico 0,86 ppm sob a forma de um singuleto largo de seis protões. Verifica-se ainda a existência de sinais correspondentes a dezasseis de oito grupos $CH_2$ da cadeia alquílica, no intervalo 1,70 -1,29ppm sob a forma de três singuletos largos. Os protões pertencentes ao grupo $NCH_2$ da cadeia alquílica surgem aos desvios químicos 4,25 e 4,18 sob a forma de um singuleto largo de dois protões cada. Pode-se ainda verificar a presença de dois singuletos de um protão cada, referentes aos protões da cadeia polimetínica CH=C, aos desvios químicos 6,32 e 6,10 ppm. Os sinais referentes aos sete protões aromáticos, surgem sob a forma de sete sinais bem definidos ao desvio químico 8,34-7,32. Há ainda a referir neste espectro o sinal dos dois protões do grupo amino ($NH_2$), que surge ao desvio químico 8,69 ppm sob a forma de um singuleto de dois protões, que troca com $D_2O$.

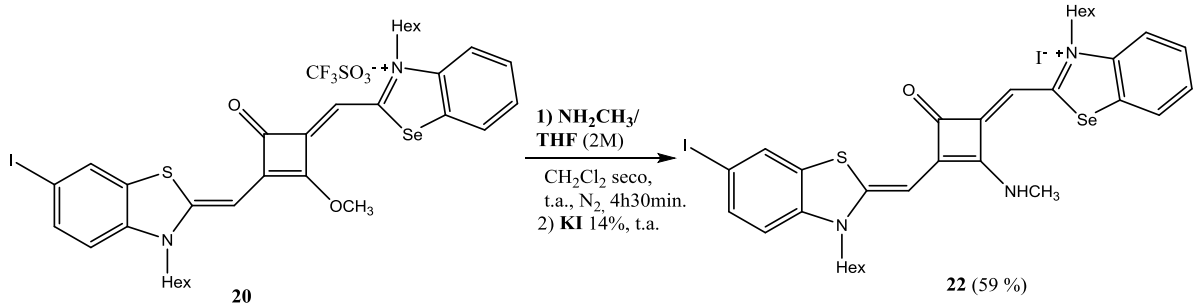
No espectro de $^{13}$C-RMN, apenas foi possível identificar alguns dos sinais observados. O sinal dos carbonos dos grupos metilo da cadeia alquílica surge ao mesmo desvio químico (13,94 ppm). Observam-se sete sinais que correspondem aos oito grupos $CH_2$ da cadeia alquílica ao desvio químico 31,25 -22,30 ppm e dois sinais que surgem aos desvios 47,40 e 46,50 ppm, que foram atríbuidos aos carbonos dos grupos $NCH_2$ da mesma cadeia. Os sinais dos dois carbonos dos grupos CH=C da cadeia polimetínica surgem aos desvios químicos 91,40 e 86,86 ppm. Também neste espetro se observam sete sinais na zona aromática que foram atribuídos aos sete carbonos C-H aromáticos existentes no composto, ao desvio químico 136,17-113,97.

A massa exacta encontrada para o composto **21** está dentro dos limites aceitáveis, sendo m/z: 718,08626 $[M- I^-]^+$ ( $C_{32}H_{37}IN_3OSSe^+$; calc. 718,08630).

### 2.4.2.2 Síntese do iodeto de 3-hexil-2-[3-(3-hexil-6-iodo-3H-benzotiazol-2-ilideno-metil)-2-metilamino-4-oxo-ciclobut-2-enilidenometil]-3-benzoselenazol-3-io (22)

O iodetode 3-hexil-2-[3-(3-hexil-6-iodo-3H-benzotiazol-2-ilidenometil)-2-metilamino-4-oxo-ciclobut-2-enilidenometil]-3-benzoselenazol-3-io (**22**) foi obtido após reacção entre o corante cianínico esquarílico *O*-metilado (**20**) e uma solução de metilamina (2M) em tetra-hidrofurano de acordo com o método apresentado na literatura (Reis *et al*., 2002), para corantes aminoesquarílicos simétricos e posterior reacção do produto bruto dissolvido em

metanol com uma solução aquosa de KI (14%) (Esquema2.15), com um rendimento de 59 %, cromatograficamente puro, sob a forma de cristais azuis esverdeados, apresentando um intervalo de fusão que se situa entre os 246 e 248 $^{o}$C.




**Esquema 2.15** Síntese do corante aminoesquarílico **22**

Os dados físicos e espectroscópicos do corante cianínico aminoesquarílico **22** encontram-se reunidos na Tabela 2.9.

No espectro no IV há a salientar a banda característica de vibração da ligação N-H, fraca, a 3448 $cm^{-1}$, da vibração das ligações C-H alifáticas a 2927 $cm^{-1}$ e ainda a banda da vibração do grupo C=O a 1625 $cm^{-1}$, também ela fraca.

O espectro de $^{1}$H-RMN deste composto é muito diferente do do seu análogo **21**, verificando-se um elevado aumento do número de sinais, para o dobro, o que nos indica que neste caso, devido ao seu carácter de ligação dupla, há restrição da rotação em torno da ligação N-C do grupo amino, que está ligado ao anel de quatro membros, o que provoca assimetria molecular podendo-se verificar sinais correspondentes a duas conformações do composto, contrariamente ao que se verificou nos espectros dos análogos **19**-**21**. O mesmo efeito foi já observado por Santos *et al*., 2010 em corantes cianínicos aminoesquarílicos simétricos com o grupo $NHCH_3$. Assim no espectro do composto **22** observaram-se todos os sinais dos 39 protões presentes no composto, mas em duplicado uma vez que a molécula para além de sofrer este impedimento de rotação da ligação C-N também, por si só, já apresenta assimetria. O sinal dos protões da cadeia alquílica correspondente aos dois grupos metilo surge ao desvio químico entre 0,91 e 0,80 ppm sob a forma de um multipleto de doze protões (seis de cada conformação) e os sinais dos restantes protões da cadeia alquílica, dezasseis, surgem na forma de um multipleto ao desvio químico 1,32 -1,27ppm e sob a forma de dois singuletos largos de oito protões cada, aos desvios químicos 1,76 e 1,45 ppm, com a excepção dos protões dos grupos $CH_2$ directamente ligados aos átomos de azoto que surgem aos desvios

químicos de 4,25 e 4,15 ppm, sob a forma de singuletos largos de quatro protões cada. Ao desvio químico 3,33 ppm verifica-se um singuleto de três protões correspondentes ao grupo $NHCH_3$ de uma conformação e ao desvio químico de 3,36 ppm outro singuleto, também ele de três protões do grupo $NHCH_3$ da outra conformação. Contrariamente ao que se observava nos espectros dos análogos **19-21**, verifica-se no espectro de $^1$H-RMN deste composto a presença de quatro sinais de um protão cada, na forma de singuletos aos desvios químicos de 6,73; 6,56; 6,05 e 5,83 e ppm, sendo estes atribuídos aos protões da cadeia polimetínica CH=C, corroborando a hipótese da existência das duas conformações possíveis da molécula, o que não se verificou nos compostos **19-21** onde apenas surgem dois singuletos de um protão cada.

No sentido de verificar a temperatura à qual as duas conformações se convertiam apenas numa, fizeram-se vários espectros a várias temperaturas no intervalo 25-90ºC. Na Figura 2.4 apresenta-se uma zona do espectro deste composto traçado a 25ºC em DMSO (Figura 2.4 A) onde severificam os quatro singuletos dos protões CH=C da cadeia polimetínica, referidos anteriormente e os quais colapsam a dois singuletos quando o composto dissolvido em DMSO é aquecido a 60ºC (Figura 2.4 B). Também se verificou que após o arrefecimento da amostra, o espectro apresentava novamente os quatro singuletos referentes aos protões CH=C da cadeia polimetínica, concluindo-se então, que à temperatura ambiente existe impedimento da rotação em torno da ligação N-C e que à temperatura de 60ºC esse impedimento deixa de existir.

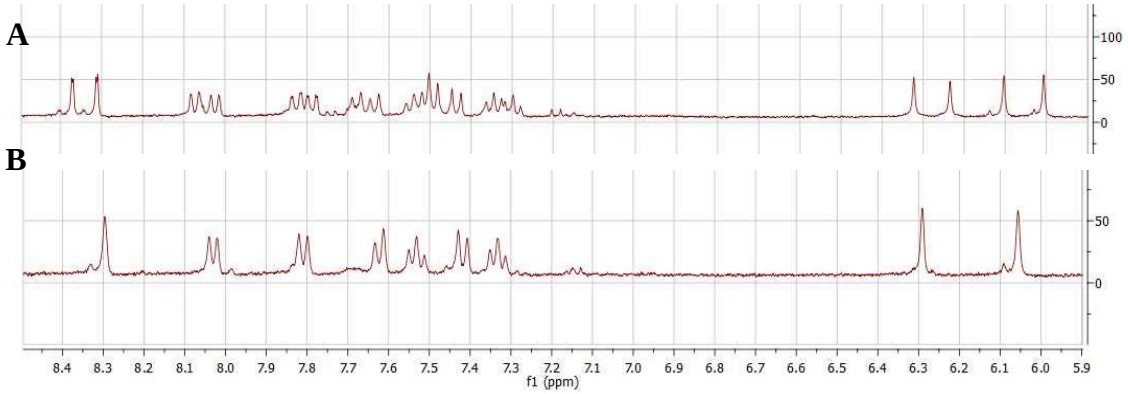



**Figura 2.4** Espectro parcial de $^1$H-RMN do composto **22** em DMSO: **a)** T = 25ºC, **b)** T= 60ºC

Na zona aromática do espectro entre os desvios químicos 7,80 e 6,88 ppm surgem os sinais correspondentes aos catorze protões (setes protões de cada conformação adquirida pela molécula), sob a forma de quatro dupletos de um protão a 7,65; 7,59; 6,97 e 6,88 e ppm, um

tripleto largo de três protões a 7,16 ppm, três singuletos largos de um protão e um de dois protões a 7,45; 7,38 e 7,29 ppm respectivamente e dois singuletos de um protão aos desvios químicos de 7,80 e 7,49 ppm. Como se pode verificar na Figura 2.4 a zona aromática do espectro A é muito diferente da do espectro B. Destacam-se ainda os sinais do protão do grupo $N\underline{H}CH_3$ que surgem a 8,65 e 8,59 ppm sob a forma de dois singuletos largos de um protão cada correspondentes às duas conformações da molécula, que trocam com $D_2O$.

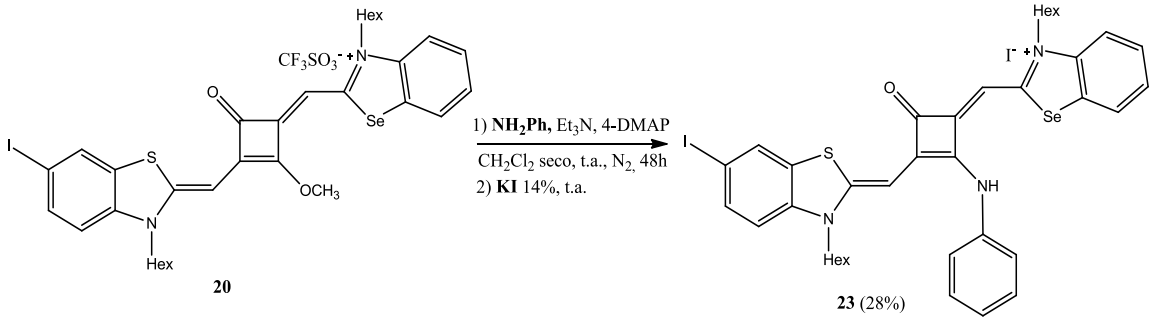
Relativamente ao espectro de $^{13}$C-RMN deste composto, **22**, observam-se os sinais dos grupos $\underline{C}H_3$ das cadeias alquílicas que surgem aos desvios 14,10 e 13,98 ppm. Entre 48,20 e 22,45 ppm surgem dezasseis sinais correspondentes a dezasseis carbonos dos grupos $\underline{C}H_2$ das cadeias alquílicas das duas conformações da molécula e quatro sinais dos grupos $NCH_2$ das mesmas cadeias a 48,20 -46,57ppm. Os sinais correspondentes aos carbonos dos grupos $NH\underline{C}H_3$ surgem aos desvios químicos de 30,77 e 30,71 ppm e aos desvios químicos de 94,03; 90,53; 89,36 e 86,33 ppm os sinais correspondentes aos carbonos da cadeia polimetínica CH=C. O aparecimento destes sinais em duplicado corrobora mais uma vez a hipótese da existência de duas conformações da molécula. Na zona aromática do espectro, podem-se identificar catorze sinais correspondentes a catorze carbonos C-H aromáticos entre os desvios químicos 136,67 e 112,91 ppm. Os restantes sinais correspondentes aos carbonos quaternários encontram-se na parte experimental, no ponto3.3.2.2.

A massa exacta encontrada para este composto está dentro dos limites aceitáveis sendo: m/z = 732,10185 $[M- I^-]^+$, ($C_{33}H_{39}IN_3OSSe^+$; calc. 732,10197).

### 2.4.2.3 Síntese do iodeto de 2-[2-fenilamino-3-(3-hexil-6-iodo-3H-benzotiazol-2-ilidenometil)-4-oxo-ciclobut-2-enilidenometil]-3-hexilbenzoselenazol-3-io (23)

O corante cianínico aminoesquarílico **23** foi sintetizado fazendo reagir o corante cianínico esquarílico *O*-metilado (**20**) com anilina, trietilamina e 4-(*N*,*N*-dimetilamino)piridina, segundo o método descrito na literatura (Reis *et al*., 2009) para corantes aminoesquarílicos simétricos. Tal como os análogos **21** e **22** aminoesquarílicos o produto bruto obtido dissolvido em metanol foi colocado a reagir com uma solução aquosa de KI (14%) a fim de trocar o contra-ião $CF_3SO_3^-$ por $I^-$, melhorando assim as capacidades de produção de oxigénio singuleto da molécula (Esquema 2.16). O composto **23** foi então obtido após recristalização com éter dietílico e $CH_2Cl_2$, com um rendimento relativamente baixo (28

%), cromatograficamente puro, sob a forma de cristais azuis esverdeados, apresentando um intervalo de ponto de fusão de 266-268 $^{o}$C.




**Esquema 2.16** Síntese do corante aminoesquarílico **23**

Os dados físicos e espectroscópicos do corante cianínico aminoesquarílico **23** encontram-se descritos na Tabela 2.9.

No espectro no IV salientam-se a banda característica da vibração da ligação N-H do grupo amino (N-H), fraca a 3483 $cm^{-1}$, a banda característica das vibrações das ligações C-H alifáticas a 2926 $cm^{-1}$ e ainda a banda fraca, da vibração do grupo C=O a 1654 $cm^{-1}$.

À semelhança do composto **22**, o corante **23** também apresenta uma ligação C-N com carácter de ligação dupla, o que impede a livre rotação desta ligação, fazendo com que se observem sinais correspondentes a duas conformações diferentes e como consequência o aumento de sinais nos espectros de RMN.

No espectro de $^{1}$H-RMN observam-se os sinais correspondentes aos 41 protões existentes na molécula do composto **23**, mas em duplicado devido há existência das duas conformações em simultâneo da molécula. Tal como no espectro do composto **22**, o sinal correspondente aos dois grupos metilo terminais da cadeia alquílica surge sob a forma de um singuleto largo de doze protões, ao desvio químico1,00-0,81 ppm. Os sinais dos grupos $CH_2$da cadeia alquílica surgem sob a forma de um multipleto de vinte e quatro protões, ao desvio químico 1,24-1,01 ppm, aos desvios químicos 1,55-1,24 ppm sob a forma de um multipleto de quatro protões e ao desvio químico 1,80 ppm um singuleto largo de quatro protões. Os sinais dos grupos $NCH_2$ da cadeia alquílica surgem ao desvio químico 4,50-3,66 ppm sob a forma de dois singuletos largos de quatro protões cada, tal como se verifica no espectro do análogo **22**.

Também o espectro deste composto apresenta quatro singuletos largos de um protão cada, referentes aos protões do grupo CH=C aos desvios químicos entre 4,91 e 7,01 ppm que sugere a introdução de mais assimetria na molécula. Os doze protões ligados aos anéis

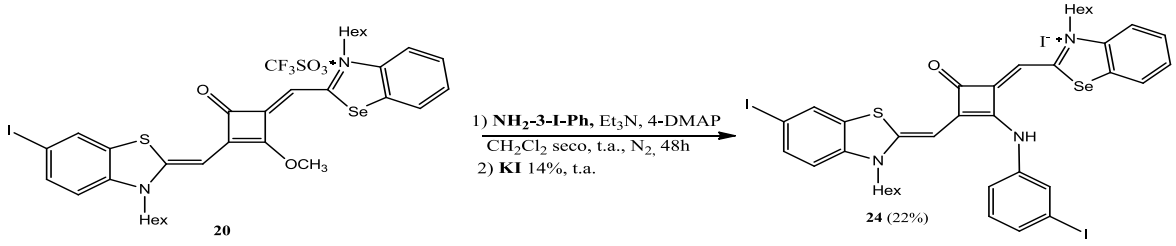
aromáticos surgem em duplicado, sob a forma de um multipleto de vinte e dois protões ao desvio químico 7,74-7,03 ppm e sob a forma de um singuleto largo de dois protões ao desvio químico 7,81 ppm. O protão do grupo N-H, surge sob a forma de um singuleto largo de dois protões ao desvio químico 10,98 ppm e troca com $D_2O$.

No espectro de $^{13}$C-RMN, observam-se os sinais referentes a quatro carbonos metílicos da cadeia alquílica, aos desvios químicos entre 15,35 e 14,06 ppm, o que corrobora a presença de duas conformações da molécula, observam-se onze sinais dos doze grupos $CH_2$ das cadeias alquílicas sendo quatro correspondentes aos grupos $NCH_2$ que surgem aos desvios químicos 47,92-46,89 ppm. De salientar mais uma vez a presença de quatro sinais aos desvios químicos 96,30-87,67 que foram atríbuidos aos carbonos CH=C da cadeia polimetínica. Na zona aromática do espectro, apenas se observam dezasseis sinais de carbonos ArC-H aos desvios químicos 136,81-113,45 ppm.

A massa exacta encontrada para este composto está dentro dos limites aceitáveis sendo m/z = 794,11760 $[M- I^-]^+$ ; ($C_{38}H_{41}IN_3OSSe^+$; calc. 794,11768).

### 2.4.2.4. Síntese do iodeto de 2-[2-(3-iodofenilamino)-3-(3-hexil-6-iodo-3H-benzotiazol-2-ilidenometil)-4-oxociclobut-2-enilidenometil]-3-hexilbenzoselenazol-3-io (24)

O iodeto de 2-[2-(3-iodofenilamino)-3-(3-hexil-6-iodo-3H-benzotiazol-2-ilidenometil)-4-oxociclobut-2-enilidenometil]-3-hexilbenzoselenazol-3-io(**24**), foi obtido fazendo reagir o corante cianínico esquarílico *O*-metilado (**20**) com 3-iodoanilina, trietilamina e 4-(*N*,*N*-dimetilamino)piridina, segundo o método descrito na literatura (Reis *et al*., 2009) para corantes aminoesquarílicos simétricos. O produto bruto obtido foi dissolvido com metanol e colocado a reagir com uma solução aquosa de KI (14%) (Esquema 2.17) a fim de trocar o contra-ião $CF_3SO_3^-$ por $I^-$. O composto **24** foi então obtido, após recristalização com éter dietílico e $CH_2Cl_2$, com um rendimento de apenas 22 %, cromatograficamente puro, sob a forma de cristais azuis esverdeados, apresentando um intervalo de fusão de 165-167 $^oC$.




**Esquema 2.17** Síntese do corante aminoesquarílico **24**

Os dados físicos e espectroscópicos do corante cianínico aminoesquarílicos **24** encontram-se descritos na Tabela 2.9.

No espectro no IV salientam-se a banda característica da vibração da ligação N-H do grupo amino (N-H), fraca a 3447 $cm^{-1}$, a banda característica das vibrações das ligações C-H alifáticas a 2925 $cm^{-1}$ e ainda a banda das vibrações do grupo C=O a 1718 $cm^{-1}$.

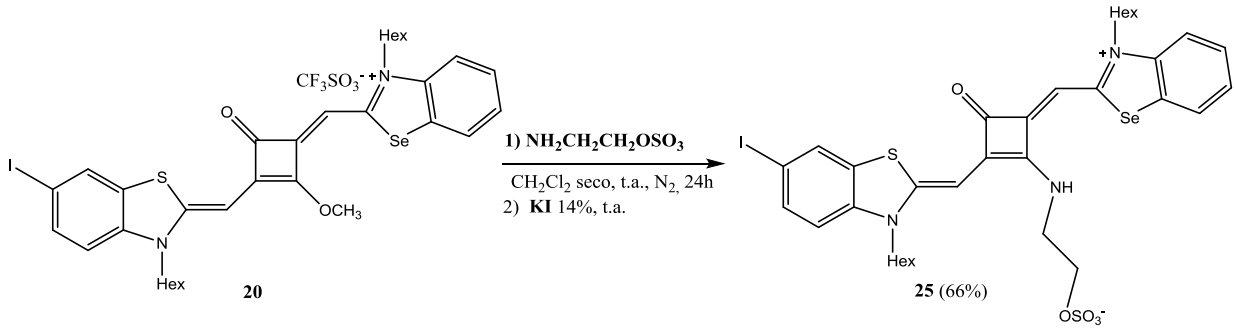
No que diz respeito ao espectro de $^{1}$H-RMN, observam-se todos os sinais dos 40 protões correspondentes ao composto **24**, mas em duplicado devido há existência das duas conformações da molécula, tal como referido nos seus análogos **21**-**23**. Os sinais dos protões da cadeia alquílica correspondente aos dois grupos metilo surgem sob a forma de um singuleto largo de doze protões ao desvio químico 0,88 ppm. Dos sinais dos grupos $CH_2$ da cadeia alifática destacam-se dois sinais de quatro protões cada, sob a forma de multipletos, ao desvio químico 3,54-3,40 e 4,55-4,45 ppm que foram atribuídos aos grupos $NCH_2$. Também neste espectro a assimetria provocada pelo impedimento à livre rotação da ligação N-C do anel de quatro membros é confirmada pela presença de três singuletos de um protão cada, ao desvio químico 4,99-6,91 atríbuidos aos protões da cadeia polimetínica CH=C. O quarto sinal destes protões CH=C, surge sobreposto com os sinais dos protões aromáticos. Na zona aromática surgem sinais correspondentes aos 22 protões aromáticos do composto nas duas conformações. Por último, ao desvio químico 11,01 ppm surge um sinal sob a forma de um singuleto de dois protões, que troca com $D_2O$, o qual é referente ao protão do grupo N-H de ambas as conformações.

Relativamente ao espectro de carbono $^{13}$C-RMN apenas alguns sinais característicos de algumas ligações foram identificados, uma vez que o composto se apresentava muito insolúvel nos solventes utilizados para leitura, diminuindo bastante a qualidade dos picos no espectro. Apenas foram identificados os seguintes sinais: ao desvio químico 14,07 ppm, correspondente ao carbono de um dos grupos metilo da cadeia *N*-alquílica, aos desvios químicos entre 49,02 e 43,12 ppm os quatro carbonos das ligações $NCH_2$ das cadeias alquílicas (dois de cada conformação) e por último aos desvios químicos 92,03 e 91,45 ppm dois sinais correspondentes a dois carbonos CH=C da cadeia polimetínica. Como foi referido anteriormente este composto é bastante insolúvel pelo que a qualidade deste espectro foi por isso afetada, não se observando todos os sinais esperados

A massa exacta encontrada para este composto está dentro dos limites aceitáveis sendo m/z = 920,01413 $[M- I]^+$ ; ($C_{38}H_{40}I_2N_3OSSe^+$; calc. 920,0143

### 2.4.2.5. Síntese do sal interno de 3-hexil-2-[3-(3-hexil-6-iodo-3H-benzotiazol-2-ilidenometil)-4-oxo-2-(2-sulfato-etilamino)ciclobut-2-enilidenometil]-3-benzoselenazol-3-io (25)

O corante cianínico aminoesquarílico (**25**) foi sintetizado fazendo reagir o corante cianínico esquarílico *O*-metilado (**20**) com $NH_2C_2H_4SO_4$ (sulfato de 2-aminoetilo) e trietilamina. O produto bruto obtido foi dissolvido em metanol e colocado a reagir com uma solução aquosa de KI (14%) (Esquema 2.18). Obteve-se então o corante **25**, sob a forma de cristais azuis-escuros, cromatograficamente puros, com rendimento de 66 % e com um ponto de fusão > 300ºC.




**Esquema 2.18** Síntese do corante aminoesquarílico **25**

Os dados físicos e espectroscópicos do corante cianínico aminoesquarílico **25** encontram-se descritos na Tabela 2.9.

No espectro no IV salienta-se as bandas características da vibração da ligação N-H fraca a 3462 $cm^{-1}$, as vibrações características das ligações aromáticas C-H (fraca) a 3062 $cm^{-1}$, as bandas características das vibrações das ligações C-H alifáticas, também estas fracas, a 2924 $cm^{-1}$ e ainda a banda fraca da vibração do grupo C=O a 1625 $cm^{-1}$.

No espectro de $^1$H-RMN, não foi possível a distinção dos quarenta protões correspondentes ao composto **25**, no entanto à semelhança dos restantes corantes cianínicos aminoesquarílicos os sinais surgem em duplicado devidos há existência de duas conformações da molécula, pela razão já referida anteriormente. Sendo assim os sinais dos protões da cadeia alquílica correspondente aos dois grupos metilo terminais surgem ao desvio químico 0,85 ppm. Ao desvio químico1,40-1,28 ppm surge um multipleto de 24 protões que foi atribuído aos grupos $CH_2$ da cadeia *N*-alquílica bem como o sinal que surge a desvio químico 1,69 ppm. Os sinais dos grupos $CH_2$ ligados diretamente ao átomo de azoto e de oxigénio surgem a

campo mais baixo, tal como observado para os outros corantes aminoesquarílicos, entre 4,40 e 3,83 ppm. Tal como nos espectros dos corantes esquarílicos já discutidos, também neste espectro se observam quatro singuletos de um protão cada, correspondentes aos dois protões da cadeia polimetínica CH=C das duas conformações, que surgem aos desvios químicos entre 6,37-6,03 ppm, o que corrobora mais uma vez a existência de duas conformações.

Na zona aromática do espectro, os catorze protões aromáticos existentes nas duas conformações da molécula surgem aos desvios químicos 8,34-7,33 ppm e por último ao desvio químico 9,02 ppm surge um sinal de dois protões na forma de um singuleto largo que corresponde aos protões do grupo N-H e que trocam com $D_2O$.

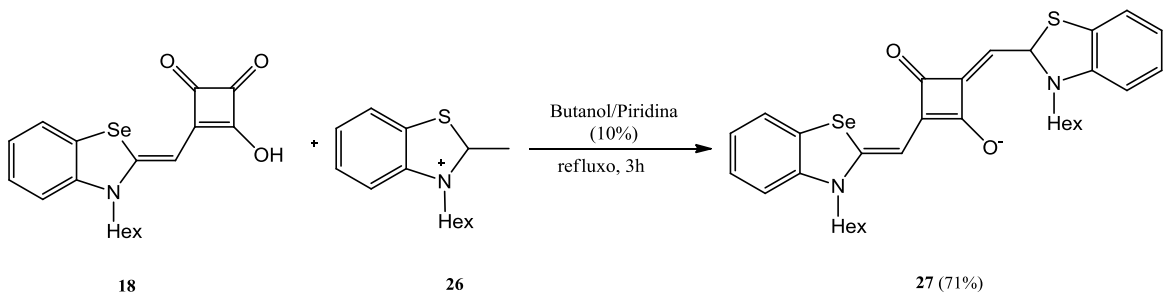
Relativamente ao espectro de carbono $^{13}$C-RMN, à semelhança do que ocorreu no espectro de $^{1}$H-RMN, não foi possível a identificação de todos os sinais referentes aos trinta e quatro carbonos da molécula (66, devido à existência de duas conformação da molécula). São de salientar os sinais dos carbonos da cadeia alquílica correspondentes aos dois grupos metilo terminais que surgem aos desvios químicos 14,12, 14,09, 14,05 e 14,04 ppm. Dos vinte e quatro sinais que deveriam ser identificados para os carbonos dos grupos $CH_2$ das cadeias alquílicas de seis e quatro carbonos, apenas se observamvinte entre os desvios químicos 66,02 e 22,44 ppm. Também neste espectro se observam os quatro sinais dos quatro carbonos das cadeias polimetínicas CH=C das duas conformações que surgem entre os desvios químicos 93,20-83,34 ppm. Na zona aromática, é possível identificar catorze sinais correspondentes aos catorze carbonos aromáticos, Ar-CH das duas conformações aos desvios químicos 135,93-112,52 ppm.

A massa exacta encontrada para este composto está dentro dos limites aceitáveis sendo, m/z = 796,61839 $[M- H^+]^+$ ; ($C_{33}H_{40}IN_3O_5S_2Se^+$; calc. 796,61905).

### 2.4.2.6. Síntese do 4-[(3-hexilbenzoselenazol-3-io-2-il)metililideno]-2-[(3-hexil-3H-benzotiazol-2-ilidenometil]-3-oxociclobut-1-en-1-olato (27)

O 4-[(3-hexilbenzoselenazol-3-io-2-il)metililideno]-2-[(3-hexil-3H-benzotiazol-2-ilidenometil]-3-oxociclobut-1-en-1-olato **(27)**, foi sintetizado fazendo reagir o 3-[(3-hexilbenzoselenazol-2(3H)-ilideno)metil]-4-hidroxi-3-ciclobuten-1,2-diona] (**18**) e iodeto de 3-hexil-6-iodo-2-metilbenzotiazol-3-io (**26**) numa solução de BuOH/Piridina a refluxo durante 3 horas (Esquema 2.19). O composto **27**, foi obtido, após recristalização com etanol,

sob a forma de cristais azuis esverdeados, cromatograficamente puros, com um rendimento de 71%, possuindo um intervalo de fusão 275-276 ºC.




**18** **26** **27** (71%)

**Esquema 2.19** Síntese do corante esquarílico **27**

Os dados físicos e espectroscópicos do corante cianínico aminoesquarílicos **27** encontram-se descritos na Tabela 2.9.

No espectro no IV salienta-se a banda de absorção (fraca) das ligações C-H alifáticas a 2925 $cm^{-1}$ e C-H aromáticas entre 1577 e 1443 $cm^{-1}$ forte e média respectivamente.

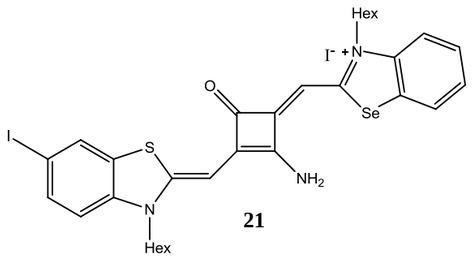
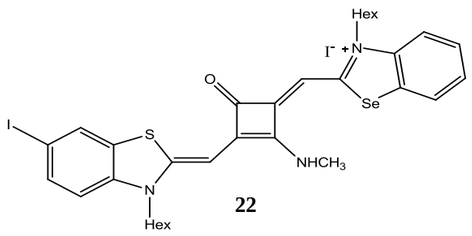
O espectro de $^{1}$H-RMN do composto **27** apresenta todos os sinais esperados para a totalidade dos protões presentes na molécula. Os protões dos dois grupos metilo terminais da cadeia alquílica, surgem ao desvio químico entre 0,86-0,82 ppm, sob a forma de um multipleto de seis protões. Os sinais dos quatro grupos $CH_2$da cadeia $NCH_2(C\underline{H}_2)_4CH_3$) surgem ao desvio químico 1,73-1,20 ppm, sob a forma de vários multipletos. Pode-se verificar ainda a presença de um sinal de quatro protões na forma de multipleto, que surge ao desvio químico entre 4,01-3,96 ppm, atribuído aos quatro protões dos grupos $CH_2$ (dois de cada cadeia alquílica) ligados directamente ao átomo de azoto. Os sinais correspondentes aos dois protões CH=C da cadeia polimetínica, surgem aos desvios químicos 6,00 e 5,84 ppm sob a forma de singuletos de um protão. Na zona aromática os sinais dos oito protões aromáticos da molécula surgem ao desvio químico a 7,48, 7,26, 7,28 e 7,14 ppm sob a forma de três tripletos de um protão e um tripleto de dois protões, respectivamente, a 7,02 ppm sob a forma de um tripleto de dois protões e a 7,01 ppm sob a forma de um dupleto de um protão.

No que diz respeito ao espectro de carbono $^{13}$C-RMN, os sinais correspondente aos dois carbonos dos grupos metilo, surgem aos mesmos desvios químicos de 13,99 ppm, já os sinais dos oito carbonos dos grupos $\underline{C}H_2$da cadeia $NCH_2(CH_2)_4CH_3$ surgem aos desvios químicos entre 31,47 e 22,45 ppm. Verifica-se também a presença dos dois sinais correspondentes aos dos carbonos das ligações $NCH_2$ da cadeia alquílica aos desvios químicos 47,09 e 46,44 ppm

e dos dois sinais dos dois carbonos CH=C da cadeia polimetínica, aos desvios químicos 89,66 e 85,72 ppm. Na zona aromática, os sinais dos oito carbonos C-H aromáticos, surgem na forma de oito sinais entre os desvios químicos 127,18 e 111,61 ppm.

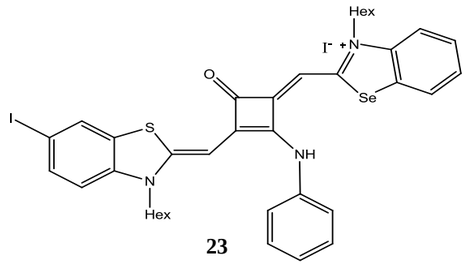
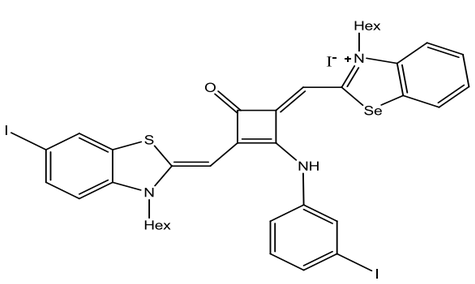
A massa exacta encontrada para este composto está dentro dos limites aceitáveis sendo m/z = 592.16519 $[M- I^-]^+$; ($C_{34}H_{41}IN_3O_5S_2Se^+$; calc. 592.16585).

**Tabela 2.9** Dados físicos e espectroscópicos dos compostos **21-27.**

| **Composto** | **p.f.** ($^{o}$C) | **IV υmáx** (pastilha em KBr, $cm^{-1}$) | **$^{1}$H-RMN** **δ** (ppm, *J* em Hz)[a)] | **$^{13}$C-RMN** **δ** ($CDCl_3$, ppm, *J* em Hz) | **EMAR-ESI-TOF** Determinado (calculado) |
|---|---|---|---|---|---|
|  **21** | 297-> 300 | 3448 (fr, N-H), 3097 (fr, ArC-H), 2925 (fr, C-H*alif.*), 1631 (fr, C=O) | 0,86 (6H, sl, $N(CH_2)_5C\underline{H}_3$), 1,29 (8H, sl, $N(CH_2)_3(C\underline{H}_2)_2CH_3$), 1,40 (4H, sl, $N(CH_2)_2C\underline{H}_2(CH_2)_2CH_3$), 1,70 (4H, sl, $NCH_2C\underline{H}_2(CH_2)_3CH_3$); 4,18 (2H, sl, $NC\underline{H}_2(CH_2)_4CH_3$), 4,25 (2H, sl, $NC\underline{H}_2(CH_2)_4CH_3$), 6,10 (1H, *s*, CH=C), 6,32 (1H, *s*, CH=C), 7,32 (1H, *t*; *J*=7,8; 7,4, Ar-H), 7,46 (1H, *d*, *J*=8,8, Ar-H), 7,52 (1H, *t*, *J*=7,0; 7,7, Ar-H), 7,64 (1H, *d*, *J*=8,5, Ar-H), 7,81 (1H, *d*, *J*=7,6, Ar-H), 8,04 (1H, *d*, *J*=7,6, Ar-H), 8,34 (1H, *s*, Ar-H), 8,69 (2H, *s*, N-$H_2$ troca com $D_2O$) | 13,94 ($CH_3$), 22,30 ($CH_2$), 22,67 ($CH_2$), 26,11 ($CH_2$), 26,16 ($CH_2$), 27,34 ($CH_2$), 27,23 ($CH_2$), 31,25 ($CH_2$), 46,50 ($N\underline{C}H_2$), 47,40 ($N\underline{C}H_2$), 86,86 (CH=C), 91,40 (CH=C), 113,97 (ArC-H), 114,29 (ArC-H), 124,86 (ArC-H), 125,70 (ArC-H), 127,50 (ArC-H), 130,40 (ArC-H), 136,17 (ArC-H) | 718,08626 [M-$I^-$ ]$^+$($C_{32}H_{37}IN_3OSSe^+$, calc.718,08630). |
|  **22** | 246-248 | 3448 (fr, N-H), 2927 (fr, C-H*alif.*), 1625 (fr, C=O) | 0,91-0,80 (12H, *m*, $N(CH_2)_5C\underline{H}_3$), 1,32-1,27 (16H, *m*, $N(CH_2)_3(C\underline{H}_2)_2CH_3$), 1,45 (8H, *s*l, $N(CH_2)_2C\underline{H}_2(CH_2)_2CH_3$), 1,76 (8H, sl, $NCH_2C\underline{H}_2(CH_2)_3CH_3$), 3,33(3H, *s*, $NHC\underline{H}_3$), 3,36 (3H, *s*, $NHC\underline{H}_3$), 4,15 (4H, *s*l, $NC\underline{H}_2(CH_2)_4CH_3$), 4,25 (4H, *s*l, $NC\underline{H}_2(CH_2)_4CH_3$), 5,83 (1H, *s*, CH=C), 6,05 (1H, *s*, CH=C), 6,56 (1H, *s*, CH=C), 6,73 (1H, *s*, CH=C), 6,88 (1H, *d*, *J*=8, Ar-H),6,97 (1H, *d*, *J*=6, Ar-H), 7,16 (3H, *t*l, Ar-H), 7,29 (1H, *s*l, Ar-H), 7,38 (1H, *s*l, Ar-H), 7,45 (2H, *s*l, ArH-), 7,49 (1H, *s*, Ar-H), 7,59 (1H, *d*, *J*=6, Ar-H), 7,65 (1H, *d*, *J*=6, Ar-H), 7,70 (1H, *s*l, Ar-H), 7,80 (1H, *s*, ArH), 8,56 (1H, *s*l, N-H troca com $D_2O$), 8,59 (1H, *s*l, N-H troca com $D_2O$) | 13,98 ($CH_3$), 14,10 ($CH_3$), 22,45 ($CH_2$), 22,47 ($CH_2$), 22,52 ($CH_2$), 26,22 ($CH_2$), 26,54 ($CH_2$), 26,62 ($CH_2$), 27,19 ($CH_2$), 27,29 ($CH_2$), 27,91 ($CH_2$), 27,97 ($CH_2$), 30,71 ($NCH_3$), 30,77 ($NCH_3$), 31,45 ($CH_2$), 31,48 ($CH_2$), 31,59 ($CH_2$), 31,62 ($CH_2$), 46,57 ($N\underline{C}H_2$), 47,34 ($N\underline{C}H_2$), 47,44 ($N\underline{C}H_2$), 48,20 ($N\underline{C}H_2$), 86,33 (CH=C), 89,36 (CH=C), 90,53 (CH=C), 94,03 (CH=C), 112,91 (ArC-H), 113,48 (ArC-H), 114,35 (ArC-H), 114,82 (ArC-H), 124,46 (ArC-H), 125,06 (ArC-H), 125,32 (ArC-H), 125,40 (ArC-H), 127,46 (ArC-H), 127,82 (ArC-H), 130,03 (ArC-H), 130,43 (ArC-H), 136,07 (ArC-H), 136,67 (ArC-H) | 732,10185 [M-$I^-$ ]$^+$($C_{33}H_{39}IN_3OSSe^+$, calc.732,10197) |

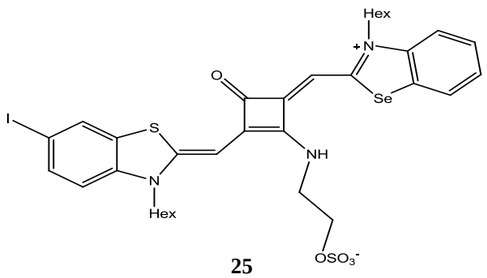
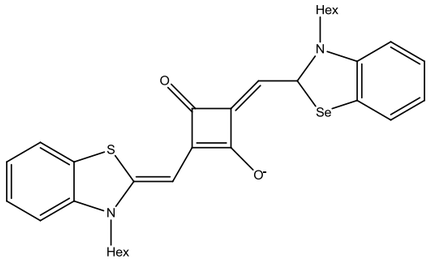
[a)]Espectro de $^{1}$H-RMN: **21**: em DMSO+$CDCl_3$; **22**:em $CDCl_3$

**Tabela 2.9** Dados físicos e espectroscópicos dos compostos **21-27** (Cont.)

| **Composto** | **p.f.** ($^{o}$C) | **IV υmáx** (pastilha em KBr, $cm^{-1}$) | **$^{1}$H-RMN** **δ** ($CDCl_3$, ppm, *J* em Hz)[a)] | **$^{13}$C-RMN** **δ** ($CDCl_3$, ppm, *J* em Hz)[a)] | **EMAR-ESI-TOF** Determinado (calculado) |
|---|---|---|---|---|---|
|  **23** | 266-268 | 3483 (fr, N-H),<br>2926 (fr, C-H*alif.*),<br>1654 (fr, C=O), | 1,00-0,81 (12H, *s*l, C<u>H</u>$_3$),<br>1,24-1,01 (24H, *m*, NCH$_2$CH$_2$(C<u>H</u>$_2$)$_3$CH$_3$),<br>1,55-1,24 (4H, *m*, NCH$_2$C<u>H</u>$_2$(CH$_2$)$_3$CH$_3$),<br>1,80 (4H, *s*l, NCH$_2$C<u>H</u>$_2$(CH$_2$)$_3$CH$_3$),<br>3,66 (4H, *s*l, NC<u>H</u>$_2$(CH$_2$)$_4$CH$_3$),<br>4,50 (4H, *s*l, NC<u>H</u>$_2$(CH$_2$)$_4$CH$_3$),<br>4,91 (1H, *s*l, CH=C),<br>5,19 (1H, *s*l, CH=C),<br>6,82 (1H, *s*l, CH=C),<br>7,01 (1H, *s*l, CH=C),<br>7,74-7,03 (22H, *m*, Ar-H),<br>7,81 (2H, *s*l, Ar-H),<br>10,98 (2H, *s*l, N-H, troca com $D_2O$). | 14,06 ($CH_3$), 14,13 ($CH_3$), 14,17 ($CH_3$),<br>15,35 ($CH_3$),<br>22,57 ($CH_2$), 23,05 ($CH_2$), 23,79 ($CH_2$),<br>26,43 ($CH_2$), 26,45 ($CH_2$), 31,42 ($CH_2$),<br>31,67 ($CH_2$),<br>46,89 ($NCH_2$), 47,77 ($NCH_2$),<br>47,92 ($NCH_2$), 47,97 ($NCH_2$),<br>87,67 (CH=C), 91,74 (CH=C),<br>92,39 (CH=C), 96,30 (CH=C);<br>113,45 (ArC-H); 113,74 (ArC-H);<br>114,56 (ArC-H); 115,21 (ArC-H);<br>124,59 (ArC-H); 125,21 (ArC-H), 125,46<br>(ArC-H), 125,69 (ArC-H), 126,38 (ArC-H),<br>127,55 (ArC-H), 128,90 (ArC-H),<br>130,18 (ArC-H), 130,57 (ArC-H),<br>130,97 (ArC-H), 136,23 (ArC-H),<br>136,81 (ArC-H) | 794,11760[M-$I^-$]$^+$<br>( $C_{38}H_{41}IN_3OSSe^+$,<br>calc.794,11768) |
|  **24** | 165-167 | 3447 (fr, N-H),<br>2925 (fr, C-H*alif.*),<br>1718 (m, C=O) | 0,88 (12H, *s*, $CH_3$),<br>1,45-1,03 (16H, *m*, N($CH_2$)$_3$(C<u>H</u>$_2$)$_2$$CH_3$),<br>1,77-1,46 (12H, *m*, $CH_2$),<br>1,87 (4H, *s*l, $CH_2$),<br>3,54-3,40 (4H, *m*, NC<u>H</u>$_2$($CH_2$)$_4$$CH_3$),<br>4,55-4,45 (4H, *m*, NC<u>H</u>$_2$($CH_2$)$_4$$CH_3$),<br>4,99 (1H, *s*l, CH=C),<br>5,26 (1H, *s*l, CH=C),<br>6,91 (1H, *s*l, CH=C),<br>7,86-7,01 (21H, *m*, Ar-H+CH=C),<br>7,85 (2H, *s*l, Ar-H),<br>11,01 (2H, *s*, N-H troca com $D_2O$) | 14,07 ($CH_3$)<br>22,49 ($CH_2$), 22,52 ($CH_2$), 22,99 ($CH_2$),<br>23,77 ($CH_2$), 26,44 ($CH_2$), 27,06 ($CH_2$),<br>28,15 ($CH_2$), 28,91 ($CH_2$), 30,34($CH_2$),<br>31,16 ($CH_2$), 31,59 ($CH_2$),<br>43,12 ($NCH_2$), 46,93 ($NCH_2$),<br>47,94 ($NCH_2$), 49,02 ($NCH_2$),<br>91,45 (CH=C), 92,03 (CH=C)<br>113,17 (ArC-H), 113,56 (ArC-H),<br>114,43 (ArC-H), 115,13, (ArC-H),<br>123,73 (ArC-H), 124,83 (ArC-H),<br>125,30 (ArC-H), 127,60 (ArC-H),<br>127,95 (ArC-H), 128,78 (ArC-H),<br>130,25 (ArC-H), 130,56 (ArC-H),<br>130,90 (ArC-H), 132,53 (ArC-H),<br>153,02 (ArC-H), 136,37 (ArC-H),<br>136,80 (ArC-H) | 920,01413[M-$I^-$<br>]$^+$($C_{38}H_{40}I_2N_3OSSe^+$,<br>calc.920,01433). |

[a)] **23**: espectro em 400 MHz; O espectro de $^{13}$C-RMN do composto **24** tem uma resolução muito baixa e por isso não são visíveisalgunssinais

**Tabela 2.9** Dados físicos e espectroscópicos dos compostos **21-27** (Cont.)

| **Composto** | **p.f.** ($^{o}$C) | **IV υmáx** (pastilha em KBr, $cm^{-1}$) | **$^{1}$H-RMN** **δ (**DMSO, ppm, *J* em Hz)[a)] | **$^{13}$C-RMN** **δ** ($CDCl_3$, ppm, *J* em Hz)[b)] | **EMAR-ESI-TOF** Determinado (calculado) |
|---|---|---|---|---|---|
|  **25** | > 300 | 3462 (fr, N-H), 3062 (fr, ArC-H), 2924 (fr, C-H*alif.*), 1625 (f, C=O), | 0,85 (12H, *sl*,$CH_3$), 1,40-1,28 (24H, *m*, $NCH_2CH_2(C\underline{H}_2)_3CH_3$), 1,69 (8H, *s*l, $NCH_2C\underline{H}_2(CH_2)_2CH_3$), 3,83 (4H, *s*l, $NC\underline{H}_2CH_2OSO_3^-$), 3,99 (4H, *s*l, $NCH_2C\underline{H}_2OSO_3^-$), 4,19 (2H, *t*l, $NC\underline{H}_2(CH_2)_4CH_3$), 4,23 (2H, *t*l, $NC\underline{H}_2(CH_2)_4CH_3$), 4,35 (2H, *t*l, $NC\underline{H}_2(CH_2)_4CH_3$), 4,40 (2H, *t*l, $NC\underline{H}_2(CH_2)_4CH_3$), 6,03 (1H, *s*, CH=C), 6,16 (1H, *s*, CH=C), 6,23 (1H, *s*, CH=C), 6,37 (1H, *s*, CH=C), 7,33-7,26 (2H, *m*, Ar-H), 7,41-7,53 (4H, *m*, Ar-H), 7,63 (2H, *t*, *J*=7,0,Ar-H), 7,78 (2H, *t*, *J*=7,0, Ar-H), 8,06-8,01 (2H, *m*, Ar-H), 8,29 (1H, *s*, Ar-H), 8,34 (1H, *s*, Ar-H), 9,02 (2H, *s*l, N-H troca com $D_2O$) | 14,04 ($CH_3$), 14,05 ($CH_3$), 14,09 ($CH_3$),14,12 ($CH_3$),22,27 ($CH_2$) 22,44 ($CH_2$), 22,49 ($CH_2$), 22,57 ($CH_2$), 26,08 ($CH_2$), 26,11 ($CH_2$), 26,46 ($CH_2$), 27,32 ($CH_2$),27,45 ($CH_2$), 27,80 ($CH_2$), 27,86 ($CH_2$), 31,55 ($CH_2$), 31,57 ($CH_2$), 31,59 ($CH_2$), 31,63 ($CH_2$), 44,85 ($CH_2$), 46,04 ($CH_2$),46,54 ($CH_2$),47,02 ($CH_2$), 47,49 ($CH_2$), 66,02 ($CH_2$), 83,34 (CH=C), 88,51 (CH=C), 92,89 (CH=C), 93,20 (CH=C), 112,52 (ArC-H), 112,93 (ArC-H), 113,16 (ArC-H), 113,64 (ArC-H), 124,13 (ArC-H), 124,58 (ArC-H), 125,09 (ArC-H); 125,10 (ArC-H), 127,30 (ArC-H), 127,40 (ArC-H), 129,90 (ArC-H), 130,39 (ArC-H), 135,88 (ArC-H) 135,93 (ArC-H) | 796,61839 [M-$H^+$]$^+$($C_{33}H_{40}IN_3O_5SSe^+$, calc.796,61905). |
|  **27** | 275- 276 | 2925 (fr, C-H*alif.*) | 0,86-0,82 (6H, *m*, $N(CH_2)_5C\underline{H}_3$), 1,30-1,20 (8H, *m*, $N(CH_2)_2CH_2(C\underline{H}_2)_2CH_3$), 1,45-1,32 (4H, *m*, $N(CH_2)_2C\underline{H}_2(CH_2)_2CH_3$), 1,73-1,69 (4H, *m*, $NCH_2C\underline{H}_2(CH_2)_3CH_3$), 4,01-3,96 (4H, *m*, $NC\underline{H}_2(CH_2)_4CH_3$), 5,84 (1H, *s*, CH=C), 6,00 (1H, *s*, CH=C), 7,01 (1H, *d*, *J*=8, Ar-H), 7,07 (2H, *t*; *J*=8, Ar-H), 7,14 (1H, *t*, *J*=8, Ar-H), 7,28 (1H, *t*, *J*=8, Ar-H), 7,26 (1H, *t*, *J*=8; Ar-H), 7,48 (2H, t, *J*=8, Ar-H) | 13,99 ($CH_3$), 22,45 ($CH_2$), 22,53 ($CH_2$), 22,56 ($CH_2$), 26,53 ($CH_2$), 27,16 ($CH_2$), 27,38 ($CH_2$), 31,44 ($CH_2$), 31,47 ($CH_2$), 46,44 ($NCH_2$), 47,09 ($NCH_2$), 85,72 (CH=C), 89,66 (CH=C), 111,61 (ArC-H), 113,04 (ArC-H), 122,17 (ArC-H), 123,95 (ArC-H), 124,15 (ArC-H), 125,08 (ArC-H), 127,07 (ArC-H), 127,18 (ArC-H) | 592.16519 [M-$I^-$]$^+$($C_{32}H_{36}N_2O_2SSe^+$, calc.592.16585) |

[a)]Espectros a 400 MHz; [b)] espectros de $^{1}$H-RMN a 400 MHz

## 2.5 Espectros no UV/Vis dos corantes esquarílicos assimétricos

Na Figura 2.5, encontram-se representados os espectros no UV/Vis dos corantes assimétricos sintetizados neste trabalho usando como solvente o DMSO.

Neste solvente, os corantes apresentam valores para o comprimento de onda do máximo de absorção, que variam entre 689 e 659 nm, valores estes que se inserem na chamada "Janela Fototerapêutica", a qual se situa entre 600 e 850 nm (Avirah *et al.*, 2012). Este é um dos parâmetros mais importantes na seleção de um composto como FS para PDT.

Como se pode verificar na Figura 2.5 o comportamento que estes compostos seguem, é semelhante ao observado para os corantes simétricos (Figura 2.2) apresentando bandas de absorção estreitas e intensas. Da análise da Figura 2.5, conclui-se que em relação ao composto zwiteriónico **19**, todos os compostos apresentam um desvio hipsocrómico, sendo este mais acentuado para o derivado *O*-metilado (**20**), com a excepção doscompostos **24** e **25** que apresenta o mesmo $\lambda_{máx}$ de absorção.

Sendo assim, para este estudo, pode-se concluir que o efeito da presença do grupo amino nestes compostos, se manifesta num ligeiro efeito hipsocrómico.

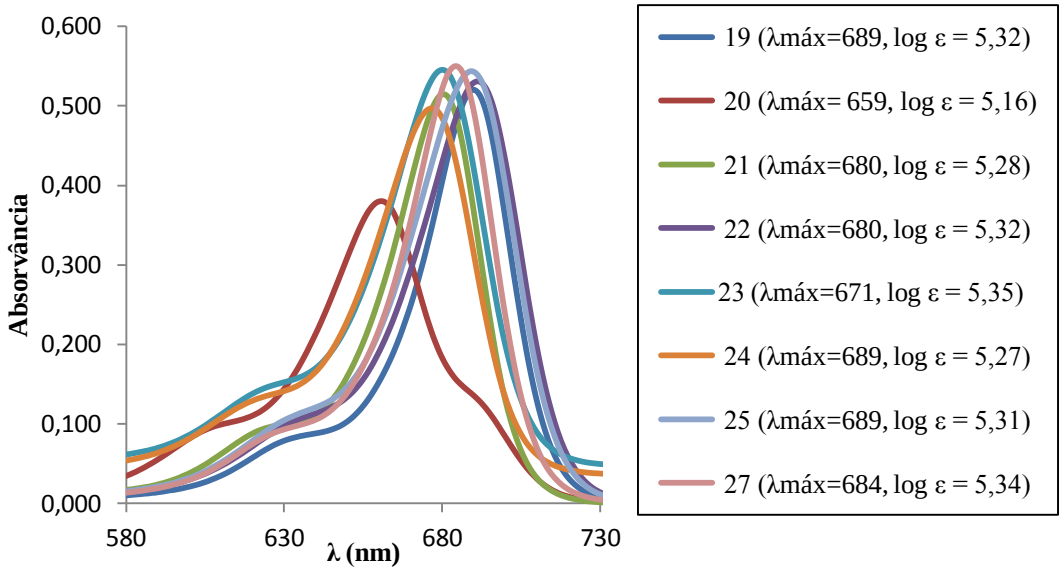



**Figura 2.5** Espectros de absorção no UV/Vis dos compostos assimétricos em DMSO

Na Figura 2.6 encontram-se representados os espectros de absorção no UV/Vis dos corantes cianínicos esquarilicos assimétricos sintetizados (**19-27**), numa solução de DMEM (meio de cultura celular, sem soro).

Quando dissolvidos em DMEM, estes compostos possuem um comportamento bastante diferente, daquele que se observa quando dissolvidos em DMSO, como se pode verificar pela Figura 2.6. Neste caso as curvas de absorção são largas e apresentam normalmente dois picos de $\lambda_{máx}$. Este efeito pode ser justificado pela elevada propensão à formação de agregados num solvente mais polar. O mesmo foi observado por Halkiotis e colaboradores (1997), quando introduziam ftalocianinas tetrassulfonadas em PBS (tampão fosfato-salino), em que se observavam dois picos de $\lambda_{máx}$ e a sua absorvância descia para cerca de metade dos valores obtidos quando dissolvidos em metanol.

Da análise da Figura 2.6 conclui-se que para os compostos **22**, **23** e **24** ocorreu um ligeiro efeito batocrómico em relação ao composto zwiteriónico**19**, sendo esse efeito mais acentuado para o composto **24,** que possui como substituinte no anel de quatro membros uma amina aromática com um átomo de iodo. No caso do composto **25**, não se verificaram alterações significativas em relação ao precursor zwiteriónico e para o caso do composto **21**, verificou-se um efeito hipsocrómico, em relação ao composto zwiteriónico **19.**

Para o composto **27**, que não apresenta átomos de iodo na sua estrutura, verificou-se uma alteração da forma da curva, sendo que o segundo pico apresenta valores de comprimento de onda do máximo de absorção acima dos do primeiro pico. Para este verificou-se um desvio hipsocrómico pouco significativo em relação ao seu análogo **19**.

Verificou-se que os compostos dissolvidos em DMEM apresentam uma média λ de absorção (entre os dois picos) de cerca de 660 nm, sendo este o valor escolhido para o λ de emissão dos LEDs utilizados para irradiação das células.

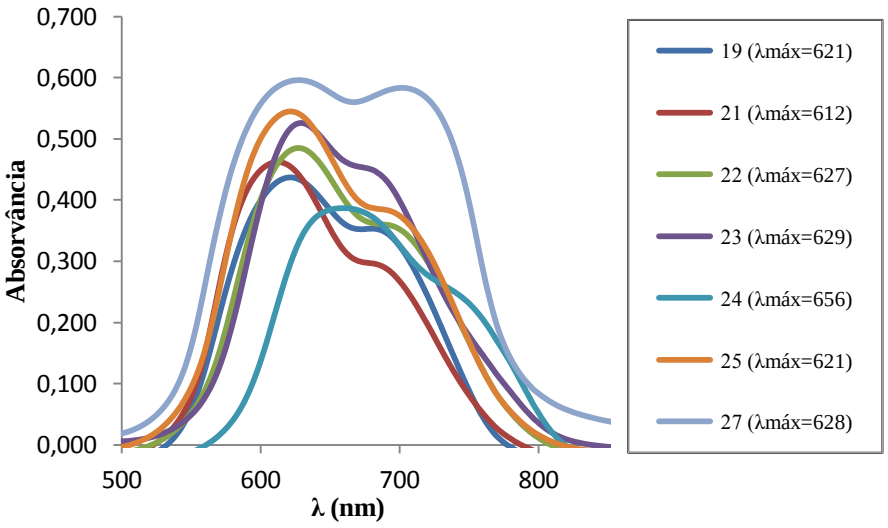


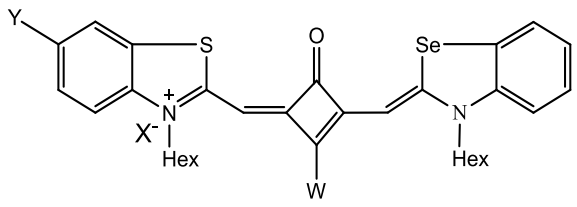

**Figura 2.6** Espectros de absorção no UV/Vis dos compostos assimétricos em DMEM (meio base de cultura, sem soro)

## 2.6 Avaliação da capacidade de formação de oxigénio singuleto ($^1O_2$) por parte dos corantes cianínicos esquarílicos assimétricos sintetizados

Na Tabela 2.10, estão representados os valores do rendimento quântico na formação de oxigénio singuleto de cada um dos novos corantes cianínicos esquarílicos assimétricos sintetizados.

Como seria de esperar, o composto que apresenta menor rendimento quântico de oxigénio singuleto, é o composto **27**, que não apresenta na sua estrutura nenhum átomo de iodo. Quando na estrutura se introduziu um átomo de iodo, o rendimento quântico aumentou cerca de sete vezes (composto **19**). A introdução de grupos amino no anel esquarílico aumentou ligeiramente o φΔ sendo o valor mais acentuado quando se introduz uma amina primária (**21**). No entanto, o composto **24** (W = 3-I-NHPh) é o composto que possui o maior rendimento quântico na formação de oxigénio singuleto, quando comparado com os restantes derivados esquarílicos (φΔ = 0,26), confirmando assim a teoria de que quanto maior o número de átomos pesados (neste caso o átomo de iodo) se introduz na estrutura molecular, maior é o seu rendimento na formação de oxigénio singuleto (Avirah *et al*., 2012).

**Tabela 2.10** Rendimentos quânticos na formação do oxigénio singuleto, por parte dos novos corantes cianínicos esquarílicos assimétricos sintetizados

| | Composto | X | Y | W | φΔ |
|---|---|---|---|---|---|
|  | **19** | - | I | $O^-$ | 0,14 |
| | **21** | I | I | $NH_2$ | 0,22 |
| | **22** | I | I | NHMe | 0,17 |
| | **23** | I | I | NHPh | 0,18 |
| | **24** | I | I | 3-I-NHPh | 0,26 |
| | **25** | - | I | $NHCH_2CH_2OSO_3^-$ | 0,16 |
| | **27** | - | H | $O^-$ | 0,02 |

Resultados semelhantes, porém com valores de formação de oxigénio singuleto maiores foram encontrados na literatura. Em 2003, Santos e colaboradores determinaram o rendimento quântico na formação de oxigénio singuleto, de alguns corantes cianínicos esquarílicos simétricos, sendo que o composto zwiteriónico, que apresentava um átomo de Se ou um átomo de S em cada anel de cinco membros e um grupo hexilo ligado ao átomo de azoto,

possuíam um φΔ= 0,31 e 0,26 respectivamente. Para os corantes cianínicos esquarílicos com W= $NHCH_3$eátomos de Se e S inseridos no anel de cinco membros, detectaram rendimentos quânticos na formação de oxigénio singuleto por volta dos 0,68 e 0,14 (Santos *et al.*, 2003).

Em 2005 este grupo de investigadores sintetizou corantes aminoesquarílicos com os mesmos átomos, porém na posição W possuíam ou o grupo NHPh ou o grupo 3-I-NHPh e um átomo de iodo como contra-ião e detectou rendimentos quânticos na formação de oxigénio singuleto de cerca de 0,46 e 0,66 respectivamente (Reis *et al*., 2009).

Sabe-se hoje que estes valores não foram determinados corretamente e que quando determinados pelo mesmo método que foi usado para os compostos sintetizados nesta dissertação, são da mesma ordem grandeza, nomeadamente para o corante esquarílico simétrico com enxofre no anel de cinco membros, um grupo hexilo e utilizando como contra-ião o $I^-$, este grupo obteve um valor de rendimento quântico na formação de oxigénio singuleto para o grupo substituinte $NH_2$, de 0,15 e para o $NHCH_3$ de 0,23. Substituindo o átomo de enxofre por selénio na molécula, o valor para ambos aos grupos substituintes é de 0,25 e 0,28 respectivamente (Ferreira *et al*., 2013), valores estes bastante próximos dos encontrados por estes autores.

## 2.7 Efeito citotóxico dos corantes esquarílicos simétricos nas linhas celulares Caco-2 e HepG2.

### 2.7.1 Efeito da irradiação em células não expostas aos corantes esquarílicos simétricos e assimétricos.

Com o objetivo de verificar se a radiação por si era citotóxica nas células, reduzindo a sua viabilidade, irradiaram-se células Caco-2 e HepG2, durante 14 minutos, de modo idêntico àquelas que foram previamente incubadas com corantes (secções seguintes).

Como se pode verificar na Figura 2.7, tanto nas células HepG2 como nas Caco-2, a irradiação e o tempo de incubação que se sucede (de 1 h ou de 24 h), não interferem significativamente na viabilidade celular, comparando com o controlo não irradiado que foi deixado durante 14 minutos ao abrigo da luz e à temperatura ambiente. Conclui-se que a viabilidade celular não é influenciada pela irradiação, a este λ e durante este período.

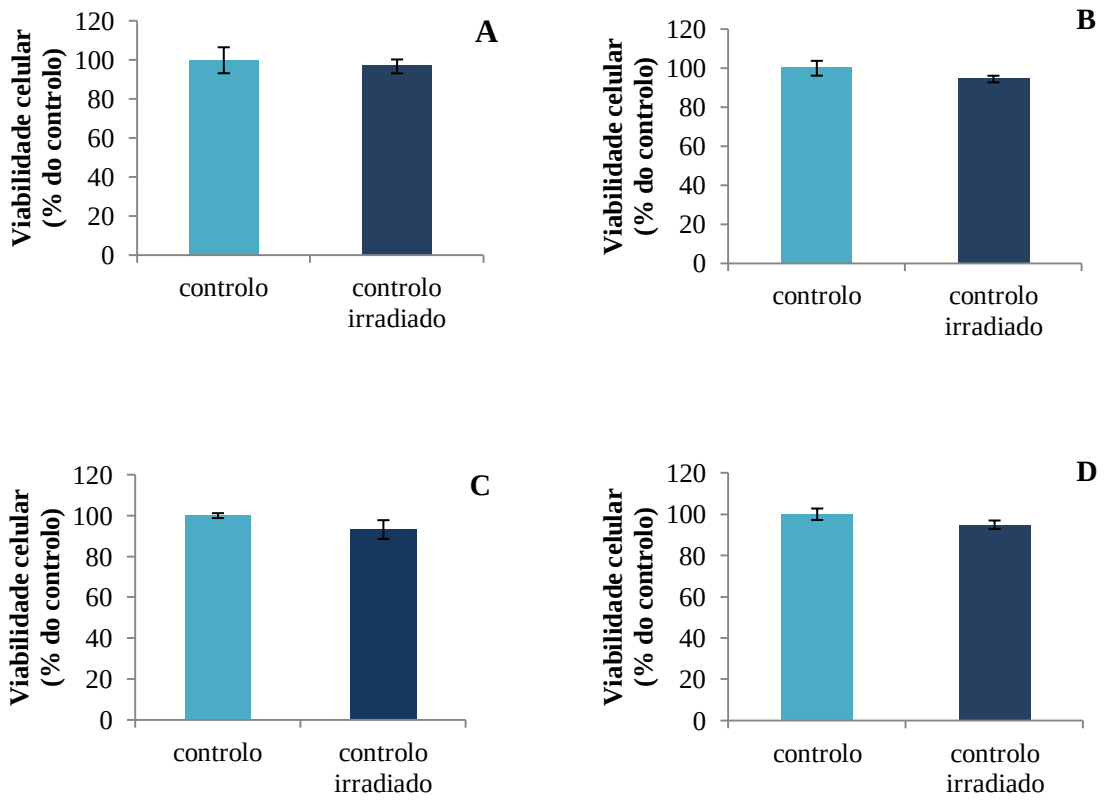



**Figura 2.7** Efeito da irradiação em células HepG2 (A e C) e Caco-2 (B e D) não expostas aos corantes esquarílicos simétricos, ao fim de 1h de incubação (A e C) e ao fim de 24h de incubação (B e D). Resultados apresentados em termos de viabilidade celular (% do controlo) ± S.D.

### 2.7.2 Efeito citotóxico dos corantes esquarílicos na linha celular Caco-2 e HepG2

#### 2.7.2.1 Efeito do tempo de espera até lavagem dos compostos, após irradiação.

A adição das soluções suplementadas com os corantes simétricos, foi realizada de acordo com a Tabela 3.2 (ver capítulo 3 – Resultados Experimentais). Após 24 h de incubação das células com os compostos, estas foram submetidas a irradiação com LED's centrados a 660 nm e durante 7 ou 14 minutos e 1 hora depois foram lavadas com PBS (2 vezes) e adicionou-se meio sem soro contendo Alamar Blue (10% v/v). Em paralelo, outras células, irradiadas do mesmo modo, foram deixadas em contacto com o corante após irradiação, durante 24 horas. Após este tempo foram lavadas com PBS e adicionou-se Alamar blue diluído em meio de cultura sem soro. Este procedimento foi realizado com o objetivo de estudar o efeito do tempo de permanência do composto depois de ser excitado pela luz a um determinado comprimento de onda, na viabilidade celular.

A Figura 2.8 representa a viabilidade celular (% de controlo), registada 1 h e 24 h após irradiação das células, pré-incubadas com corantes simétricos (**4**, **8**, **9**, **7** e **6**) na concentração de 5 μM, á excepção do composto **9**, no qual essa concentração não foi testada, tanto na linha celular HepG2 (**A**) como Caco-2 (**B**). Verifica-se em ambas as linhas celulares que o composto **4**, induz uma perda quase total da viabilidade celular para exposição durante 1 h após irradiação e uma perda total da viabilidade celular para 24 h, o mesmo acontece com o composto **6**, porém para este a viabilidade celular apenas sofreu um decréscimo de cerca de 60% a 1 h após irradiação. Já com os compostos **7** e **8**, ocorreu uma perda total da viabilidade celular em ambos os tempos de espera. Finalmente com o composto **9** verificou-se uma ligeira redução da viabilidade para 1 h na linha celular HepG2 e para a Caco-2 após este tempo de exposição não ocorreu redução da viabilidade celular, já para as 24 h de exposição após irradiação ocorreu uma perda de cerca de 40% na viabilidade celular.

Pode-se então concluir que após 24 h de espera entre a irradiação e a lavagem dos compostos, quando aplicados o composto **4**, **9** e **6**, a redução da viabilidade celular é mais eficaz.

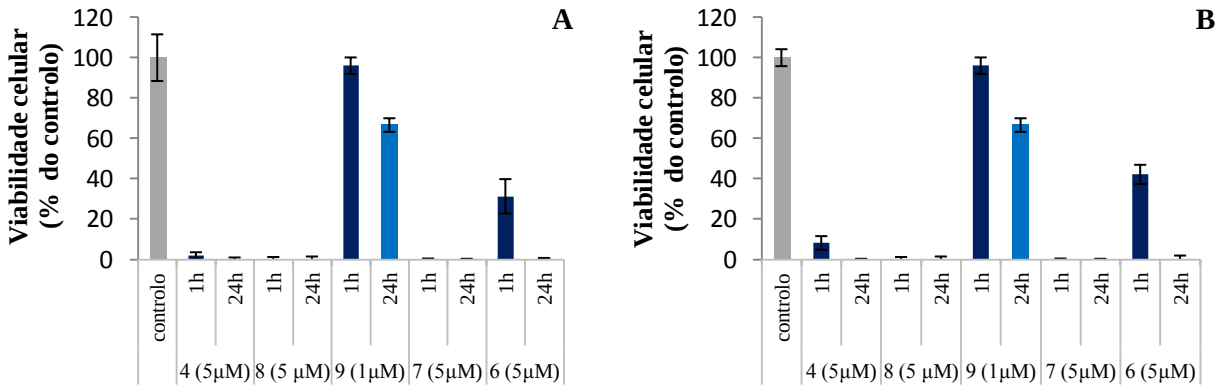



**Figura 2.8** Efeito do tempo de exposição das células HepG2 (**A**) e Caco-2 (**B**) aos corantes simétricos, após irradiação. As células foram expostas durante 24 h aos corantes simétricos a 1 ou 5 μM, antes da irradiação (660 nm) e os compostos permaneceram em contacto com as células após irradiação, por 1h ou 24h. Resultados apresentados em termos de viabilidade celular (% do controlo) ± S.D.

Na Figura 2.9, está representada a viabilidade celular, 1 h e 24h após irradiação das células, quando expostas aos corantes assimétricos (**19**, **20**, **21**, **22**, **23**, **24**, **25** e **27**) na concentração de 5 μM.

Para a linha celular HepG2 (Figura 2.9**A**), nas células expostas aos corantes **20**, **21**, **22, 23** e **27** verificou-se uma perda total da viabilidade celular em ambos os tempos de exposição

após irradiação. Nas células expostas aos corantes **24** e **25** verificou-se um ligeiro decréscimo da viabilidade celular, sendo este mais acentuado com 1 h de exposição após irradiação. No composto **19** verificou-se uma perda de cerca de 80 % da viabilidade celular a 1 h apos irradiação e uma perda total após 24 h da irradiação.

Na linha celular Caco-2 (Figura 2.9 **B**) verificou-se nas células expostas aos corantes **20**, **21**, **22, 23** e **27,** uma perda total da viabilidade celular, nas células expostas aos corantes **24** e **25** verificou-se uma redução ligeira da viabilidade, sendo mais acentuada às 24 h de exposição após irradiação. Nas células expostas ao corante **19** verificou-se uma perda total da viabilidade celular para o tempo de 24 h após irradiação e uma perda de cerca de 60 % da viabilidade celular para 1 h após irradiação.

Conclui-se então que para os compostos **19**, **20**, **21**, **22** e **27** em ambas as linhas celulares e **24** e **25** na linha celular Caco-2, as 24 h de exposição após irradiação mostraram ser mais eficientes na perda da viabilidade celular, ao contrário do que acontece nos compostos **24** e **25** para a linha celular HepG2, nos quais o efeito do tempos de exposição de 1 h após irradiação se mostraram mais eficazes na redução embora que ligeira, da viabilidade celular,

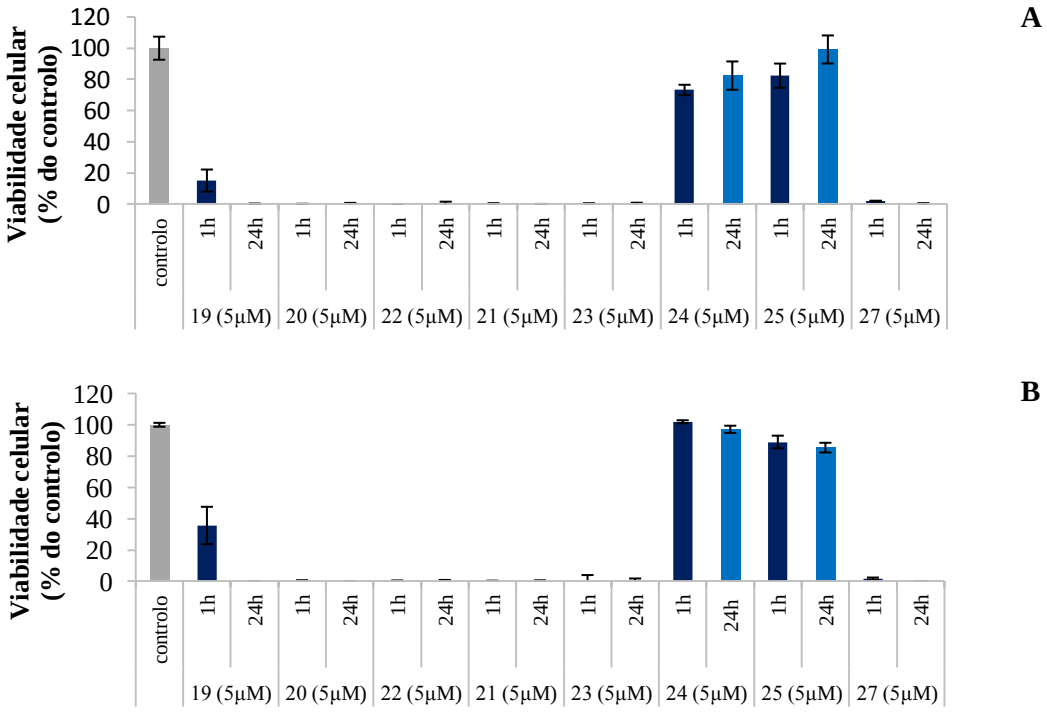



**Figura 2.9** Efeito do tempo de exposição das células HepG2 (**A**) e Caco-2 (**B**) aos corantes assimétricos, após irradiação. As células foram expostas durante 24 h aos corantes assimétricos a 1 ou 5 μM, antes da irradiação (660 nm) e os compostos permaneceram em contacto com as células após irradiação, por 1 h ou 24 h. Resultados apresentados em termos de viabilidade celular (% do controlo) ± S.D.

#### 2.7.2.2 Análise do efeito citotóxico dos corantes esquarílicos simétricos e do efeito do tempo de irradiação nas linhas celulares HepG2 e Caco-2

Depois de aplicado meio de cultura sem soro, suplementado com os compostos às diferentes concentrações deu-se incubação durante 24 h. Após este tempo as células foram sujeitas a 3 condições distintas de irradiação. i) sem irradiação, a placa de cultura foi colocada á temperatura ambiente durante 14 minutos, ii) irradiação durante 7 minutos e iii) irradiação durante 14 minutos, todo o processo foi feito ao abrigo da luz ambiente.

Após irradiação realizaram-se duas condições distintas, as células permaneceram expostas aos compostos, após irradiação durante 1 h ou durante 24 h. Após esse tempo os corantes foram lavados das caixas (2 vezes com PBS) e foi adicionado às caixas 100 µL/poço de AB (10% v/v) em meio de cultura sem soro. A viabilidade celular foi quantificada através da percentagem de redução do Alamar Blue, calculada de acordo com as absorvâncias obtidas nas leituras efetuadas a 570 e 620 nm.

##### 2.7.2.2.1 Composto 4

Para o composto **4** foram selecionados os resultados da exposição das células após 24 h da irradiação. Todos os resultados de viabilidade celular foram analisados e comparados com um controlo não irradiado.

Nas células HepG2 (Figura 2.10 **A**), não irradiadas, nenhuma das concentrações utilizadas induziu citotoxicidade nas células. Verificou-se que após irradiação durante 7 minutos (Figura 2.10 **B**), as concentrações de 5 e 10 µM reduziram quase na totalidade a viabilidade celular, enquanto a concentração de 1 µM apenas reduziu a viabilidade celular para cerca de 50%. Nas células irradiadas durante 14 minutos (Figura 2.10 **C**), verificou-se um decréscimo pouco significativo da viabilidade celular para a concentração de 1 µM e nas restantes concentrações não se verificou nenhuma alteração, relativamente à irradiação durante 7 minutos. Para as 3 condições de irradiação a concentração de 0,1 µM não provocou qualquer alteração na viabilidade celular. Estes resultados estão de acordo com os mencionados na literatura para o mesmo composto, mas com o contra-ião $CF_3SO_3$- (Gomes, 2010).

Nas células Caco-2, pode verificar-se que quando não irradiadas (Figura 2.10 **D**) apenas a concentração de 10 µM apresentou citotoxicidade (redução da viabilidade em cerca de 50

%), nas concentrações de 1 e 5 µM não se observaram alterações significativas, da viabilidade celular, em relação ao controlo. Na Figura 2.10 **E,** correspondente airradiação durante 7 minutos, verificou-se uma redução quase total da viabilidade celular para as concentrações de 1; 5 e 10 µM e uma ligeira redução para a concentração de 0,1 µM. Na Figura 2.10 **F**, irradiação durante 14 minutos, não se verificaram quaisquer alterações em relação à Figura 2.10 **E**.

Sendo assim através da análise da Figura 2.10 pode-se concluir que utilizando o composto **4**, a cultura celular Caco-2 apresenta maior sensibilidade em relação à HepG2, de uma forma geral, o composto não apresenta citotoxicidade no escuro, fator crucial na escolha de um fotossensibilizador. Conclui-se também que as concentrações de 1; 5 e 10 µM reduziram eficazmente a viabilidade celular após irradiação e que o tempo de irradiação teve influência na alteração da viabilidade celular. Contudo aumentando o tempo de irradiação de 7 para 14 minutos, não se aumentou a citotoxicidade.

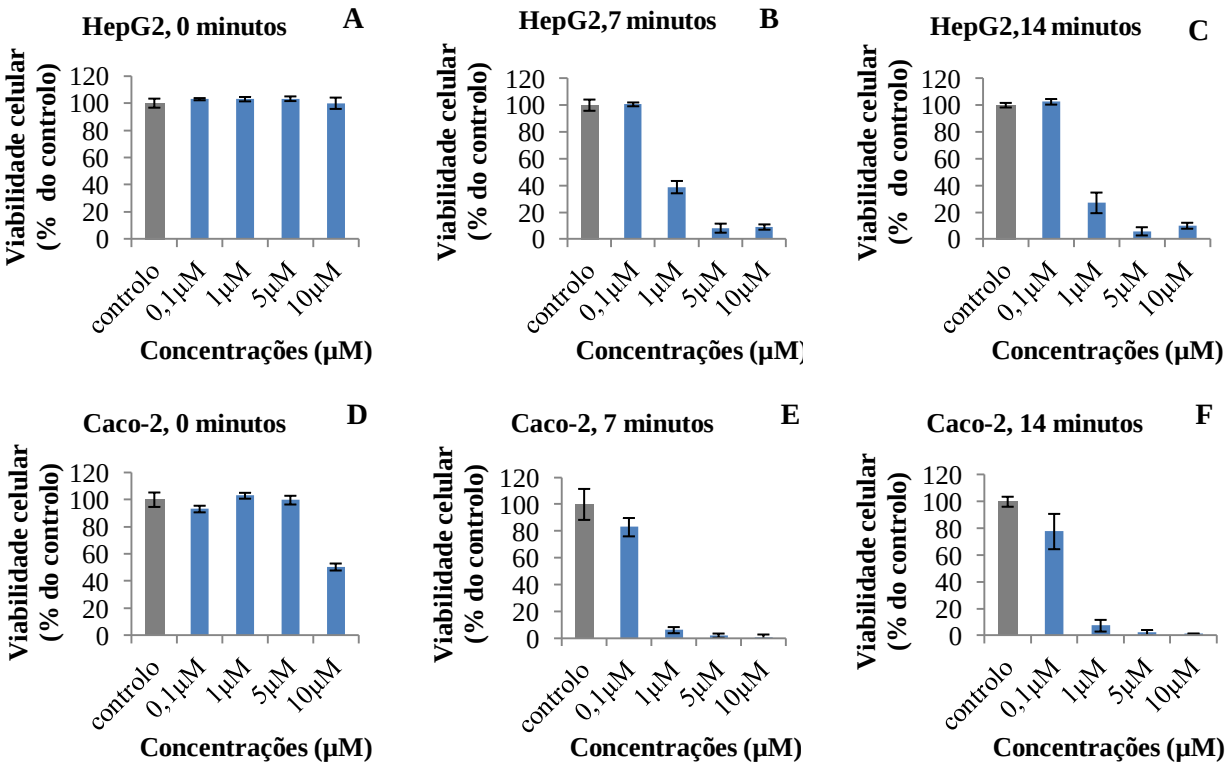



**Figura 2.10** Efeito citotóxico do corante esquarílico **4** nas linhas celulares HepG2 (A, B, C) e Caco-2 (D, E, F), em função da concentração e do tempo de irradiação. As células foram pré-incubadas por 24 horas com o corante, ás concentrações indicadas, e depois sujeitas a irradiação por 7 (B e E) ou 14 minutos (C e F) com LED's centrados a 660 nm. Fez-se um controlo não irradiado (A e D) que foi mantido no escuro por 14 minutos. Resultados representam valores médios ± S.D.

#### 2.7.2.2.2 Composto 6

Relativamente ao composto **6** foram selecionados os dados correspondentes à exposição das células por 24 h da irradiação. Os resultados são expressos em viabilidade celular (% do controlo), em função do controlo não irradiado.

Nas células HepG2, não irradiadas (Figura 2.11 **A**) verificou-se que 5 e 10 μM do composto apresenta elevada citotoxicidade reduzindo a viabilidade celular na totalidade e 1 μM reduziu a viabilidade celular para cerca de 40 %. Na Figura 2.11 **B**, células irradiadas durante 7 minutos, as concentrações de 1; 5 e 10 μM aboliram a viabilidade celular e a concentração de 0,1 μM reduziu em 40 %. Na Figura 2.11 **C**, células irradiadas durante 14 minutos, manteve-se o padrão de toxicidade das células irradiadas por 7 minutos (sem diferenças significativas).

Nas células Caco-2, não irradiadas (Figura 2.11 **D**), à concentrações de 5 e 10 μM do composto também é citotóxico, reduzindo a viabilidade celular totalmente, mas 0,1 e 1 μM não são citotóxicas (viabilidade ≈ 100 % do controlo). Na Figura 2.11 **E**, nas células irradiadas durante 7 minutos, às concentrações de 1; 5 e 10 μM, o composto **6** reduziu a viabilidade celular na totalidade e a 0,1μM reduziu cerca de 20 %. Com irradiação durante 14 minutos (Figura 2.11 **F**), não se verificaram alterações de toxicidade, comparando com 7 minutos de irradiação (Figura 2.11 **E**). Estes resultados estão de acordo com os mencionados na literatura para o mesmo composto, mas com o contra-ião $CF_3SO_3^-$ (Gomes, 2010).

Conclui-se também que as células HepG2 apresentam maior sensibilidade que as células Caco-2, sendo as concentrações mais elevadas, 5 e 10 μM, citotóxicas no escuro para ambas as células, 1,0 μM é ainda citotóxica para as células HepG2. Este composto não obedece assim a um dos parâmetros fundamentais para ser um bom fotossensibilizador. Conclui-se ainda que a irradiação por si só não potencia a citotoxicidade uma vez que às concentrações de 5 e 10 μM o composto já apresenta citotoxicidade.

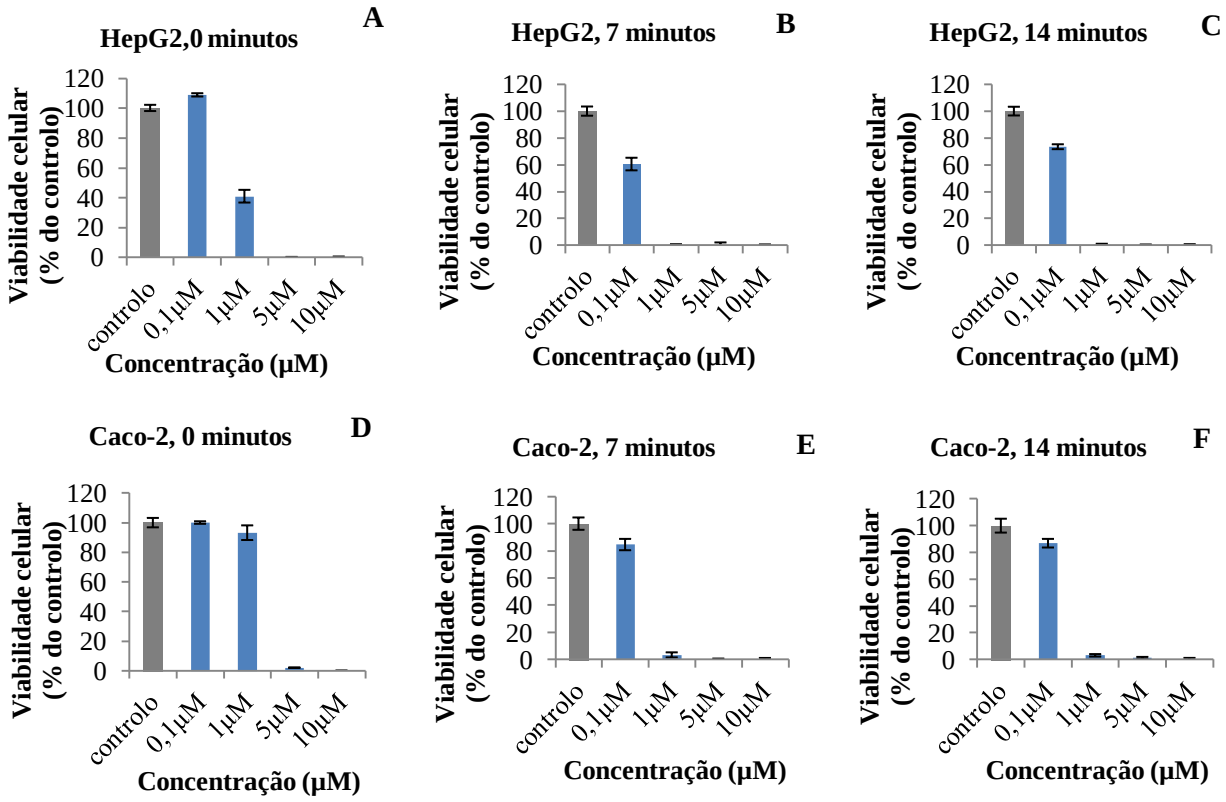



**Figura 2.11** Efeito citotóxico do corante esquarílico **6** nas linhas celulares HepG2 (A, B, C) e Caco-2 (D, E, F), em função da concentração e do tempo de irradiação. As células foram pré-incubadas por 24 horas com o corante, ás concentrações indicadas, e depois sujeitas a irradiação por 7 (B e E) ou 14 minutos (C e F) com LED's centrados a 660 nm. Fez-se um controlo não irradiado (A e D) que foi mantido no escuro por 14 minutos. Resultados representam valores médios ± S.D.

#### 2.7.2.2.3 Composto 7

Para o composto **7** foram seleccionados os dados de exposição das células ao corante durante 1 h após irradiação. Todos os resultados de viabilidade celular foram analisados e comparados com um controlo não irradiado (Figura 2.12).

Nas células HepG2, não irradiadas (Figura 2.12 **A**), as concentrações de 5 e 10 µM apresentaram citotoxicidade reduzindo na totalidade a viabilidade celular e a concentração de 1 µM reduziu a viabilidade celular para cerca de 50 % do controlo. Na Figura 2.12 **B**, células irradiadas durante 7 minutos, as concentrações de 1; 5 e 10 µM reduziram completamente a viabilidade celular e a concentração de 0,1 µM reduziu cerca de 30%, porém é de notar que as concentrações de 5 e 10 µM já se apresentavam citotóxicas no escuro. Na Figura 2.12 **C**, nas células irradiadas durante 14 minutos, verificou-se a toxicidade anterior, acrescentando que à

concentração de 0,1 µM ainda reduziu um pouco mais a viabilidade (≈ 50% do controlo). Nas células Caco-2, não irradiadas (Figura 2.12 **D**), observa-se que 10 µM do composto é citotóxico, reduzindo a viabilidade celular totalmente, às concentrações de 1 e 5 µM o composto reduziu significativamente a viabilidade celular e à concentração de 0,1 µM não se verificou toxicidade. Na Figura 2.12 **E**, células irradiadas durante 7 minutos, verificou-se que às concentrações de 1; 5 e 10 µM o composto **7** reduziu a viabilidade celular na totalidade e a concentração de 0,1 µM reduziu a viabilidade em 30%. Na Figura 2.12 **F**, células irradiadas durante 14 minutos, verificou-se uma descida de cerca de 50 % na viabilidade celular para a concentração de 0,1 µM, mantendo-se as outras concentrações citotóxicas tal como na Figura 2.12 **E**. Estes resultados estão de acordo com os mencionados na literatura para o mesmo composto, mas com o contra-ião $CF_3SO_3^-$ (Gomes, 2010).

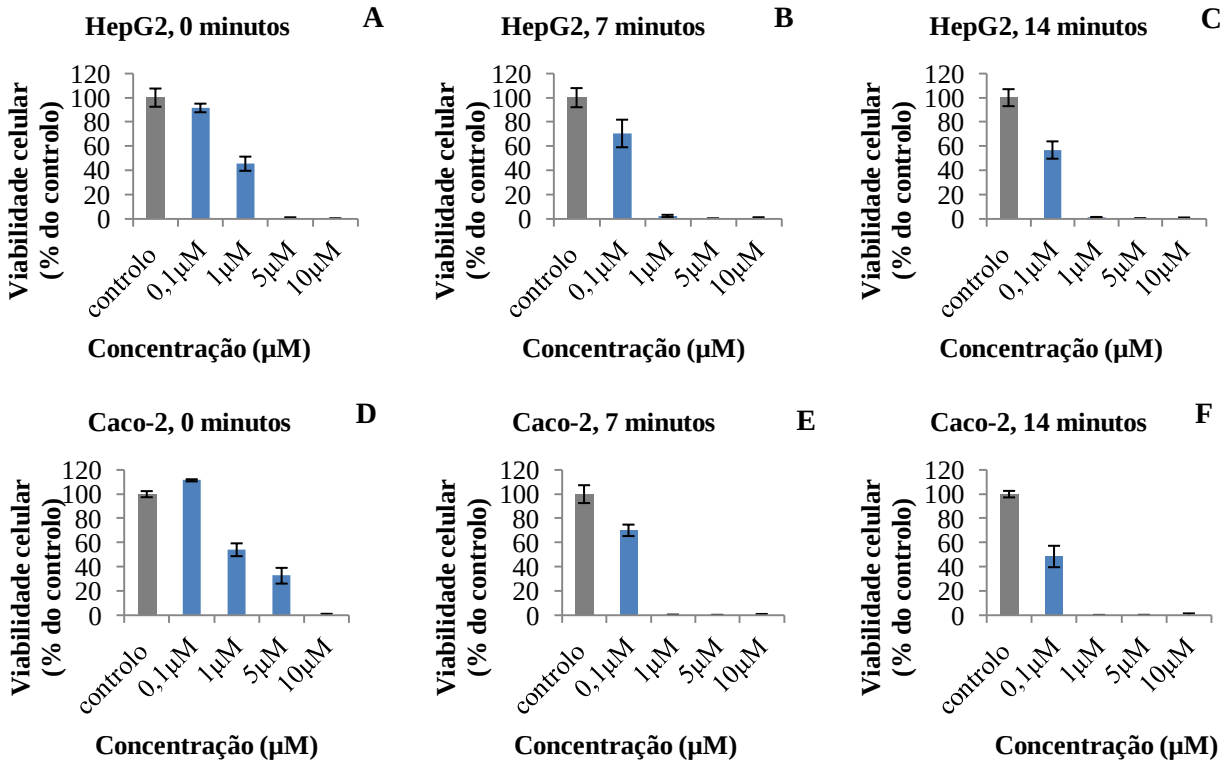



**Figura 2.12** Efeito citotóxico do corante esquarílico **7** nas linhas celulares HepG2 (A, B, C) e Caco-2 (D, E, F), em função da concentração e do tempo de irradiação. As células foram pré-incubadas por 24 horas com o corante, ás concentrações indicadas, e depois sujeitas a irradiação por 7 (B e E) ou 14 minutos (C e F) com LED's centrados a 660 nm. Fez-se um controlo não irradiado (A e D) que foi mantido no escuro por 14 minutos. Resultados representam valores médios ± S.D.

Também, relativamente ao composto **7**, as células HepG2 apresentaram maior sensibilidade, comparando com as células Caco-2. Dado que as concentrações mais elevadas deste composto apresentaram elevada citotoxicidade no escuro, não obedecendo aos parâmetros fundamentais para ser um bom fotossensibilizador, conclui-se também que às concentrações de 1; 5 e 10 μM, o composto é citotóxico no escuro, contudo quando irradiado, a citotoxicidade aumenta ligeiramente.

#### 2.7.2.2.4 Composto 8

Para o composto **8** foram selecionados os dados correspondentes à exposição durante 1 h após irradiação. Os resultados de viabilidade celular foram analisados e comparados com um controlo não irradiado.

Nas células HepG2 (Figura 2.13 **A)** não irradiadas, verificou-se que às concentrações de 5 e 10 μM, o composto **8** apresenta citotoxicidade elevada, assim como à concentração de 1 μM onde apresenta uma citotoxicidade de cerca de 50 %, tais características fazem deste composto um fraco candidato a fotossensibilizador. Na Figura 2.13 **B,** irradiação durante 7 minutos, verificou-se que as concentrações de 1; 5 e 10 μM, reduziram na totalidade a viabilidade celular, a concentração de 0,1 μM não foi citotóxica na presença ou na ausência de radiação. Na Figura 2.13 **C**, irradiação durante 14 minutos, não se verificaram alterações significativas relativamente à irradiação por 7 minutos.

Nas células Caco-2, não irradiadas (Figura 2.13 **D**), apenas à concentração de 10 μM o composto reduziu completamente a viabilidade celular, à concentração de 5 μM reduziu para 70 % e as restantes concentrações não provocaram qualquer alteração comparando com o grupo controlo. Na Figura 2.13 **E,** irradiação durante 7 minutos, verificou-se que as concentrações de 1 e 5 μM reduziram a viabilidade celular na sua totalidade, ao contrário da concentração de 0,1 μM que não produziu qualquer efeito. Na Figura 2.13 **F**, irradiação durante 14 minutos, à concentração de 1 μM ocorreu um ligeiro aumento da viabilidade celular.

Sendo assim após análise da Figura 2.13 pode concluir-se que utilizando o composto **8**, nas células HepG2, as concentrações de 1; 5 e 10 μM são citotóxicas mesmo no escuro, reduzindo assim as suas capacidades como fotossensibilizador. Nas células Caco-2, apenas as concentrações de 5 e 10 μM mostraram ser citotóxicas no escuro sendo este efeito mais acentuado para a concentração de 10 μM, verificando-se assim uma maior sensibilidade a este

composto por parte das células HepG2. Conclui-se também que as concentrações de 1 e 5 µM provocaram perda da viabilidade celular quando irradiadas e que o tempo de irradiação teve influência na alteração da viabilidade celular. Contudo aumentando o tempo de irradiação de 7 para 14 minutos, não se verificou um aumento da citotoxicidade. Devido às razões atrás apresentadas, pode-se concluir que o composto **8** não reúne as condições para ser considerado um bom fotossensibilizador. Estes resultados estão de acordo com os mencionados na literatura para o mesmo composto, mas com o contra-ião $CF_3SO_3^-$ (Gomes, 2010).

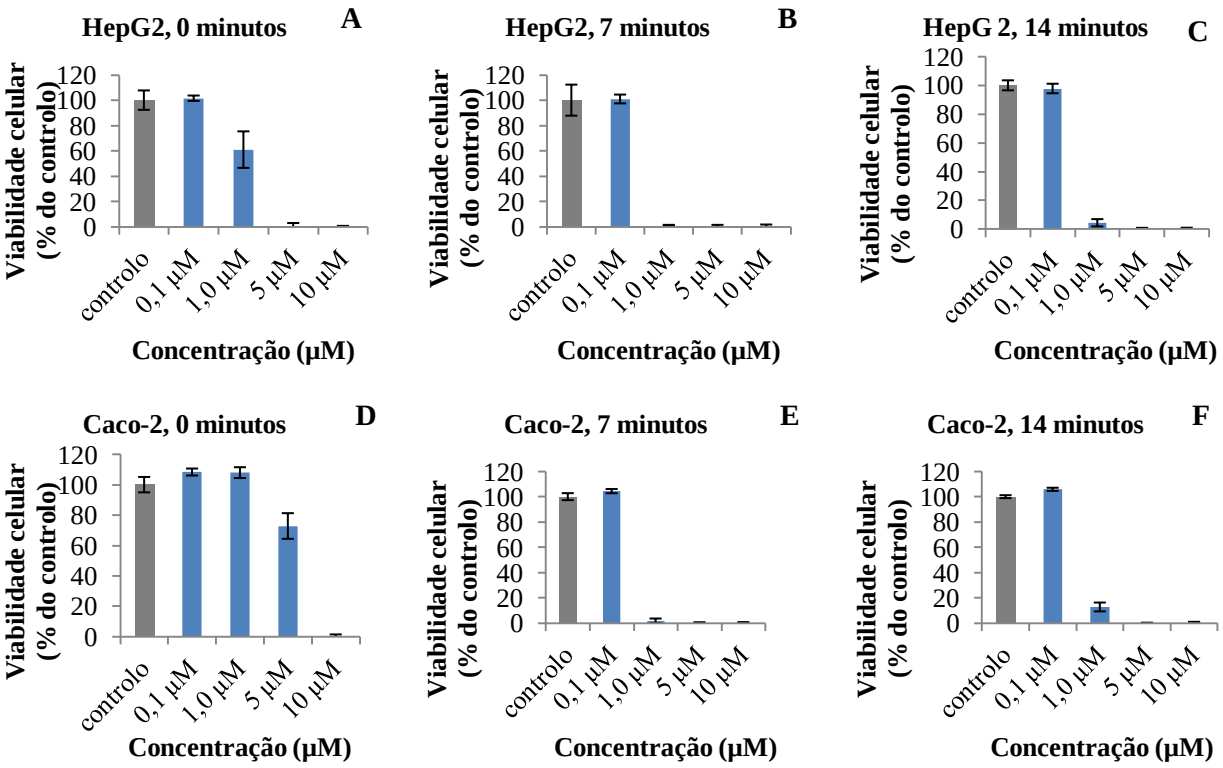



**Figura 2.13** Efeito citotóxico do corante esquarílico **8** nas linhas celulares HepG2 (A, B, C) e Caco-2 (D, E, F), em função da concentração e do tempo de irradiação. As células foram pré-incubadas por 24 horas com o corante, ás concentrações indicadas, e depois sujeitas a irradiação por 7 (B e E) ou 14 minutos (C e F) com LED's centrados a 660 nm. Fez-se um controlo não irradiado (A e D) que foi mantido no escuro por 14 minutos. Resultados representam valores médios ± S.D.

### 2.7.2.2.5 Composto 9

Para o composto **9** foram selecionados os dados de exposição durante 24 h após irradiação. Os resultados de viabilidade celular foram analisados e comparados com o

controlo não irradiado. Para este composto, uma vez que foi o primeiro da bateria de ensaios a ser testado e como se testou juntamente na caixa um controlo irradiado e outro não irradiado, só foram utilizados as concentrações de 0,1; 1 e 10 μM.

Nas células HepG2, não irradiadas (Figura 2.14 **A**), apenas à concentração de 10 μM o composto **9** induziu citotóxicidade, as restantes concentrações (mais baixas), não provocaram qualquer alteração na viabilidade celular. Na Figura 2.14 **B**, irradiação durante 7 minutos, apenas a concentração de 1 μM reduziu para cerca de 50%. Na Figura 2.14 **C**, irradiação durante 14 minutos, apenas se verificou uma redução pouco significativa da viabilidade celular à concentração de 1 μM, as restantes concentrações comportaram-se de forma semelhante à apresentada na Figura 2.14 **B**.

Nas células Caco-2, não irradiadas (Figura 2.14 **D**), à concentração de 10 μM o composto apresenta-se citotóxico, reduzindo a viabilidade celular quase totalmente. Na Figura 2.14 **E**, irradiação durante 7 minutos, a concentração de 10μM reduziu a viabilidade celular na totalidade e a concentração de 1 μM reduziu até cerca de 60%. Na Figura 2.14 **F**, irradiação durante 14 minutos, não se verificaram alterações relativamente à irradiação por 7 minutos (Figura 2.14 **E**). Estes resultados estão de acordo com os mencionados na literatura para o mesmo composto, mas com o contra-ião $CF_3SO_3^-$ (Gomes, 2010).

Pode concluir-se que as concentrações de 1 e 5 μM podem ser utilizadas em PDT, dado que não apresentam citotoxicidade no escuro, que a acção citotóxica do composto depende do tempo de irradiação, que as células HepG2 se apresentam mais sensíveis á acção deste composto e que apenas a concentração de 1 μM se mostrou eficaz na redução da viabilidade celular, sem apresentar citotoxicidade no escuro. No futuro terá de se testar uma concentração intermédia entre 1 e 10 μM, no entanto com os resultados apresentados pode-se concluir que o composto **9** não reúne as condições necessárias para ser considerado um bom fotossensibilizador.

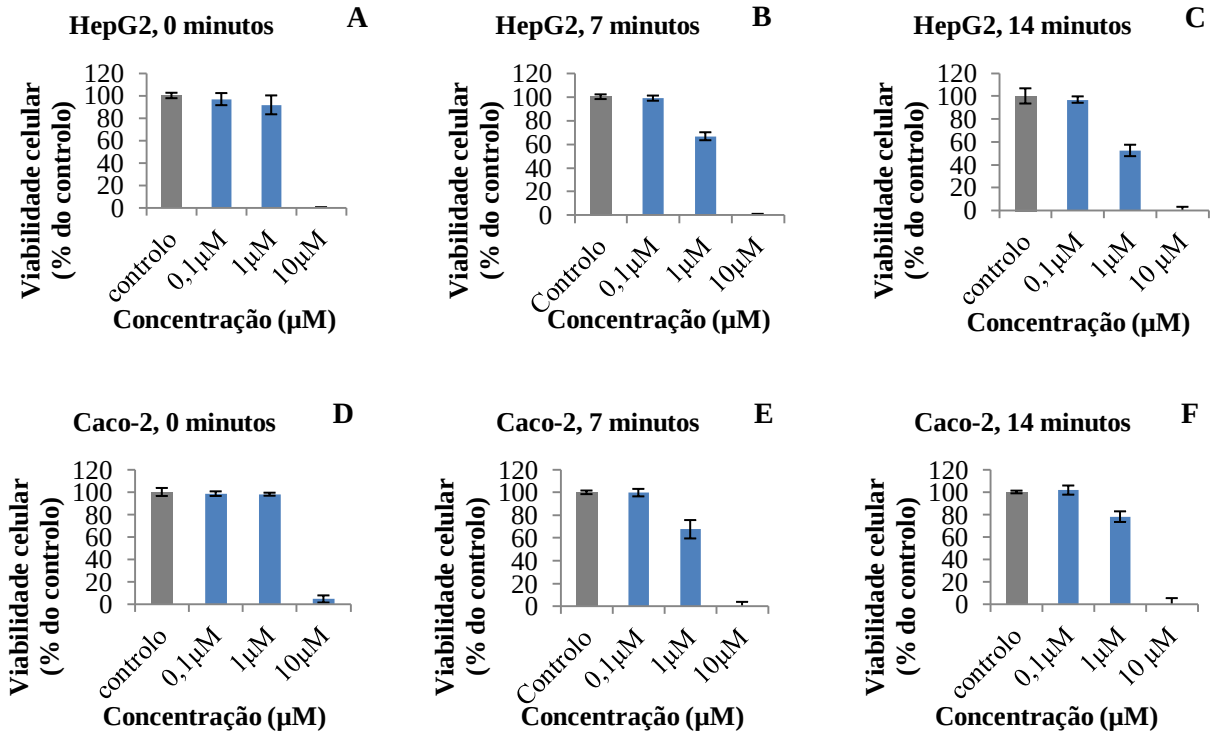



**Figura 2.14** Efeito citotóxico do corante esquarílico **9** nas linhas celulares HepG2 (A, B, C) e Caco-2 (D, E, F), em função da concentração e do tempo de irradiação. As células foram pré-incubadas por 24 horas com o corante, ás concentrações indicadas, e depois sujeitas a irradiação por 7 (B e E) ou 14 minutos (C e F) com LED's centrados a 660 nm. Fez-se um controlo não irradiado (A e D) que foi mantido no escuro por 14 minutos. Resultados representam valores médios ± S.D.

### 2.7.2.3 Análise do efeito citotóxico dos corantes esquarílicos assimétricos e do efeito do tempo de irradiação nas linhas celulares HepG2 e Caco-2

Para os compostos assimétricos utilizaram-se os mesmos protocolos experimentais utilizados para os corantes esquarílicos simétricos.

#### 2.7.2.3.1 Composto 19

Para o composto **19** foram seleccionados os dados resultantes da exposição das células por 24 h após irradiação. Os resultados são apresentados em viabilidade celular e foram comparados com um controlo não irradiado (viabilidade celular, % de controlo).

Nas células HepG2 não irradiadas mas que permaneceram 14 minutos à temperatura ambiente, ao abrigo da luz, podemos verificar que o composto **19** não induz citotoxicidade significativa no escuro para nenhuma das concentrações. Nas células irradiadas durante 7

minutos (Figura 2.15 **B**), verificou-se que às concentrações de 1; 5 e 10 µM o composto **19** irradiado reduziu totalmente a viabilidade celular, contudo a 0,1 µM não se observou toxicidade. Na Figura 2.15 **C**, células irradiadas durante 14 minutos, manteve-se a toxicidade observada para 7 minutos de irradiação (Figura 2.15 **B**), ocorrendo apenas um ligeiro aumento da toxicidade para a concentração de 0,1 µM.

Nas células Caco-2, não irradiadas, observou-se uma ligeira toxicidade no escuro para 5 e 10 µM. A irradiação por 7 e 14 min. (Figura 2.15 **E** e **F**, respectivamente) nas células expostas a 5 e 10 µM de composto, reduziram completamente a viabilidade celular e a concentração de 1 µM reduziu a viabilidade em cerca de 80 %, já à concentração de 0,1 µM o composto não é citotóxico nem no escuro nem quando irradiado.

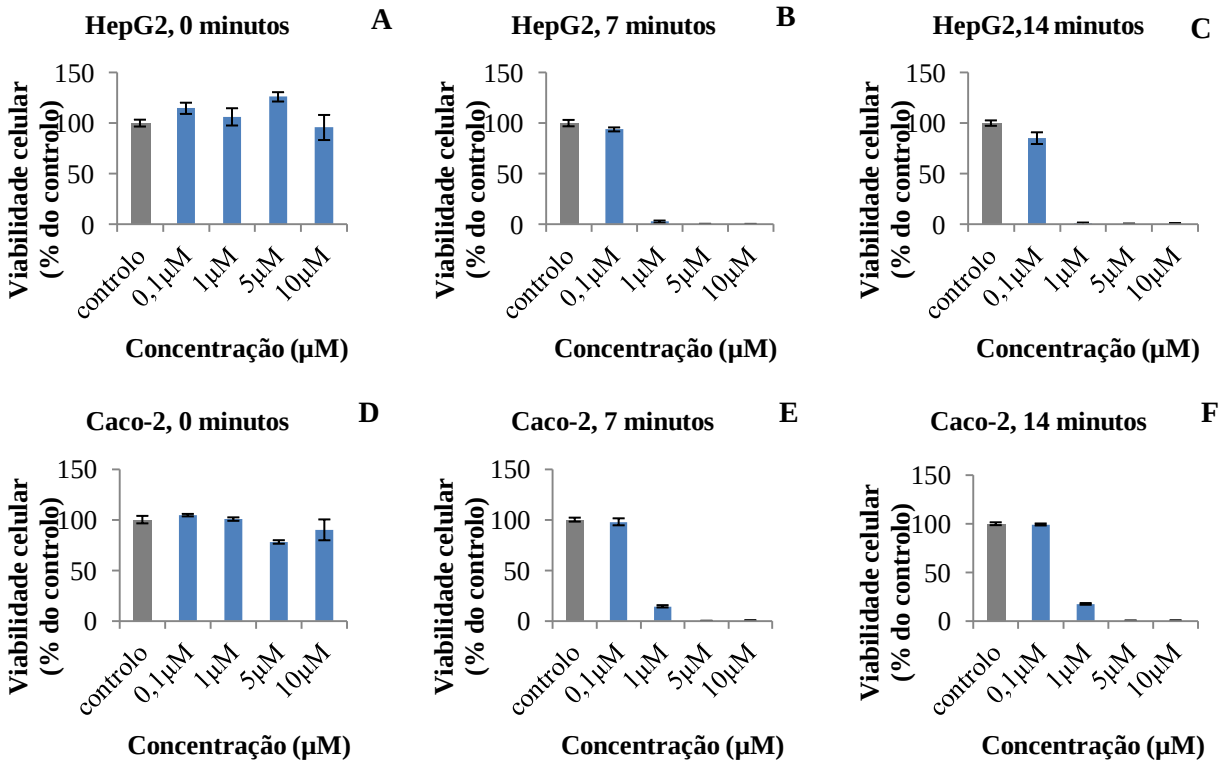



**Figura 2.15** Efeito citotóxico do corante esquarílico **19** nas linhas celulares HepG2 (A, B, C) e Caco-2 (D, E, F), em função da concentração e do tempo de irradiação. As células foram pré-incubadas por 24 horas com o corante, ás concentrações indicadas, e depois sujeitas a irradiação por 7 (B e E) ou 14 minutos (C e F) com LED's centrados a 660 nm. Fez-se um controlo não irradiado (A e D) que foi mantido no escuro por 14 minutos. Resultados representam valores médios ± S.D.

Pode concluir-se que o composto **19** não apresenta citotoxicidade no escuro, para ambas as culturas celulares, preenchendo assim um dos requisitos mais importantes para a escolha de um bom fotossensibilizador. Que após irradiação, as concentrações de 1; 5 e 10

μM reduziram eficazmente a viabilidade celular. Verificou-se sensibilidade similar ao composto para ambas as linhas celulares e que a irradiação por 7 minutos atingiu o máximo de efeito, não se verificando acréscimo de toxicidade para irradiação de 14 minutos. Este composto quando irradiado, aumenta o seu poder citotóxico.

#### 2.7.2.3.2 Composto 20

Para o composto **20** foram selecionados os dados correspondentes à exposição por mais 1 h após irradiação. Os resultados foram comparados com um controlo não exposto e não irradiado e apresentados em viabilidade celular (% do controlo).

Nas células HepG2, expostas ao corante **20** mas não irradiadas mas que permaneceram 14 minutos à temperatura ambiente, ao abrigo da luz, 1 h antes de lavar o composto e adicionar o Alamar Blue (Figura 2.16 **A**). Podemos verificar que à exceção de 10 μM que induziu redução quase total da viabilidade celular, todas as outras concentrações não foram citotóxicas no escuro. Na Figura 2.16 **B**, células irradiadas durante 7 minutos, verificou-se que 5 e 10 μM do composto reduziram completamente a viabilidade celular e que 1 μM reduziu a viabilidade em cerca de 50 %. Na Figura 2.16 **C**, células irradiadas durante 14 minutos, manteve-se a citotoxicidade total de 5 e 10 μM, e 1μM produziu uma maior perda da viabilidade.

Nas células Caco-2, expostas ao composto **20** mas não irradiadas (Figura 2.16 **D**) pode-se verificar que 10 μM reduziu em cerca de 80 % a viabilidade e para 5 μM ocorreu uma redução de cerca de 20 % na viabilidade celular, nas restantes concentrações não ocorreram alterações de viabilidade quando comparadas com o controlo. Nas Figuras 2.16 **E** e **F**, correspondentes à irradiação por 7 e 14 minutos, respectivamente, verificou-se perda total da viabilidade celular para 5 e 10 μM, enquanto para 1 μM de composto a irradiação de 7 minutos reduziu a viabilidade para cerca de 50 % do controlo (Figura 2.16 **E**) e 14 minutos de irradiação reduziu a viabilidade para cerca de 20% (Figura 2.16 **F**).

Na Figura 2.16 pode-se concluir que, para ambas as células, o composto apresenta baixa citotoxicidade no escuro, sendo apenas 10 μM, a concentração citotóxica. Verifica-se práticamente a mesma sensibilidade ao composto para as duas linhas celulares. A irradiação das células expostas ao corante, provoca uma grande perda de viabilidade para 10 (citotóxica) e 5 μM de composto. A citotoxicidade do composto é dependente do tempo de radiação e

sendo assim o composto tem elevado potencial para ser utilizado como fotossensibilizador a concentrações inferiores a 10 µM, em terapia fotodinâmica do cancro.

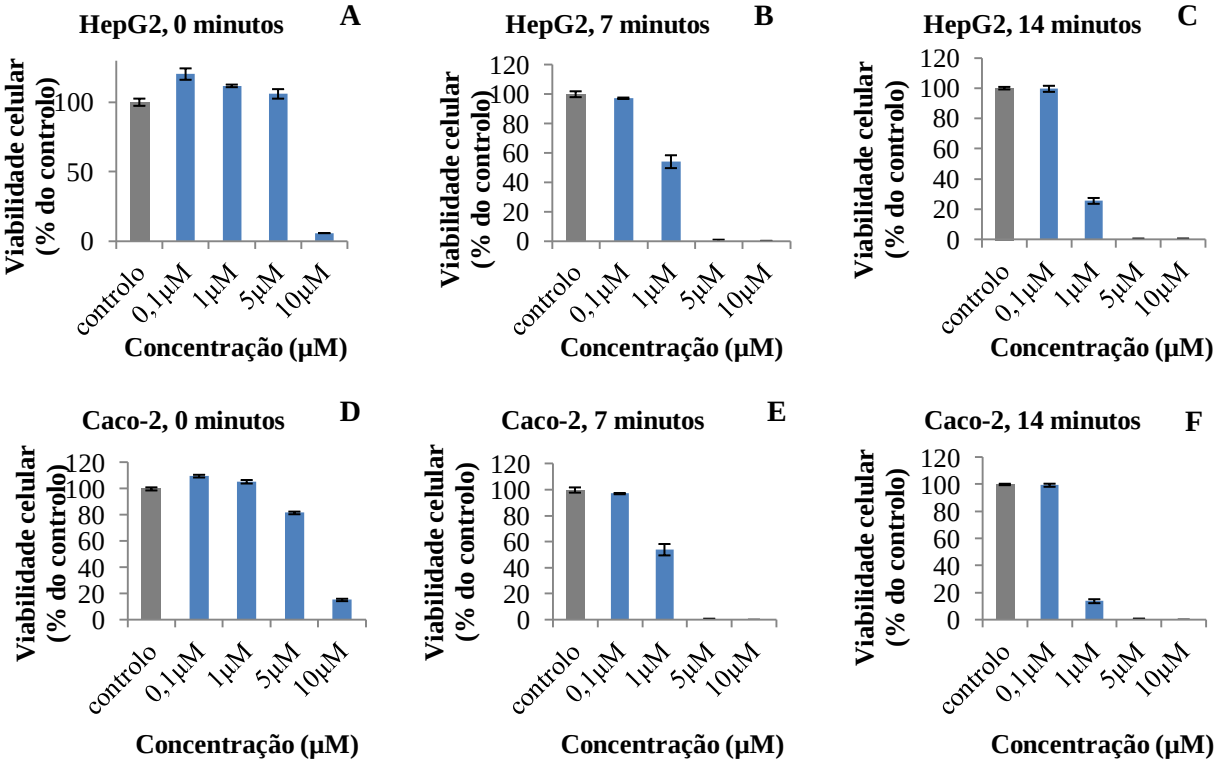



**Figura 2.16** Efeito citotóxico do corante esquarílico **20** nas linhas celulares HepG2 (A, B, C) e Caco-2 (D, E, F), em função da concentração e do tempo de irradiação. As células foram pré-incubadas por 24 horas com o corante, ás concentrações indicadas, e depois sujeitas a irradiação por 7 (B e E) ou 14 minutos (C e F) com LED's centrados a 660 nm. Fez-se um controlo não irradiado (A e D) que foi mantido no escuro por 14 minutos. Resultados representam valores médios ± S.D.

### 2.7.2.3.3 Composto 21

Para o corante **21**, foram utilizados os resultados obtidos por exposição das células ao corante por mais 1 h após irradiação.Todos os resultados são analisados e comparados com o controlo não exposto e não irradiado.

As células HepG2 não irradiadas (Figura 2.17 **A**), expostas a 10 µM do composto perderam totalmente a viabilidade demonstrando-se citotóxico no escuro, para 5 µM ocorreu uma descida da viabilidade para cerca de 50% e nas restantes concentrações não se verificou perda de viabilidade celular, indicando que para estas concentrações o composto não se apresenta citotóxico no escuro. Na Figura 2.17 **B**, células irradiadas durante 7 minutos, verificou-se citotoxicidade total para as concentrações de 1; 5 e 10 µM e uma ligeira descida

(de 20 %) da viabilidade celular para a concentração de 0,1 µM. Nas células irradiadas durante 14 minutos verificou-se um ligeiro incremento na toxicidade induzida por 0,1 µM, as restantes concentrações mantiveram o perfil de toxicidade.

Nas células Caco-2, verificou-se alguma citotoxicidade paras as concentrações mais altas, no escuro (Figura 2.17 **D**), contudo menor que a observada nas células HepG2 nas mesmas condições. Nas células Caco-2 irradiadas 7 e 14 minutos (Figura 2.17 **E** e **F**, respectivamente), verificou-se que às concentrações de 1; 5 e 10 µM ocorreu perda total da viabilidade celular, e na concentração de 0,1 µM apenas uma ligeira descida para a irradiação de 7 minutos e uma descida na viabilidade de cerca de 40 % nas irradiadas 14 minutos.

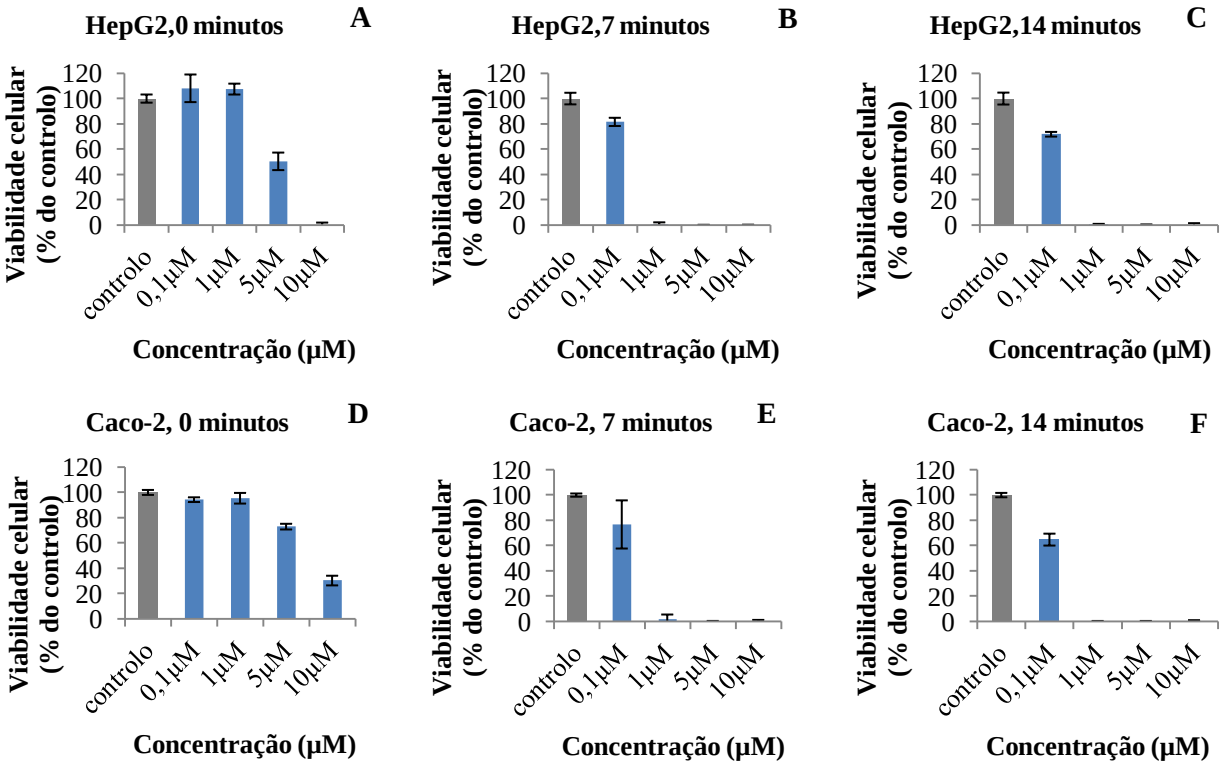



**Figura 2.17** Efeito citotóxico do corante esquarílico **21** nas linhas celulares HepG2 (A, B, C) e Caco-2 (D, E, F), em função da concentração e do tempo de irradiação. As células foram pré-incubadas por 24 horas com o corante, ás concentrações indicadas, e depois sujeitas a irradiação por 7 (B e E) ou 14 minutos (C e F) com LED's centrados a 660 nm. Fez-se um controlo não irradiado (A e D) que foi mantido no escuro por 14 minutos. Resultados representam valores médios ± S.D.

Na Figura 2.17 pode concluir-se que o composto apenas apresenta alguma citotoxicidade no escuro para as concentrações maiores (5 e 10 µM), que as células HepG2 são mais sensíveis à acção do composto **21** no escuro. Ainda que às concentrações de 1; 5 e 10 µM o composto tem um elevado efeito citotóxico quando irradiado e que o efeito

citotóxico do composto em ambas as linhas celulares é dependente do tempo de irradiação, tendo o máximo já sido atingido aos 7 minutos.

#### 2.7.2.3.4 Composto 22

Neste ensaio, utilizaram-se os resultados obtidos por exposição das células em contacto com o composto irradiado por mais 1 h após irradiação. Todos os resultados foram analisados através da comparação com o controlo não irradiado.

As células HepG2, não irradiadas (Figura 2.18 **A**), apresentaram nas concentrações mais elevadas (5 e 10 μM) perda total de viabilidade no escuro, na concentração de 1 μM verificou-se uma ligeira diminuição da viabilidade celular quando comparada com o grupo controlo, e na concentração de 0,1 μM não se verificou alteração. Na Figura 2.18 **B**, células irradiadas durante 7 minutos verificou-se perda total da viabilidade para as concentrações acima de 1 μM, o mesmo se observa, quando as células são irradiadas durante 14 minutos (Figura 2.18 **C**), no entanto à concentração de 0,1 μM também se verificou uma descida de cerca de 40% na viabilidade celular, quando passamos de 7 para 14 minutos de irradiação.

Nas células Caco-2, não irradiadas (Figura 2.18 **D**) também se verifica citotoxicidade a partir de 1 μM, observando-se cerca de 40%, 70% e 100% de perda de viabilidade para 1; 5 e 10 μM, respectivamente.

Células expostas a 0,1 μM do composto, não sofreram alterações de viabilidade em relação ao controlo. Na Figura 2.18 **E** e **F**, células irradiadas durante 7 e 14 minutos respectivamente verificou-se a redução total da viabilidade celular para as concentrações de 1; 5 e 10 μM, verificando-se ainda que 0,1 μM não induz perda de viabilidade nas células não irradiadas ou irradiadas durante 7 minutos, quando irradiadas durante 14 minutos já induz descida da viabilidade.

Da análise da Figura 2.18 pode concluir-se que o efeito do composto é dependente do tempo de irradiação, que nas concentrações maiores o composto apresenta citotoxicidade no escuro, que as células HepG2 são ligeiramente mais sensíveis à acção do composto, quando comparada com as células Caco-2 e que as concentrações de 1; 5 e 10 μM reduzem totalmente a viabilidade celular quando irradiadas, no entanto são citotóxicas no escuro, sem irradiação. Conclui-se então, segundo os motivos atrás mencionados que o composto **22** não reúne as condições necessárias para ser utilizado como fotossensibilizador em PDT.

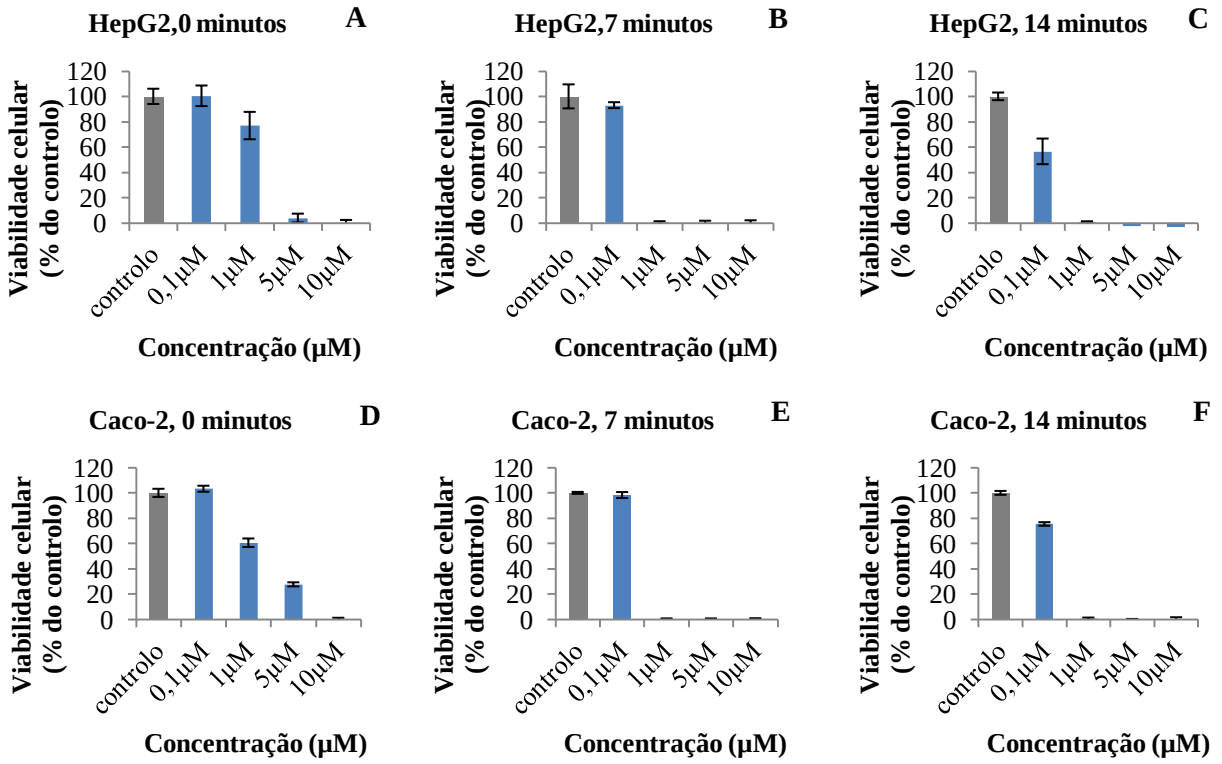



**Figura 2.18** Efeito citotóxico do corante esquarílico **22** nas linhas celulares HepG2 (A, B, C) e Caco-2 (D, E, F), em função da concentração e do tempo de irradiação. As células foram pré-incubadas por 24 horas com o corante, ás concentrações indicadas, e depois sujeitas a irradiação por 7 (B e E) ou 14 minutos (C e F) com LED's centrados a 660 nm. Fez-se um controlo não irradiado (A e D) que foi mantido no escuro por 14 minutos. Resultados representam valores médios ± S.D.

### 2.7.2.3.5 Composto 23

Para o composto **23**, utilizaram-se os resultados obtidos por exposição das células após irradiação por mais 1 h seguido de lavagem do corante. Todos os resultados foram analisados através da comparação com o controlo não irradiado.

Na Figura 2.19 **A**, células HepG2 não irradiadas, observa-se que nas concentrações de 5 e 10 µM o composto **23** é citotóxico no escuro, as restantes concentrações (mais baixas), não provocaram qualquer alteração na viabilidade celular. Na Figura 2.19 **B** e **C**, células irradiadas durante 7 e 14 minutos respectivamente, observou-se que as concentrações de 1; 5 e 10 µM reduziram completamente a viabilidade celular, relembrando que as concentrações de 5 e 10 µM já eram citotóxicas no escuro.

Nas células Caco-2 não irradiadas (Figura 2.19 **D**) expostas a 10 µM do composto apresentam perda de viabilidade total se apresenta citotóxico no escuro. Na Figura 2.19 **E** e **F**,

células irradiadas durante 7 minutos e 14 minutos respectivamente, verifica-se que 1; 5 e 10 µM reduziram quase na totalidade a viabilidade celular.

Conclui-se assim, da análise da Figura 2.19, que a cultura celular HepG2 apresenta maior sensibilidade à acção citotóxica no escuro do composto (a 5 e 10 µM o composto **23** apresenta citotoxicidade no escuro), que o efeito do composto em termos de viabilidade celular é dependente do tempo de irradiação, e que as concentrações de 1; 5 e 10 µM reduziram eficazmente a viabilidade celular quando submetidas a irradiação, sendo que 10 µM já era citotóxica no escuro.

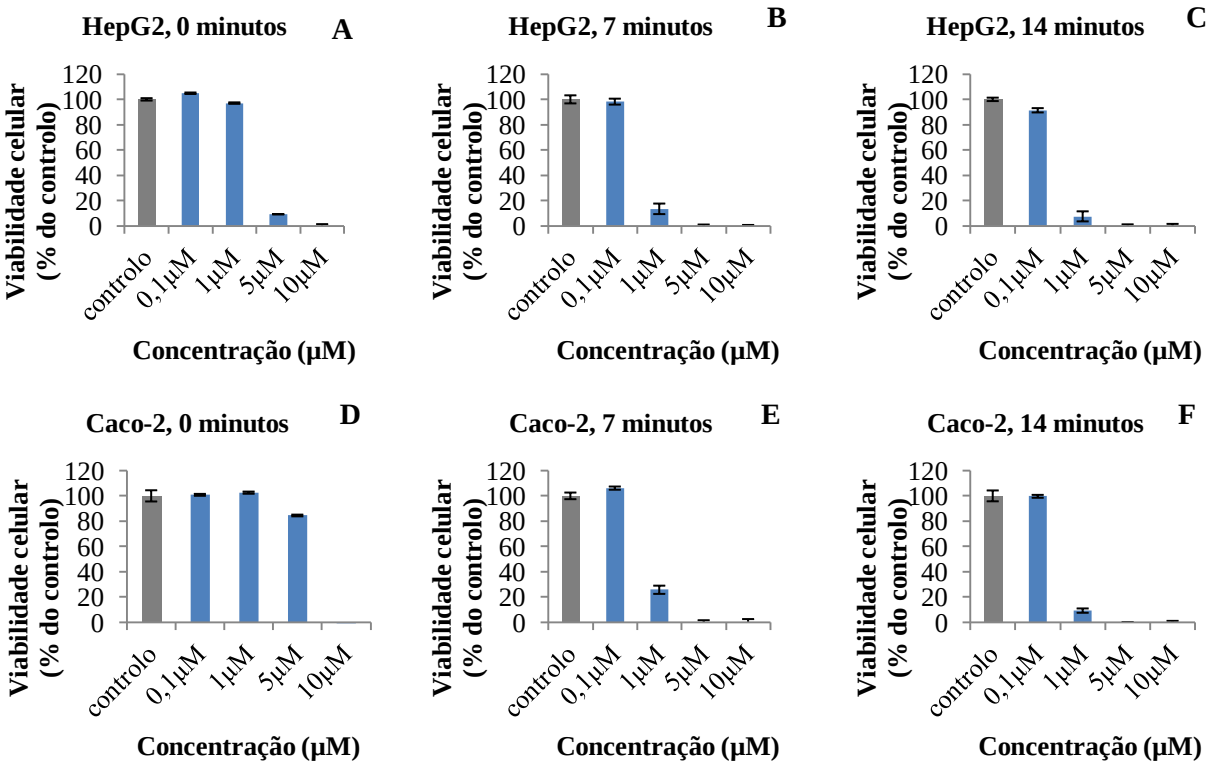



**Figura 2.19** Efeito citotóxico do corante esquarílico **23** nas linhas celulares HepG2 (A, B, C) e Caco-2 (D, E, F), em função da concentração e do tempo de irradiação. As células foram pré-incubadas por 24 horas com o corante, ás concentrações indicadas, e depois sujeitas a irradiação por 7 (B e E) ou 14 minutos (C e F) com LED's centrados a 660 nm. Fez-se um controlo não irradiado (A e D) que foi mantido no escuro por 14 minutos. Resultados representam valores médios ± S.D.

#### 2.7.2.3.6 Composto 24

Relativamente ao composto **24** selecionaram-se os dados da exposição das células por mais 24 h após a irradiação. Todos os resultados são apresentados em viabilidade celular (% do controlo) e foram analisados e comparados com um controlo não exposto e não irradiado.

Nas células HepG2, não irradiadas (Figura 2.20 **A**) pode verificar-se que apenas a concentração de 10 μM apresentou alguma toxicidade no escuro fazendo descer a viabilidade celular até cerca de 20% do controlo. Na irradiação por 7 ou 14 minutos (Figura 2.20 **B** e **C**, respectivamente), há uma descida (pouco significativa) para a concentração de 5 e 10 μM.

Nas células Caco-2, nas três condições, células não irradiadas , irradiadas 7 minutos e irradiadas 14 minutos (Figuras 2.20 **D**, **E** e **F** respectivamente) verificou-se que a 10 μM do composto, este é ligeiramente citotóxico (redução de 50 % da viabilidade celular) e que a irradiação não potencia a toxicidade.

Para o composto **24** eram espectáveis bons resultados na redução da viabilidade celular quando irradiado, uma vez que este composto apresenta mais um átomo pesado de iodo no anel aromático, que deveria induzir a uma maior produção de oxigénio singuleto e por isso ter um efeito mais citotóxico a nível celular. No entanto tal não se verifica, o que pode ter ocorrido devido a uma incompatibilidade entre a estrutura do composto e a membrana celular não ocorrendo assim a passagem deste para o interior da célula, ou então por este composto atuar por um mecanismo tipo I e não pelo tipo II mais comum em PDT. Da análise da Figura 2.20 pode concluir-se que o composto **24** não preenche os requisitos para ser utilizados como fotossensibilizador em PDT, uma vez que quando irradiado não produz efeito citotóxico a nível celular, conclui-se também que, tal como se verificou nos outros corantes, a células HepG2, apresentam ligeiramente maior sensibilidade a este composto.

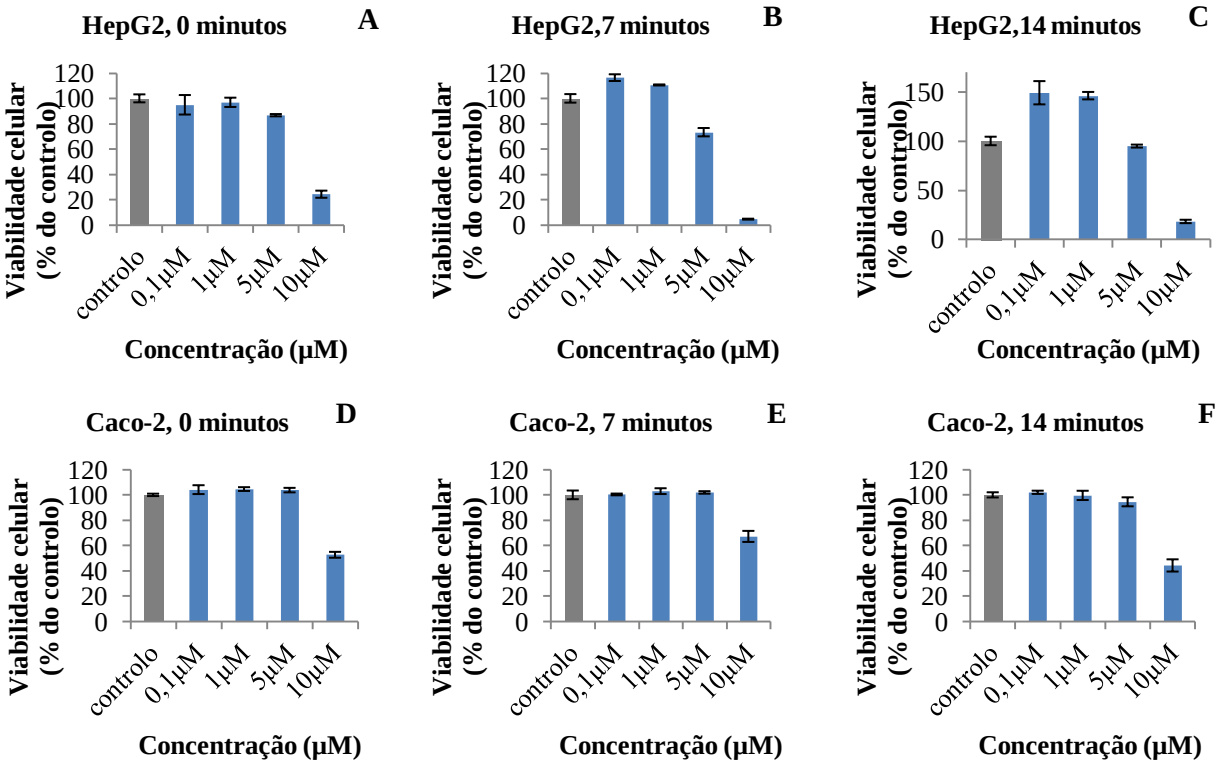



**Figura 2.20** Efeito citotóxico do corante esquarílicos **24** nas linhas celulares HepG2 (A, B, C) e Caco-2 (D, E, F), em função da concentração e do tempo de irradiação. As células foram pré-incubadas por 24 horas com o corante, ás concentrações indicadas, e depois sujeitas a irradiação por 7 (B e E) ou 14 minutos (C e F) com LED's centrados a 660 nm. Fez-se um controlo não irradiado (A e D) que foi mantido no escuro por 14 minutos. Resultados representam valores médios ± S.D.

### 2.7.2.3.7 Composto 25

Para o composto **25** foram utilizados os resultados obtidos por exposição durante mais 1 h após irradiação. Todos os resultados são analisados e comparados com o controlo não exposto e não irradiado.

Nas células HepG2 não irradiadas (Figura 2.21**A**), verificou-se que 10 µM do composto se mostrou citotóxico no escuro. Na Figura 2.21 **B**, célulasirradiadas durante 7 minutos, só a concentração de 10 µM que já era citotóxica no escuro, reduziu a viabilidade. Na Figura 2.21 **C**, células irradiadas durante 14 minutos, verificou-se uma ligeira descida da viabilidade (cerca de 30 %) para a concentração de 5 µM mantendo-se a toxicidade da concentração de 10 µM.

Nas células Caco-2 (Figura 2.21 **D**) não irradiadas somente 10 µM reduziu a viabilidade celular em 20 %, sendo as outras concentrações não citotóxicas. A irradiação durante 7

minutos ou 14 minutos (Figura 2.21 **E** e **F**, respectivamente) só produziu uma descida acentuada da viabilidade celular para a concentração de 10 μM relativamente aos resultados do controlo, sendo mais acentuada para 7 minutos de irradiação.

O composto **25** apresenta-se carregado negativamente, segundo a literatura (Robertson *et al.*, 2009), compostos com duas ou mais cargas negativas penetram mais facilmente a membrana plasmática e por isso produzem mais efeito, no entanto tal não se verificou nestes ensaios. Segundo os resultados apresentados o composto **25** não apresenta os requisitos necessários para ser utilizado como fotossensibilizador em PDT uma vez que quando irradiado não produz efeitos citotóxicos significativos a nível celular.

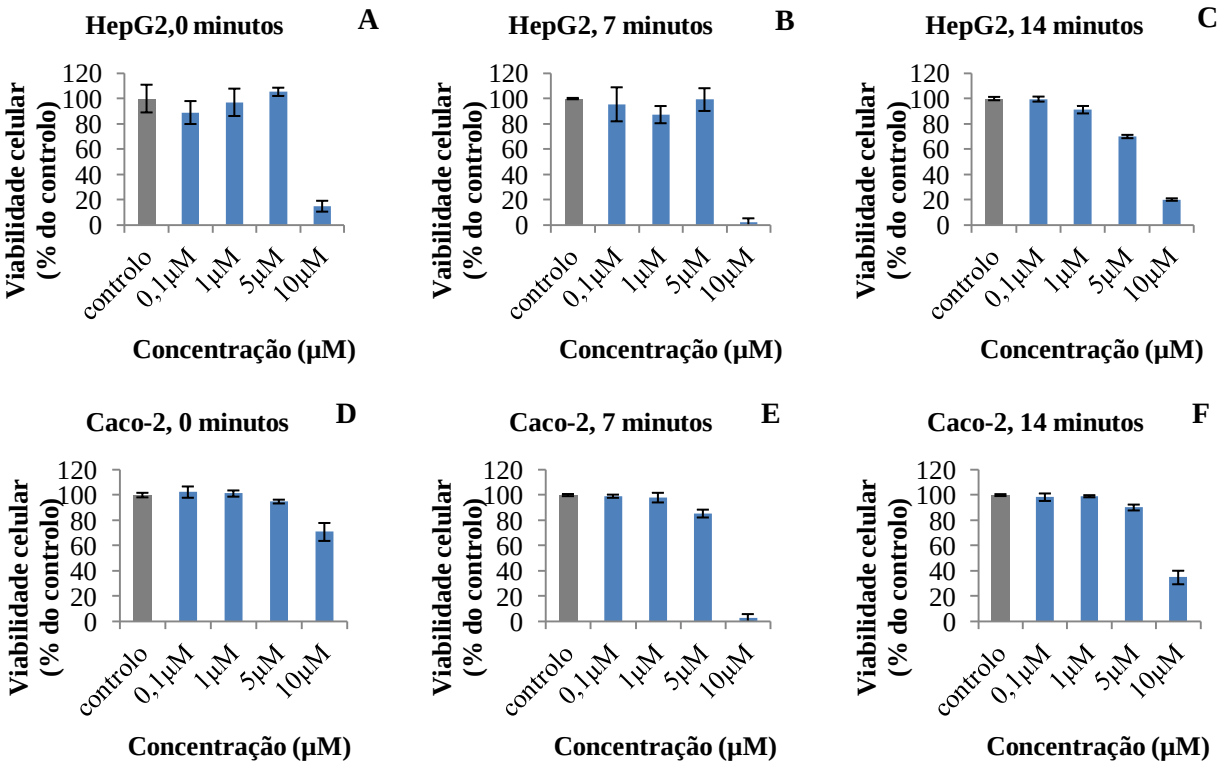



**Figura 2.21** Efeito citotóxico do corante esquarílico **25** nas linhas celulares HepG2 (A, B, C) e Caco-2 (D, E, F), em função da concentração e do tempo de irradiação. As células foram pré-incubadas por 24 horas com o corante, ás concentrações indicadas, e depois sujeitas a irradiação por 7 (B e E) ou 14 minutos (C e F) com LED's centrados a 660 nm. Fez-se um controlo não irradiado (A e D) que foi mantido no escuro por 14 minutos. Resultados representam valores médios ± S.D.

### 2.7.2.3.8 Composto 27

Para o composto **27** selecionaram-se os dados resultantes da exposição ao corante por mais 1 h após irradiação. Todos os resultados de viabilidade celular foram analisados e comparados com um controlo não irradiado.

Na Figura 2.22 **A**, células HepG2, não irradiadas, apenas a 10 µM, o composto teve um efeito citotóxico no escuro (reduzindo em cerca de 80 % a viabilidade celular. Na irradiação durante 7 minutos (Figura 2.22 **B**) e 14 minutos (Figura 2.22 **C**) verificou-se que 1; 5 e 10 µM reduziram totalmente a viabilidade celular.

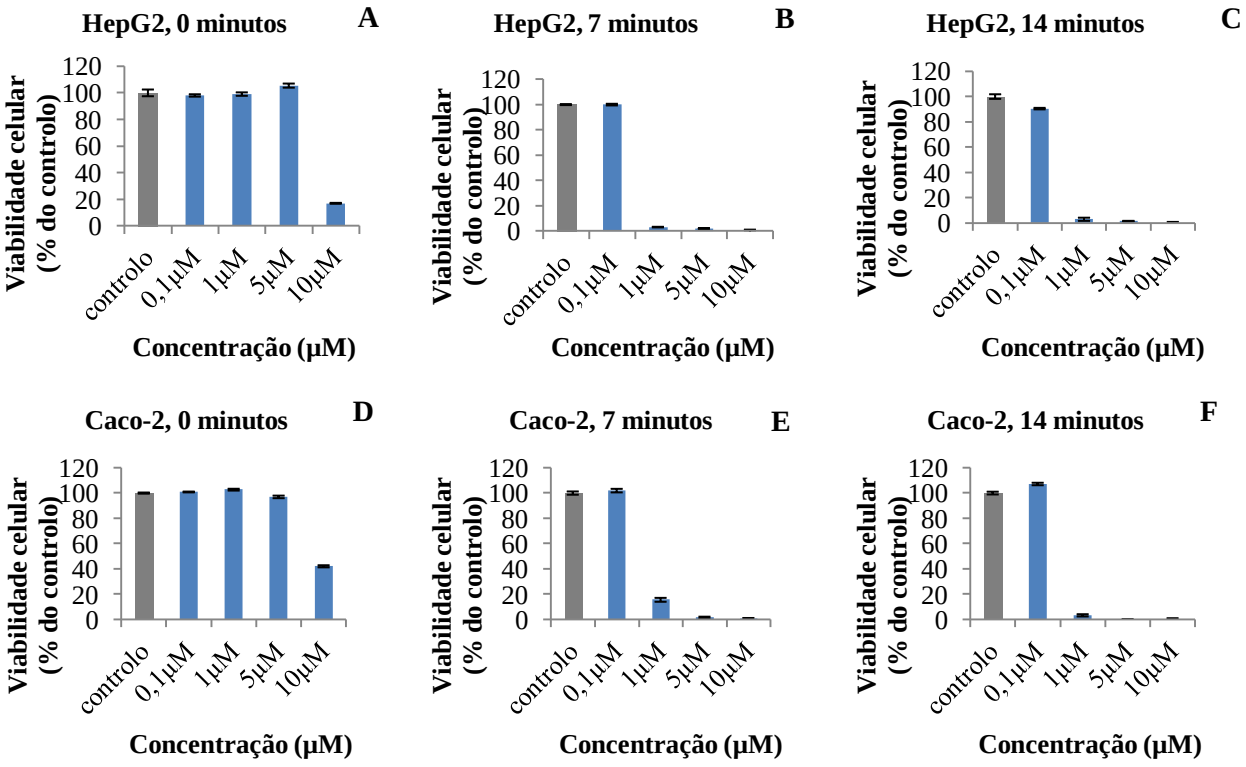



**Figura 2.22** Efeito citotóxico do corante esquarílico **27** nas linhas celulares HepG2 (A, B, C) e Caco-2 (D, E, F), em função da concentração e do tempo de irradiação. As células foram pré-incubadas por 24 horas com o corante, ás concentrações indicadas, e depois sujeitas a irradiação por 7 (B e E) ou 14 minutos (C e F) com LED's centrados a 660 nm. Fez-se um controlo não irradiado (A e D) que foi mantido no escuro por 14 minutos. Resultados representam valores médios ± S.D.

Nas células Caco-2, os resultados foram idênticos aos obtidos nas células HepG2, embora esta última demonstrasse maior sensibilidade ao composto. Sendo assim pode-se concluir que em concentrações mais baixas que 10 µM o composto não apresenta

citotoxicidade no escuro, que a cultura celular HepG2 é ligeiramente mais sensível à acção deste corante, que o efeito citotóxico a nível celular é dependente do tempo de irradiação sendo aos 7 minutos atingido o máximo e que as concentrações de 1; 5 e 10 μM reduzem eficazmente a viabilidade celular para ambas as culturas celulares quando irradiados.

Por estas razões pode-se afirmar que o composto **27** pode ser utilizado como eficiente fotossensibilizador na PDT.

## 2.8 Conclusões

Relativamente à primeira fase deste trabalho, que envolveu a síntese e caracterização dos corantes cianínicos aminoesquarílicos simétricos e assimétricos, podem-se tirar as seguintes conclusões:

- o sal quaternário de amónio **2**, foi facilmente obtido, com rendimento bastante satisfatório.

- o composto zwiteriónico **4** assim como o seu derivado *O*-metilado **5**, foram também sintetizados de uma forma simples, e o método de recristalização utilizado demonstrou-se ser bastante eficaz, permitindo a obtenção de rendimentos bastante bons, embora fossem ligeiramente mais baixos do que os encontrados na literatura.

- a síntese dos corantes cianínicos aminoesquarílicos **6**-**9**, também se demonstrou bastante simples e eficaz, assim como a troca do contra-ião $CF_3SO_3^-$ por $I^-$, sendo os rendimentos obtidos de uma forma geral mais elevados do que os encontrados na literatura.

Relativamente à síntese dos novos corantes esquarílicos assimétricos:

- o composto **11**, foi facilmente obtido com rendimento satisfatório e está de acordo com o encontrado na literatura.

- para o composto **12**, o método B mostrou-se mais eficaz, obtendo-se rendimentos mais elevados e o mesmo sucedeu com o composto **13**, onde o método sintético B, pelo qual se optou, apresenta uma dificuldade acrescida em relação aos outros compostos, no entanto o rendimento obtido foi bastante bom.

-a síntese do sal quaternário de amónio **14**, foi realizada de acordo com um método simples e foi obtido com rendimentos muito satisfatório que vai ao encontro dos referidos na literatura.

- durante a síntese do composto **16**, não foi possível a sua purificação devido aos métodos utilizados, que necessitavam de um aperfeiçoamento, e por isso para obtenção dos corantes finais, teve de se optar por uma via sintética diferente, dando origem ao composto **17**, com rendimento bastante bom.

- o composto **18** foi facilmente sintetizado, e obtido com um rendimento excelente. No que diz respeito ao corante cianínico zwiteriónico **19** e ao seu derivado *O*-metilado (**20**), ambos foram obtidos com bons rendimentos, no entanto o composto **19**, apresentou alguma dificuldade na sua recristalização, havendo necessidade de optimizar o método.

- em relação à síntese dos novos corantes (**19**-**27**), pode-se concluir que para todos eles o método sintético foi considerado eficaz, à exceção dos compostos **23** e **24**, que apresentam rendimentos bastante baixos, o que se deveu à dificuldade encontrada no método de recristalização utilizado, pelo que este necessita de ser optimizado.

Quanto à caracterização espectroscópica dos compostos, os dados estavam concordantes com as estruturas moleculares propostas, e os que foram possível comparar, estavam também concordantes com os valores encontrados na literatura.

Relativamente aos rendimentos quânticos na formação de oxigénio singuleto, demonstrou-se, tal como referido na literatura, que a introdução de átomos pesados de iodo, aumentam estes valores, no entanto os rendimentos obtidos para os compostos **19** a **27** foram relativamente baixos.

Em relação ao estudo feito sobre o efeito do tempo de exposição das células aos compostos, após irradiação, conclui-se que para os compostos **19** e **27**, as 24 h de exposição potenciam a redução da viabilidade celular relativamente à 1 h de exposição depois da irradiação, ao contrário do que acontece nos compostos **24** e **25**.

Nas células Caco-2 verificou-se uma ligeira descida da viabilidade celular, para os compostos **19**, **24**, **25** e **27**, quando sujeitos a 24 h de exposição após irradiação. Nos restantes compostos não ocorreram alterações, concluindo-se então que na linha celular Caco-2, a redução da viabilidade celular provocada pelos compostos **19**, **24**, **25** e **27** é favorecida por um tempo exposição de 24 h após irradiação.

Quanto ao efeito da irradiação em células não expostas aos corantes esquarílicos simétricos e assimétricos, pode-se então concluir que a viabilidade, não é influenciada por fatores capazes de induzir stresse como seja a irradiação.

Relativamente aos ensaios de viabilidade celular, para o composto **4** conclui-se que as células Caco-2 apresentam maior sensibilidade em relação às HepG2. De uma forma geral o composto não apresenta citotoxicidade no escuro, fator crucial na escolha de um fotossensibilizador, concluindo-se também que as concentrações de 1; 5 e 10 μM reduziram eficazmente a viabilidade celular quando irradiadas, levando a crer que este composto pode ser eficazmente utilizado como fotossensibilizador em terapia fotodinâmica do cancro.

Para o composto **6**, conclui-se que as células HepG2 apresentam maior sensibilidade que as células Caco-2, sendo as concentrações mais elevadas, 5 e 10 μM, citotóxicas no escuro para ambas as células, sendo a concentração de 1 μM ainda citotóxica para as células HepG2. Conclui-se ainda que não potencia a toxicidade, mas que aos 7 minutos de irradiação,

esta já é máxima não aumentando com 14 minutos de irradiação. Este composto não obedece assim a um dos parâmetros fundamentais para ser um bom fotossensibilizador.

Para o composto **7**, conclui-se que as células HepG2 apresentaram maior sensibilidade, comparando com as células Caco-2. Dado que as concentrações mais elevadas deste composto apresentaram elevada citotoxicidade no escuro, não obedecendo aos parâmetros fundamentais para ser um bom fotossensibilizador, conclui-se também que às concentrações de 1; 5 e 10 μM, o composto é citotóxico, contudo quando irradiado, a citotoxicidade aumentou, mas só ligeiramente. Perante as razões apresentadas conclui-se que o composto **7** não apresenta as características necessárias para ser utilizado como fotossensibilizador em PDT.

Em relação ao composto **8** conclui-se que as concentrações de 1; 5 e 10 μM provocaram perda da viabilidade celular e que o tempo de irradiação tem influência na alteração da viabilidade celular. Contudo aumentando o tempo de irradiação de 7 para 14 minutos, não se verifica um aumento da citotoxicidade. Devido às razões apresentadas, pode-se concluir que o composto **8** não reúne as condições para ser considerado num bom fotossensibilizador para PDT.

Para o composto **9** concluiu-se que à exceção da concentração de 10 μM todas as concentrações podem ser utilizadas, dado que não apresentam citotoxicidade no escuro, que a acção citotóxica do composto depende do tempo de irradiação, que as células HepG2 se apresentam mais sensíveis à acção deste composto, e que apenas a concentração de 1 μM se mostrou eficaz na redução da viabilidade celular, sem apresentar citotoxicidade no escuro. No futuro terá de se testar uma concentração intermédia entre 1 e 10 μM, no entanto com os resultados apresentados pode-se concluir que o composto **9** não reúne as condições necessárias para ser considerado um bom fotossensibilizador.

Relativamente ao composto **19** não apresenta citotoxicidade no escuro, para ambas as culturas celulares, preenchendo assim um dos requisitos mais importantes para a escolha de um bom fotossensibilizador. Após irradiação, as concentrações de 1; 5 e 10 μM reduziram a viabilidade celular. Verificou-se ainda igual sensibilidade ao composto por partedas linhas celulares e que a irradiação durante 7 minutos atingiu o máximo de efeito, não se verificando acréscimo de toxicidade para irradiação de 14 minutos. Este composto quando irradiado, aumenta o seu poder citotóxico. Sendo assim conclui-se que o composto **19** possui todas as características necessárias para ser utilizado como um bom fotossensibilizador em PDT.

Relativamente ao composto **20** pode concluir-se que para ambas as células o composto apresenta baixa citotoxicidade no escuro, sendo apenas 10 μM, a concentração citotóxica.

Verifica-se praticamente a mesma sensibilidade ao composto para as duas linhas celulares. A irradiação das células expostas ao corante, provoca uma grande perda de viabilidade para 10 (citotóxica) e 5 μM de composto. A citotoxicidade do composto é dependente do tempo de irradiação.

Em relação ao composto **21** pode concluir-se que o composto apenas apresenta alguma citotoxicidade no escuro para as concentrações maiores (5 e 10 μM), que as células HepG2 são mais sensíveis à acção do composto **21** no escuro. Conclui-se ainda que às concentrações de 1; 5 e 10 μM o composto tem um elevado efeito citotóxico quando irradiado e que o efeito citotóxico do composto em ambas as linhas celulares é dependente do tempo de irradiação, tendo o máximo já sido atingido aos 7 minutos. Sendo assim o composto **21** apenas pode ser utilizado como fotossensibilizador para PDT, em concentrações iguais ou mais baixas que 5 μM.

Quanto ao composto **22** pode concluir-se que o seu efeito é dependente do tempo de irradiação, que nas concentrações maiores o composto apresenta citotoxicidade no escuro, que as células HepG2 são ligeiramente mais sensíveis à acção do composto quando comparada com as células Caco-2 e, que as concentrações de 1; 5 e 10 μM reduzem totalmente a viabilidade celular quando irradiadas, no entanto são citotóxicas no escuro, sem irradiação. Conclui-se então, segundo os motivos atrás mencionados que o composto **22** não reúne as condições necessárias para ser utilizado como fotossensibilizador em PDT.

Para o composto **23**, conclui-se que a cultura celular HepG2 apresenta maior sensibilidade à acção citotóxica no escuro do composto (a 5 e 10 μM o composto **23** apresenta citotoxicidade no escuro), que o efeito do composto em termos de viabilidade celular é dependente do tempo de irradiação, e que as concentrações de 1; 5 e 10 μM reduziram eficazmente a viabilidade celular quando submetidas a irradiação, sendo que a 10 μM já era citotóxica no escuro. Devido às razões apresentadas o composto **23** não pode ser utilizado como FS em PDT.

Em relação ao composto **24** pode concluir-se que o composto não preenche os requisitos para ser utilizados como fotossensibilizador em PDT, uma vez que quando irradiado não produz efeito citotóxico a nível celular, conclui-se também que, tal como se verificou nos outros corantes, as células HepG2, apresentam ligeiramente maior sensibilidade a este composto.

Já o composto **25** não segue as normas apresentadas na literatura (Robertson *et al*., 2009), que diz que compostos com duas ou mais cargas negativas penetram mais facilmente a

membrana plasmática e por isso produzem mais efeito, no entanto tal não se verificou nestes ensaios. Segundo os resultados apresentados o composto **25** não apresenta os requisitos necessários para ser utilizado como fotossensibilizador em PDT uma vez que quando irradiado não produz efeitos citotóxicos significativos a nível celular.

E por fim para o composto **27** pode-se concluir que este pode ser utilizado como eficiente fotossensibilizador na PDT, uma vez que apenas em concentrações mais baixas que 10 μM o composto não apresenta citotoxicidade no escuro, que a cultura celular HepG2 é ligeiramente mais sensível à acção deste corante, que o efeito citotóxico a nível celular é dependente do tempo de irradiação sendo aos 7 minutos atingido o máximo e que as concentrações de 1; 5 e 10 μM reduzem eficazmente a viabilidade celular para ambas as culturas celulares quando irradiados.

Pode ainda concluir-se que o corante que apresenta um maior rendimento quântico de oxigénio singuleto (**24**) não é o que apresenta melhor comportamento em relação às linhas celulares estudadas. Isto pode sugerir que o mecanismo de acção neste caso, não envolve a espécie citotóxica oxigénio singuleto, mas sim outras espécies ROS.

Tendo em conta os resultados gerais do trabalho, pode-se então concluir que os compostos **4**, **19**, **21** e **27** apresentam potencial para serem utilizados como eficientes fotossensibilizadores do cancro no futuro, sendo a ordem de potência **19**> **4**> **27**> **21.**

.

# Capítulo 3.

## RESULTADOS EXPERIMENTAIS

## 3.1 Reagentes e Equipamentos

Os reagentes utilizados e cuja síntese não foi efectuada durante o trabalho experimental, são analiticamente puros (p.a.) e foram adquiridos comercialmente.

O $CH_2Cl_2$ foi previamente seco com $CaCl_2$ e refluxado sob $CaH_2$ de acordo com os métodos padronizados na literatura (Perrin *et al.*, 1988).

A evolução das reacções foi controlada por c.c.f. utilizando para isso, placas de silíca-gel (Merck, 60 $F_{254}$, espessura de 0,25 mm).

Os eluentes utilizados em c.c.f, foram $CH_2Cl_2$ ou uma mistura de MeOH/$CH_2Cl_2$ (2%, v/v). Após eluição, as placas de cromatografia foram observadas sob luz ultravioleta (UV) nos c.d.o de 366 e/ou 254 nm. As placas correspondentes a reacções de formação de sais quaternários de amónio e aminas, foram também reveladas, pulverizando com solução de Draggendorff (mistura 1/1 (v/v) de nitrato de bismuto 2% (v/v) em solução aquosa de ácido acético 20% (v/v) e iodeto de potássio 40% (v/v) em água), desenvolvendo uma coloração alaranjada nos compostos com azotos básicos.

As fases orgânicas obtidas após tratamento das misturas reaccionais foram secas, usando sulfato de sódio anidro ($Na_2SO_4$).

Os p.f. foram determinados num microscópio binocular (URA Technic, Portugal) com placa aquecida e não foram corrigidos.

Para obtenção e registo dos espectros no UV/Vis foi usado o espetrofotómetro Spectrophotometer Perkin-Elmer Lambda 25, na gama de comprimentos de onda entre 400 e 900 nm. As soluções utilizadas para cada composto foram preparadas usando ou uma mistura de MeOH/$CH_2Cl_2$ (99:1) ou DMSO ou meio de cultura sem soro (DMEM) e posteriormente colocadas numa célula de quartzo (com 1 cm de percurso óptico) para leitura.

Na descrição de cada espectro UV-Vis, os dados encontram-se expostos pela seguinte ordem: valor de c.d.o. correspondente ao máximo de absorção ($\lambda_{máx}$, em nm), logaritmo do valor do coeficiente de extinção molar correspondente a essa banda ($\varepsilon_{máx}$ em $dm^3.mol^{-1}.cm^{-1}$).

Para a obtenção dos espectros no IV foi utilizado o espetrofotómetro UNICAM Research Series FTIR. Na descrição dos espectros os dados obtidos encontram-se expostos pela seguinte ordem: estado físico da amostra [KBr (em pastilhas de brometo de potássio)]; frequência do máximo de uma banda de absorção ($\upsilon_{máx}$ em $cm^{-1}$); tipo de banda [forte (f), média (m), fraca (fr), fraca e larga (frl)]; atribuição dessa banda a um grupo de átomos na molécula.

Os espectros de ressonância magnética nuclear de protão ($^{1}$H-RMN) e de carbono ($^{13}$C-RMN) foram registados nos espectrómetros (Brücker Avance III 400 e Avance III 600) da Universidade da Beira Interior. Todos os espectros foram realizados nos espectrómetros de 600 MHz, com excepção de alguns que foram realizados nos de 400 MHz estando estes assinalados. Na descrição de cada espectro os dados são descritos da seguinte maneira: solvente; desvio químico δ (em ppm); área relativa [nH (como número de protões a que corresponde o sinal)]; multiplicidade do sinal [singuleto (*s*), singuleto largo (*sl*) dupleto (*d*), tripleto (*t*), quarteto (*q*) e multipleto (*m*)]; valor da constante de acoplamento (*J*, em Hz); atribuição a protões da molécula; confirmação de protões lábeis após agitação da amostra com óxido de deutério (troca com $D_2O$).

A obtenção dos espectros de massa foi conseguida num espectrómetro micro TDF (focus) (Brücker Daltonics) nos serviços de Espectrometria de massa do C.A.C.T.I. da Universidade de Vigo, num espectrómetro (Micromass e AutoSpec M.). Na descrição dos espectros obtidos, os dados estão indicados da seguinte forma: razão massa/carga do ião molecular (m/z); fórmula molecular e massa exacta calculada para o ião molecular correspondente.

O Oxigénio singuleto foi medido no Centro de Química-Física Molecular, do Instituto Superior Técnico, Universidade Técnica de Lisboa, utilizando um sistema equipado com um laser de azoto e um sistema de detecção com fotodiodo InGaAs (PDA) (Andor, modelo i-Dus, a 60 ºC). Este detector permite a aquisição de sinais na região próximo do Infra-vermelho (700-1700 nm), que não são possíveis de adquirir usando um detector de UV-Visível normal (cerca de 200 a 800 nm). Para avaliar a eficácia na produção oxigénio singuleto por parte dos corantes esquarílicos, os rendimentos quânticos na formação de Oxigénio singuleto ($\varphi\Delta$) foram medidos, em clorofórmio a 337nm, com densidade óptica de 0,6, utilizando como padrão a Fenazina.

Na cultura de células foram utilizados frascos ventilados com filtro (Orange Scientific) e placas de cultura de 96 poços (Orange Scientific). A manutenção das células foi efectuada numa incubadora de $CO_2$ (Binder CB150), a uma temperatura de 37°C com uma humidade controlada e 5% $CO_2$/ 95% ar.

Passando à aplicação dos compostos orgânicos nas linhas celulares, para tal utilizou-se sempre material esterilizado e descartável e todo o processo foi efectuado em câmara de fluxo laminar (Classe II) a fim de evitar possíveis contaminações.

O meio base de cultura utilizado foi o DMEM (Ref. 21969 GIBCO, Alfagene, Portugal), armazenado no frigoríficoa 4ºC, com 4,5 g/L de glicose e 0,11 g/L de piruvato de sódio (sem L-glutamina pois este composto sofre degradação ao longo do tempo).

Na observação das placas de cultura foi utilizado o microscópio invertido (Olympus) e para a leitura das absorvâncias usou-se o espetrofotómetro de microplacas (Labysistems Multiskan Ex).

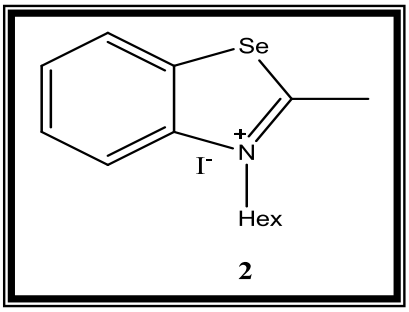
Para as pipetagens utilizaram-se pipetas de Pasteur, pipetas graduadas, micropipetas (Gilson) e micropipeta multi-canal.

O sistema LED para irradiação das células foi idealizado e desenvolvido em conjunto com o Professor José Ramiro Fernandes do Departamento de Física, Escola de Ciências e Tecnologia da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro.

## 3.2 Síntese dos corantes esquarílicos simétricos

### 3.2.1 Síntese Prévia

#### 3.2.1.1 Síntese do iodeto de 3-hexil-2-metilbenzoselenazólio (2)



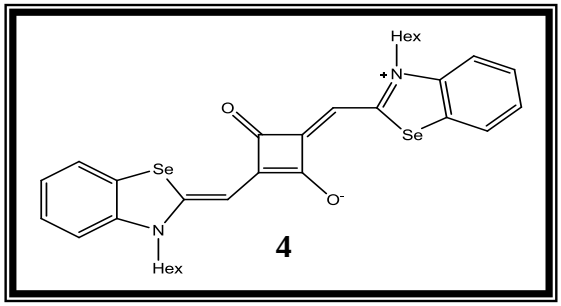
**2**

Fez-se reagir 2-metilbenzoselenazol (**1**) (7,0 g; 36 mmol) e 1-iodo-hexano (15,8 mL; 110 mmol) em acetonitrilo (100 mL), a refluxo e sob agitação. A evolução da reacção foi seguida por c.c.f. (sílica, $CH_2Cl_2$/MeOH 2%). Após 7 dias de reacção, a mistura reaccional obtida foi previamente arrefecida em banho de gelo, tendo-se adicionado éter dietílico para precipitar o produto. O precipitado foi recolhido por filtração a pressão reduzida e os cristais obtidos, lavados com éter dietílico. Ao filtrado, após remoção do éter a pressão reduzida, foi adicionado mais um equivalente molar de iodo-hexano e colocado novamente a refluxo durante cinco dias para obtenção de mais produto. Este procedimento foi repetido mais 2 vezes a fim de melhorar o rendimento da reacção.

Deste modo, foi obtido iodeto de 3-hexil-2-metilbenzoselenazólio com um rendimento de 97 %, na forma de cristais bege, apresentando: p.f. 121-123$^o$C(dec), ([132-133$^o$C]; Pardal *et al.*, 2002).IV $\upsilon_{máx}$ (KBr): 3054 (fr), 2912 (f), 2842 (f), 1555 (fr), 1520 (m), 1438 (f), 1367

(m), 1319 (f), 1178 (m), 989 (fr), 754 (f), 718 (m) $cm^{-1}$.Este espectro coincide com o reportado na literatura (Pardal *et al*., 2002).

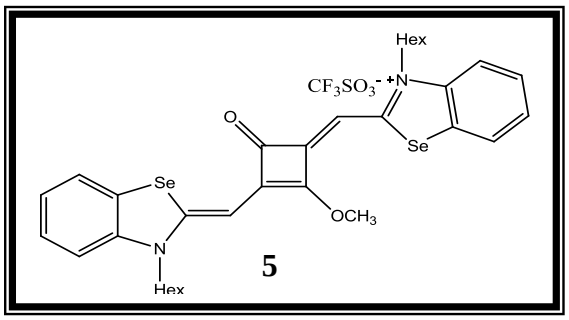
### 3.2.1.2 Síntese do 4-[(3-hexilbenzoselenazol-3-io-2-il)metilideno]-2-[(3-hexil-3H- -benzoselenazol-2-ilideno)metil]-3-oxociclobut-1-en-1-olato (4)



**4**

Levou-se a refluxo, sob agitação, iodeto de 3-hexil-2-metilbenzoselenazólio (**2**) (4,002 g; 9,804 mmol) com ácido esquárico (**3**) (0,562 g; 4,902 mmol) em butanol/piridina a 10% (v/v) (100,0 mL). A reacção foi seguida por c.c.f (sílica, $CH_2Cl_2$/MeOH 2%) até consumo completo do material de partida (3h e 30 min.). A mistura reaccional obtida foi arrefecida em banho de gelo e adicionado éter etílico para que ocorresse a precipitação completa do produto. Após filtração do resíduo obtido a pressão reduzida, este foi lavado com éter etílico seguido de água destilada gelada, obtendo-se o composto 4-[(3-hexilbenzoselenazol-3-io-2-il)metilideno]-2-[(3-hexil-3H- -benzoselenazol-2-ilideno)metil]-3-oxociclobut-1-en-1-olato(**4**) com um rendimento de 60%, na forma de cristais dourado-metálico apresentando: p.f. 261 ºC (dec) ([262ºC]; Reis *et al*., 2009); UV/Vis $\lambda_{máx}$ (DMSO): 667nm.IV $\upsilon_{máx}$ (KBr): 3055 (fr, ArC-H), 2951 (fr, C-H*alif.*), 2921 (fr, C-H*alif.*), 2850 (fr, C-H*alif.*), 1587 (m, ArC=C), 1442 (f), 1407 (f), 1445 (fr), 1284 (fr), 1212 (f, C-O), 1073 (f), 945 (fr), 813 (fr), 741 (fr) $cm^{-1}$. Este espectro coincide com o reportado na literatura (Reis *et al*., 2009).

### 3.2.1.3 Síntese do trifluorometanossulfonato de 3-hexil-2-[3-(3-hexil-3H-benzoselenazol-2-ilidenometil)-2-metoxi-4-oxociclobut-2-enilidenometilbenzoselenazol-3-io (5)



**5**

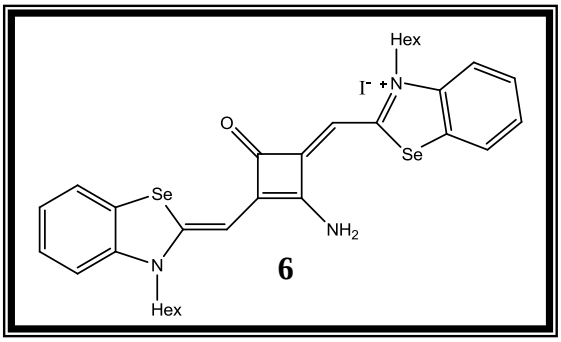
Fez-se reagir o 4-[(3-hexilbenzoselenazol-3-io-2-il)metilideno]-2-[(3-hexil-3H-benzoselenazol-2-ilideno)metil]-3-oxociclobut-1-en-1-olato (**4**) (1,965 g; 3,1 mmol) e trifluorometanossulfonato de metilo (1,052 mL; 9,3 mmol) em diclorometano seco

(aproximadamente 100 mL) à temperatura ambiente, sob atmosfera de azoto e em agitação. A evolução da reacção foi seguida por c.c.f (sílica, $CH_2Cl_2$/MeOH 2%) até consumo completo do material de partida (4 h e 30 min).

A mistura reaccional obtida foilavada duas vezes na solução aquosa de hidrogenocarbonato de sódio a 4% (p/v), seguida de água destilada. Após separação, as fases orgânicas foram reunidas e secas sobre sulfato de sódio anidro. Após remoção do solvente a pressão reduzida e recristalizaçãocom diclorometano/éter etílico foi obtido o trifluorometanossulfonato de 3-hexil-2-[3-(3-hexil-3H-benzoselenazol-2-ilidenometil)-2-metoxi-4-oxociclobut-2-enilidenometilbenzoselenazol-3-io(**5**) com um rendimento de 67%, na forma de cristais roxos cromatograficamente purosapresentando: p.f. 248 ºC (dec.) ([249ºC], Reis *et al*., 2009);UV/Vis $\lambda_{máx}$ (DMSO): 651nm.IV $\upsilon_{máx}$ (KBr): 3060 (fr, ArC-H), 2927 (fr, C-H*alif.*), 2862 (fr), 1643 (fr, C=O), 1579 (fr, ArC=C) 1510 (fr, ArC=C), 1416 (f), 1352 (m), 1352 (m), 1246 (f, C-O), 1113 (f), 1118 (m), 970 (fr), 825 (fr), 756 (fr), 636 (fr) $cm^{-1}$. Este espectro coincide com o reportado na literatura (Reis *et al*., 2009).

### 3.2.2 Síntese dos corantes aminoesquarílicos simétricos

#### 3.2.2.1 Síntese do iodeto de2-[2-amino-3-(3-hexil-3H-benzoselenazol-2-ilidenometil)-4-oxo-ciclobut-2-enilidenometil]-3-hexilbenzoselenazo-3-io (6)



**6**

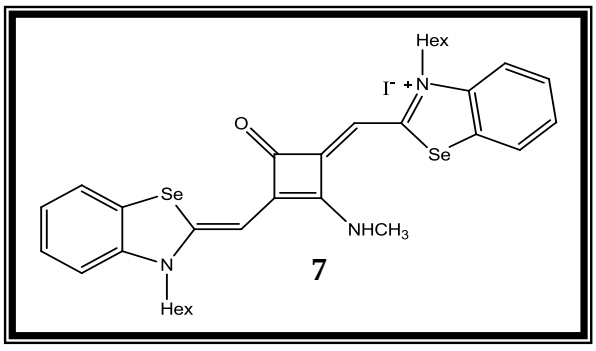
Fez-se reagir o trifluorometanossulfonato de 3-hexil-2-[3-(3-hexil-3H-benzoselenazol-2-ilidenometil)-2-metoxi-4-oxociclobut-2-enilidenometil]benzoselenazol-3-io (**5**) (0,200 g; 0,249 mmol) com amónia em metanol 2 N (0,62 mL; 1,24 mmol) em diclorometano seco (aproximadamente 15 mL) à temperatura ambiente, sob atmosfera de azoto e com agitação. A evolução da reacção foi seguida por c.c.f (sílica, $CH_2Cl_2$/MeOH 2%) até consumo completo do material de partida (2 h).

A mistura reaccional obtida foi vertida numa ampola de extracção e lavada com água destilada (2x50 mL). Após separação, as fases orgânicas foram reunidas e secas sobre sulfato de sódio anidro. Após filtração e remoção do solvente a pressão reduzida e recristalização

com diclorometano/éter etílicoos cristais resultantes fizeram-se reagir com 15 mL de MeOH e 15 mL de uma solução aquosa de KI (14%) (2 horas).Oprecipitado resultante foi recolhido por filtração a pressão reduzida e os cristais obtidos, lavados várias vezes com $H_2O$ e éter dietílico previamente arrefecido e recristaizados com éter dietílico e $CH_2Cl_2$.Foi então obtido oiodeto de 2-[2-amino-3-(3-hexil-3H-benzoselenazol-2-ilidenometil)-4-oxo-ciclobut-2-enilidenometil]-3-hexilbenzoselenazol-3-io (**6**), após recristalização com éter dietílico e diclorometano, com um rendimento de 68 % , na forma de cristais azuis-roxeados, cromatograficamente puros apresentando: p.f. 280-282$^o$C (dec) ([281$^o$C],Gomes, 2010) ; UV/Vis $\lambda_{máx}$ (DMSO): 668 nm; IV $\upsilon_{máx}$ (KBr): 3262 (fr, N-H), 3110 (fr, N-H), 2922 (fr, C-H*alif.*), 2840 (fr), 1630 (fr, C=O), 1501 (f), 1418 (f), 1349 (f), 1218 (f), 1078 (f), 961 (f), 734 (m) $cm^{-1}$. Este espectro está de acordo com o publicado na literatura (Gomes, 2010).

### 3.2.2.2 Síntese do iodeto de 3-hexil-2-[3-(3-hexil-3H-benzoselenazol-2-ilidenometil)-2-metilamino-4-oxo-ciclobut-2-enilidenometil]benzoselenazol-3-io(7)

Fez-se reagir o trifluorometanossulfonato de 3-hexil-2-[3-(3-hexil-3H-benzoselenazol-2-ilidenometil)-2-metoxi-4-oxociclobut-2-enilidenometilbenzoselenazol-3-io (**5**) (0,200 g; 0,249 mmol) com metilamina 2 M em THF (0,062 mL; 1,24 mmol) durante 4 horas.



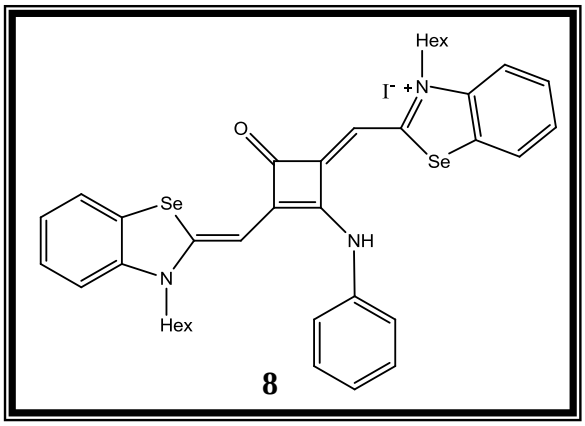
**7**

Após o tratamento da reacção de acordo com o método referido em 3.2.2.1, os cristais resultantes fizeram-se reagir durante 2 horas, com 15 mL de MeOH e 15 mL de uma solução aquosa de KI (14%). O precipitado resultante foi recolhido por filtração a pressão reduzida e os cristais obtidos, lavados várias vezes com $H_2O$ e éter dietílico previamente arrefecido e recristaizados com éter dietílico e $CH_2Cl_2$. Foi então obtido o iodeto de 3-hexil-2-[3-(3-hexil-3H-benzoselenazol-2-ilidenometil)-2-metilamino-4-oxo-ciclobut-2-enilidenometil]benzoselenazol-3-io (**7**) com um rendimento de 70% na forma de cristais roxos, cromatograficamente purosapresentando: p.f. 240-241 ºC (dec.)([240$^o$C], Reis *et al.*,

2002); UV/Vis $\lambda_{máx}$ (DMSO): 678 nm; IV $\upsilon_{máx}$ (KBr): 3145 (fr), 3039 (fr, N-H), 2910 (fr, C-H*alif.*), 2850 (fr), 1629 (fr, C=O), 1559 (m), 1502 (fr), 1449 (m), 1421 (f), 1342 (m), 1236 (f), 1208 (f), 1189 (f), 1106 (f), 980 (m), 755 (fr), 740 (fr) $cm^{-1}$.

### 3.2.2.3 Síntese do iodeto de2-[2-fenilamino-3-(3-hexil-3H-benzoselenazol-2-ilidenometil)-4-oxociclobut-2-enilidenometil]-3-hexilbenzoselenazol-3-io (8).

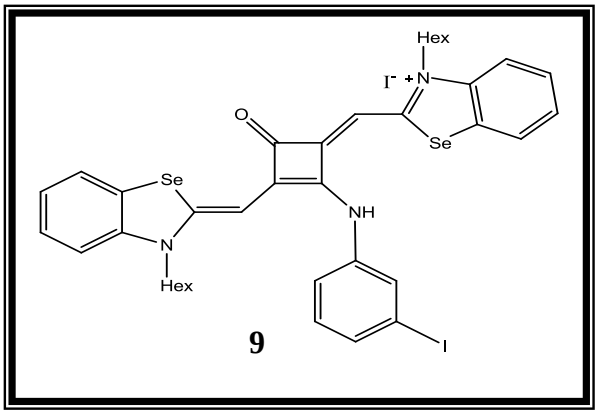
Fez-se reagir o trifluorometanossulfonato de 3-hexil-2-[3-(3-hexil-3H-benzoselenazol-2-ilidenometil)-2-metoxi-4-oxociclobut-2-enilidenometilbenzoselenazol-3-io (**5**) (0,200 g; 0,249 mmol), anilina (0,170mL; 1,87 mmol), 4-(dimetilamino)piridina (0,0151 g; 0,124 mmol), trietilamina (0,017 mL; 0,124 mmol), durante 4 dias.



**8**

Após tratamento da reacção, os cristais resultantes fizeram-se reagir durante 2 horas, com 15 mL de MeOH e 15 mL de uma solução aquosa de KI (14%). Oprecipitado resultante foi recolhido por filtração a pressão reduzida e os cristais obtidos, lavados várias vezes com $H_2O$ e éter dietílico previamente arrefecido e recristaizados com éter dietílico e $CH_2Cl_2$e então obteve-se oiodeto de 2-[2-fenilamino-3-(3-hexil-3H-benzoselenazol-2-ilidenometil)-4-oxociclobut-2-enilidenometil]-3-hexilbenzoselenazol-3-io(**8**) após recristalização com éter e diclorometano, com um rendimento de 46% na forma de cristais roxos, cromatograficamente puros apresentando: p.f.259-260 ºC ([258-260$^{o}$C], Reis *et al.*, 2002); UV/Vis $\lambda_{máx}$ (DMSO): 670 nm; IV $\upsilon_{máx}$ (KBr): 3005 (fr, N-H) 2922 (fr, C-H*alif.*), 2875 (fr), 1619 (fr, C=O), 1536 (m), 1443 (f), 1336 (m), 1255 (f), 1175 (m), 1157 (m), 1134 (m), 983 (fr), 749 (fr), $cm^{-1}$. Este espectro encontra-se de acordo com o publicado na literatura (Reis *et al.*, 2002).

### 3.2.2.4 Síntese do iodeto de 2-[2-(3-iodofenilamino)-3-(3-hexil-3H-benzoselenazol-2-ilidenometil)-4-oxo-ciclobut-2-enilidenometil]-3-hexilbenzoselenazol-3-io (9).




**9**

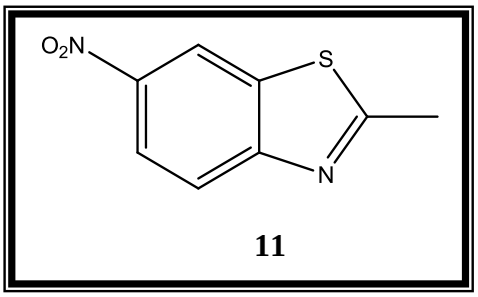
Fez-se reagir o trifluorometanossulfonato de 3-hexil-2-[3-(3-hexil-3H-benzoselenazol-2-ilidenometil)-2-metoxi-4-oxociclobut-2-enilidenometilbenzoselenazol-3-io (**5**) (0,200 g; 0,249 mmol), iodoanilina (0,272 g; 1,24 mmol), 4-(dimetilamino)piridina (0,0151 g; 0,124 mmol), trietilamina (0,017 mL; 0,124 mmol) de acordo com o método descrito em 3.2.2.3, durante5 dias.

Após tratamento da reacção,os cristais resultantes fizeram-se reagir durante 2 horas, com 15 mL de MeOH e 15 mL de uma solução aquosa de KI (14%). Oprecipitado resultante foi recolhido por filtração a pressão reduzida e os cristais obtidos, lavados várias vezes com $H_2O$ e éter dietílico previamente arrefecido e recristaizados com éter dietílico e $CH_2Cl_2$ e obteve-se o iodeto de 2-[2-(3-iodofenilamino)-3-(3-hexil-3H-benzoselenazol-2-ilidenometil)-4-oxo-ciclobut-2-enilidenometil]-3-hexilbenzoselenazol-3-io(**9**) após recristalização com éter e diclorometano, com um rendimento de 75% na forma de cristais roxos, cromatograficamente puros, apresentando: p.f.252-257 ºC([261-263ºC], Reis *et al*., 2009); UV/Vis $\lambda_{máx}$ (DMSO): 667 nm; IV $\upsilon_{máx}$ (KBr): 3149 (fr, N-H), 3054 (fr, ArC-H), 2924 (fr; C-H*alif.*), 2866 (fr), 1563 (m), 1507 (fr), 1446 (m), 1415 (m), 1334 (m), 1237 (f), 1207 (f), 1181 (f), 1099 (f), 978 (fr), 741 (fr) $cm^{-1}$. Este espectro está de acordo com o publicado na literatura (Reis *et al.*, 2009).

## 3.3 Síntese dos corantes esquarílicos assimétricos

### 3.3.1 Sínteses prévias

#### 3.3.1.1 Síntese do 2-metil-6-nitro-benzotiazol (11)

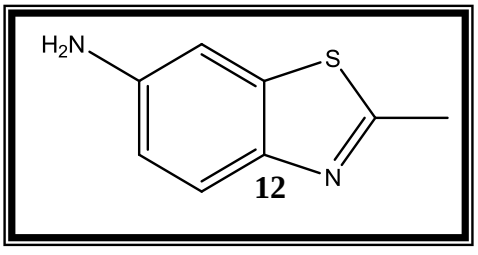



**11**

A uma mistura de 2-metil-benzotiazol (**10**) (5,87 g; 39,4mmol) e $H_2SO_4$ (23 mL) arrefecida em banho de gelo com agitação, foi adicionada lentamente uma mistura de $HNO_3$ (4,7 mL) e $H_2SO_4$ (3,5 mL). A mistura reaccional foi mantida gelada (colocando o balão num gobelé com gelo) e sob agitação durante 3 horas. A evolução da reacção foi seguida por c.c.f. (sílica, $CH_2Cl_2$/MeOH 2%). Terminada a reacção verteu-se toda a mistura reaccional para um gobelé contendo gelo e deixou-se algum tempo para precipitação completa do produto. O precipitado resultante foi recolhido por filtração a pressão reduzida e lavado varias vezes com água destilada gelada, até obtenção de pH neutro. Após recristalização com MeOH, obteve-se então 2-metil-6-nitro-benzotiazol (**11**), com um rendimento de 56%, na forma de agulhas beges, cromatograficamente puro, apresentando: p.f. 168-172ºC (dec) ([167-168ºC], Santos *et al*., 2005) ([168-170ºC], Tabakovic *et al*., 1979). IV $\upsilon_{máx}$ (KBr): 3078 (fr), 1603 (m), 1520 (m), 1556 (m), 1473 (f), 1437 (m), 1344 (f), 1237 (f), 1167 (m), 1060 (fr), 894 (fr), 754 (fr) $cm^{-1}$. Este espectro está de acordo com o referido na literatura (Santos, *et al*., 2005).

#### 3.3.1.2 Síntese do 6-amino-2-metilbenzotiazol (12)

##### 3.3.1.2.1 Método A




**12**

A uma solução de 2-metil-6-nitro-benzotiazol (**11**) (2,811g; 14,5 mmol) em THF(56,2 mL) e MeOH (28,1 mL), foram adicionados Pd/C (1,054 g) e $HCOONH_4$ (13,69 g; 210,8 mmol). A mistura reaccional foi colocada sob agitação constante àtemperatura ambiente durante 3 dias. A evolução da reacção foi seguida por c.c.f. (sílica,

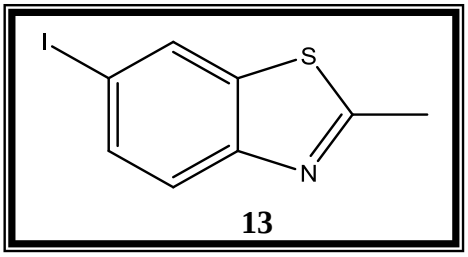
$CH_2Cl_2$/MeOH 2%). Ao fim desse tempo não era notório um avanço significativo da reacção e portanto, teve de se alternar a adição de mais 1-2 equivalentes de Pd/C e de $HCOONH_4$ com o aquecimento (cerca de 50ºC) da mistura reaccional em banho de óleo, até não existir material de partida. Acabada a reacção, a mistura reaccional foi filtrada a pessão reduzida, numa camada de *celite* e lavada com MeOH quente. O filtrado, foi evaporado à secura e o resíduo resultante dissolvido em $CHCl_3$ e lavado com *brine*. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e levada à secura a pressão reduzida. Obteve-se então o 6-amino-2-metilbenzotiazole (**12**) com um rendimento de 49 %, na forma de cristais amarelo-alaranjados, cromatograficamente puros. Esta reacção foi repetida mais 2 vezes, mas sempre sem sucesso, uma vez que se estava a adicionar um excesso muito grande de catalisador e os rendimentos eram muito baixos.

#### 3.3.1.2.2 Método B

A uma mistura de $SnCl_2.2H_2O$ (12,200g) e HCl (14,0 mL) previamente aquecida entre 110-120ºC foi adicionada gota a gota uma solução de 2-metil-6-nitro-benzotiazol (**11**) (2,0g; 10,31 mmol) e ácido acético glacial (50,0 mL). A mistura reaccional foi mantida a refluxo e sob agitação constante durante 90 minutos. A evolução da reacção foi seguida por c.c.f. (sílica, $CH_2Cl_2$/MeOH 2%). Terminada a reacção, a mistura reaccional foi vertida num copo com 200 mL de água destilada gelada, onde se adicionaram pequenas porções de solução aquosa de NaOH (6M) até se atingir um pH=8. O produto foi extraído com éter dietílico, desidratado ($Na_2SO_4$), filtrado e levado à secura. Obteve-se o 6-amino-2-metilbenzotiazole (**12**) na forma de cristais bege, cromatograficamente puros, com um rendimento de 76% apresentando: p.f. 122-124 ºC (dec) ([119-120ºC] Santos, *et al*., 2005).IV $\upsilon_{máx}$ (KBr): 3291 (fr), 3195 (fr), 1603 (f), 1568 (m), 1532 (m), 1426 (m), 1213 (m), 1195 (m), 1037 (fr), 812 (m) $cm^{-1}$. Este espectro está de acordo com o referido na literatura (Santos *et al*., 2005).

### 3.3.1.3 Síntese do 6-iodo-2-metil-benzotiaol (13)

#### 3.3.1.3.1 Método A



**13**

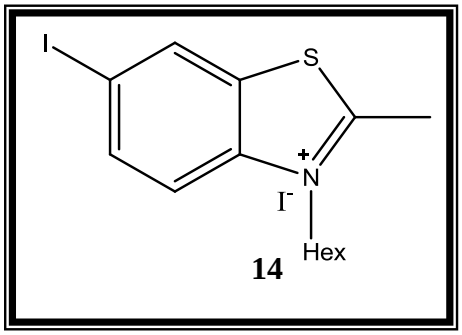
A uma mistura previamente arrefecida a -10ºC em banho de gelo, de 6-amino-2-metilbenzotiazol (**12**) (1,48g; 9,02 mmol) em HCl (4 mL) concentrado e água destilada, foi adicionada gota a gota uma mistura de $NaNO_2$ (1,14g; 16 mmol) e $H_2O$ (5,2 mL) e 30 minutos depois uma mistura de KI (2,59g; 16 mmol) em $H_2O$ (3 mmol). Após agitação durante 10 minutos, a mistura foi aquecida a 30-40ºC durante 15 minutos. A evolução da reacção foi seguida por c.c.f. (sílica, $CH_2Cl_2$/MeOH 2%). O produto pastoso castanho-escuro formado, foi dissolvido em $CH_2Cl_2$ e lavado com uma solução aquosa de $NaHSO_3$ (5%). A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e levada á secura a pressão reduzida. Após múltiplas tentativas de recristalização com EtOH e éter de petróleo, obteve-se um sólido laranja escuro. Este foi novamente recristalizado, desta vez com EtOH e $H_2O$, obtendo-se um sólido laranja claro em forma de agulha, com um rendimento de 42 %. Esta reacção foi efectuada em diferentes escalas tendo-se obtido sempre um rendimento nesta ordem de grandeza.

#### 3.3.1.3.2 Método B

Este processo foi realizado de acordo com um método de iodação referido na literatura (Gorlushko *et al*., 2008). Num almofariz colocou-se a amina aromática anteriormente obtida, 6-amino-2-metilbenzotiazole (**12**) (5,0 g; 30 mmol) juntamente com $H_2O$ (3mL) destilada e a mistura foi triturada durante 5 minutos. Passado esse tempo adicionou-se p-TsOH (17,12 g; 90 mmol) e voltou-se a triturar durante mais 7 minutos tendo-se obtido uma pasta verde acinzentada. Adicionou-se então o reagente de diazotização, $NaNO_2$ (5,18 g; 75 mmol) e triturou-se a mistura durante 10 minutos, obtendo-se um resíduo castanho-escuro. Passados 10 minutos adicionou-se KI (12,45 g; 75 mmol) e triturou-se a mistura durante aproximadamente 15 minutos. Nesta etapa verificou-se a libertação de gases e o aumento de volume da pasta

(castanha alaranjada). O sólido resultante foi tratado com $H_2O$ destilada (100 mL) e solução aquosa de $Na_2SO_3$ (10% (p/v), 225mL), lavado com $H_2O$ e éter dietílico duas vezes. Como o sólido não estava cromatograficamente puro, realizou-se uma cromatografia em coluna de sílica utilizando como eluente $CH_2Cl_2$, as fracções correspondentes ao produto no estado puro, foram reunidas e levadas à secura a pressão reduzida tendo-se obtido o 6-iodo-2-metilbenzotiazole (**13**), com um rendimento de 59%na forma de um pó laranja claro, cromatograficamente puro, apresentando: p.f. 139-140 ºC (dec.) ([140-141ºC], Santos *et al*., 2005). IV $\upsilon_{máx}$ (KBr): 2912 (fr), 1568 (fr), 1520 (fr), 1426 (f), 1285 (fr), 1261 (fr), 1237 (fr), 1167 (m), 800 (f), 730 (fr), 636 (fr) $cm^{-1}$. Este espectro está de acordo com o publicado na literatura (Santos *et al*., 2005).

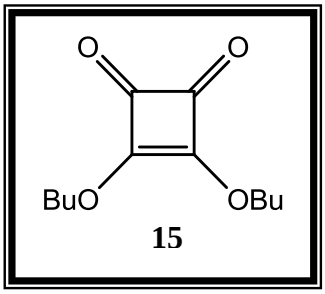
### 3.3.1.4 Síntese do iodeto de 3-hexil-6-iodo-2-metilbenzotiazol-3-io(14)



**14**

Fez-se reagir o 6-iodo-2-metilbenzotiazol (**13**) (3,30 g; 12,0 mmol) e 1-iodohexano (7,63 g; 36,0 mmol) em acetonitrilo (100mL) a refluxo, sob agitação durante 5 dias. A evolução da reacção foi seguida por c.c.f. (sílica, $CH_2Cl_2$/MeOH 2%). Após arrefecimento da mistura reaccional em banho de gelo, adicionou-se éter dietílico para precipitar o produto. O precipitado foi recolhido por filtração a pressão reduzida e os cristais obtidos, lavados várias vezes com éter dietílico previamente arrefecido. Ao filtrado, após remoção de éter a pressão reduzida, foram adicionados mais dois equivalentes molares de iodo-hexano e a mistura colocada a refluxo durante mais 5 dias, segundo o procedimento atrás descrito. Este processo foi repetido 5 vezes até obtenção de um rendimento considerável. Obteve-se então o iodeto de 3-hexil-6-iodo-2-metil-benzotiazol-3-io (**14**), na forma de um pó que varia entre o castanho-escuro e o castanho-claro, dependendo das recolhas, cromatograficamente puro, com um rendimento de 72 %, apresentando: p.f. 209-210 ºC (dec) ([202-203$^o$C], Santos *et al*., 2005).IV $\upsilon_{máx}$ (KBr): 2948 (fr), 2924 (m), 1568 (fr), 1497 (m), 1449 (f), 1379 (m), 1343 (m), 1201 (fr), 800 (f) $cm^{-1}$. Este espectro está de acordo com o publicado na literatura (Santos *et al*., 2005).

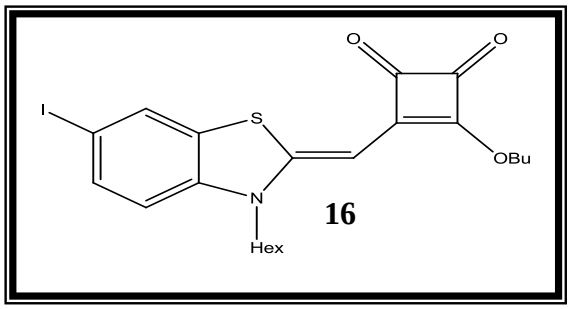
### 3.3.1.5 Síntese de 3,4-dibutoxi-3-ciclobuteno-1,2-diona (15)



**15**

O composto 3,4-dibutoxi-3-ciclobuteno-1,2-diona (**15**), foi sintetizado de acordo com o método descrito na literatura (Yum *et al*., 2007). Uma mistura de ácido esquárico (1 g; 44,0 mmol) e butanol (10 mL) foi colocada a refluxo, sob agitação durante 3 horas. A mistura reaccional foi evaporada em vácuo até permanecer um óleo acastanhado, ao qual se adicionou $Et_2O$, lavou-se várias vezes com água destilada gelada. Após separada a fase orgânica esta foi seca com sulfato de sódio anidro e levou-se á secura sob vácuo. Obteve-se um óleo acastanhado, cromatograficamente puro, com um rendimento de 52%.

### 3.3.1.6 Tentativa de síntese do 6-iodo-3-butoxi-4-[(3-hexilbenzotiazol-2(3H)-ilideno)metil]-3-ciclobuteno-1,2-diona (16)

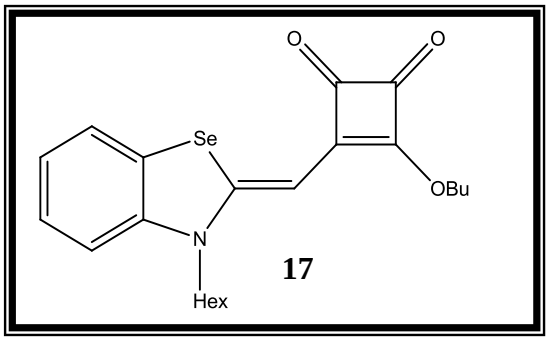


**16**

A síntese do composto**16** foi adaptada da síntese descrita na literatura (Kim *et al*., 2010). A uma mistura de 3,4-dibutoxi-3-ciclobuteno-1,2-diona (**15**) (0,21g; 0,91 mmol), trietilamina (0,14 mL) e EtOH (5 mL), foi lentamente adicionada uma mistura de iodeto de 3-hexil-6-iodo-2-metil-1,3-benzotiazol-3-io (**14**) (0,500 g; 1,0 mmol) e EtOH (3 mL). A mistura reaccional foi colocada sob agitação durante 4 horas a refluxo. A evolução da reacção foi seguida por c.c.f. (sílica, $CH_2Cl_2$/MeOH 2%). Ao fim desse tempo era notória através da avaliação da c.c.f., a presença de uma mancha vermelha com um r.f. inferior e uma mancha amarela com um r.f. superior, que poria em causa o sucesso da reacção. A mistura de produtos foi precipitada do meio reaccional, por adição de EtOH, obtendo-se cristais vermelho-escuros. Para separação dos dois produtos, recorreu-se a uma cromatografia em coluna de sílica, utilizando como eluente $CH_2Cl_2$, no entanto a separação cromatografica não foi bem sucedida uma vez que não se conseguiu obter fracções de cada um dos compostos no estado puro.As várias tentativas de recristalização da mistura dos dois compostos também não permitiram a obtenção dos compostos puros. Devido ao insucesso da purificação destes compostos, este método de síntese foi abandonado, tendo-se optado por sintetizar um composto análogo ao **16** mas em

que no anel aromático não existe o átomo de iodo e a base metilénica de partida foi um derivado do benzoselenoazole. Assim sintetizou-se o composto **17** de acordo com o método apresentado no ponto 3.3.1.6.

### 3.3.1.7 Síntese de 3-butoxi-4-[(3-hexilbenzoselenazol-2(3H)-ilideno)metil]-3-ciclobuten-1,2-diona (17)

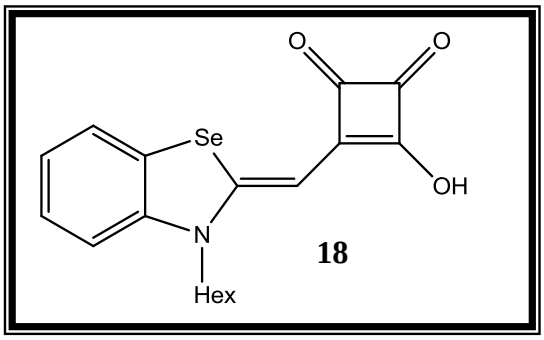



**17**

Fez-se reagir uma mistura de iodeto de 3-hexil-2-metilbenzoselenazólio (**2**) (3,95 g; 9,68 mmol), 3,4-dibutoxi-3-ciclobuteno-1,2-diona (**15**) (1,99 g; 8,80 mmol), EtOH (63,7 mL) e trietilamina (1,35 mL). A mistura reaccional foi colocada a refluxo, sob agitação durante 4 horas.A evolução da reacção foi seguida por c.c.f. (sílica, $CH_2Cl_2$/MeOH 2%). Ao fim desse tempo era notória a formação da mistura de dois produtos (amarelo e vermelho). O produto bruto foi seco a pressão reduzida e diluído em pouco diclorometano. Tentou-se então uma purificação, desta vez bem sucedida, através de cromatografia em coluna de sílica, utilizando como eluente uma mistura de éter de petróleo/ éter dietílico (1:1). As fracções puras do composto amarelo foram recolhidas e o solvente foi removido a pressão reduzida. O composto vermelho não se conseguiu recuperar uma vez que ficava retido no ponto de aplicação da coluna cromatografica. Obteve-se então o produto3-butoxi-4-[(3-hexilbenzoselenazol-2(3H)-ilideno)metil]-3-ciclobuten-1,2-diona (**17**) , com um rendimento de 59%, cromatograficamente puro, em forma de cristais amarelos, apresentando: p.f.104-106ºC (dec.); UV/Vis $\lambda_{máx}$ (DMSO): 448,7 nm, log ε= 5,87; IV $\upsilon_{máx}$ (KBr): 3063 (fr, Ar-H), 2925 (fr, C-H), 1763 (m, C=O), 1546 (f), 1497 (f), 1475 (m), 1417 (f), 1348 (f), 1187 (m), 1050 (fr),757 (fr)$cm^{-1}$. $^1$H-RMN δ (600 MHz, $CDCl_3$): 0,91 (3H,*t*, *J* = 7,0; $OCH_2CH_2CH_2C\underline{H}_3$), 0,99 (3H,*t*, *J* =7,4; $NCH_2(CH_2)_4C\underline{H}_3$),1,32-1,37 (4H, *m*), 1,41-1,48 (4H, *m*), 1,77 (2H, *quint*, $NCH_2C\underline{H}_2(C\underline{H}_2)_3CH_3$), 1,84 (2H, *quint*., $OCH_2CH_2CH_2CH_3$), 3,95 (2H, *t*, *J* = 8,0,$NC\underline{H}_2(CH2)_4CH_3$), 4,78 (2H, *quint*, $OC\underline{H}_2CH_2CH_2CH_2CH_3$), 5,66 (1H, *s*, CH=C), 7,01 (1H, *d*, *J* = 8,2, Ar-H), 7,10 (1H, *t*, *J* = 7,6, Ar-H), 7,33 (1H, *t*, *J* = 8,4, Ar-H), 7,52 (1H, *d*,*J* = 8,7, Ar-H). $^{13}$C-RMN δ (600 MHz, $CDCl_3$): 12,06 ($CH_3$), 13,35 ($CH_3$), 16,79 ($CH_2$), 20,30 ($CH_2$), 21,79 ($CH_2$), 29,39 ($CH_2$), 30,15 ($CH_2$), 44,55 ($CH_2$), 67,85 ($NCH_2$), 70,75 (O-$CH_2$), 81,49 (CH=C), 110,45 (ArC-H), 121,65 (ArC-H), 123,05 (ArC-H), 125,05, 126,85

(ArC-H), 130,45, 140,65, 159,95, 171,55, 183,75, 183,95, 188,35 ppm.EMAR-ESI-TOF m/z: 434,12306 $[M+ H]^+$($C_{22}H_{28}NO_3Se^+$, calc.434,12299)

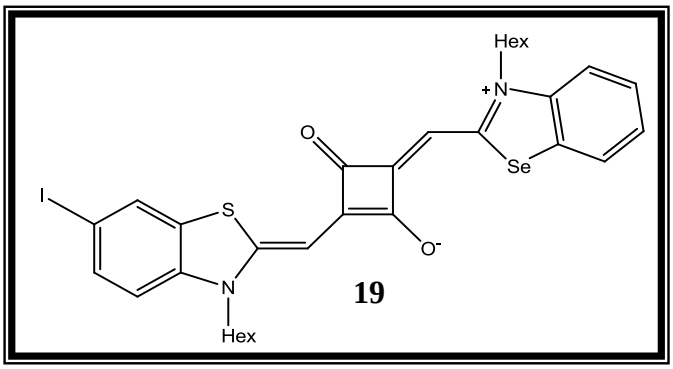
### 3.3.1.8 Síntese do 3-[(3-hexilbenzoselenazol-2(3H)-ilideno)metil]-4-hidroxi-3-ciclobuteno-1,2-diona (18)



**18**

A síntese do composto**18** foi adaptada da síntese descrita na literatura (Kim *et al.*, 2010).
Fez-se reagir uma mistura de 3-butoxi-4-[(3-hexilbenzoselenazol-2(3H)-ilideno)metil]-3-ciclobuten-1,2-diona (**17**)(1,05g; 2,42 mmol) com EtOH (50,1 mL) e 0,28 mL de uma solução aquosa de NaOH (40%). A mistura reaccional foi colocada sob agitação, a refluxo, durante 2 horas.A evolução da reacção foi seguida por c.c.f. (sílica, $CH_2Cl_2$/MeOH 2%). Terminada a reacção foi adicionada uma solução aquosa de HCl (2 N) (2,84 mL) e colocou-se em banho de gelo sob agitação, para precipitar o produto. O precipitado foi recolhido por filtração a pressão reduzida e lavados várias vezes com $H_2O$ e éter dietílico previamente arrefecido. Obteve-se então o composto 3-[(3-hexilbenzoselenazol-2(3H)-ilideno)metil]-4-hidroxi-3-ciclobuteno-1,2-diona (**18**), com um rendimento de 96%, em forma de cristais vermelho-alaranjados. Estes foram usados na reacção seguinte sem qualquer purificação posterior.

### 3.3.1.9 Síntese do 4-[(3-hexilbenzoselenazol-3-io-2-il)metilideno]-2-[3-(3-hexil-6-iodo-3H-benzotiazol-2-ilidenometil]-3-oxo-ciclobut-1-en-1-olato(19)



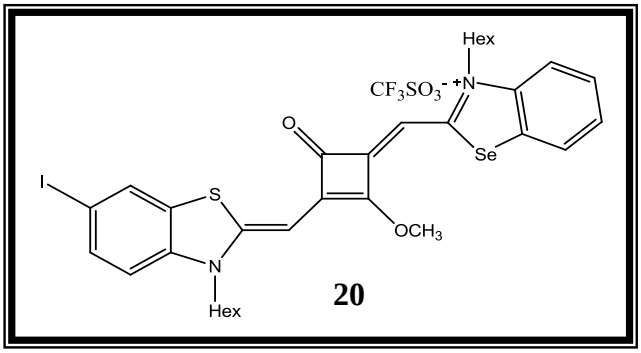
**19**

Ao composto **18** anteriormente obtido (0,910 g; 2,41 mmol), adicionou-se o sal iodeto de 3-hexil-6-iodo-2-metilbenzotiazol-3-io(**14**) (1,17 g; 2,41 mmol) e 100 mL de uma mistura de piridina/butanol a 10%. A mistura reaccional foi colocada a refluxo, sob agitação durante 2 horas e a evolução da reacção foi seguida por c.c.f. (sílica, $CH_2Cl_2$/MeOH

2%). Após o término da reacção adicionou-se $CH_2Cl_2$e lavou-se a fase orgânica várias vezes com água destilada gelada. Após separação da fase orgânica, esta foi seca com sulfato de sódio anidro e o solvente removido pressão reduzida. Ao produto bruto obtido, adicionou-se éter dietílico e colocou-se a precipitar em gelo. O precipitado foi recolhido por filtração a pressão reduzida e os cristais obtidos, lavados várias vezes com éter dietílico previamente arrefecido e recristalizados com EtOH. Obteve-se então o composto 4-[(3-hexilbenzoselenazol-3-io-2-il)metilideno]-2-[3-(3-hexil-6-iodo-3H-benzotiazol-2-ilidenometil]-3-oxo-ciclobut-1-en-1-olato(**19**), com um rendimento de 47 %, cromatograficamente puro, em forma de cristais azuis arroxeados, apresentando: p.f. 130,2-132 $^oC$ (dec.);UV/Vis $\lambda_{máx}$ (DMSO): 689,3 nm, log ε=5,32; IV $\upsilon_{máx}$ (KBr): 2924 (fr, C-H*alif.*), 1589 (f),1448 (f), 1420 (f), 1342 (m),1280 (m), 1228 (f), 1186 (m), 1088 (f), 764 (fr) $cm^{-1}$. $^1$H-RMN δ (600 MHz, $CDCl_3$): 0,93-0,90 (6H,*t*l, $N(CH_2)_5C\underline{H}_3$), 1,37-1,31 (8H,*m*, $N(CH_2)_3(C\underline{H}2)_2CH_3$), 1,45-1,40 (4H,*m*, $N(CH_2)_2C\underline{H}_2(CH_2)_2CH_3$), 1,74-1,83 (4H, *m*, $N(CH_2)_2C\underline{H}_2(CH_2)_2CH_3$), 3,97 (2H,*t*; *J*=6, $NC\underline{H}_2(CH_2)_4CH_3$), 4,08 (2H,*t*; *J*=6, $NC\underline{H}_2(CH_2)_4CH_3$), 5,81 (1H, *s*, CH=C), 6,07 (1H, *s*, CH=C), 6,79 (1H,*d*,*J*=6, Ar-H), 7,10 (1H,*d*, *J*=6, Ar-H), 7,15 (1H, *t*; *J*=6, Ar-H), 7,35 (1H, *t*, *J*=6, Ar-H), 7,58 (2H, *d*, *J*=6, Ar-H), 7,72 (1H, *s*, Ar-H). $^{13}$C-RMN δ (600 MHz, $CDCl_3$): 13,99 ($CH_3$), 15,27 ($CH_3$), 18,45 ($CH_2$), 22,51 ($CH_2$), 22,55 ($CH_2$), 26,53 ($CH_2$), 26,56 ($CH_2$), 27,14 ($CH_2$), 27,23 ($CH_2$), 31,45 ($CH_2$), 46,20 ($NCH_2$), 47,12 ($NCH_2$), 85,43 (CH=C), 89,82 (CH=C), 112,65 (ArC-H), 113,25 (ArC-H), 124,22 (ArC-H), 125,24 (ArC-H), 127,18 (ArC-H), 130,16 (ArC-H), 130,78, 135,82 (ArC-H), 141,12, 142,54, 157,97, 162,85, 167,83, 174,20, 176,58 ppm; EMAR-ESI-TOF m/z: 718,06272$[M]^+$ ($C_{32}H_{35}IN_2O_2SSe^+$, calc.718,06249).

### 3.3.1.10 Síntese do trifluorossulfonato de 3-hexil-2-[3-(3-hexil-6-iodo-3H-benzotiazol-2-ilidenometil)-2-metoxi-4-oxociclobut-2-enilidenometil]benzoselenazol-3-io (20)

Fez-se reagir 4-[(3-hexilbenzoselenazol-3-io-2-il)metilideno]-2-[3-(3-hexil-6-iodo-3H-benzotiazol-2-ilidenometil]-3-oxo-ciclobut-1-en-1-olato (**19**) (0,722 g; 1,02 mmol), com $CF_3SO_3CH_3$ (0,35 mL; 3,07 mmol) em



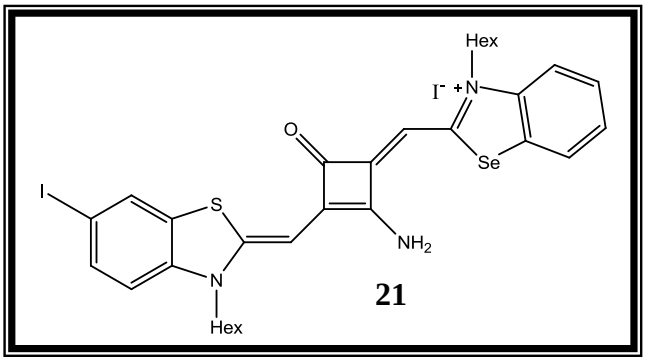

**20**

$CH_2Cl_2$seco. A mistura reaccional foi colocada em atmosfera de azoto, sob agitação (4 horas), a evolução da reacção seguida por c.c.f. (sílica, $CH_2Cl_2$/MeOH 2%).

Terminada a reacção, fez-se o tratamento da mistura reaccional lavando-a várias vezes comuma solução aquosa de $NaHCO_3$ (5%) e $H_2O$ gelada.Depois de separada, a fase orgânicafoi seca com sulfato de sódio anidro e o solvente evaporado a pressão reduzida. O produto bruto obtido foi recristalizado com éter dietílico e $CH_2Cl_2$, tendo-se obtido então o composto trifluorossulfonato de 3-hexil-2-[3-(3-hexil-6-iodo-3H-benzotiazol-2-ilidenometil)-2-metoxi-4-oxociclobut-2-enilidenometil]benzoselenazol-3-io(**20**), com um rendimento de 78 %, cromatograficamente puro, em forma de cristais azuis arroxeados, apresentando: p.f. 211-215 $^oC$ (dec.); UV/Vis $\lambda_{máx}$ (DMSO): 659,5 nm, log ε=5,16; IV $\upsilon_{máx}$ (KBr): 1928 (fr, C-H*alif.*), 1654 (fr, C=O), 1578 (fr), 1502 (fr), 1420 (f), 1351(m), 1246 (f), 1208( m), 1147 (f), 1115 (f), 1030(m), 744 (fr), 737 (fr) $cm^{-1}$. $^1$H-RMN δ (400 MHz, $CDCl_3$): 0,90-0,85 (6H, *m*, $N(CH_2)_5C\underline{H}_3$), 1,35-1,26 (8H, *m*, $N(CH_2)_2CH_2(C\underline{H}_2)_2CH_3$), 1,49-1,37 (4H, *m*, $N(CH_2)_2C\underline{H}_2(CH_2)_2CH_3$), 1,87-1,74 (4H, *m*, $NCH_2C\underline{H}_2(CH_2)_3CH_3$),4,40-4,30 (4H, *m*, $NC\underline{H}_2(CH_2)_4CH_3$), 4,61 (3H, *s*, $OC\underline{H}_3$), 6,01 (1H, *s*, CH=C), 6,13 (1H, *s*, CH=C), 7,09 (1H, *d*, *J*=8,7, Ar-H), 7,29-7,35 (2H, *m*, Ar-H), 7,48 (1H, *t*, *J*=8, Ar-H), 7,70 (1H, *d*, *J*=8, Ar-H), 7,74 (1H, *d*, *J*=8, Ar-H), 7,89 (1H, *s*, Ar-H).$^{13}$C-RMN δ (600 MHz, $CDCl_3$): 14,00 ($CH_3$), 14,02 ($CH_3$), 22,40 ($CH_2$), 22,50 ($CH_2$), 26,40 ($CH_2$), 26,60 ($CH_2$), 27,94 ($CH_2$), 27,97 ($CH_2$), 31,46 ($CH_2$), 47,34 (N-$CH_2$), 48,15 (N-$CH_2$), 61,60 ($OCH_3$), 88,75 (CH=C), 114,67, 114,92 (ArC-H), 114,93, 115,18 (ArC-H), 125,36, 125,60 (ArC-H), 125,69, 125,93 (ArC-H), 128,30 (ArC-H), 128,76, 129,02, 129,24, 130,05, 130,40, 130,65 (ArC-H), 131,12, 132,64, 136,91, 137,16 (ArC-H), 140,72, 142,14, 161,70, 166,38, 168,02, 178,44 ppm; EMAR-ESI-TOF m/z: 733,08647$[M]^+$ ($C_{33}H_{38}IN_2O_2SSe^+$, calc.733,08598).

### 3.3.2 Síntese dos corantes aminoesquarílicos assimétricos

#### 3.3.2.1 Síntese do iodeto de 2-[-2-amino-3-(3-hexil-6-iodo-3H-benzotiazol-2-ilidenometil)-4-oxociclobut-2-enilidenometil]-3-hexilbenzoselenazol-3-io (21)

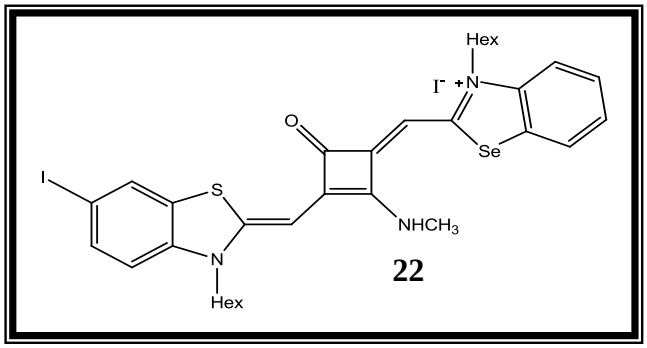



**21**

Fez-se reagir trifluorossulfonato de 3-hexil-2-[3-(3-hexil-6-iodo-3H-benzotiazol-2-ilidenometil)-2-metoxi-4-oxociclobut-2-enilidenometil]benzoselenazol-3-io **(20)** (0,200 g; 2,8 mmol), com amónia (2 M, em metanol) (0,69 mL; 1,38 mmol)em $CH_2Cl_2$ seco.A mistura reaccional foi colocada sob atmosfera de azoto, á temperatura ambiente. A evolução da reacção foi seguida por c.c.f. (sílica, $CH_2Cl_2$/MeOH 2%) (3h 30min.). Terminada a reacção, fez-se o tratamento da mistura reaccional lavando a mistura várias vezes com água destilada gelada. Após separação da fase orgânica, este foi seco sob pressão reduzida. Os cristais resultantes foram dissolvidos com 15 mL de MeOH tendo-se adicionado uma solução aquosa de KI (14%). A mistura foi deixada a reagir à temperatura ambiente durante 2horas. Após filtração dos cristais a pressão reduzida e lavagem dos mesmos com água destilada gelada, obteve-se o composto iodeto de 2-[-2-amino-3-(3-hexil-6-iodo-3H-benzotiazol-2-ilidenometil)-4-oxociclobut-2-enilidenometil]-3-hexilbenzoselenazol-3-io(**21**)com um rendimento de 75 %, cromatograficamente puro, em forma de cristais azuis apresentando: p.f. 297-> 300$^o$C (dec.); UV/Vis $\lambda_{máx}$ (DMSO): 680nm, log ε=5,28; IV $\upsilon_{máx}$ (KBr): 3448 (fr, N-H), 3097 (fr, ArC-H), 2925(fr, C-H*alif.*), 2855 (fr), 1631 (fr, C=O), 1518 (fr), 1466 (f), 1437 (f), 1361 (fr), 1248 (f), 1072 (fr), 978 (fr), 751 (fr) $cm^{-1}$. $^1$H-RMN δ (600 MHz, DMSO+$CDCl_3$): 0,86 (6H, *s*l, $N(CH_2)_5C\underline{H}_3$), 1,29 (8H,*s*l, $N(CH_2)_3(C\underline{H}_2)_2CH_3$), 1,40 (4H,*s*l, $N(CH_2)_2C\underline{H}_2(CH_2)_2CH_3$), 1,70 (4H, *s*l, $NCH_2C\underline{H}_2(CH_2)_3CH_3$); 4,18 (2H, *s*l, $NC\underline{H}_2(CH_2)_4CH_3$), 4,25 (2H,*s*l, $NC\underline{H}_2(CH_2)_4CH_3$), 6,10 (1H, *s*, CH=C), 6,32 (1H, *s*, CH=C), 7,32 (1H, *t*, *J*=7,8;7,4, Ar-H), 7,46 (1H, *d*, *J*=8,8, Ar-H), 7,52 (1H, *t*, *J*=7,0; 7,7, Ar-H), 7,64 (1H, *d*, *J*=8,5, Ar-H), 7,81 (1H, *d*, *J*=7,6, Ar-H), 8,04 (1H, *d*, *J*=7,6, Ar-H), 8,34 (1H, *s*, Ar-H), 8,69 (2H, *s*, $NH_2$ troca com $D_2O$).$^{13}$C-RMN δ (600 MHz, $CDCl_3$): 13,94 ($CH_3$), 22,30 ($CH_2$), 22,67 ($CH_2$), 26,11 ($CH_2$), 26,16 ($CH_2$), 27,34 ($CH_2$), 27,23 ($CH_2$), 31,25 ($CH_2$), 46,50 ($N\underline{C}H_2$), 47,40 ($N\underline{C}H_2$), 86,86 (CH=C), 87,45, 91,40 (CH=C), 113,97 (ArC-H), 114,29 (ArC-

H), 124,86 (ArC-H), 125,60, 125,70 (ArC-H), 127,50 (ArC-H), 128,9, 1340,0, 130,40 (ArC-H), 130,41, 136,17 (ArC-H), 136,17, 140,60, 142,10, 157,20, 159,10, 159,70, 164,90, 166,50, 174,86ppm; EMAR-ESI-TOF m/z: 718,08626 $[M- I^-]^+$($C_{32}H_{37}IN_3OSSe^+$, calc.718,08630).

### 3.3.2.2 Síntese do iodeto de 3-hexil-2-[3-(3-hexil-6-iodo-3H-benzotiazol-2-ilidenometil)-2-metilamino-4-oxo-ciclobut-2-enilidenometil]-3-benzoselenazol-3-io (22)

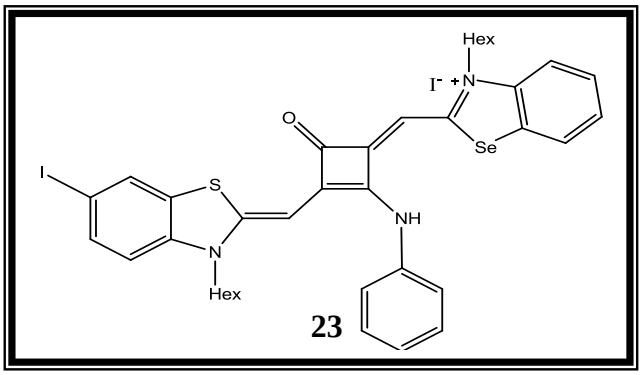



**22**

Fez-se reagir trifluorossulfonato de 3-hexil-2-[3-(3-hexil-6-iodo-3H-benzotiazol-2-ilidenometil)-2-metoxi-4-oxociclobut-2-enilidenometil]benzoselenazol-3-io **(20)** ( 0,200 g; 2,8 mmol), com metilamina (2M, em THF) (0,7 mL; 1,4 mmol) em $CH_2Cl_2$ seco.A mistura reaccional foi colocada á temperatura ambiente, em atmosfera de azoto com agitação. A evolução da reacção foi seguida por c.c.f. (sílica, $CH_2Cl_2$/MeOH 2%) (4 h 30min.). Terminada a reacção, fez-se o tratamento da mistura reaccional lavando várias vezes com água destilada gelada. Após separação da fase orgânica, esta foi seca com sulfato de sódio anidro e o solvente removido a pressão reduzida. Os cristais resultantes foram dissolvidos em 15 mL de MEOH tendo-se adicionado 15 mL de uma solução aquosa de KI (14%). A mistura ficou em agitação à temperatura ambiente durante duas horas. Após filtração dos cristais obtidos, a pressão reduzida, estes foram lavados com água destilada gelada e depois de secos a pressão reduzida, obteve-se então o produto iodeto de 3-hexil-2-[3-(3-hexil-6-iodo-3H-benzotiazol-2-ilidenometil)-2-metilamino-4-oxo-ciclobut-2-enilidenometil]-3-3-benzoselenazol-3-io (**22**) após recristalização com éter dietílico, com um rendimento de 59%, cromatograficamente puro, em forma de cristais azuis esverdeados, apresentando: p.f. 246,3-247,7$^oC$ (dec.); UV/Vis $\lambda_{máx}$ (DMSO): 691 nm, log ε=5,32; IV $\upsilon_{máx}$ (KBr): 3448 (fr, N-H), 2927 (fr, C-H*alif.*), 1744 (fr), 1625 (fr, C=O), 1578 (fr), 1444 (f), 1427 (f), 1348 (fr), 1241 (f), 1213 (m), 1182 (fr), 984 (fr) $cm^{-1}$. $^1$H-RMN δ (600 MHz, $CDCl_3$): 0,91-0,80 (12H, *m*, $N(CH_2)_5C\underline{H}_3$), 1,27-1,32 (16H, *m*, $N(CH_2)_3(CH_2)_2C\underline{H}_3$), 1,45 (8H, *sl*, $N(CH2)C\underline{H}_2(CH_2)_2CH_3$, 1,76 (8H, *sl*, $NCH_2C\underline{H}_2(CH_2)_3CH_3$), 3,33(3H, *s*, $NHC\underline{H}_3$), 3,36(3H, *s*, $NHC\underline{H}_3$), 4,15 (4H, *sl*, $NC\underline{H}_2(CH_2)_4CH_3$, 4,25 (4H, *sl*, $NCH_2(CH_2)_4CH_3$), 5,83 (1H, *s*, CH=C),

6,05 (1H, *s*, CH=C), 6,56 (1H, *s*, CH=C), 6,73 (1H, *s*, CH=C), 6,88 (1H, *d*, *J*=8, Ar-H), 6,97 (1H, *d*, *J*=6, Ar-H), 7,16 (3H, *t*l, Ar-H), 7,29 (1H, *s*l, Ar-H), 7,38 (1H, *s*l, Ar-H), 7,45 (2H, *s*l, Ar-H), 7,49 (1H, *s*, Ar-H), 7,59 (1H, *d*, *J*=6, Ar-H), 7,65 (1H, *d*, *J*=6, Ar-H), 7,70 (1H, *s*l, Ar-H), 7,80 (1H, *s*, Ar-H), 8,56 (1H, *s*l, N-H troca com $D_2O$), 8,59 (1H, *s*l, N-H troca com $D_2O$). $^{13}$C-RMN δ (600 MHz, $CDCl_3$): 13,98 ($CH_3$), 14,10 ($CH_3$), 22,45 ($CH_2$), 22,47 ($CH_2$), 22,52 ($CH_2$), 26,22 ($CH_2$), 26,54 ($CH_2$), 26,62 ($CH_2$), 27,19 ($CH_2$), 27,29 ($CH_2$), 27,91 ($CH_2$), 27,97 ($CH_2$), 30,71 ($NCH_3$), 30,77 ($NCH_3$), 31,45 ($CH_2$), 31,48 ($CH_2$), 31,59 ($CH_2$), 31,62 ($CH_2$), 46,57 ($CH_2$), 47,34 ($CH_2$), 47,44 (N<u>C</u>$H_2$), 48,20 (N<u>C</u>$H_2$), 86,33 (CH=C), 89,36 (CH=C), 90,53 (CH=C), 94,03 (CH=C), 112,91 (ArC-H), 113,48 (ArC-H), 114,35 (ArC-H), 114,82 (ArC-H), 124,46 (ArC-H), 125,06 (ArC-H), 125,32 (ArC-H), 125,40 (ArC-H), 127,46 (ArC-H), 127,82 (ArC-H), 130,03 (ArC-H), 130,43 (ArC-H), 136,07 (ArC-H), 136,17, 136,67 (ArC-H), 136,76, 140,74, 140,85, 142,18, 142,34, 154,59, 156,65, 157,92, 158,58, 159,93, 161,81, 162,28, 165,08, 165,20, 167,08, 167,88, 174,90 ppm; EMAR-ESI-TOF m/z: 732,10185 $[M\text{-}I^-]^+$ ($C_{33}H_{39}IN_3OSSe^+$, calc.732,10197)

### 3.3.2.3 Sintese do iodeto de 2-[2-fenilamino-3-(3-hexil-6-iodo-3H-benzotiazol-2-ilidenometil)-4-oxo-ciclobut-2-enilidenometil]-3-hexilbenzoselenazol-3-io (23)



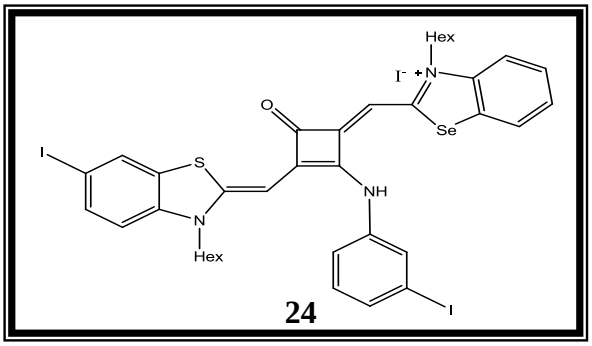
**23**

Fez-se reagir trifluorossulfonato de 3-hexil-2-[3-(3-hexil-6-iodo-3H-benzotiazol-2-ilidenometil)-2-metoxi-4-oxociclobut-2-enilidenometil]benzoselenazol-3-io**(20)** (0,200 g; 2,8 mmol), com anilina (0,13 mL; 1,40 mmol), trietilamina (0,02 mL; 0,14 mmol) e 4-DMAP(0,017g; 0,14 mmol)em $CH_2Cl_2$ seco.A mistura reaccional foi colocada em atmosfera de azoto, com agitação a temperatura ambiente. A evolução da reacção foi seguida por c.c.f. (sílica, $CH_2Cl_2$/MeOH 2%) (48 horas). Terminada a reacção, fez-se o tratamento da mistura reaccional lavando várias vezes com água destilada gelada. A solução resultante foi seca com sulfato de sódio anidro e o solvente evaporado a pressão reduzida. Os cristais resultantes foram dissolvidos em 15 mL de MEOH tendo-se adicionado a esta solução 15 mL de uma solução aquosa de KI (14%). A mistura foi deixada à temperatura ambiente com agitação durante duas horas. Oprecipitado resultante foi recolhido por filtração

a pressão reduzida e os cristais obtidos, lavados várias vezes com água destilada e éter dietílico previamente arrefecido e recristaizados com éter dietílico e $CH_2Cl_2$. Obteve-se então o composto iodeto de 2-[2-fenilamino-3-(3-hexil-6-iodo-3H-benzotiazol-2-ilidenometil)-4-oxo-ciclobut-2-enilidenometil]-3-hexilbenzoselenazol-3-io(**23**), com um rendimento de 28%, cromatograficamente puro, em forma de cristais azuis esverdeados apresentando: p.f. 266-268 $^oC$ (dec.); UV/Vis $\lambda_{máx}$ (DMSO): 680 nm, log ε=5,35; IV $\upsilon_{máx}$ (KBr): 3483 (f, C-H), 2926 (fr, C-H*alif.*), 1654 (fr, C=O), 1541 (fr), 1430 (f), 1345 (fr), 1284 (f), 1247 (f), 1171 (f), 1129 (m), 983 (fr), 802 (fr), 765 (fr) $cm^{-1}$. $^1$H-RMN δ (400 MHz, $CDCl_3$): 0,81-1,00 (12H, *sl*, C<u>H</u>$_3$), 1,01-1,24 (24H, *m*, NCH$_2$CH$_2$(C<u>H</u>$_2$)$_3$CH$_3$), 1,55-1,24 (4H, *m*, NCH$_2$C<u>H</u>$_2$(CH$_2$)$_3$CH$_3$), 1,80 (4H, *sl*, NCH$_2$C<u>H</u>$_2$(CH$_2$)$_3$CH$_3$), 3,66 (4H, *sl*, NC<u>H</u>$_2$), 4,50 (4H, *sl*, NC<u>H</u>$_2$), 4,91 (1H, *sl*, CH=C), 5,19 (1H, *sl*, CH=C), 6,82 (1H, *sl*, CH=C), 7,01 (1H, *sl*, CH=C), 7,74-7,03 (22H, *m*), 7,81 (2H, *sl*, Ar-H), 10,98 (2H, *sl*, N-H, troca com $D_2O$).$^{13}$C-RMN δ (400 MHz, $CDCl_3$): 14,06 ($CH_3$), 14,13 ($CH_3$), 14,17 ($CH_3$), 15,35 ($CH_3$), 22,57 ($CH_2$), 23,05 ($CH_2$), 23,79 ($CH_2$), 26,43 ($CH_2$), 26,45 ($CH_2$), 31,42 ($CH_2$), 31,67 ($CH_2$), 46,89 ($CH_2$), 47,77 ($CH_2$), 47,97 ($CH_2$), 47,92 ($CH_2$), 87,67 (CH=C), 91,74 (CH=C), 92,39 (CH=C), 96,30 (CH=C); 113,45 (ArC-H); 113,74 (ArC-H); 114,56 (ArC-H); 115,21 (ArC-H); 124,59 (ArC-H); 125,21 (ArC-H), 125,46 (ArC-H), 125,69 (ArC-H), 126,38 (ArC-H), 127,55 (ArC-H), 128,90 (ArC-H), 130,18 (ArC-H), 130,57 (ArC-H), 130,97 (ArC-H), 132,43, 136,23 (ArC-H), 136,40, 136,81 (ArC-H), 140,63, 142,13, 153,23, 155,31, 157,81, 159,56, 160,82, 161,45, 162,18, 162,36, 167,42, 167,74, 176,40 ppm; EMAR-ESI-TOF m/z: 794,11760 $[M\text{-}I^-]^+$( $C_{38}H_{41}IN_3OSSe^+$, calc.794,11768)

### 3.3.2.4 Síntese do iodeto de 2-[2-(3-iodofenilamino)-3-(3-hexil-6-iodo-3H-benzotiazol-2-ilidenometil)-4-oxociclobut-2-enilidenometil]-3-hexilbenzoselenazol-3-io (24)

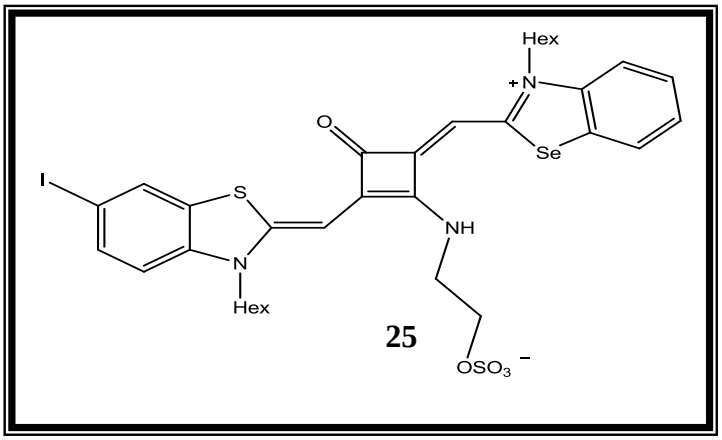
Fez-se reagir trifluorossulfonato de 3-hexil-2-[3-(3-hexil-6-iodo-3H-benzotiazol-2-ilidenometil)-2-metoxi-4-oxociclobut-2-enilidenometil]benzoselenazol-3-io**(20)** (0,200 g; 2,8 mmol), com iodoanilina (0,310 g; 1,40 mmol), trietilamina (0,02



**24**

mL; 0,14 mmol) e 4-DMAP (0,017 g; 0,14 mmol)em $CH_2Cl_2$ seco.A mistura reaccional foi deixada em atmosfera de azoto e com agitação. A evolução da reacção foi seguida por c.c.f. (sílica, $CH_2Cl_2$/MeOH 2%) (48 horas). Terminada a reacção, fez-se o tratamento da mistura reaccional lavando várias vezes com água destilada gelada. Após separação da fase orgânica, esta foi seca com sulfato de sódio anidro e o solvente evaporado a pressão reduzida. Os cristais resultantes foram dissolvidos em 15 mL de MeOH e á mistura adicionados 15 mL de uma solução aquosa de KI (14% (p/v)). A mistura reaccional foi deixada á temperatura ambiente durante duas horas.Oprecipitado resultante foi recolhido por filtração a pressão reduzida e os cristais obtidos, lavados várias vezes com água destilada e éter dietílico previamente arrefecido e recristaizados com éter dietílico e $CH_2Cl_2$. Obteve-se então o composto iodeto de 2-[2-(3-iodofenilamino)-3-(3-hexil-6-iodo-3H-benzotiazol-2-ilidenometil)-4-oxociclobut-2-enilidenometil]-3-hexilbenzoselenazol-3-io(**24**), com um rendimento de 22%, cromatograficamente puro, em forma de cristais azuis esverdeados apresentando: p.f. 165-167$^{o}$C (dec); UV/Vis $\lambda_{máx}$ (DMSO): 689 nm, log ε= 5,27; IV $\upsilon_{máx}$ (KBr):3447,40 (fr, N-CH), 2925,05 (fr, C-H), 2853,65 (fr), 1718 (m, C=O), 1533 (fr), 1439 (f), 1348 (fr), 1251 (m), 1173 (m), 1134 (fr), 987 (fr), 793 (fr), 757 (fr) $cm^{-1}$. $^{1}$H-RMN δ (600 MHz, $CDCl_3$): 0,88 (12H, *s*, $CH_3$), 1,45-1,03 (16H, *m*, $N(CH_2)_3(CH_2)_2CH_3$), 1,77-1,46 (12H, *m*, $CH_2$), 1,87 (4H, *s*l, $CH_2$), 3,54-3,40 (4H, *m*, $NC\underline{H}_2(CH_2)_4CH_3$), 4,55-4,45(4H, *m*, $NC\underline{H}_2(CH_2)_4CH_3$), 4,99 (1H, *s*l, CH=C), 5,26 (1H, *s*l, CH=C), 6,91 (1H, *s*l, CH=C), 7,86-7,01 (21H, *m*, Ar-H+CH=C), 7,85 (2H, *s*l, Ar-H), 11,01 (2H, *s*, N-H troca com $D_2O$).$^{13}$C-RMN δ (600 MHz, $CDCl_3$): O composto é muito insolúvel, logo só serão representados os picos que se apresentam perfeitamente diferenciados nos espectros. 14,07 ($CH_3$), 22,44 ($CH_2$), 22,52 ($CH_2$), 22,99 ($CH_2$), 23,77 ($CH_2$), 26,44 ($CH_2$), 27,06 ($CH_2$), 28,15 ($CH_2$), 28,91 ($CH_2$), 30,34 ($CH_2$), 31,16 ($CH_2$), 31,59 ($CH_2$), 43,12 ($NCH_2$), 46,93 ($NCH_2$), 47,94 ($NCH_2$), 49,02 ($NCH_2$), 91,45 (CH=C), 92,03 (CH=C), 113,35, 113,76, 114,46, 114,87, 116,41, 124,83, 125,30, 127,60, 127,73, 127,95, 128,79, 130,25, 130,56, 130,90, 132,53, 135,02, 136,37, 136,80, 137,72, 140,56, 142,10, 160,97, 167,92, 176,63 ppm; EMAR-ESI-TOF m/z: 920,01413$[M\text{-}I^-]^+$ ($C_{38}H_{40}I_2N_3OSSe^+$, calc.920,01433).

### 3.3.2.5 Síntese do sal interno de 3-hexil-2-[3-(3-hexil-6-iodo-3H-benzotiazol-2-ilidenometil)-4-oxo-2-(2-sulfato-etilamino)ciclobut-2-enilidenometil]-3-benzoselenazol-3-io (25)



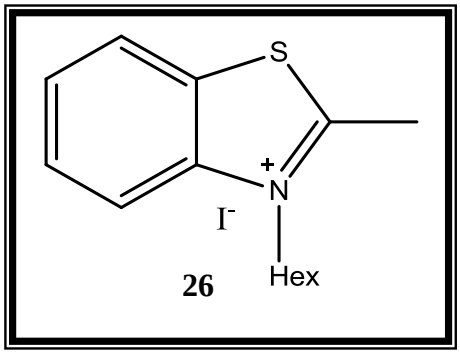

**25**

Fez-se reagir trifluorossulfonato de 3-hexil-2-[3-(3-hexil-6-iodo-3H-benzotiazol-2-ilidenometil)-2-metoxi-4-oxociclobut-2-enilidenometil]benzoselenazol-3-io**(20)** (0,200g; 2,8 mmol), com $NH_2C_2H_4OSO_3$- (0,199g; 1,40 mmol), trietilamina (0,271mL; 1,96mmol) em $CH_2Cl_2$ seco.A mistura reaccional foi deixada em atmosfera de azoto com agitação. A evolução da reacção foi seguida por c.c.f. (sílica, $CH_2Cl_2$/MeOH 2%) (24horas).Parada a reacção, fez-se o tratamento da mistura reaccional lavando várias vezes com água destilada gelada. A fase orgânica, depois de separada foi seca com sulfato de sódio anidro e depois de filtrado o solvente foi removido a pressão reduzida. Os cristais resultantes foram dissolvidos com 15 mL de MeOH tendo-se adicionado posteriormente 15 mL de uma solução aquosa de KI (14%). A mistura foi deixada com agitação à temperatura ambiente durante duas horas. Após filtração dos cristais obtidos, estes foram lavados várias vezes com água destilada gelada e obteve-se então o composto sal interno de 3-hexil-2-[3-(3-hexil-6-iodo-3H-benzotiazol-2-ilidenometil)-4-oxo-2-(2-sulfato-etilamino)ciclobut-2-enilidenometil]-3-benzoselenazol-3-io (**25**)com um rendimento de 66%, cromatograficamente puro, em forma de cristais azuis-escuros apresentando: p.f. > 300ºC (dec.); UV/Vis $\lambda_{máx}$ (DMSO): 689nm, log ε=5,31; IV $\upsilon_{máx}$ (KBr): 3462,55 (fr, N-CH), 3062,16 (fr, ArC-H), 2923,71 (fr, C-H), 2854,92 (fr), 1625,52 (f, C=O), 1431,07 (f), 1350,61 (m), 1236,49 (f), 1174,36 (f), 1132,89 (m), 984; 80 (fr), 789,06 (fr), 743,46 (fr) $cm^{-1}$. $^1$H-RMN δ (400 MHz, DMSO): 0,85 (12H, *sl*, $CH_3$), 1,28-1,40 (24H, *m*), 1,69 (8H, *s*l, $CH_2$), 3,83 (4H, *s*l, $NCH_2CH_2OSO_3$), 3,99 (4H, *s*l, $NCH_2CH_2OSO_3$), 4,19 (2H, *t*l, N-$CH_2$), 4,23 (2H, *t*l, N-$CH_2$), 4,35 (2H, *t*l, N-$CH_2$), 4,40 (2H, *t*l, N-$CH_2$), 6,03 (1H, *s*, CH=C), 6,16 (1H, *s*, CH=C), 6,23 (1H, *s*, CH=C), 6,37 (1H, *s*, CH=C), 7,33-7,26 (2H, *m*, ArH), 7,41-7,53 (4H, *m*, Ar-H), 7,63 (2H, *t*, *J*=7/7,8, Ar-H), 7,78 (2H, *t*, *J*=7/8, Ar-H), 8,06-8,01 (2H, *m*, Ar-H), 8,29 (1H, *s*, Ar-H), 8,34 (1H, *s*, Ar-H), 9,02 (2H, *s*l, N-H troca com $D_2O$). $^3$C-RMN δ (600 MHz, $CDCl_3$):

14,04 ($CH_3$), 14,05 ($CH_3$), 14,09 ($CH_3$), 14,12 ($CH_3$), 22,27 ($CH_2$), 22,44 ($CH_2$), 22,49 ($CH_2$), 22,57 ($CH_2$), 26,08 ($CH_2$), 26,11 ($CH_2$), 26,46 ($CH_2$), 27,32 ($CH_2$), 27,45 ($CH_2$), 27,80 ($CH_2$), 27,86 ($CH_2$), 31,55 ($CH_2$), 31,57 ($CH_2$), 31,59 ($CH_2$), 31,63 ($CH_2$), 44,85 ($CH_2$), 46,04 ($CH_2$), 46,54 ($CH_2$), 47,02 ($CH_2$), 66,02 ($CH_2$), 67,21 ($CH_2$), 83,34 (CH=C), 88,51 (CH=C), 92,89 (CH=C), 93,20 (CH=C), 112,52 (ArC-H), 112,93 (ArC-H), 113,16 (ArC-H), 113,64 (ArC-H), 124,13 (ArC-H), 124,58 (ArC-H), 125,09 (ArC-H); 125,10 (ArC-H), 127,30 (ArC-H), 127,40 (ArC-H), 129,90 (ArC-H), 130,39 (ArC-H), 135,88 (ArC-H), 135,93 (ArC-H), 154,47, 166,48, 157,10, 158,25, 159,83, 161,58, 165,19, 165,23, 166,93, 167,79, 175,46, 175,52 ppm; EMAR-ESI-TOF m/z: 796,61839 $[M\text{-}H^+]^+$($C_{33}H_{40}IN_3O_5SSe^+$, calc.796,61905).

### 3.3.2.6 Síntese Prévia

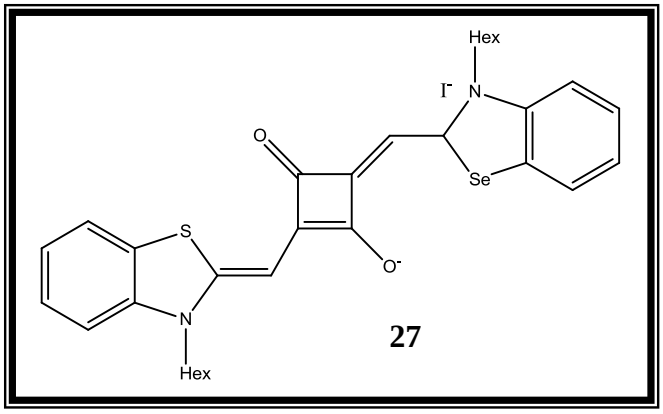
#### 3.3.2.6.1 Síntese do 3-hexil-2-metilbenzotiazólio (26)



**26**

Fez-se reagir o 2-metilbenzotiazol (4,26 mL; 33,56 mmol) e 1-iodohexano (14,85 mL; 100,6 mmol) em acetonitrilo (70 mL) com agitação a refluxo. A evolução da reação foi seguida por cromatografia em camada fina (sílica, $CH_2Cl_2$/MeOH 2%). Ao fim de 5 dias a mistura reacional foi arrefecida em banho de gelo, à qual foi adicionado éter etílico para precipitação total do produto. O precipitado formado foi recolhido por filtração a pressão reduzida e os cristais obtidos foram lavados com éter etílico. Todas as fases etéreas obtidas após as lavagens foram reunidas e concentradas por evaporação a pressão reduzida e a mistura resultante foi aquecida a refluxo durante mais 5 dias. Este processo foi repetido mais duas vezes para a obtenção de um maior rendimento e após recristalização com diclorometano/éter foi obtido o iodeto de 3-hexil-2-metilbenzotiazólio (**26**) com um rendimento de 74% na forma de cristais beges, apresentando: p.f. 127-128 ºC (éter etílico) ([ 125-126 °C], Pardal *et al.*, 2002) ; IV λmáx (KBr): 3040 (fr, ArC-H), 2948 (m, C-H), 2919 (f, C-H), 1808 (fr), 1570 (fr, ArC=C), 1510 (m), 1440 (f), 1334 (m), 1204 (m), 1020 (m), 931 (fr), 759 (f), 718 (m).

### 3.3.2.7 Síntese do 4-[(3-hexilbenzoselenazol-3-io-2-il)metililideno]-2-[(3-3H-benzotiazol-2-ilidenometil]-3-oxociclobut-1-en-1-olato (27)




**27**

Fez-se reagir 3-[(3-hexilbenzoselenazol-2(3H)-ilideno)metil]-4-hidroxi-3-ciclobuteno-1,2-diona (**18**)(0,600 g; 1,6 mmol), com 3-hexil-2-metilbenzotiazólio(**26**) (0,570 g; 1,6 mmol) numa solução de piridina/butanol a 10% (v/v) (100 mL). A mistura reaccional foi colocada a refluxo, sob agitação constante, até consumo do material de partida (3 horas). A evolução da reacção foi seguida por c.c.f. (sílica, $CH_2Cl_2$/MeOH 2%). Terminada a reacção, fez-se o tratamento da mistura reaccional lavando várias vezes com água destilada gelada. Após separação da fase orgânica, esta foi seca com sulfato de sódio anidro e o solvente evaporado a pressão reduzida.Ao produto bruto obtido, adicionou-se éter dietílico e colocou-se a precipitar em gelo. O precipitado foi recolhido por filtração a pressão reduzida e os cristais obtidos, lavados várias vezes com éter dietílico previamente arrefecido e recristaizados com EtOH. Obteve-se então o composto 4-[(3-hexilbenzoselenazol-3-io-2-il)metililideno]-2-[(3-3H-benzotiazol-2-ilidenometil]-3-oxociclobut-1-en-1-olato (**27**), com um rendimento de 71%, cromatograficamente puro, em forma de cristais azuis esverdeados, apresentando: p.f. 275-276 ºC (dec.); UV/Vis $\lambda_{máx}$ (DMSO): 684 nm, log ε= 5,34; IV $\upsilon_{máx}$ (KBr): 3445 (fr), 2925 (fr, C-H*alif*.), 2850 (fr), 1577 (m, ArC-H), 1443 (f,ArC-H), 1402 (f), 1225 (f), 1083 (f), 816 (fr), 731 (fr) $cm^{-1}$. $^1$H-RMN δ (400 MHz, $CDCl_3$): 0,86-0,82 (6H, *m*, $N(CH_2)_5C\underline{H}_3$), 1,30-1,20 (8H, *m*, $N(CH_2)_2CH_2(C\underline{H}_2)_2CH_3$), 1,45-1,32 (4H, *m*, $N(CH_2)_2C\underline{H}_2(CH_2)_2CH_3$), 1,73-1,69 (4H, *m*, $NCH_2C\underline{H}_2(CH_2)_3CH_3$), 4,01-3,96 (4H, *m*, $NC\underline{H}_2(CH_2)_4CH_3$), 5,84 (1H, *s*, CH=C), 6,0 (1H, *s*, CH=C), 7,01 (1H, *d*, *J*=8, Ar-H), 7,07 (2H, *t*; *J*=8, Ar-H), 7,14 (1H, *t*, *J*=8, Ar-H), 7,28 (1H, *t*, *J*=8, Ar-H), 7,26 (1H, *t*, *J*=8; Ar-H), 7,48 (2H, t, *J*=8, Ar-H). $^{13}$C-RMN δ (400 MHz, $CDCl_3$): 13,99 ($CH_3$), 22,45 ($CH_2$), 22,53 ($CH_2$), 22,56 ($CH_2$), 26,53 ($CH_2$), 27,16 ($CH_2$), 27,38 ($CH_2$), 31,44 ($CH_2$), 31,47 ($CH_2$), 46,44 (N-$CH_2$), 47,09 (N-$CH_2$), 85,72 (CH=C), 89,66 (CH=C), 111,61 (ArC-H), 113,04 (ArC-H), 122,17 (ArC-H), 123,95 (ArC-H), 124,15 (ArC-H), 124,91, 125,08 (ArC-H), 127,07 (ArC-H), 127,18 (ArC-H), 128,54, 128,88, 140,98, 142,53, 159,99, 161,82 ppm. EMAR-ESI-TOF m/z: 592.16519 $[M\text{-}I^-]^+$ ($C_{32}H_{36}N_2O_2SSe^+$, calc.592.16585).

## 3.4 Aplicação dos corantes esquarilicos em linhas celulares Caco-2 e HepG2

### 3.4.1 Preparação do meio de cultura

Usou-se o meio base DMEM (Dulbecco`s Modified Eagle Medium; Gibco, Invitrogen, Portugal) numa preparação que já possui 4,5 g/L de glicose e 0,11 g/L de piruvato de sódio e vermelho de fenol (um indicador de pH). Para preparar meio de cultura completo, suplementou-se o DMEM com soro fetal bovino (PBS, 10% (v/v), Gibco), antibiótico (200 U/mL de *penicilina* e 200 µg/mL de *streptomicina*, Gibco) e 1 mM de *L*-Glutamina (Gibco).

### 3.4.2 Culturas celulares e sua manutenção

Neste trabalho usaram-se duas linhas celulares, nomeadamente, células HepG2 (ATCC, HB, linha celular derivada de carcinoma hepatocelular) e células Caco-2 (ATCC, MTB-37 $^{TM}$, linha celular derivada de adenocarcinoma colorectal).

As células Caco-2 e HepG2 crescem aderentes às caixas ou frascos de cultura, as primeiras em monocamada e as segundas formam pequenos agregados, tal como se pode verificar na Figura 3.1 A e B respectivamente.

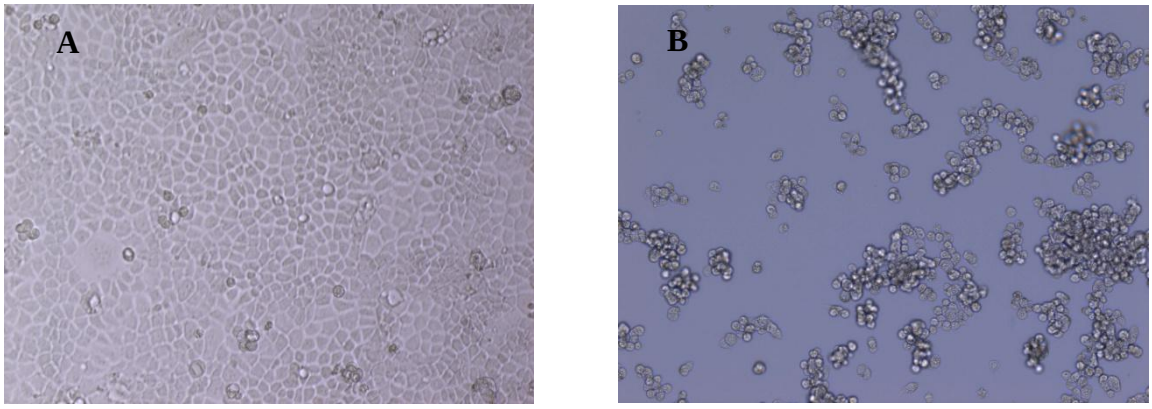



**Figura 3.1** Imagem das células Caco2 (**A**) e HepG2 (**B**) (200xx ampliação e 10xx objectiva).

As células HepG2 e Caco-2 são mantidas em meio de cultura completo, em frascos de cultura ventilados, numa incubadora de $CO_2$, a 37$^{o}$C e humidade controlada (Silva *et al.*, 2013).

Quando as culturas apresentavam um crescimento em estado de confluência de 80% (HepG2) ou 90-100% (Caco-2) foramtratadas para subcultura ou para ensaios. Removeu-se todo o meio de cultura, com auxílio de uma pipeta de pasteur estéril edescartou-se para um frasco com lixívia. Adicionou-se a cada frasco de cultura $T_{25}$, 1 mL de HBSS ("Hank´s Balanced Salt Solution", Gibco) para lavar as células, removendo o $Ca^{2+}$ do meio e vestígios de soro. Após lavagem removeu-se o HBSS e adicionou-se 1 mL de Tripsina-EDTA 0,05% (Gibco) a cada frasco, estes foram colocados a 37$^{o}$C, na incubadora durante 5 ou 8 minutos, para as células HepG2 e Caco-2 respectivamente.

Passado este tempo, os frascos foram retirados da incubadora e acrescentou-se 1,5 mL de meio DMEM com soro para inibir a acção da tripsina e com a ajuda de uma pipeta de Pasteur auxiliou-se na desagregação das células ainda aderentes ao frasco, com aspirações suaves separaram-se os grumos em suspensão. Removeram-se 4 ou 5 mL da suspensão celular para um tubo cónico. Às células que ficaram no frasco de cultura adicionou-se 5mL de meio completo e estas foram recolocadas na incubadora de $CO_2$ para voltarem a crescer e dividir-se (subcultura).

### 3.4.3 Contagem de células

Após tripsinização das células (de um ou vários frascos), estas foram contadas usando um hemocitómetro convencional (câmara de Neubauer) ou usando um contador de células automático (TC10 Automated Cell Counter 145-0001 BIO-RAD). O hematocitómetro consiste em nove quadrados de um milímetro divididos em quadrados menores, um dos nove quadrados de 1 mm representa o volume de 0,1 $mm^3$ ou $10^{-4}$mL. A contagem das células é realizada sob observação ao microscópio. Alternativamente, usou-se um contador automático, colocando-se na câmara uma lâmina descartável (Figura 3.2 B), suspensão celular até encher, usando uma micropipeta. Esta lâmina, com a câmara cheia, voltada para a frente, é colocada na ranhura do contador automático e o número de células é imediatamente dado em células/ mL.Após contagem das células, fez-se uma conversão do volume para determinar a densidade celular em células/mL. Sendo assim as células contadas foram depois diluídas para uma densidade final de 5,0x$10^4$ células por mL.

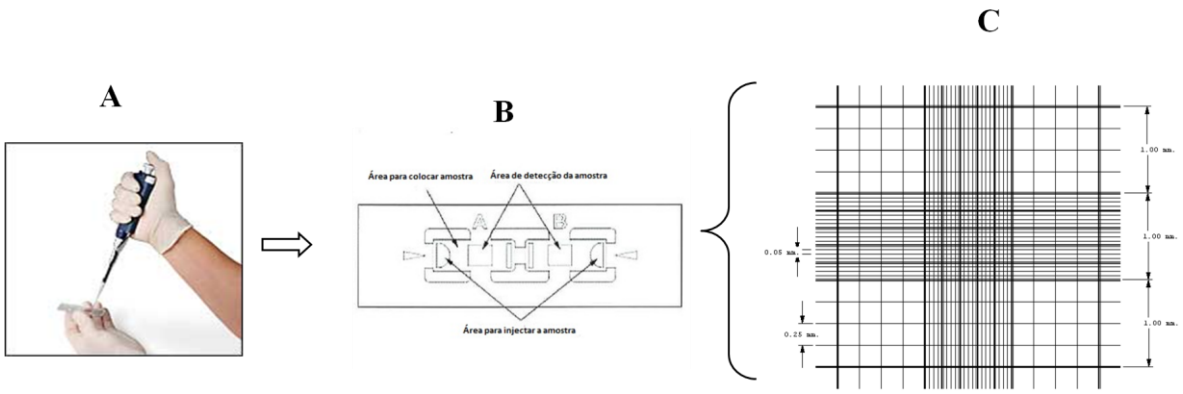



**Figura 3.2** Processo de contagem das células **A.** Deposição no hemocitómetro ou nas câmaras do contador automático **B**.

### 3.4.4 Plantação das células e aplicação dos corantes esquarílicos

Após preparação de um volume adequado de suspensão de células, com densidade $5{,}0x10^{4}$ células/mL. As células foram depositadas em placas de 96 poços segundo o esquema apresentado na Tabela 3.1. Após aplicação das células nasplacas (100 µL de suspensão com $5{,}0x10^{-4}$ células/mLpor poço) estasforam colocadas na incubadora de $CO_2$, a 37ºC, onde permaneceram 24 h para adesão das células às placas.

**Tabela 3.1** Esquema da plantação das células nas placas de cultura de 96 poços. (Ø representa os poços sem células, C os poços com células, a branco está representada a zona da placa que levou células Caco-2 e a cinza claro as células HepG2).

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| A | | | | | | | | | | | | |
| B | | | | | | | | | | | | |
| C | | | | | | | | | | | | |
| D | | | | | | | | | | | | |
| E | | | | | | | | | | | | |
| F | | | | | | | | | | | | |
| G | | | | | | | | | | | | |
| H | Ø | C | C | C | C | C | Ø | C | C | C | C | C |

### 3.4.4.1 Preparação das soluções dos corantes a serem testados nas células

Preparou-se uma solução mãe de cada corante a ser testado num balão volumétrico de 10 mL com uma concentração final conhecida e na ordem dos $10^{-4}$M, utilizando como solvente DMSO (dimetilsulfóxido), em seguida estas soluções foram diluídas em meio de cultura sem soro para as concentrações finais de 0,1; 1,0; 5,0 e 10,0 μM.

### 3.4.4.2 Aplicação dos corantes às células

Passadas 24 horas, as placas foram retiradas da incubadora e o meio de cultura foi retirado dos poços com a ajuda de uma micropipeta multicanal automática, seguiu-se a adição de 100 μL de meio de cultura sem soro, contendo os corantes esquarílicos nas concentrações desejadas, aos poços, segundo o esquema representado na Tabela 3.2.As placas foram colocadas novamente na incubadora por mais 24 h, até irradiação.

**Tabela 3.2** Esquema da disposição da aplicação dos corantes nas placas de cultura de 96 poços, sendo Ø, os poços onde não se aplicou nem células nem corante, 0,1; 1,0; 5,0 e 10,0 as concentrações dos corantes aplicados em μM e C o controlo onde não se aplicou o corante mas se aplicou células).

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| A | | | | | | | | | | | | |
| B | | | | | | | | | | | | |
| C | | | | | | | | | | | | |
| D | | | | | | | | | | | | |
| E | | | | | | | | | | | | |
| F | | | | | | | | | | | | |
| G | | | | | | | | | | | | |
| H | | | | | | | | | | | | |
| | Ø | 0,1 | 1,0 | 5,0 | 10,0 | C | Ø | 0,1 | 1,0 | 5,0 | 10,0 | C |

### 3.4.5 Irradiação das células

O sistema LED foi montado pelo Professor José Ramiro Fernandes, tendo em conta o comprimento de onda de irradiação e a manutenção da temperatura nas caixas de cultura, durante a irradiação.

Após as 24 horas de incubação, na presença dos corantes, as placas foram irradiadas, com LED's com uma banda de emissão centrada a 660 nm (comprimento de onda utilizado segundo os valores de λmáx obtido nos estudos UV-Vis dos corantes) e uma potência de 3,6 mW. Foram efectuadas 3 condições de irradiação: i) uma placa não irradiada e deixada durante 14 minutos à temperatura ambiente, ao abrigo da luz; ii) uma placa irradiada durante 7 minutos e iii) uma placa irradiada durante 14 minutos. Uma hora após irradiação foi realizada a lavagem dos poços (três vezes, por adição com pipeta multicanal e remoção suave) das filas A, B, C e D e passadas 24 horas a lavagem dos poços das filas E, F, G e H, com PBS (solução salina fisiológica) (100μL) em cada poço. Por fim, após remoção do PBS da última lavagem, adicionou-se o indicador de viabilidade celular Alamar Blue (Invitrogen, Alfagene, Portugal) diluído em meio de cultura sem soro (10%), colocando 100μL em cada poço.

### 3.4.6 Determinação da viabilidade celular

A viabilidade celular foi avaliada usando o indicador de viabilidade celular Alamar Blue. Trata-se de um composto indicador de oxidação-redução, baseado na estrutura do tetrazólio, incorporando resazurina e resorufina (Figura 1.22, Capítulo 1). Na forma oxidada, (resazurina) apresenta cor azul e é não fluorescente, permeia as células e é reduzido por células metabolicamente activas (resorufina) originando uma cor-de-rosa intenso e fluorescente, tal como se pode verificar pela Figura 3.3 A. Tais formas conferem a este corante a capacidade de produzir mudanças colorimétricas e um sinal de fluorescência em resposta ao metabolismo de células vivas, sendo a viabilidade seguida por alteração da absorvância medida a 570 (forma reduzida) e 600 (forma oxidada) nm (Byth *et al*., 2001; Hamid *et al*., 2004; O´Brien *et al*., 2000).

A percentagem de redução do Alamar Blue foi calculada pela seguinte equação, de acordo com as indicações da empresa que o comercializou.

$$\% \text{ Redução} = \frac{(\varepsilon_{ox})\,\lambda\, A\lambda_1 - (\varepsilon_{ox})\,\lambda_1 A\lambda_2 \times 100}{(\varepsilon_{red})\,\lambda_1 A`\lambda_2 - (\varepsilon_{red})\,\lambda_2 A`\lambda_1}$$

*Onde:*

$\varepsilon_{ox}$= *coeficiente de extinção molar do Alamar Blue oxidado*

$\varepsilon_{red}$= *coeficiente de extinção molar do Alamar Blue reduzido*

*A = absorvância dos poços a testar*

*A`= absovância dos brancos*

$\lambda_1$ *= 570 nm*

$\lambda_2$ *= 620 nm*

A quantificação da viabilidade celular foi então feita através da leitura das absorvâncias a dois comprimentos de onda distintos, 570 nm e 620 nm, passadas 5 horas após lavagem das células. Foram também realizadas leituras passadas 24 h, 30h e 48 h após a irradiação das células incubadas com os corantes esquarílicos.

**Figura 3.3**Placa de cultura 24 horas após a adição de AB e Espetrofotómetro de leitura de placas de 96 poços.

### 3.4.7 Análise e apresentação dos resultados

Os valores de viabilidade celular são apresentados como o valor médio de um número de experiências (não indicado no texto) ± desvio do erro médio (SEM). Os valores foram calculados por rotinas dos programas Microsoft Excel.

# Capítulo 4.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

# Bibliografia


Abraham A., Gayathri D.D., Cibin T.R., e Ramaiah D. (2010). Two different approaches in cancer therapy - using photosensitizer and natural product. *Progress in Biomedical Optics and Imaging - Proceedings of SPIE*, 7576: 757603-757614.

Agostinis P., Vantieghem A., Merlevede W. e Witte P. (2002). Hypericin in câncer treatment: more light on the way. *Inter.J.Biochem.Cell Biol.*, 34: 221-241.

Alex S., Basheer M. C., Arun K. T., Ramaiah D. e Das S. (2007). Aggregation Properties of Heavy Atom Substituted Squaraine Dyes: Evidence for the Formation of J-Type Dimer Aggregates in Aprotic Solvents. *J. Phys. Chem. A.*, 111: 3226-3230.

Arun K.T. e Ramaiah D. (2005). Near-infrared fluorescent probes: synthesis and spectroscopic investigation of a few amphiphilic squaraine dyes. *J.Phys.Chem.*, 109: 5571-5578.

Arun K.T., Jayaram D.T., Avirah R.R. e Ramaiah D. (2011). β-cyclodextrin as a photosensitiser carrier: effect on photophysical properties and chemical reactivity of squaraine dyes. *J.Phys.ChemB.*, 115: 7122-7128.

Arunkumar E., Sudeep P., Kamat P., Noll B. e Smith D. (2006). Singlet oxygen generation using iodinated squaraine and squaraine-rotaxane dyes. *New J. Chem*., 31: 677-683.

Avirah R., Jyothish K. e Ramaiah D. (2008). Infrared absorbing croconaine dyes: synthesis and metal ion binding properties. *J.Org.Chem.*, 73: 274-279.

Avirah R., Jayaram D., Adarsh N. e Ramaiah D. (2012). Squaraine dyes in PDT: from basic design to in vivo demonstration. *Org. Biomol. Chem*., 10: 911-920.

Beverina L., Abbotto A., Landenna M., Germinara M., Tubino R., Meinardi F., Bradamante S. e Paganti G. (2005). New π-extended water-soluble squaraines as singlet oxygen generators. *Org.Lett.*, 7: 4257- 4260.

Bisland S.K. e Burch S. (2006).Photodynamic therapy of disease bone. *Photodiag.Photodyn.Ther.*, 13: 147- 155.

Bosch F.X., Ribes J., Diaz M. e Cleries R. (2008). Primary liver cancer: worldwide incidence and trends. *Gastroenterol.*, 127: 5– 16.

Boiy A., Roelandts R. e Witte P.A.M. (2011). Photodynamic therapy using topically applied hypericin: Comparative effect with methyl-aminolevulinic acid on UV induced skin tumours. *J. Photochem. Photobiol.B: Biol.*, 102: 123– 131.

Bonnett R. (2000). *Chemical aspects of photodynamic therapy*. Gordon & Breash Science Publishers, Amsterdam. ISBN: 90-5699-248-1.

Broadbent A.D (2001). *Basic Principles of Textile Coloration Society of Dyers and Colourists.*Canadá. Université de Sherbrooke .*Society of Dyers and Colourists*. ISBN 0 901956 76 7.

Byth H.A., Mchunu B., Dubery I. e Bornmam L. (2001). Assesment of a simple, non-toxic alamar blue cell survival assay to monitor tomato cell viability.*Phytochem. Anal.*, 12: 340-346.

Chen B., Roskams T., Xu Y., Agostinis P. e Witte P. (2002). Photodynamic therapy with hypericin induces vascular damages and apoptosis in the RIF-1 mouse tumor model. *Int.J.Cancer*, 98: 284- 290.

Chiu S.M. e Oleinick N.L. (2001).Dissociation of mitochondrial depolarization from cytochrome c release during apoptosis induced by photodynamic therapy. *British J. Cancer* , 84: 1099–1106

Christie R.M. (2001). *Colourchemistry*.Heriot-Watt University, Scottish Borders Campus, Galashiels, United Kingdom. *The Royal Soc. Chem.*. ISBN 0-85404-573-2.

Delaey E., Van L. F., Vos D., Kamuhabwa A., Jacobs P. e Witte P. (2000). A comparative study of the photosensitizing characteristics of some cyanine dyes. *J. Photochem. Photobiol. B., Biol.* 55: 27– 36.

Devi D., Cibin T., Ramaiah D. e Abraham A. (2008). Bis(3,5-diiodo-2,4,6-trihydroxyphenyl) squaraine: A novel candidate in photodynamic therapy for skin câncer models in vivo. *J. Photochem. Photobiol. B., Biol* , 92: 153- 159.

Ethirajan M., Saenz C., Gupta A., Dobhal M. e Pandey R. (2008). Photosensitizers for photodynamic therapy and imaging.*Advances in photodynamic therapy, Artech House series*. ISBN: 1-596993-277-5.

Ferreira D. P., Conceição D. S., Ferreira V. R. A., Graça V. C., Santos P. F. e Vieira Ferreira L. F. (2013). Photochemical properties of squarylium cyanine dyes. *Photochem.Photobiol.Scienc*. 12: 1948–1959.

GayathriD., Devi, Cibin T.R., Ramaiah D. e Abraham A. (2008). Bis(3,5-diiodo-2,4,6-trihydroxyphenyl)squaraine: A novel candidate in photodynamic therapy for skin cancer models in vivo. *J. Photochem. Photobiol. B., Biol*, 92: 153- 159.

Guerra S. (2012). Síntese, caracterização espectroscópica de corantes esquarílicos e sua avaliação na proliferação e viabilidade das linhas celulares HepG2 e Caco-2. Relatório final de estágio de licenciatura. Vila Real. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro.

Gilman, H. e Avakian, S. (1964). Some dialkylaminoalkylamino derivatives of dibenzothiophene. *J.Am. Soc*., 68: 1514- 1515.

Gomes A.F.S. (2010). Síntese, caracterização espectroscópica de corantes esquarílicos e sua avaliação na proliferação e viabilidade numa linha celular HepG2. *Relatório final de estágio. Vila Real. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro.*

Gorlushko D.A., Filimonov V. D., Krasnokutskaya E. A., Semenischeva N. I., Go B. S., Hwang H. Y., Cha E. H. e Chi K.W. (2008). Iodination of aryl amines in a water-paste form via stable aryl diazonium tosylates, *Elsevier, Tetrahedron Lett.*, 49: 1080-1082.

Gupta M., Owano T., Baer D. S., O_Keefe A. e Williams S. (2004). Quantitative determination of singlet oxygen density and temperature for Oxygen-Iodine Laser .*Applications Chem.Phys. Lett.*, 400: 42–46.

Haillant O. (2009). The Photofading of Colored Materials Material Testing Product and Technology News, *O., Sun Spots*, 39: 84.

Hachimine K., Shibaguchi H., Kuroki M., Yamada H., Kinugasa T., Nakae Y., Asano R., Sakata I., Yamashita Y., Shirakusa T. e Kuroki M. (2007). Sonodynamic therapy of cancer using a novel porphyrin derivative, DCPH-P-Na (I), which is devoid of photosensitivity.*Cancer Sci*., 98: 916-920.

Halkiotis K.N., Uzunoglu N.K., Loukas S., Portelias G.E., Tortalis D. e Yova D. (1997). Influence of drug and light dose in determining PDT efficacy in human pancreatic cancer cells, treated with zinc tetrassulfonated phthalocyanines (ZnTSPc). *Photochemotherapy: Photodyn. Ther. and other modalities III*, 3191: 243- 251.

Hambling M. e Mróz P. (2008). History of PDT: The first hundred years. *Advances in photodynamic therapy, Artech House series,* 10, ISBN: 1-596993-277-5.

Hamid R., Rotshteyn Y., Rabadi L., Parikh R. e Bullock P. (2004). Comparison of alamar blue and MTT assays for high through-put screening. *Toxicology in vitro,* 18: 703-710.

He G.F., Bian M.L., Zhao Y.W., Xiang Q., Li H.Y. e Xiao C. (2009).A study on the mechanism of 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy in vitro and in vivo in cervical cancer. *Oncol.Rep.*, 21, 861-868.

*http://www.trivenichemicals.com/tetrapyrroles.html*, acedido a 23 de Outubro de 2013.

*http://www.pharmacelsus.de/resazurin_assay/* acedido a 22 julho de 2013.

Jablonski, A. (1933). Efficiency of anti-stokes fluorescence in dyes. *Nature*, 131: 839**.**

Jisha V., Arun K., Hariharan M. e Ramaiah D. (2006). Site-selective binding and dual mode recognition of serum albumin by a squaraine dye. *J. Am. Chem. Soc.*, 128: 6024- 6025.

Kashef N., Borghei Y.S. e Avid G.E.P. (2013).Photodynamic effect of hypericin on the microorganisms and primary human fibroblast. *Photodiagn.Photodyn.Ther.*, 10: 150- 155.

Kim S., Mor G., Paulose M., Varghese O., Baik C. e Grimes C. (2010). Molecular design of near-IR harvesting unsymmetrical squaraine dyes. *Langmuir*, 26: 13486- 13492.

Lai J.C., Lo P.C., Ng D.K.P., Stanley W.H.K., Leung C.H., Fung K.P. e Fong W.P. (2006). BAM-SiPc, a novel agent for photodynamic therapy, induces apoptosis in human hepatocarcinoma HepG2 cells by a direct mitochondrial action. *Cancer Biol.Ther.* 5: 413-418.

Lukšienė Ž. (2003). Photodynamic therapy: mechanism of action and ways to improve the efficiency of treatment. *MEDICINA*, 39: 12: 1137-1150.

Mathai S., Smith T.A. e Ghiggino K.P. (2007).Singlet oxygen quantum yields of potential porphyrin-based photosensitisers for photodynamic therapy, *Photochem. Photobiol.Sci.*, 6: 995– 1002.

Miret S. (2006). Comparasion of in vitro assays of cellular toxicity in humam hepatic cell line HepG2. *J.Biomol.Screen.*, 11: 184- 193.

Mroz P., Yaroslavsky A., Kharkwal G.B. and Hamblin M.R. (2011).Cell Death Pathways in Photodynamic Therapy of Cancer.*Cancers*, 3: 2516- 2539.

Nagata S., Obana A., Gohto Y. e Nakajima S. (2003). Necrotic and Apoptotic Cell Death of Human Malignant Melanoma Cells Following Photodynamic Therapy Using an Amphiphilic Photosensitizer, ATX-S10 (Na). *Lasers in Surgery and Medicine*, 33: 64–70.

O'Brien J., Wilson I., Orton T. e Pognan F. (2000). Investigation of the alamar blue (resazurin) fluorescent dye for the assessement of mammalian cell cytotoxicity. *Eur.J.Biochem*, 267: 5421-5426.

Panigrahi M., Dash S., Patel S. e Mishra B. (2012). Syntheses of cyanines: a review. *Tetrahedron*, 68: 781-805.

Parda A.C., Ramos S.S., Santos P.F., ReisL.V. e AlmeidaP. (2002). Synthesis and Spectroscopic Characterisation of *N*-Alkyl Quaternary Ammonium Salts Typical Precursors of Cyanines. *Molecules*, 7: 320- 330.

Peng Q., Juzeniene A., Chen J., Svaasand L., Warloe T., GierckskyK.E. e Moan J. (2008). Lasers in medicine.*Rep. Prog. Phys.* 71: 1-28.

Perrin D.D. e Armarego W.L.F. (1988). Purification of laboratory chemicals.*Pergamon Press*, Oxford, 391, ISBN 0 08 034714 2.

Perussi J.R. (2007). Inactivação fotodinâmica de microorganismos. *Quim. Nova*, 30: 988- 994.

Pervaiz S. e Olivo M. (2006). Art and science of photodynamic therapy. *Clin.Exp.Pharmacol.Physiol.*, 33:551–556.

Portt L., Norman G., Clapp C., Greenwood M., Greenwood M.T. (2011).Anti-apoptosis and cell survival. *A review Biochimica et Biophysica Acta*, 1813: 238– 259.

Ramaiah D., Eckert I., Arun K., Weidenfeller L. e Epe B. (2002). Squaraine dyes for photodynamic therapy: study of their cytotoxicity and genotoxicity in bacteria and mammalian cells. *Photochem.Photobiol.*, 76: 672- 677.

Ramaiah D., Joy A., Chandrasekhar N., Eldho N., Das S. e George M. (1997). Halogenated squaraine dyes as a potential photochemotherapeutic agent. Synthesis and study of photophysical properties and quantum efficiences of singlet oxygen generation. *Photochem.Photobiol*., 65: 783- 790.

Redmond R. W. (2008).Photophysics and photochemistry in photodynamic therapy.Advances in photodynamic therapy, Artech House series. ISNB 1-596993-277-5.

Reis L.V., Serrano J.P.C., Almeida P. e Santos P.F. (2002). New synthetic approach to aminosquarylium cyanines dyes. Dyes and Pigm. 10: 1617- 1620.

Reis L.V., Serrano J.P., Almeida P. e Santos P.F. (2009). The synthesis and characterization of novel, aza-substituted squarilium cyanine dyes. *Dyes and Pigm.*, 81:197- 202.

Ribeiro J., Silva A. e Jorge R. (2004). Involvement of motochondrial in apoptosis of câncer cells induced by photodynamic therapy. *Bras Patol Med Lab*. 40: 383- 90.

Ritz R., Wein H., Dietz K., Schenk M., Roser F., Tatagiba M. e Strauss W.S.L. (2007). Photodynamic therapy of malignant glioma with hypericin:Comprehensive *in vitro* study in human glioblastoma cell lines. *Intern. J. Oncol*., 30: 659-667.

Robertson C.A., Evans D. H. e Abrahamse H. (2009). Photodynamic therapy (PDT): A short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol*. 96: 1–8.

Santos P.F., Reis L.V., Almeida P., Oliveira A.S. e Ferreira L.F.V. (2003). Singlet oxygen generation ability of squarylium cyanine dyes. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, 160: 159- 161.

Santos P. F., Reis L. V., Almeida P., Serrano J. P., Oliveira A. S. e Ferreira L. F., J. (2004). Efficiency of singlet oxygen generation of aminosquarylium cyanines. *Photochem.Photobiol.*, 163: 267- 269.

Santos P. F., Reis L. V., Duarte I., Serrano J. P., Almeida P., Oliveira A. S. e Ferreira L. F. (2005). Synthesis and photochemical evaluation of iodinated squarylium cyanine dyes.*Helvet Chim. Act.*, 88: 1135- 1143.

Sharman W.M., Allen C.M. e Van Lier J.E. (1999). Photodynamic therapeutics: basic principles and clinical applications. *Elsevier Science Ltd*., 1359: 6446- 99.

Shen X.Y., Zaca N., Singh G. e Rainbow A. J. (2005). Alterations in Mitochondria1 and Apoptosis-regulating Gene Expression in Photodynamic Therapy-resistant Variants of HT29 Colon Carcinoma Cells. *Photochem. Photobiol.*, 81: 306-31 3.

Silva A. M., Miranda A., Fernandes E., Santos S., Fraga I., Santos D. L., Dias A. A. e Bezerra R.M. (2013). Endopolysaccharides from Ganoderma resinaceum, Phlebia rufa, and Trametes versicolor Affect Differently the Proliferation Rate of HepG2 Cells. *Appl. Biochem.Biotechnol*. 169: 1919-1926.

Sotomayor M., Dias I., Lanza M., Moreira A. e Kubota L. (2008). Aplicação e avanços da espectroscopia de luminescência em análises farmacêuticas. *Quim. Nova*, 31: 1755- 1774.

Sprenguer H. e Ziegenbein W. (1968). Cyclobutenediylium Dyes. *Chem. Internat.*, 7: 530-535.

Tabaković I., Trkovnik M., Batušić M. e Tabaković K. (1979). Electrochemical Synthesis of Heterocyclic Compounds; VII1. Anodic Synthesis of 1,3 -Thiazole Derivatives. *Synthesis*, 8: 590-592..

Torres E. (2010). Fotoquímica e caracterização espectroscópica de novos corantes cianínicos. *Dissertação de mestrado Mestrado*. Vila Real. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro.

Treibs W. e Poppe E.J. (1961). Über bi- und polycyclische Azulene.IL. Heterocyclisch anellierte Azazulene.*J. Prakt. Chem.*, 13: 330.

Usuada J., Chiu S.M., Azizuddin K., Xue L.Y., Lam M., Nieminen A.L. e Oleinick N.L. (2002). Promotion of photodynamic therapy-induced apoptosis by the mitochondrial protein Smac/DIABLO: Dependence on Bax. *Photochem.Photobiol*., 76: 217- 223.

Voytik-Harbin S., Brigntman A., Waisner B., Lamar C. e Badylak S. (1998).Application and evaluation of the alamar blue assay for cell growth and survival of fibroblasts.In vitro cell.*Dev.Biol.Animal*, 34: 239- 246.

Weersink R.A. e Lilge L. (2008). Light dosmetry and light sources for photodynamic therapy. *Advances in photodynamic therapy. Artech House series*. ISNB 1-596993-277-5.

Xua D.D., Lamb H.M., Hoevenc R., Xud C.B., Leung W.N., Cho W.C. (2013). Photodynamic therapy induced cell death of hormone insensitive prostate cancer PC-3 cells with autophagic characteristics. *Photodiagn. Photodyn.Ther.*, 10: 278- 287.

Xue L., Chiu S.e Oleinick N.L. (2001). Photochemical destruction of the Bcl-2 oncoprotein during photodynamic therapy with the phthalocyanine photosensitizer Pc 4. *Oncogene* 20: 3420- 3427.

Yum J., Walter P., Huber S., Rentsh D., Geiger T., Nuesch F., Angelis F., Gratzel M. e Nazeeruddin K. (2007). Efficient far red sensitization of nanocrystaline $TiO_2$ films by an unsymmetrical squaraine dye. *J. Am. Soc*,129: 10320-1.

YumitaN., Iwase Y., Nishi K., Ikeda T., Fukai T., Takeda K., Onodera K., Umemura S., Okudaira K. e Momose Y. (2011). Involvement of Reactive Oxygen Species in Sonodynamically Induced Apoptosis by 4 Formyloximeetylidene-3-Hydroxyl-2-Vinyl-Deuterio-Porphynyl (IX)-6-7-Diaspartic Acid (ATX-S10). *Biochem & Anal Biochem*, 2161-1009.

Zhuang S., Lynch M. C. e Kochevar I. E. (1999). Caspase-8 Mediates Caspase-3 Activation and Cytochrome c Release during Singlet Oxygen-Induced Apoptosis of HL-60 Cells. *Exp. Cell Research*, 250: 203- 212.