

UNIVERSIDADE DE TRÁS-OS-MONTES E ALTO DOURO

**Síntese, caracterização espectroscópica de novos corantes
esquarílicos assimétricos e sua avaliação como potenciais
fotossensibilizadores em Terapia Fotodinâmica**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOQUÍMICA

SOFIA MANUELA PINTO FRIÃES

Orientadora: Professora Doutora Lucinda Vaz Reis

Coorientadora: Professora Doutora Amélia M. Lopes Dias da Silva



Vila Real, 2015

UNIVERSIDADE DE TRÁS-OS-MONTES E ALTO DOURO

**Síntese, caracterização espectroscópica de novos corantes
esquarílicos assimétricos e sua avaliação como potenciais
fotossensibilizadores em Terapia Fotodinâmica**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOQUÍMICA

SOFIA MANUELA PINTO FRIÃES

Orientadora: Professora Doutora Lucinda Vaz Reis

Coorientadora: Professora Doutora Amélia M. Lopes Dias da Silva



Vila Real, 2015

UNIVERSIDADE DE TRÁS-OS-MONTES E ALTO DOURO

**Síntese, caracterização espectroscópica de novos corantes
esquarílicos assimétricos e sua avaliação como potenciais
fotossensibilizadores em Terapia Fotodinâmica**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOQUÍMICA

SOFIA MANUELA PINTO FRIÃES

Orientadora: Professora Doutora Lucinda Vaz Reis

Coorientadora: Professora Doutora Amélia M. Lopes Dias da Silva

Composição do Júri:

Vila Real, 2015

Declaração

Eu, Sofia Manuela Pinto Friães, declaro, sob compromisso de honra, que este trabalho é original e que todas as contribuições não originais foram devidamente referenciadas com identificação da fonte.

Vila Real, 9 de Junho de 2015

(Sofia Manuela Pinto Friães)

“Eu sei
Que a vida tem pressa
Que tudo aconteça
Sem que a gente peça
Eu sei

Eu sei
Que o tempo não pára
O tempo é coisa rara
E a gente só repara
Quando ele já passou

Não sei se andei depressa demais
Mas sei, que algum sorriso eu perdi
Vou pedir ao tempo
que me dê mais tempo
Para olhar para ti
De agora em diante,
não serei distante
Eu vou estar aqui”

Miguel Gameiro

Agradecimentos

Finalizar mais esta etapa é sem dúvida uma grande recompensa por todo o esforço, trabalho e dedicação durante estes dois anos de mestrado. É um complemento da minha vida profissional e uma conquista da minha vida pessoal.

Ao longo de todo este meu percurso académico muitas foram as pessoas que, direta ou indiretamente, me ajudaram a atingir e cumprir os meus objetivos. Todas elas, de uma forma ou de outra, se revelaram determinantes para a realização e concretização deste projeto e por isso aqui deixo algumas palavras, que apesar não serem suficientes para descrever a minha gratidão, contêm nelas o reconhecimento, agradecimento e carinho que sinto.

À Professora Doutora Lucinda Vaz Reis, Orientadora, e Professora Doutora Amélia Lopes da Silva, Coorientadora, agradeço a excelente orientação, marcada pela sapiência, disponibilidade, brilhantismo científico, técnico e humano, que muito enriqueceram os meus conhecimentos científicos e estimularam a vontade de querer fazer melhor e o desejo de saber e aprender, sempre, mais. Agradeço também a amizade e a oportunidade que me proporcionaram de poder integrar e fazer parte do vosso grupo de investigação, reconhecendo, com gratidão, toda a confiança depositada em mim, bem como o sentido de responsabilidade que me incutiram desde o início e durante as várias fases deste trabalho.

À Professora Doutora Maria Manuel Oliveira, anterior diretora, e à Professora Doutora Carla Amaral, agora diretora do Mestrado em Bioquímica agradeço as oportunidades de aprendizagem que me ofereceram bem como o privilégio de ter frequentado este mestrado que muito contribuiu para o enriquecimento da minha formação académica e científica. Agradeço ainda a disponibilidade e atenção dedicada ao longo destes anos.

Ao Professor Doutor José Ramiro Fernandes, do Departamento de Física, Escola de Ciências e Tecnologia, desta Universidade, agradeço o tempo dispensado na idealização e construção dos sistemas de irradiação que permitiram o sucesso deste trabalho.

Ao Professor Doutor Renato Boto e ao Professor Paulo Almeida da Universidade da Beira-Interior pela amabilidade prestada, disponibilidade e rapidez com que fizeram as análises às minhas amostras.

Ao Professor Doutor Luís Filipe Vieira Ferreira, do Centro de Química-Física Molecular, do Instituto Superior Técnico, Universidade Técnica de Lisboa, e à sua equipa pela disponibilidade e rapidez com que analisaram e as minhas amostras, nomeadamente na determinação do rendimento quântico de produção do oxigénio singuleto.

Aos meus colegas de laboratório Marlene, Susana e Tiago agradeço a companhia, a animação, boa disposição e a forma como alegraram os dias menos bons passados no laboratório. À Céu, que na qualidade de doutoranda, já trabalhava no laboratório, foi também minha colega e me acompanhou deste o início do projeto, um agradecimento muito especial, não só pela companhia e amizade, mas também pelas palavras de apoio, ajuda, disponibilidade, sugestões e conselhos. À Marita, que chegou mais tarde ao laboratório mas que acompanhou de perto a última etapa deste projeto, agradeço as palavras de apoio e incentivo e todos os conselhos dados nestes últimos meses.

À Vanessa Gomes, que durante este ano trabalhou ali no laboratório do lado, agradeço além do apoio e das palavras de conforto, a amizade, a boa disposição e a alegria partilhada durante estes dois anos de mestrado.

Aos meus pais, Pedro Friães e Maria Manuela Friães, agradeço o facto de me proporcionarem a conclusão de mais uma etapa importante da minha vida académica, o apoio e por me ensinarem a ser a pessoa que sou hoje. Espero que esta etapa, que agora termina, possa, de alguma forma, retribuir e compensar todo o carinho e dedicação que todos os dias vocês me oferecem.

Aos meus familiares, Aníbal, Cândida, José e Paula Morgado, agradeço o carinho, a ajuda, o apoio e incentivo prestado durante mais esta etapa. Obrigada por estarem sempre lá, não me deixarem desistir e por acreditarem que sou capaz.

Ao meu namorado, Tiago, agradeço a paciência, o apoio, o carinho, a partilha, dedicação, valorização, alegria e companheirismo. Obrigada por ouvires os meus desabafos e por me aconselhares sobre as minhas dúvidas e inquietações, foste e és, sem dúvida, importante.

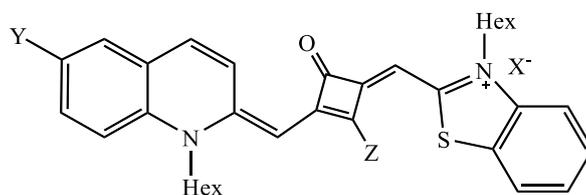
E por fim aqueles amigos que, apesar de os encontrar poucas vezes, acreditam em mim e me apoiam, principalmente à Zita, que mesmo distante nunca se esquece e me dá sempre força para continuar a lutar e alcançar os meus sonhos.

A todos um grande e sincero OBRIGADA!!

Resumo

Neste trabalho é apresentada a síntese e caracterização estrutural de dois conjuntos de corantes esquarílicos assimétricos (Figura 1) bem como a avaliação da sua citotoxicidade *in vitro*, no escuro e após irradiação a um comprimento de onda adequado, nas linhas celulares Caco-2 e HepG2, com o objetivo de estudar o potencial dos corantes como agentes fotossensibilizadores para aplicação em terapia fotodinâmica do cancro.

Esta dissertação encontra-se dividida em quatro capítulos. No primeiro é apresentada uma revisão bibliográfica sobre a terapia fotodinâmica e os corantes esquarílicos. No segundo capítulo é apresentada uma descrição de todos os métodos utilizados na síntese dos compostos pretendidos, bem como a sua caracterização espectroscópica detalhada, e uma breve descrição das técnicas usadas no estudo do potencial fototerapêutico dos corantes, nas linhas celulares Caco-2 e HepG2. No terceiro capítulo são discutidos os resultados experimentais de síntese bem como da caracterização estrutural de todos os corantes esquarílicos assimétricos. Os compostos obtidos foram caracterizados a partir de técnicas de ponto de fusão, espectros no visível, espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C e espectros de massa de alta ou baixa resolução. Neste capítulo são também apresentados e discutidos os valores de rendimento quântico de formação do oxigénio singuleto, obtidos para todos os corantes esquarílicos e aminoesquarílicos a serem aplicados nas referidas linhas celulares. No quarto, e último capítulo, são apresentados e discutidos os resultados de citotoxicidade dos corantes, no escuro, e após irradiação com LEDs centrados a 630 ou 660 nm, durante 7 ou 14 minutos, onde são de salientar os resultados obtidos para o corante zwitteriónico ($Z = \text{O}^-$; $Y = \text{I}$) que, pode ser considerado como um potencial fotossensibilizador para terapia fotodinâmica do cancro.



$X = \text{I}, \text{CF}_3\text{SO}_3^-$; $Y = \text{I}, \text{H}$; $Z = \text{O}^-, \text{NH}_2, \text{NHCH}_3, \text{NHPh}, \text{NH-3-I-Ph}$

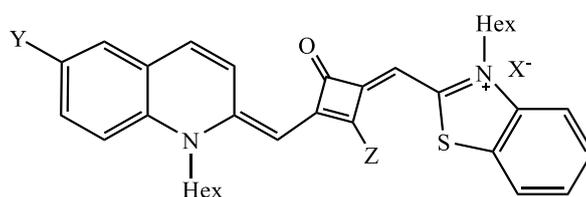
Figura 1. Fórmula geral dos corantes cianínicos esquarílicos sintetizados

Palavras-Chave: Terapia fotodinâmica, cianinas, corantes esquarílicos, oxigénio singuleto, células HepG2, células Caco-2

Abstract

In this work it is presented the synthesis and structural characterization of two sets of asymmetric squarylium dyes (Figure 1) as well as the evaluation of their cytotoxicity, *in vitro*, in the dark and after irradiation at a suitable wavelength, in Caco-2 and HepG2 cell lines, in order to study the potential of these dyes as photosensitizers for use in photodynamic therapy of cancer.

The present dissertation is divided into four chapters. In the first chapter, it is presented a literature review on photodynamic therapy and squarylium dyes. The second chapter presents a description of all experimental methods used for the synthesis of the organic compounds, the spectroscopic characterization as well as physical characterization and a brief description of the techniques used to study the phototherapeutic potential of the dyes, using Caco-2 and HepG2 cell lines. In the third chapter, the results of experimental synthesis as well as the structural characterization of all asymmetric squarylium dyes are discussed. The obtained compounds were fully characterized from techniques such as melting point, visible spectra, nuclear magnetic resonance spectra (NMR) of ^1H and ^{13}C and mass spectra of high or low resolution. In this chapter it is also presented and discussed the quantum yield values of singlet oxygen formation, obtained for all squarylium and aminosquarylium dyes, to be applied in cells lines referred above. In the last chapter the results of dyes cytotoxicity obtained in the dark and after irradiation with LEDs centered at 630 or 660 nm during 7 or 14 minutes, are presented and discussed; From the obtained data it is highlighted the results obtained for the zwitterionic dye ($Z = \text{O}$; $Y = \text{I}$), that can be considered as a potential photosensitizer for photodynamic therapy of cancer.



$X = \text{I}, \text{CF}_3\text{SO}_3$; $Y = \text{I}, \text{H}$; $Z = \text{O}^-, \text{NH}_2, \text{NHCH}_3, \text{NHPh}, \text{NH-3-I-Ph}$

Figure 1. General formula of the squarylium cyanine dyes synthesized

Key-Words: Photodynamic therapy, cyanines, squarylium dyes, singlet oxygen, HepG2 cells, Caco-2 cells

Índice Geral

Índice de Figuras.....	xvii
Índice de Esquemas.....	xxiii
Índice de Tabelas.....	xxiii
Lista de abreviaturas, siglas e símbolos.....	xxiv
Capítulo 1 – Introdução.....	1
1.0 Nota Introdutória.....	2
1.1 Terapia Fotodinâmica.....	3
1.1.1 Mecanismos de ação da PDT nos sistemas biológicos.....	5
1.1.2 Aplicações da PDT.....	8
1.2 Fotossensibilizadores.....	9
1.2.1 Parâmetros para um fotossensibilizador eficiente.....	11
1.2.1.1 Pureza.....	12
1.2.1.2 Toxicidade e estabilidade.....	12
1.2.1.3 Parâmetros fotofísicos e fotoquímicos.....	12
1.2.1.4 Absorção de luz.....	13
1.2.1.5 Hidrofilicidade e lipofilicidade.....	14
1.2.1.6 Estado de agregação.....	14
1.3 Corantes.....	16
1.3.1 Cianinas.....	17
1.3.2 Cianinas Esquarílicas.....	19
1.3.2.1 Estudo do potencial dos corantes esquarílicos, para aplicação em PDT, <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	22
1.4 Linhas Celulares: um modelo de estudo <i>in vitro</i> para PDT.....	24
1.4.1 Obtenção de cultura de células e sua manutenção – Cultura primária e subcultura.....	25

1.4.2 Condições para uma cultura de células e morfologia adquirida pelas células em cultura.....	26
1.4.3 Avaliação da citotoxicidade em cultura de células.....	27
1.5 Principais objetivos do trabalho.....	29
Capítulo 2 – Parte Experimental.....	30
2.1 Procedimento experimental para a síntese de compostos orgânicos.....	31
2.1.1 Reagentes e Equipamentos.....	31
2.1.2 Síntese de corantes esquarílicos assimétricos derivados do benzotiazole e da quinaldina.....	33
2.1.2.1 Sínteses prévias.....	33
2.1.2.1.1 Síntese do iodeto de <i>N</i> -hexil-2-metilquinolínio (2).....	33
2.1.2.1.2 Síntese de 3,4-dibutoxi-3-ciclobuteno-1,2-diona (4).....	33
2.1.2.1.3 Síntese da 3-butoxi-4-[(1-hexilquinolin-2(1 <i>H</i>)-ilideno) metil]-3-ciclobuteno-1,2-diona (5).....	34
2.1.2.1.4 Síntese de 3-[(1-hexilquinolin-2(1 <i>H</i>)-ilideno)metil]-4-hidroxi-3-ciclobuteno-1,2-diona (6).....	35
2.1.2.1.5 Síntese do iodeto de 3-hexil-2-metilbenzotiazólio (8).....	36
2.1.2.1.6 Síntese de 3-butoxi-4-[(3-hexilbenzotiazole-2(3 <i>H</i>)-ilideno)metil]-3-ciclobuteno-1,2-diona (9).....	37
2.1.2.1.7 Síntese do 3-[(3-hexilbenzotiazole-2(3 <i>H</i>)-ilideno) metil]-4-hidroxi-3-ciclobuteno-1,2-diona (10).....	38
2.1.2.1.8 Tentativa de síntese 2-[(3-hexilbenzotiazole-2(3 <i>H</i>)-ilideno)metil]-4-[(1-hexilquinolin-1- <i>io</i> -2- <i>il</i>)metileno]-3-oxociclobut-1-en-1-olato (11).....	39
2.1.2.1.9 Síntese de 4-[(3-hexilbenzotiazole-3- <i>io</i> -2- <i>il</i>)metileno]-2-[(1-hexilquinolin-2(1 <i>H</i>)-ilideno)metil]-3-oxociclobut-1-en-1-olato (11)...	40

2.1.2.1.10 Síntese de trifluorometanossulfonato de 3-hexil-2-[(3-[(1-hexilquinolin-2(1 <i>H</i>)-ilideno)metil]-2-metoxi-4-oxociclobut-2-en-1-ilideno)metil]benzotiazole-3-io (12).....	41
2.1.2.2 Síntese de corantes aminoescarílicos assimétricos derivados do benzotiazole e da quinaldina.....	42
2.1.2.2.1 Síntese de iodeto de 2-[(2-amino-3-[(1-hexilquinolin-2(1 <i>H</i>)-ilideno)metil]-4-oxociclobut-2-en-1-ilideno)metil]-3-hexilbenzotiazole-3-io (13).....	42
2.1.2.2.2 Síntese de iodeto de 3-hexil-2-[(3-[(1-hexilquinolin-2(1 <i>H</i>)-ilideno)metil]-2-metilamino-4-oxociclobut-2-en-1-ilideno)metil]benzotiazole-3-io (14).....	43
2.1.2.2.3 Síntese de iodeto de 3-hexil-2-[(3-[(1-hexilquinolin-2(1 <i>H</i>)-ilideno)metil]-4-oxo-2-(fenilamino)ciclobut-2-en-1-ilideno)metil]benzotiazole-3-io (15).....	45
2.1.2.2.4 Síntese de trifluorometanossulfonato de 3-hexil-2-[(3-[(1-hexilquinolin-2(1 <i>H</i>)-ilideno)metil]-2-[(3-iodofenil)amino]-4-oxociclobut-2-en-1-ilideno)metil]benzotiazole-3-io (16).....	46
2.1.2.2.5 Síntese de iodeto de 3-hexil-2-[(3-[(1-hexilquinolin-2(1 <i>H</i>)-ilideno)metil]-2-[(3-iodofenil)amino]-4-oxociclobut-2-en-1-ilideno)metil]benzotiazole-3-io (17).....	47
2.1.3 Síntese de corantes escarílicos assimétricos derivados do benzotiazole e da 6-iodoquinaldina.....	48
2.1.3.1 Sínteses prévias.....	48
2.1.3.1.1 Síntese da 6-iodoquinaldina (19).....	48
2.1.3.1.2 Síntese do iodeto de 6-iodo-1-hexilquinaldínio (20).....	50

2.1.3.1.3 Síntese de 2-[(1-hexil-6-iodoquinolin-2(1 <i>H</i>)-ilideno)metil]-4-[(3-hexilbenzotiazole-3-io-2-il)metileno]-3-oxociclobut-1-en-1-olato (21).....	51
2.1.3.1.4 Síntese de trifluorometanossulfonato de 3-hexil-2-[(3-[(1-hexil-6-iodoquinolin-2(1 <i>H</i>)-ilideno)metil]-2-metoxi-4-oxociclobut-2-en-1-ilideno)metil]benzotiazole-3-io (22).....	52
2.1.3.2 Síntese de corantes aminoescarílicos assimétricos derivados do benzotiazole e da 6-iodoquinaldina.....	53
2.1.3.2.1 Síntese de trifluorometanossulfonato de 2-[(2-amino-3-[(1-hexil-6-iodoquinolin-2(1 <i>H</i>)-ilideno)metil]-4-oxociclobut-2-en-1-ilideno)metil]-3-hexilbenzotiazole-3-io (23).....	53
2.1.3.2.2 Síntese de trifluorometanossulfonato de 3-hexil-2-[(3-[(1-hexil-6-iodoquinolin-2(1 <i>H</i>)-ilideno)metil]-2-metilamino-4-oxociclobut-2-en-1-ilideno)metil]benzotiazole-3-io (24).....	54
2.1.3.2.3 Síntese de trifluorometanossulfonato de 3-hexil-2-[(3-[(1-hexil-6-iodoquinolin-2(1 <i>H</i>)-ilideno)metil]-4-oxo-2-(fenilamino)ciclobut-2-en-1-ilideno)metil]benzotiazole-3-io (25).....	56
2.1.3.2.4 Síntese de trifluorometanossulfonato 3-hexil-2-[(3-[(1-hexil-6-iodoquinolin-2(1 <i>H</i>)-ilideno)metil]-2-[(3-iodofenil)amino]-4-oxociclobut-2-en-1-ilideno)metil]benzotiazole-3-io (26).....	57
2.2 Procedimento experimental para avaliação da citotoxicidade dos corantes escarílicos em linhas celulares Caco-2 e HepG2.....	58
2.2.1 Culturas de células utilizadas neste trabalho.....	58
2.2.1.1 Células Caco-2.....	58
2.2.1.2 Células HepG2.....	59
2.2.2 Preparação do meio de cultura.....	59
2.2.3 Subcultura e manutenção.....	60

2.2.4	Contagem das células.....	61
2.2.5	Plantação das células nas placas.....	61
2.2.6	Preparação das soluções de corantes a serem testados nas células.....	62
2.2.7	Aplicação dos corantes às células.....	62
2.2.8	Irradiação das células.....	62
2.2.9	Determinação da viabilidade celular.....	63
2.2.10	Análise e apresentação dos resultados.....	65
Capítulo 3 – Discussão da Síntese e Caracterização Espectroscópica de Compostos Orgânicos.....		66
3.1	Síntese de corantes esquarílicos assimétricos.....	67
3.1.1	Síntese de corantes esquarílicos assimétricos derivados do benzotiazole e da quinaldina.....	68
3.1.1.1	Síntese do iodeto de <i>N</i> -hexil-2-metilquinolínio (2).....	68
3.1.1.2	Síntese do 3,4-dibutoxi-3-ciclobuteno-1,2-diona (4).....	69
3.1.1.3	Síntese do 3-butoxi-4-[(1-hexilquinolin-2(1 <i>H</i>)-ilideno)metil]-3-ciclobuteno-1,2-diona (5).....	70
3.1.1.4	Síntese do 3-[(1-hexilquinolin-2(1 <i>H</i>)-ilideno)metil]-4-hidroxi-3-ciclobuteno-1,2-diona (6).....	72
3.1.1.5	Síntese do iodeto de 3-hexil-2-metilbenzotiazólio (8).....	73
3.1.1.6	Tentativa de síntese do 2-[(3-hexilbenzotiazole-2(3 <i>H</i>)-ilideno)metil]-4-[(1-hexilquinolin-1- <i>io</i> -2- <i>il</i>)metileno]-3-oxociclobut-1-en-1-olato (11).....	74
3.1.1.7	Síntese do 3-butoxi-4-[(3-hexilbenzotiazole-2(3 <i>H</i>)-ilideno) metil]-3-ciclobuteno-1,2-diona (9).....	75
3.1.1.8	Síntese do 3-[(3-hexilbenzotiazole-2(3 <i>H</i>)-ilideno)metil]-4-hidroxi-3-ciclobuteno-1,2-diona (10).....	77
3.1.1.9	Síntese de 2-[(3-hexilbenzotiazole-2(3 <i>H</i>)-ilideno)metil]-4-[(1-hexilquinolin-1- <i>io</i> -2- <i>il</i>)metileno]-3-oxociclobut-1-en-1-olato (11).....	78

3.1.1.10 Síntese do trifluorometanossulfonato de 3-hexil-2-[(3-[(1-hexilquinolin-2(1 <i>H</i>)-ilideno)metil]-2-metoxi-4-oxociclobut-2-en-1-ilideno)metil]benzotiazole-3-io (12).....	80
3.1.1.11 Síntese dos corantes cianínicos aminoescuarílicos assimétricos 13-17	82
3.1.2 Síntese de corantes esuarílicos assimétricos derivados do benzotiazole e da 6-iodoquinaldina.....	88
3.1.2.1 Síntese da 6-iodoquinaldina (19).....	88
3.1.2.2 Síntese do iodeto de 6-iodo-1-hexilquinaldínio (20).....	90
3.1.2.3 Síntese do 2-[(1-hexil-6-iodoquinolin-2(1 <i>H</i>)-ilideno)metil]-4-[(3-hexilbenzotiazole-3-io-2-il)metileno]-3-oxociclobut-1-en-1-olato (21).....	91
3.1.2.4 Síntese de trifluorometanossulfonato de 3-hexil-2-[(3-[(1-hexil-6-iodoquinolin-2(1 <i>H</i>)-ilideno)metil]-2-metoxi-4-oxociclobut-2-en-1-ilideno)metil]benzotiazole-3-io (22).....	93
3.1.2.5 Síntese dos corantes cianínicos aminoescuarílicos assimétricos 23-26	95
3.2 Espectros no Visível.....	101
3.2.1 Espectros no Visível dos corantes esuarílicos assimétricos derivados do benzotiazole e da quinaldina.....	101
3.2.2 Espectros no Visível dos corantes esuarílicos assimétricos derivados do benzotiazole e da 6-iodoquinaldina.....	103
3.3 Avaliação da capacidade de formação de oxigénio singuleto (¹ O ₂) por parte de todos os corantes esuarílicos assimétricos sintetizados.....	106
3.4 Conclusões.....	108
Capítulo 4 – Apresentação e Discussão dos Resultados de Citotoxicidade.....	109
4.1 Avaliação do potencial fototerapêutico dos corantes esuarílicos e aminoescuarílicos assimétricos em linhas celulares Caco-2 e HepG2.....	110
4.1.1 Efeito citotóxico dos corantes esuarílicos e aminoescuarílicos assimétricos.....	111
4.1.1.1 Efeito citotóxico dos corantes esuarílicos e aminoescuarílicos assimétricos derivados do benzotiazole e da quinaldina.....	111

4.1.1.2 Efeito citotóxico dos corantes esquarílicos e aminoesquarílicos derivados do benzotiazole e da 6-iodoquinaldina.....	114
4.1.2 Efeito dos corantes esquarílicos e aminoesquarílicos assimétricos após irradiação nas linhas celulares Caco-2 e HepG2.....	117
4.1.2.1 Avaliação do potencial fototerapêutico do corante 11	117
4.1.2.2 Avaliação do potencial fototerapêutico do corante 13	120
4.1.2.3 Avaliação do potencial fototerapêutico do corante 14	122
4.1.2.4 Avaliação do potencial fototerapêutico do corante 15	123
4.1.2.5 Avaliação do potencial fototerapêutico dos corantes 16 e 17	125
4.1.2.6 Avaliação do potencial fototerapêutico do corante 21	129
4.1.2.7 Avaliação do potencial fototerapêutico do corante 23	131
4.1.2.8 Avaliação do potencial fototerapêutico do corante 24	133
4.1.2.9 Avaliação do potencial fototerapêutico do corante 25	134
4.1.2.10 Avaliação do potencial fototerapêutico do corante 26	136
4.1.3 Avaliação do potencial dos corantes esquarílicos e aminoesquarílicos derivados do benzotiazole e da quinaldina e do benzotiazole e da 6-iodoquinaldina para aplicação como FS em PDT – Comparação de Resultados.....	137
4.2 Conclusões.....	140
Capítulo 5 – Referências Bibliográficas	141
ANEXOS	151
ANEXO A - Corantes esquarílicos e aminoesquarílicos aplicados nas linhas celulares Caco-2 e HepG2, e respectivos $\lambda_{\text{máx}}$ e $\Phi\Delta$	152
ANEXO B – Publicações no âmbito deste trabalho.....	153

Índice de Figuras

Figura 1.1 Representação esquemática das várias etapas envolvidas na PDT. 1) Administração do FS por via sistêmica, tópica ou local, 2) Acumulação seletiva do FS, na lesão após um determinado tempo de incubação, 3) Irradiação da lesão com luz a um comprimento de onda específico, 4) destruição da lesão devido à formação de espécies citotóxicas (Figura adaptada de Photolitec, 2013).....	4
Figura 1.2 Representação esquemática dos vários tipos de reações que podem ocorrer na Terapia Fotodinâmica, após ativação do FS (adaptado de Allison e Moghissi, 2013).....	4
Figura 1.3 Representação dos principais mecanismos de morte celular e respectivas características morfológicas e imunológicas (adaptado de Agostinis <i>et al.</i> , 2011).....	7
Figura 1.4 Representação esquemática das duas vias apoptóticas que podem ocorrer na PDT após a ativação do FS (adaptado de (Yoo e Ha, 2012).....	8
Figura 1.5 Mecanismos de citotoxicidade da PDT: diagrama de Jablonski modificado (adaptado de Konan <i>et al.</i> , 2002 e Ethirajan <i>et al.</i> , 2011).....	13
Figura 1.6 Representação esquemática da relação entre arranjo estrutural das moléculas do corante e desvio espectral baseado na teoria de excitação molecular (adaptado de Mishra <i>et al.</i> , 2000).....	15
Figura 1.7 Espectro eletromagnético.....	17
Figura 1.8 Estrutura geral das cianinas e típicos componentes heterocíclicos (adaptado de Armitage, 2008).....	18
Figura 1.9 Estrutura geral das cianinas esquarílicas onde R ₁ e R ₂ = grupos alquilo; X = O ⁻ ; OCH ₃ , NH ₂ , NHCH ₃ , etc.; Y = grupos aromáticos; Z ⁻ = I; CF ₃ SO ₃ , etc.....	19
Figura 1.10 Esquema representativo da síntese geral de uma cianina esquarílica onde Z = grupos aromáticos ou heteroaromáticos e R = grupos alquilo.....	20
Figura 1.11 Corantes cianínicos esquarílicos. R = CH ₃ , C ₂ H ₅ , <i>n</i> -C ₆ H ₁₃ ; X = S, Se, CH=CH (adaptado de Santos <i>et al.</i> , 2003).....	21
Figura 1.12 Corantes cianínicos esquarílicos. R = CH ₂ C ₆ H ₅ , C ₆ H ₅ , 3-I-C ₆ H ₄ , N(CH ₃) ₂ , CH ₂ CH ₂ SO ₃ ⁻ (adaptado de Reis <i>et al.</i> , 2009).....	21
Figura 1.13 Corantes cianínicos esquarílicos. X = S, Se; Y = O ⁻ , NH ₂ , NHCH ₃ ; Z ⁻ = I, CF ₃ SO ₃ ⁻ ; R ₁ = CH ₂ CH ₃ , C ₆ H ₁₄ (adaptado de Ferreira <i>et al.</i> , 2013b).....	21
Figura 1.14 Floroglucinol (estrutura baseada em corantes esquarílicos). X = H, Br, I (adaptado de Ramaiah <i>et al.</i> , 2002).....	22
Figura 1.15 bis(3,5-di-iodo-2,4,6- tri-hidroxifenil) (adaptado de Devi <i>et al.</i> , 2008).....	22
Figura 1.16 Corantes esquarílicos. X = NH ₂ , NHMe, NHPH (adaptado de Guerra, 2012).....	23

Figura 1.17 Corantes esquarílicos. $X=Y$; $X\neq Y = S, Se$; $S_1 = I, H$; $S_2 = NH_2, NHMe, NHPH, 3-I-NHPH, NHCH_2CH_2OSO_3^-$ (adaptado de Fagundes, 2013).....	23
Figura 1.18 Representação da reação de redução do MTT, em células viáveis (adaptado de Riss <i>et al.</i> , 2013).....	27
Figura 1.19 Representação da reação de redução da rezasurina, em células viáveis (adaptado de Riss <i>et al.</i> , 2013).....	28
Figura 1.20 Fórmula geral dos corantes esquarílicos a serem sintetizados.....	29
Figura 2.1 Fotografia de células Caco-2, cedida pela Prof. Amélia Silva (ampliação de 100x).....	58
Figura 2.2 Fotografia de células HepG2, cedida pela Prof. Amélia Silva (ampliação de 100x).....	59
Figura 2.3 Incubadora de CO ₂ (Binder CB150).....	60
Figura 2.4 Contador de células automático.....	61
Figura 2.5 Esquema representativo das placas de cultura após a plantação das células, onde \emptyset representa os poços sem células e C os poços com células. Na zona a cinzento claro foram depositadas células Caco-2 e na zona a cinza escuro foram depositadas células HepG2.....	61
Figura 2.6 Esquema representativo da lavagem das placas decorridos os 60 min ou 24 h de contacto com o corante irradiado.....	63
Figura 2.7 Espectrofotómetro de microplacas.....	64
Figura 3.1 Estrutura de ressonância no anel de quatro membros dos corantes esquarílicos zwitteriónicos.....	79
Figura 3.2 Estrutura de ressonância do anel de quatro membros dos corantes aminoesquarílicos....	84
Figura 3.3 Espectros parciais de RMN de ¹ H dos compostos 11 , 12 e 14 . A: espectro do composto 11 em CDCl ₃ +MeOD (600 MHz); B: espectro do composto 12 em CDCl ₃ (600 MHz); C: espectro do composto 14 em DMSO (600 MHz); D: espectro do composto 14 em DMSO (400 MHz) a 90 °C. Os picos assinalados com um x correspondem a uma contaminação do solvente.....	86
Figura 3.4 Espectros parciais de RMN de ¹ H dos compostos 21 , 22 e 24 . A: espectro do corante 21 em CDCl ₃ (600 MHz); B: espectro do corante 22 em CDCl ₃ (600 MHz); C: espectro do corante 24 em DMSO (600 MHz); D: espectro do corante 24 em DMSO (400 MHz) a 90 °C. Os picos assinalados com um x correspondem a uma contaminação do solvente.....	99
Figura 3.5 Espectros de absorção no Visível dos corantes esquarílicos assimétricos derivados do benzotiazole e da quinaldina em DMSO.....	102
Figura 3.6 Espectros de absorção no Visível dos corantes esquarílicos assimétricos derivados do benzotiazole e da quinaldina, em DMEM.....	103

Figura 3.7 Espectros de absorção no Visível dos corantes esquarílicos assimétricos derivados do benzotiazole e da 6-iodoquinaldina em DMSO.....	104
Figura 3.8 Espectros de absorção no Visível dos corantes esquarílicos assimétricos derivados do benzotiazole e da 6-iodoquinaldina em DMEM.....	105
Figura 4.1 Efeito citotóxico dos corantes esquarílico 11 e aminoesquarílicos 13 a 17 derivados do benzotiazole e da quinaldina na linha celular Caco-2, após exposição aos corantes durante 24 h (A) e 48 h (B). Os símbolos acima das barras correspondem às diferenças encontradas após análise estatística, sendo: * controlo vs outras concentrações; # diferentes tempos de exposição ao corante.....	111
Figura 4.2 Efeito citotóxico dos corantes esquarílico 11 e aminoesquarílicos 13-17 derivados do benzotiazole e da quinaldina na linha celular HepG2, após exposição aos corantes durante 24 h (A) e 48 h (B). Os símbolos acima das barras correspondem às diferenças encontradas após análise estatística, sendo: * controlo vs outras concentrações; # diferentes tempos de exposição ao corante.....	112
Figura 4.3 Efeito citotóxico dos corantes esquarílico 21 e aminoesquarílicos 23-26 derivados do benzotiazole e da 6-iodoquinaldina na linha celular Caco-2, após exposição aos corantes durante 24 h (A) e 48 h (B). Os símbolos acima das barras correspondem às diferenças encontradas após análise estatística, sendo: * controlo vs outras concentrações; # diferentes tempos de exposição ao corante.....	114
Figura 4.4 Efeito citotóxico dos corantes esquarílico 21 e aminoesquarílicos 23-26 derivados do benzotiazole e da 6-iodoquinaldina na linha celular HepG2, após exposição aos corantes durante 24 h (A) e 48 h (B). Os símbolos acima das barras correspondem às diferenças encontradas após análise estatística, sendo: * controlo vs outras concentrações; # diferentes tempos de exposição ao corante.....	116
Figura 4.5 Efeito citotóxico do corante esquarílico 11 nas linhas celulares Caco-2, em função da concentração e do tempo de irradiação, e efeito do solvente utilizado na dissolução do corante. Os símbolos acima das barras correspondem às diferenças encontradas após análise estatística, sendo: * controlo vs outras concentrações; # diferentes tempos de exposição ao corante; a condição não irradiada vs irradiada; b 7 minutos de irradiação vs 14 minutos de irradiação; l efeito do solvente vs efeito do corante + solvente.....	118
Figura 4.6 Efeito citotóxico do corante esquarílico 11 nas linhas celulares HepG2, em função da concentração e do tempo de irradiação, e efeito do solvente utilizado na dissolução do corante. Os símbolos acima das barras correspondem às diferenças encontradas após análise estatística, sendo: * controlo vs outras concentrações; # diferentes tempos de exposição ao corante; a condição não irradiada vs irradiada; b 7 minutos de irradiação vs 14 minutos de irradiação; l efeito do solvente vs o efeito do corante + solvente.....	119
Figura 4.7 Efeito citotóxico do corante 13 na linha celular Caco-2, em função da concentração e do tempo de irradiação. Os símbolos acima das barras correspondem às diferenças encontradas após análise estatística, sendo: * controlo vs outras concentrações; # diferentes tempos de exposição ao corante;	

a condição não irradiada vs irradiada; **b** 7 minutos de irradiação vs 14 minutos de irradiação..... 121

Figura 4.8 Efeito citotóxico do corante **13** na linha celular HepG2, em função da concentração e do tempo de irradiação. Os símbolos acima das barras correspondem às diferenças encontradas após análise estatística, sendo: * controlo vs outras concentrações; # diferentes tempos de exposição ao corante; **a** condição não irradiada vs irradiada; **b** 7 minutos de irradiação vs 14 minutos de irradiação..... 121

Figura 4.9 Efeito citotóxico do corante **14** na linha celular Caco-2, em função da concentração e do tempo de irradiação. Os símbolos acima das barras correspondem às diferenças encontradas após análise estatística, sendo: * controlo vs outras concentrações; # diferentes tempos de exposição ao corante; **a** condição não irradiada vs irradiada; **b** 7 minutos de irradiação vs 14 minutos de irradiação..... 122

Figura 4.10 Efeito citotóxico do corante **14** na linha celular HepG2, em função da concentração e do tempo de irradiação. Os símbolos acima das barras correspondem às diferenças encontradas após análise estatística, sendo: * controlo vs outras concentrações; # diferentes tempos de exposição ao corante; **a** condição não irradiada vs irradiada; **b** 7 minutos de irradiação vs 14 minutos de irradiação..... 123

Figura 4.11 Efeito citotóxico do corante **15** na linha celular Caco-2, em função da concentração e do tempo de irradiação. Os símbolos acima das barras correspondem às diferenças encontradas após análise estatística, sendo: * controlo vs outras concentrações; # diferentes tempos de exposição ao corante; **a** condição não irradiada vs irradiada; **b** 7 minutos de irradiação vs 14 minutos de irradiação..... 124

Figura 4.12 Efeito citotóxico do corante **15** na linha celular HepG2, em função da concentração e do tempo de irradiação. Os símbolos acima das barras correspondem às diferenças encontradas após análise estatística, sendo: * controlo vs outras concentrações; # diferentes tempos de exposição ao corante; **a** condição não irradiada vs irradiada; **b** 7 minutos de irradiação vs 14 minutos de irradiação..... 124

Figura 4.13 Efeito citotóxico do corante **16** ou **17** na linha celular Caco-2, em função da concentração e do tempo de irradiação. Os símbolos acima das barras correspondem às diferenças encontradas após análise estatística, sendo: * controlo vs outras concentrações; # diferentes tempos de exposição ao corante; **a** condição não irradiada vs irradiada; **b** 7 minutos de irradiação vs 14 minutos de irradiação..... 126

Figura 4.14 Efeito citotóxico do corante **16** ou **17** na linha celular HepG2, em função da concentração e do tempo de irradiação. Os símbolos acima das barras correspondem às diferenças encontradas após análise estatística, sendo: * controlo vs outras concentrações; # diferentes tempos de exposição ao corante; **a** condição não irradiada vs irradiada; **b** 7 minutos de irradiação vs 14 minutos de irradiação..... 127

Figura 4.15 Efeito citotóxico do corante **21** na linha celular Caco-2, em função da concentração e do tempo de irradiação. Os símbolos acima das barras correspondem às diferenças encontradas após análise estatística, sendo: * controlo vs outras concentrações; # diferentes tempos de exposição ao corante; **a** condição não irradiada vs irradiada; **b** 7 minutos de irradiação vs 14 minutos de irradiação..... **130**

Figura 4.16 Efeito citotóxico do corante **21** na linha celular HepG2, em função da concentração e do tempo de irradiação. Os símbolos acima das barras correspondem às diferenças encontradas após análise estatística, sendo: * controlo vs outras concentrações; # diferentes tempos de exposição ao corante; **a** condição não irradiada vs irradiada; **b** 7 minutos de irradiação vs 14 minutos de irradiação..... **130**

Figura 4.17 Efeito citotóxico do corante **23** na linha celular Caco-2, em função da concentração e do tempo de irradiação. Os símbolos acima das barras correspondem às diferenças encontradas após análise estatística, sendo: * controlo vs outras concentrações; # diferentes tempos de exposição ao corante; **a** condição não irradiada vs irradiada; **b** 7 minutos de irradiação vs 14 minutos de irradiação..... **131**

Figura 4.18 Efeito citotóxico do corante **23** na linha celular HepG2, em função da concentração e do tempo de irradiação. Os símbolos acima das barras correspondem às diferenças encontradas após análise estatística, sendo: * controlo vs outras concentrações; # diferentes tempos de exposição ao corante; **a** condição não irradiada vs irradiada; **b** 7 minutos de irradiação vs 14 minutos de irradiação..... **132**

Figura 4.19 Efeito citotóxico do corante **24** na linha celular Caco-2, em função da concentração e do tempo de irradiação. Os símbolos acima das barras correspondem às diferenças encontradas após análise estatística, sendo: * controlo vs outras concentrações; # diferentes tempos de exposição ao corante; **a** condição não irradiada vs irradiada; **b** 7 minutos de irradiação vs 14 minutos de irradiação..... **133**

Figura 4.20 Efeito citotóxico do corante **24** na linha celular HepG2, em função da concentração e do tempo de irradiação. Os símbolos acima das barras correspondem às diferenças encontradas após análise estatística, sendo: * controlo vs outras concentrações; # diferentes tempos de exposição ao corante; **a** condição não irradiada vs irradiada; **b** 7 minutos de irradiação vs 14 minutos de irradiação..... **134**

Figura 4.21 Efeito citotóxico do corante **25** na linha celular Caco-2, em função da concentração e do tempo de irradiação. Os símbolos acima das barras correspondem às diferenças encontradas após análise estatística, sendo: * controlo vs outras concentrações; # diferentes tempos de exposição ao corante; **a** condição não irradiada vs irradiada; **b** 7 minutos de irradiação vs 14 minutos de irradiação..... **135**

Figura 4.22 Efeito citotóxico do corante **25** na linha celular HepG2, em função da concentração e do tempo de irradiação. Os símbolos acima das barras correspondem às diferenças encontradas após análise estatística, sendo: * controlo vs outras concentrações; # diferentes tempos de exposição ao corante; **a** condição não irradiada vs irradiada; **b** 7 minutos de irradiação vs 14 minutos de irradiação..... **135**

Figura 4.23 Efeito citotóxico do corante **26** na linha celular Caco-2, em função da concentração e do tempo de irradiação. Os símbolos acima das barras correspondem às diferenças encontradas após análise estatística, sendo: * controlo vs outras concentrações; # diferentes tempos de exposição ao corante; **a** condição não irradiada vs irradiada; **b** 7 minutos de irradiação vs 14 minutos de irradiação..... **136**

Figura 4.24 Efeito citotóxico do corante **26** na linha celular HepG2, em função da concentração e do tempo de irradiação. Os símbolos acima das barras correspondem às diferenças encontradas após análise estatística, sendo: * controlo vs outras concentrações; # diferentes tempos de exposição ao corante; **a** condição não irradiada vs irradiada; **b** 7 minutos de irradiação vs 14 minutos de irradiação..... **137**

Índice de Esquemas

Esquema 3.1 Esquema geral da síntese dos corantes cianínicos esquarílicos assimétricos.....	67
Esquema 3.2 Síntese do sal quaternário 2	68
Esquema 3.3 Síntese do composto 4	69
Esquema 3.4 Síntese do composto 5 através de dois métodos diferentes.....	70
Esquema 3.5 Síntese do composto 6	72
Esquema 3.6 Síntese do composto 8	73
Esquema 3.7 Tentativa de síntese do corantes esquarílico 11	74
Esquema 3.8 Síntese do composto 9	75
Esquema 3.9 Síntese do composto 10	77
Esquema 3.10 Síntese do corante esquarílico 11	78
Esquema 3.11 Síntese do corante esquarílico 12	80
Esquema 3.12 Síntese dos corantes amino-esquarílicos derivados de quinaldina 13-17	83
Esquema 3.13 Síntese da 6-iodo-quinaldina (19) por três métodos diferentes.....	88
Esquema 3.14 Síntese do sal quaternário de amónio 20	90
Esquema 3.15 Síntese do corante esquarílico 21	91
Esquema 3.16 Síntese do corante esquarílico 22	93
Esquema 3.17 Síntese dos corantes amino-esquarílicos 23-26	96

Índice de Tabelas

Tabela 1.1 Lista de FSs, atualmente disponíveis no mercado, para uso em PDT (adaptado de Master <i>et al.</i> , 2013).....	10
Tabela 3.1 Rendimentos quânticos de formação de oxigénio singuleto por parte dos corantes cianínicos esquarílicos e amino-esquarílicos assimétricos sintetizados.....	106

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

AB – Alamar Blue (indicador de viabilidade celular)

AIF – Fator indutor de apoptose (do inglês *apoptosis-inducing factor*)

alif. - Alifática

Apaf-1 – Fator de ativação de protease apoptótica 1 (do inglês *Apoptotic protease activating factor 1*)

Ar – aromático

ATCC – *American Type Culture Collection*

ATP – Adenosina Trifosfato

Bid – *BH₃-interating domain death agonist*

BSA – Albumina do soro bovino (do inglês *Bovine Serum Albumin*)

Calc. – Calculado

c.c.f. – Cromatografia em camada fina

Caco-2 – Linha celular derivada de adenocarcinoma colorectal

c.d.o – Comprimento de onda

¹³C-RMN – Ressonância Magnética Nuclear de Carbono

d – duplete

dATP – Dioxiadenosina Trifosfato

dec. – Decomposição

DEPT 90 – *Distortionless enhancement by polarization 90°*

DEPT 135 – *Distortionless enhancement by polarization 135°*

DISC – Complexo intracelular de sinalização de morte celular (do inglês *Death-Inducing Signaling Complex*)

4-DMAP – 4,4-N-dimetilaminopiridina

DMBA – 7,12-dimetilbenzantraceno (imunossupressor e poderoso carcinogénico)

DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DMSO – Dimetilsulfóxido

EM – Espectrometria de Massa

EMAR – Espectrometria de Massa de Alta Resolução

EMAR-ESI-TOF – Espectrometria de Massa de Alta Resolução por *electrospray ionization time of flight-mass*

Eq. – Equivalente Molar

Et₃N - trietilamina

f – forte

fr - fraca

FS – Fotossensibilizador

HBSS – *Hank's Balanced Salt Solution*

HDL – Lipoproteína de alta densidade (do inglês *High Density Lipoprotein*)

HepG2 – linha celular derivada do carcinoma hepatocelular

¹H-RMN – Ressonância Magnética Nuclear de próton

Hz - Hertz

IV – Infravermelho

J – constante de acoplamento

J – joules

LDL – Lipoproteína de baixa densidade (do inglês *Low Density Lipoprotein*)

LED – laser de diodo

lit. – literatura

M – molaridade

m – média

m – multiplete

[M⁺] – ião molecular

Me – Metil

m/v – percentagem massa por volume

m/z – razão massa/carga do ião molecular (espectrometria de massa)

O₂ – Oxigénio molecular

³O₂ – Oxigénio no estado fundamental

¹O₂ – Oxigénio singuleto

p.a. – pró análise

PBS – Tampão fosfato salino (do inglês *Phosphate buffered saline*)

PDT – Terapia Fotodinâmica (do inglês *Photodynamic Therapy*)

p.f. – ponto de fusão

pH – potencial de hidrogénio

Ph – Fenil

ppm – parte por milhão

q – quarteto

quint. – quinteto

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

ROS – Espécies Reativas de Oxigénio (do inglês *Reactive Oxygen Species*)

s – singuleto

SD – desvio padrão

sl – singuleto largo

Smac-DIABLO – Smac: segundo derivado de ativador mitocondrial de caspase; DIABLO: inibidor direto da proteína de ligação a apoptose com baixo pI (do inglês Smac: *second mitochondrial-derived activator of caspase*; DIABLO: *direct inhibitor of apoptosis-binding protein with low pI*)

t – tripleto

TBAF – Fluoreto de tetrametilamónio (do inglês *Tetrabutylammonium Fluoride*)

tBid – *truncated Bid*

tl – tripleto largo

THF – tetra-hidrofurano

TNFr – Recetores de fatores de necrose tumoral (do inglês *Tumor Necrosis Factor receptor*)

UV - Ultravioleta

VLDL – Lipoproteína de muito baixa densidade (do inglês *Very Low Density Lipoprotein*)

v/v – percentagem volume por volume

W – watts

ϵ – coeficiente de absorvidade molar

λ – comprimento de onda

$\lambda_{\text{máx}}$ – comprimento de onda máximo de uma banda de absorção no Visível (nm)

π – ligação pi

δ – desvio químico

$\nu_{\text{máx}}$ – número de onda máximo numa banda de absorção no IV (cm^{-1})

$\phi\Delta$ - rendimento quântico na formação de oxigénio singuleto

η - rendimento

Capítulo 1

INTRODUÇÃO

Neste capítulo é feita uma introdução à terapia fotodinâmica, aos corantes cianínicos e cianínicos esquarílicos (estrutura e aplicações), bem como às suas características favoráveis para a sua aplicação em terapia fotodinâmica, nomeadamente o efeito citotóxico para células cancerígenas, o qual será estudado neste trabalho.

1.0. Nota introdutória

O cancro é uma doença crónica causada pela proliferação anormal das células (Souza, 2004). Existem mais de cem tipos de cancro, podendo citar como exemplo, e mais comuns, o da pele, pulmão, mama, fígado, estômago, colorectal e próstata, que são responsáveis pela morte de milhares de pessoas em todo o mundo. Por isso, é considerada a doença com maior impacto económico (Ferlay *et al.*, 2013). A sua incidência tem vindo a aumentar em várias áreas do Mundo, sendo uma das principais causas de morte nos países desenvolvidos (Kaatsch, 2012). O impacto da transformação gradual do estilo de vida das pessoas tem produzido alterações adversas na prevalência de fatores de risco para o aparecimento do cancro, tal como o fumo do tabaco, o uso nocivo do álcool, a dieta ou a inatividade física (Pinheiro *et al.*, 2003). No entanto, atualmente, uma percentagem significativa de cancros pode ser curada, se detetado precocemente, recorrendo à cirurgia, radioterapia, quimioterapia e mais recentemente imunoterapia. Contudo, os tratamentos atualmente existentes são muito invasivos, resultando em demasiados efeitos secundários indesejáveis e, por isso, os investigadores têm-se concentrado no desenvolvimento de novos métodos de tratamento alternativos mais vantajosos e seguros (Master *et al.*, 2013).

O enorme avanço no conhecimento e entendimento molecular do cancro, a que se tem assistido, tem revelado novos alvos de interesse que permitem o desenvolvimento de novas terapias eficazes, mais seguras e com menos danos das células saudáveis (Bertram, 2001; Wild *et al.*, 2002; Lim *et al.*, 2013). A terapia fotodinâmica (PDT de *Photodynamic Therapy*) é uma das novas modalidades de tratamento, que se tem revelado uma estratégia muito promissora (Master *et al.*, 2013). Este método terapêutico tem por base o uso de químicos fotossensibilizadores que se acumulam preferencialmente nas células alvo e, após exposição à luz a um comprimento de onda adequado, as destrói, seletivamente (Delaey *et al.*, 2000; Paszko *et al.*, 2011). Por isso, apresenta inúmeras vantagens sobre os tratamentos convencionais como a cirurgia, quimioterapia, radioterapia e/ou terapia hormonal (Reeves *et al.*, 2009). Por exemplo, em comparação com a quimioterapia convencional, o fotossensibilizador (FS) apresenta toxicidade mínima na ausência de luz e, por conseguinte, a sua acumulação em tecidos ditos normais irá conferir uma toxicidade sistémica mínima. Por outro lado, como a luz de ativação é não-ionizante, o efeito provocado nos tecidos sem fotossensibilizador não é prejudicial, sobrepondo-se à radioterapia (Master *et al.*, 2013).

Apesar do enorme potencial da PDT, ainda não se conseguiu generalizar o seu uso devido à pouca aprovação clínica dos FSs orgânicos (Shi *et al.*, 2014). Sabe-se que um grande número de corantes tem sido estudado, *in vivo* e *in vitro*, para determinar o seu potencial como fotossensibilizadores para PDT, mas poucos têm mostrado as propriedades ideais. Por esta razão, muitos cientistas continuam focados no desenvolvimento de novos fotossensibilizadores, em busca daqueles que apresentem a máxima eficiência (Robertson *et al.*, 2009).

1.1. Terapia Fotodinâmica

A era da PDT começou no início do século XX quando um estudante de medicina, alemão, chamado Oscar Raab, verificou a morte rápida de uma cultura de *Paramecium caudatum* após exposição à luz, na presença de laranja de acridina. Mas, o termo *fotodinâmica* só foi criado uns anos mais tarde, pelo seu supervisor, von Tappeiner, para descrever as reações químicas, que ocorrem nos sistemas biológicos, com consumo de oxigénio, induzidas por fotossensibilização (revisto em Kalka *et al.*, 2000). No entanto, a expansão do uso da terapia fotodinâmica, na prática clínica, deve-se ao trabalho pioneiro de Dougherty *et al.*, que, em 1978, apresentou vários dados que mostram o sucesso da aplicação da PDT no tratamento de cancro cutâneo e outras doenças malignas (Dougherty *et al.*, 1978).

A PDT, método de tratamento alternativo de várias doenças amplamente desenvolvida nas últimas décadas, utiliza três componentes: i) um FS, ii) radiação com um comprimento de onda específico e, iii) oxigénio molecular. O mecanismo terapêutico baseia-se na excitação do FS, após administração, com irradiação de luz, a um comprimento de onda adequado, onde a energia de excitação passa para a molécula de oxigénio que, alterando o seu estado quântico, de oxigénio tripleto ($^3\text{O}_2$) para oxigénio singuleto ($^1\text{O}_2$), provoca danos irreversíveis ao tecido lesado (Allison e Sibata, 2010; Avirah *et al.*, 2012).

Para este tratamento, considerado relativamente não invasivo, apenas é requerida a iluminação do local alvo, não é necessária imunossupressão sistémica e não são conhecidos efeitos de toxicidade cumulativa, o que possibilita ser várias vezes repetido, sem consequências adversas para o paciente, além de permitir o seu uso em pessoas idosas e debilitadas (Reeves *et al.*, 2009). Em virtude destas características, a PDT pode oferecer a possibilidade de dupla-seletividade na terapia do cancro através do desenvolvimento de tecnologias que garantam tanto a seletividade da acumulação do FS como da irradiação do

tecido alvo e, assim, minimizar os danos do tecido saudável (Master *et al.*, 2013). Contudo, este método terapêutico não é 100% seguro, tendo como principal desvantagem a sensibilização provocada pela exposição à luz. No entanto, este pequeno problema pode ser contornado evitando-se a exposição à luz solar ou luz artificial muito intensa durante um certo período de tempo (aproximadamente 6 semanas) dependendo do tipo de FS utilizado (Perussi, 2007).

O processo de destruição do tecido tumoral envolve várias etapas, como ilustrado na Figura 1.1.

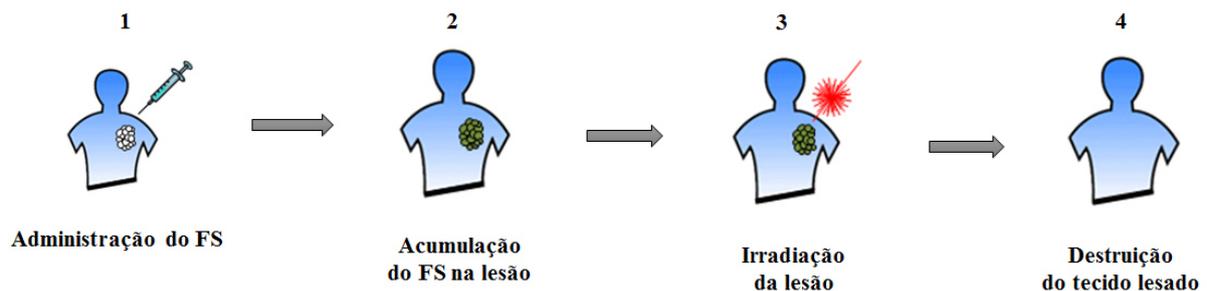


Figura 1.1. Representação esquemática das várias etapas envolvidas na PDT. 1) Administração do FS por via sistêmica, tópica ou local, 2) Acumulação seletiva do FS, na lesão após um determinado tempo de incubação, 3) Irradiação da lesão com luz a um comprimento de onda específico, 4) destruição da lesão devido à formação de espécies citotóxicas (Figura adaptada de Photolitec, 2013)

Após administração e acumulação do FS na lesão, esta é irradiada de modo a provocar a excitação do FS e conseqüentemente levar à formação de espécies citotóxicas, como espécies reativas de oxigénio (ROS) e oxigénio singuleto, que causam danos irreversíveis nas células, destruindo-as (Robertson *et al.*, 2009; Avirah *et al.*, 2012).

Para que o desaparecimento do tumor seja bem-sucedido, três mecanismos de ação tem vindo a ser discutidos (Figura 1.2), designados por reações do tipo I, II e III, respetivamente.

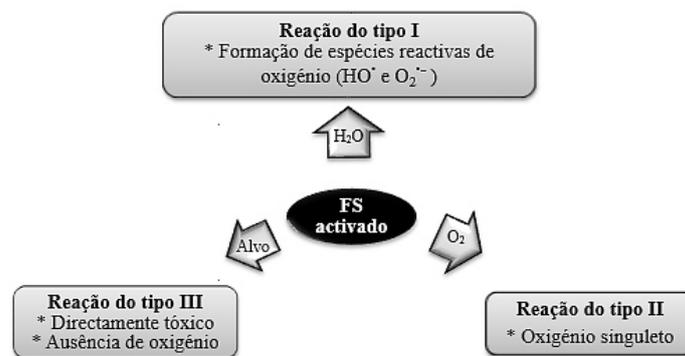


Figura 1.2. Representação esquemática dos vários tipos de reações que podem ocorrer na Terapia Fotodinâmica, após ativação do FS (adaptado de Allison e Moghissi, 2013)

Na reação do tipo I o FS ativado transfere o excesso de elétrons diretamente para o substrato (biomoléculas que rodeiam o FS, ex. H₂O, lípidos, etc.) originando ROS que desencadeiam uma série de reações biológicas destrutivas do tecido alvo. Por outro lado, o FS pode transferir o excesso de energia ao oxigênio no estado fundamental, presente no tecido alvo, dando origem ao oxigênio singuleto (reação do tipo II), espécie altamente citotóxica. Alternativamente, na reação do tipo III, o FS ativado é, por si só, tóxico para as células alvo, não sendo necessária a presença de oxigênio para a eliminação do tecido tumoral (Allison e Sibata, 2010; Allison e Moghissi, 2013). Apesar de poderem ocorrer estes três tipos de reações, acredita-se que a reação do tipo II é a base da PDT, sendo a formação de oxigênio singuleto a principal causa de dano celular que leva ao desaparecimento do tumor (Konan *et al.*, 2002; Allison e Moghissi, 2013).

1.1.1. Mecanismos de ação da PDT nos sistemas biológicos

Nas últimas décadas têm-se assistido a um enorme progresso no entendimento dos mecanismos biológicos e bioquímicos envolvidos na indução de morte celular pela PDT (Almeida *et al.*, 2004). No entanto, ainda é necessário atingir um nível de conhecimento mais detalhado sobre os mecanismos envolvidos (Yoo e Ha, 2012).

Já se sabe que as respostas ao tratamento fotodinâmico dependem de vários fatores como o tipo do FS utilizado, as condições de iluminação, o estado de oxigenação do tecido e o tipo de células envolvidas no tratamento (Moor, 2000; Buytaert *et al.*, 2007). Por outro lado, a localização subcelular do FS também tem uma grande influência no tipo de resposta da célula, determinando a localização do dano primário (Moor, 2000), uma vez que o FS se pode localizar em diferentes organelos celulares como por exemplo membranas, mitocôndrias, complexo de Golgi, retículo endoplasmático ou lisossomas (Robertson *et al.*, 2009) e, assim, determinar o mecanismo de morte celular (Zhu e Finlay, 2008).

Quando o FS é administrado através da corrente sanguínea, liga-se às proteínas séricas, através das quais é transportado até ao local alvo, sendo que a sua entrada na célula dependerá do seu carácter lipofílico (Robertson *et al.*, 2009). Os FSs mais hidrofóbicos seguem na corrente sanguínea ligados a lipoproteínas (de alta densidade (HDL) ou baixa densidade (LDL)), o que, de certo modo, permitirá a acumulação seletiva, do FS, no tecido tumoral, uma vez que há uma maior expressão de recetores de lipoproteínas (nomeadamente de LDL) nas membranas das células tumorais, quando comparadas com células normais

(Luksiene, 2003; Ribeiro *et al.*, 2007). No geral, os FSs hidrofóbicos normalmente permeiam as células provocando dano direto na célula alvo, através da produção de espécies citotóxicas (ROS e oxigênio singuleto). Por outro lado, os FSs hidrofílicos, acumulam-se nos espaços intersticiais e podem conduzir à morte celular de forma indireta, através da interrupção do fornecimento de oxigênio e nutrientes essenciais provocado pela ocorrência de trombozes ou hemorragias derivadas do dano causado pela PDT nos vasos sanguíneos do tecido tumoral (Luksiene, 2003; Robertson *et al.*, 2009).

Relativamente ao dano direto são três os mecanismos de morte celular que podem ser iniciados após a reação fotodinâmica: i) apoptose, ii) necrose e iii) autofagia (Buytaert *et al.*, 2007; Agostinis *et al.*, 2011; Yoo e Ha, 2012). Normalmente, a apoptose ocorre quando o FS ativado está localizado na mitocôndria ou no retículo endoplasmático, enquanto a necrose poderá ocorrer quando o FS está localizado nas membranas plasmáticas ou nos lisossomas e, de alguma forma, o mecanismo apoptótico foi bloqueado ou atrasado. Por outro lado, a autofagia pode ser induzida na tentativa de promover a reparação de danos causados pela PDT, e tornar-se um sinal de morte celular quando a resposta inicial falha (Buytaert *et al.*, 2007). Estes mecanismos são distinguidos e definidos pelas várias alterações morfológicas que vão ocorrendo ao longo do processo de morte celular (Figura 1.3). Na apoptose, por exemplo, ocorre uma contração celular, condensação da cromatina nuclear, fragmentação do DNA e formação de corpos apoptóticos, sem ocorrer uma resposta inflamatória (Luksiene, 2003). A autofagia é morfológicamente caracterizada pela formação e acumulação de vacúolos autofágicos (autofagossomas) no citoplasma (Buytaert *et al.*, 2007; Janku *et al.*, 2011). A necrose, contrariamente aos anteriores, é caracterizada por um aumento do volume da célula e dos seus organelos e perda de integridade da membrana plasmática, resulta numa reação inflamatória, após libertação do conteúdo intracelular (Agostinis *et al.*, 2011).

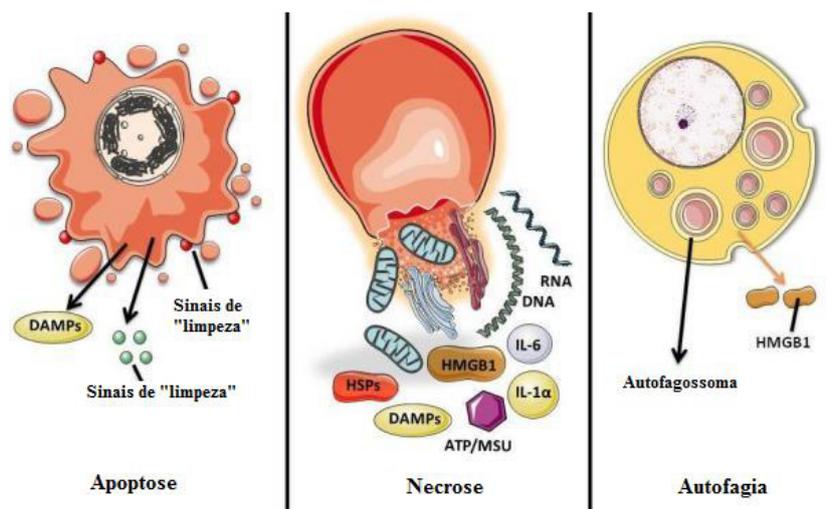


Figura 1.3. Representação dos principais mecanismos de morte celular e respectivas características morfológicas e imunológicas (adaptado de Agostinis *et al.*, 2011)

A apoptose é o principal processo de morte celular induzido pela PDT e o mais bem estudado. Este processo é regulado por diversas vias de sinalização celular e pode ocorrer segundo duas vias apoptóticas distintas, mas convergentes: a via intrínseca e a via extrínseca (Buytaert *et al.*, 2007; Yoo e Ha, 2012), tal como representado na (Figura 1.4). A via intrínseca é iniciada pela falha da função mitocondrial, associada a stresse oxidativo, que causa a libertação do citocromo *c* e outras proteínas apoptóticas [por exemplo: Smac-DIABLO (Smac: *second mitochondrial-derived activator of caspase*; DIABLO: *direct inhibitor of apoptosis-binding protein with low pI*) e AIF (*apoptosis-inducing factor*)]. O citocromo *c*, por sua vez, liga-se à Apaf-1 (*apoptotic protease activating factor 1*) e induz a sua oligomerização na presença de ATP ou dATP, levando ao recrutamento e ativação da procaspase-9, formando o apoptossoma. Posteriormente, a caspase-9, depois de ativada, ativa diretamente a caspase-3, dando-se a morte celular. Por outro lado, a via extrínseca é iniciada através da ativação de recetores de fatores de necrose tumoral (TNFr), presentes na membrana plasmática, que após a formação do complexo intracelular de sinalização de morte celular (DISC de *Death-Inducing Signaling Complex*), por ligação de moléculas adaptadoras (*Fas-associated* e *TNFR1-associated*), vão ativar a caspase-8. A caspase-8 pode, depois, ativar diretamente as caspases efetoras (3, 6 e 7) ou induzir a via intrínseca, através da clivagem do membro pró-apoptótico Bid (*BH₃-interating domain death agonist*) em tBid (*truncated Bid*), tornando-o ativo (Almeida *et al.*, 2004; Buytaert *et al.*, 2007; Mroz *et al.*, 2011; Yoo e Ha, 2012).

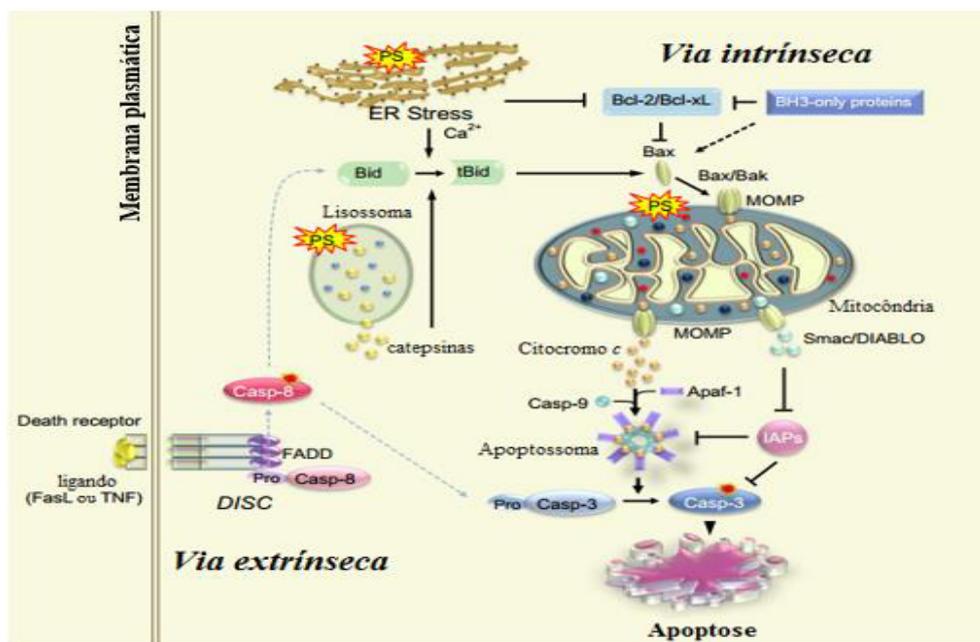


Figura 1.4. Representação esquemática das duas vias apoptóticas que podem ocorrer na PDT após a ativação do FS (adaptado de (Yoo e Ha, 2012))

1.1.2. Aplicações da PDT

A PDT, um método terapêutico dirigido principalmente para alvos oncológicos, sendo minimamente invasiva e com elevada seletividade para células tumorais, apresenta diversas vantagens sobre as técnicas comuns de tratamento do cancro (Konan *et al.*, 2002; Castano *et al.*, 2004; Robertson *et al.*, 2009; Allison e Moghissi, 2013; Shi *et al.*, 2014). Nos últimos anos, a PDT tem sido testada, a nível clínico, no tratamento do cancro da cabeça e pescoço, pulmão, mama, próstata, pâncreas, pele, entre outros (Lim *et al.*, 2012). No entanto, devido aos mecanismos de ação, que variam entre a morte celular direta e a oclusão vascular a PDT tem também sido efetiva em oftalmologia (tratamento de degenerações maculares), dermatologia (tratamento de psoríase), imunologia (tratamento de doenças autoimunes) e cardiologia (Konan *et al.*, 2002; Preuß *et al.*, 2014).

Outras aplicações do efeito fotodinâmico incluem a destruição de microrganismos patogénicos (Kashef *et al.*, 2012), tais como bactérias, fungos, leveduras e vírus (Perussi, 2007).

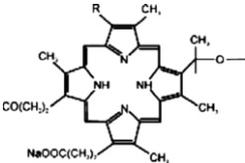
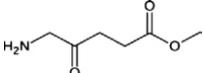
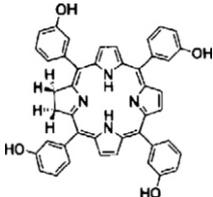
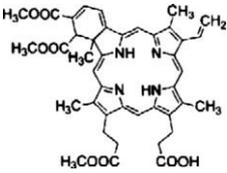
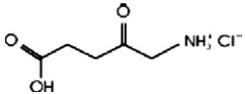
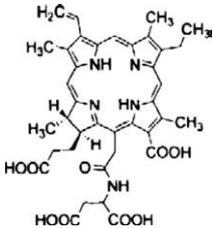
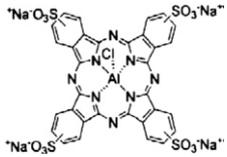
1.2. Fotossensibilizadores

O FS é uma molécula que absorve luz e desempenha a função de fármaco, geralmente designado por corante. É capaz de transferir a energia dos fotões absorvidos para o oxigénio, ou outros substratos, gerando espécies reativas de oxigénio ou outras espécies citotóxicas, que por sua vez desencadeiam uma cascata de reações bioquímicas e levam à morte celular (Bazylińska *et al.*, 2012; Lim *et al.*, 2013).

Existem várias formas de classificação dos FSs, podendo ser classificados de acordo com: i) a **geração**, onde se tenta agrupar os FSs com base na época em que são gerados, sendo que as gerações seguintes tentam colmatar as deficiências das gerações anteriores; ii) a **pureza sintética** onde os FSs são considerados puros quando correspondentes a uma só substância ou impuros quando constituídos por mais que um componente; iii) o **local de ação** onde os FSs são classificados com base no tecido em que, preferencialmente, se acumulam; iv) a **estrutura química** onde se classificam os FSs com recurso à análise da estrutura química base que apresentam. Neste último caso, o que se verifica nos grupos de compostos é a alteração da estrutura básica, normalmente ciclos tetrapirrólicos, por adição ou abstração de grupos substituintes (Alisson e Sibata, 2010).

Nas últimas décadas, foram sintetizados vários tipos de FSs, desde compostos aromáticos simples a macrociclos mais complexos (Bazylińska *et al.*, 2012; Avirah *et al.*, 2012). Muitos deles estão referidos como potenciais FSs para PDT, tendo sido já aprovados para avaliação clínica da sua eficácia (Bazylińska *et al.*, 2012). A maioria dos FSs já aplicados na PDT e aprovados na prática clínica baseiam-se em núcleos tetrapirrólicos como porfirinas, clorinas, bacterioclorinas e ftalocianinas uma vez que estes apresentam baixa toxicidade na ausência de luz e são seletivos para o tumor (Perussi, 2007). Na tabela 1.1, são apresentadas algumas formas comerciais de FSs, derivadas das várias moléculas atrás referidas.

Tabela 1.1. Lista de FSSs, atualmente disponíveis no mercado, para uso em PDT (adaptado de Master *et al.*, 2013)

Nome comercial	Empresa	Aprovação	Aplicação	λ ativação (nm)	Estrutura Química
Photofrin®	Axcan Pharm	Canada, 1993 Japão, 1994 EUA, 1995	Cancro da bexiga, pulmão, esófago e esófago Barrett's	630	
Metvixia®	Photocure/ galderma	UE, 2001 Nova Zelândia, 2002 Austrália, 2003 EUA, 2004	Queratose actínica, carcinoma de células basais, cancro não-melanoma da pele	630	
Foscan®	Biolitec Pharma	UE, 2001	Cancro da cabeça e pescoço	652	
Visudyne®	Novartis	UE, EUA e Canadá, 2000 Japão, 2003	Degeneração macular relacionada com a idade, miopia patológica, histoplasmose	690	
Levulan®	DUSA Pharma	EUA, 1999	Queratose actínica, displasia esofágica	417	
Laserphyrin®	Meiji Seika Pharma	Japão, 2004	Cancro do pulmão	664	
Photosense®	NIOPIK	Rússia, 2001	Vários cancros	675	

Os derivados de Hematoporfirina (HpD), cujo nome comercial é Photofrin[®], foram dos primeiros FSs estudados extensivamente. Só depois surgiram as porfirinas, as ftalocianinas, as cianinas, o rosa de bengala, o azul-de-metileno, etc. (Avirah *et al.*, 2012). Contudo, como a maior parte dos FSs existentes apresentam alguma fotossensibilidade cutânea prolongada, uma taxa metabólica de degradação lenta e são ativados a comprimentos de onda abaixo dos 600 nm, que não permite uma penetração da luz a mais que alguns milímetros de pele (Castano *et al.*, 2004; Avirah *et al.*, 2012; Bazylińska *et al.*, 2012), tem havido um grande interesse no desenvolvimento de novos corantes que apresentem absorção máxima na região do vermelho ou infravermelho próximo, nos quais se incluem os corantes esquarílicos (Avirah *et al.*, 2012).

Os FSs atuais têm sido concebidos para alcançar elevados níveis de reação do tipo II (Allison e Moghissi, 2013). Contudo, ainda não se conseguiu encontrar o FS que consiga satisfazer as exigências químicas, físicas e biológicas necessárias (Castano *et al.*, 2004; O'Connor *et al.*, 2009; Robertson *et al.*, 2009; Ormond e Freeman, 2013), uma vez que a manipulação de algumas características conseguem ser bem controladas enquanto outras, como a farmacocinética, não (O'Connor *et al.*, 2009).

1.2.1. Parâmetros para um fotossensibilizador eficiente

A eficiência de um fotossensibilizador, como agente terapêutico, depende de determinadas características que o composto apresenta e por isso vários têm sido os parâmetros descritos para aumentar o sucesso dos compostos usados como FS. No entanto, o sucesso de cada FS depende, não só, das suas características fotofísicas como também das suas características fotoquímicas (Santos *et al.*, 2003), as quais incluem pureza química, seletividade, estabilidade química e física, rápida acumulação no tecido alvo, comprimento de onda de emissão adequado (preferencialmente na região do vermelho ou infravermelho próximo) e rápida eliminação do organismo (Castano *et al.*, 2004; O'Connor *et al.*, 2009; Robertson *et al.*, 2009; Avirah *et al.*, 2012; Ormond e Freeman, 2013). Estes parâmetros foram criados para melhorar as propriedades de absorção, os rendimentos quânticos de formação do estado tripleto excitado do FS e conseqüente geração de oxigénio singuleto, assim como melhorar a sua farmacocinética (Avirah *et al.*, 2012).

1.2.1.1. Pureza

O FS deve ser constituído por uma única substância pura, de composição conhecida, e estável à temperatura ambiente (O'Connor *et al.*, 2009). Por outro lado, deve ser obtido com um elevado rendimento, através de vias sintéticas curtas e reprodutíveis (Ethirajan *et al.*, 2008). A pureza do FS permite simplificar as interpretações dos estudos de relação dose-resposta, pois caso o FS seja constituído por multicomponentes é difícil de prever os seus efeitos (Kudinova e Berezov, 2010).

1.2.1.2. Toxicidade e estabilidade

Um bom FS não deve apresentar toxicidade no escuro, e só deve ser citotóxico quando ativado por luz a um comprimento de onda apropriado (Alisson *et al.*, 2004; O'Connor *et al.*, 2009; Avirah *et al.*, 2012). Por outro lado, deve manter-se estável cinética e termodinamicamente (Bonnett, 1995). A sua acumulação no tecido alvo deverá ser rápida e seletiva, permitindo um tratamento mais curto, e a sua eliminação do organismo, além de rápida, não deverá produzir metabolitos tóxicos, de modo que a fotossensibilidade provocada nos pacientes seja diminuta (Alisson *et al.*, 2004; Ethirajan *et al.*, 2011; Avirah *et al.*, 2012).

1.2.1.3. Parâmetros fotofísicos e fotoquímicos

Os três parâmetros necessariamente importantes para que um FS tenha aplicação terapêutica são o rendimento quântico, o tempo de meia-vida e a energia do estado tripleto (Bonnett, 1995). A eficiência terapêutica da PDT é determinada pela eficácia do FS na produção de oxigénio singuleto (Avirah *et al.*, 2012), isto é, é necessário que o FS apresente um elevado rendimento quântico de formação do estado tripleto excitado, com elevado tempo de vida, para que a energia absorvida seja transferida para o oxigénio molecular e este se converta em oxigénio singuleto, que é citotóxico (Santos *et al.*, 2003).

Após incidência de luz o FS absorve fotões e um dos seus eletrões da orbital molecular de baixa energia, passa para uma orbital molecular de energia elevada (mantendo o spin), levando ao estado singuleto excitado do FS ($^1PS_n^*$). Este estado é de curta duração (na ordem dos nanosegundo) e pode perder energia segundo vários processos, demonstrados no diagrama de Jablonski (Figura 1.5) (Castano *et al.*, 2004; Robertson *et al.*, 2009).

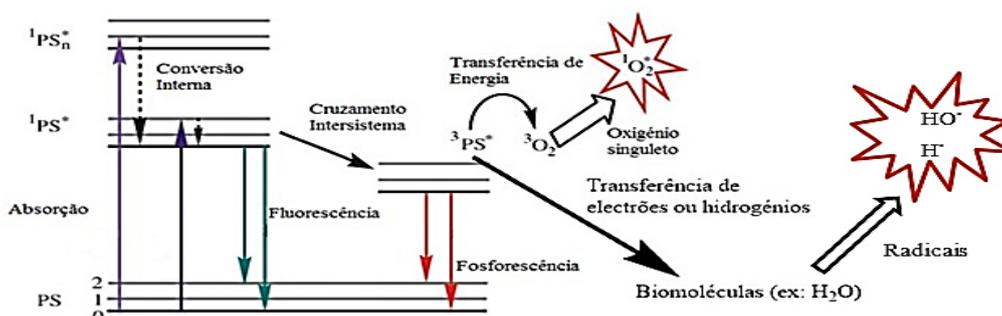


Figura 1.5. Mecanismos de citotoxicidade da PDT: diagrama de Jablonski modificado (adaptado de Konan et al., 2002 e Ethirajan et al., 2011)

O cruzamento intersistema é o processo de decaimento energético fundamental para a terapia fotodinâmica. Neste processo, o FS sofre uma transição do estado singuleto excitado para um estado tripleto excitado ($^3\text{PS}^*$), que apresenta um tempo de vida maior que o estado singuleto e, pode interagir fotoquimicamente com o oxigênio molecular, gerando espécies reativas que, ao interagir com as biomoléculas, destrói o tecido alvo (Konan *et al.*, 2002; Ribeiro *et al.*, 2007).

O sensibilizador deve, então, ter um estado singuleto excitado estável para poder ocorrer o cruzamento intersistemas e assim originar o estado tripleto excitado, por inversão do spin do elétron (Robertson *et al.*, 2009; Ormond e Freeman, 2013). Por outro lado, a perda de energia por emissão de fluorescência também pode ser um processo importante para a PDT pois permitirá a visualização do local e a monitorização do tratamento (Alisson e Sibata, 2010).

1.2.1.4. Absorção de luz

O FS ideal deverá ter o pico de absorção máxima a comprimentos de onda compreendidos entre os 600-850 nm (também, habitualmente, designada por “janela fototerapêutica”) de modo a permitir a máxima penetração e mínima dispersão da luz nos tecidos biológicos (Santos, *et al.*, 2003; O’Connor *et al.*, 2009; Alisson e Sibata, 2010; Avirah *et al.*, 2012; Allison e Moghissi, 2013; Ormond e Freeman, 2013).

As fontes de luz devem apresentar as características espectrais ideais coincidentes com o comprimento de onda de absorção máxima do FS, de modo a permitir a sua ativação e consequente produção de ROS suficiente para gerar efeito citotóxico (Robertson *et al.*, 2009). A luz solar, as lâmpadas incandescentes e fluorescentes, os lasers contínuos e pulsados e, mais recentemente, os díodos emissores de luz (LED) são as fontes de luz que têm permitido o sucesso da PDT. Os lasers apresentam mais vantagem no que diz respeito à produção de luz

monocromática e precisa, em comparação com as outras fontes de luz de custo financeiro mais elevado. Os LEDs surgiram devido ao seu baixo custo de construção, precisão de iluminação e portabilidade. Além disso, como os LEDs podem ser montados numa grande variedade de formas, podem gerar grande quantidade de energia no comprimento de onda desejado, têm uma distribuição de luz uniforme e não apresentam efeitos térmicos significativos, tornaram-se uma das fontes de radiação mais utilizada em aplicações tópicas da PDT. No entanto, os lasers continuam a ser muito utilizados na aplicação interna da PDT, isto é, como os lasers podem ser incorporados em fibra ótica, permitem a chegada de luz a órgãos lesados mais internos (Machado, 2000).

1.2.1.5. Hidrofilicidade e lipofilicidade

A solubilidade do FS é um fator importante para a sua distribuição e localização no interior da célula (Ormond e Freeman, 2013).

Idealmente, o FS deve ser anfipático, isto é, deve ser solúvel em água, ou numa mistura de solventes inofensivos miscíveis em água, para se tornar biodisponível, e ao mesmo tempo ter um certo grau de lipofilicidade que permita a sua difusão através das barreiras lipídicas e a sua localização no interior da célula (Alisson e Sibata, 2010; Ormond e Freeman, 2013). Porém, a maior parte dos FSs são de natureza hidrofóbica o que dificulta a sua dissolução em meios aquosos e conseqüentemente a sua administração (Lim *et al.*, 2013). No entanto, a anfifilicidade e seletividade dos FSs não solúveis podem ser melhoradas com manipulação química através da introdução de vários grupos substituintes como grupos carboxilos, hidroxilos e sais de amónio (Bonnett, 1995).

1.2.1.6. Estado de agregação

O termo agregado é usado para descrever a auto-associação de moléculas, por forças electrostáticas, em soluções concentradas (Kobayashi *et al.*, 2012). A formação de agregados é um processo comum em compostos com sistemas π , que ocorre quando as forças intermoleculares são superiores às forças estabelecidas entre os monómeros e o solvente. Normalmente observam-se dois tipos de agregados moleculares, conhecidos como agregados H e J. Os agregados do tipo H apresentam desvios dos picos de absorção para menores comprimentos de onda (hipsocrómicos) em relação à banda de absorção do monómero. Quando se formam agregados do tipo J, surgem bandas de absorção intensas a comprimentos

de onda maiores (desvios batocrômicos), comparativamente à banda de absorção do monômero. Estes desvios dos picos de absorção dos agregados foram explicados pela teoria da excitação molecular, sendo caracterizados pela diferente disposição das moléculas do corante (Figura 1.6) (Mishra *et al.*, 2000).

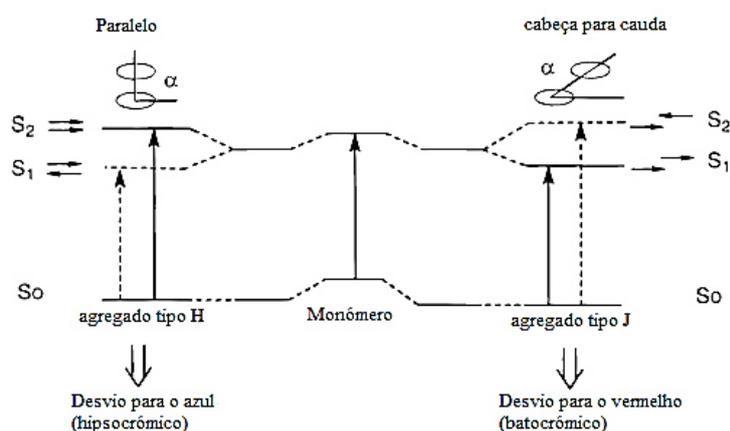


Figura 1.6. Representação esquemática da relação entre arranjo estrutural das moléculas do corante e desvio espectral baseado na teoria de excitação molecular (adaptado de Mishra *et al.*, 2000)

Idealmente o FS não deve formar agregados em sistemas biológicos. No entanto, muitos FSs são hidrofóbicos e podem agregar muito facilmente em meio aquoso, o que pode afetar as suas propriedades fotofísicas, fotoquímicas e biológicas (Paszko *et al.*, 2011).

Aquando da formação de agregados verifica-se uma redução dos rendimentos quânticos e tempos de vida dos estados tripleto e singuleto do FS que se traduz na redução da capacidade de produção de oxigênio singuleto e conseqüentemente na diminuição da eficiência fototerapêutica (Macdonald e Dougherty, 2001). Este efeito pode, no entanto, ser revertido por introdução de grupos substituintes periféricos carregados na estrutura do FS ou pela coordenação de iões metálicos (Machado, 2000). Por outro lado, a incorporação do FS em nanopartículas pode ser uma boa alternativa para melhorar não só a solubilidade do composto, como também evitar a sua agregação, além de permitir uma maior seletividade e efetividade do tratamento fototerapêutico (Lim *et al.*, 2013).

1.3. Corantes

Antes de mais, é importante saber distinguir os termos corante e pigmento porque, embora sejam usados como sinónimos e tenham a capacidade de conferir cor, os seus perfis ambientais e toxicológicos são diferentes. A grande diferença entre eles reside no tamanho das partículas e na solubilidade no meio em que se inserem (Shore, 2002). Os corantes são solúveis no substrato e ficam retidos por adsorção ou solvatação, enquanto os pigmentos ficam em suspensão, não sendo solúveis nem afetados pelo substrato (Shore, 2002).

Os corantes foram um recurso natural usado, desde o início da civilização, principalmente, para fins de coloração (Anantharaman *et al.*, 2014). Desde cedo, o Homem tentou reproduzir as cores da Natureza, tendo desenvolvido métodos de extração de corantes e pigmentos de fontes naturais. Devido aos vários problemas encontrados, para reproduzir as cores, começaram a procurar vias sintéticas para obtenção de corantes. Assim, em meados do século XIX nasceu a indústria da química orgânica, após a descoberta de uma via sintética para a produção de um corante orgânico, a Muveína, realizada por Perkin em 1853 (Berrios e Arbiser, 2011; Wainwright, 2014). Posteriormente, vários foram os estudos realizados com corantes sintéticos e no final do século XIX, os trabalhos de Koch e Ehrlich proporcionaram a aplicação dos corantes sintéticos na medicina (Wainwright, 2014).

Sabe-se, que desde a antiguidade, o Homem tem aproveitado os recursos naturais (como por exemplo, os corantes de natureza vegetal ou animal) para curar várias doenças. Nesses recursos encontrou uma série de farmacóforos com aplicação em diversas áreas como a medicina, farmácia e biologia (Teiten *et al.*, 2013). Tendo por base pequenas moléculas, provenientes da natureza, a indústria farmacêutica tem vindo a evoluir e a desenvolver novos medicamentos (Anantharaman *et al.*, 2014) e, atualmente, mais de 50% dos fármacos modernos, usados na prática clínica, são de origem vegetal tendo, grande parte deles, capacidade de produzir efeito nas células cancerosas (Unnati *et al.*, 2013).

Todos os anos são descritos, na literatura, centenas de novos compostos corados, com uma multiplicidade de aplicações. Existem numerosas estruturas químicas de corantes, cuja classificação aparece detalhada no Color Index, publicação que divide os corantes em 25 classes estruturais (Shore, 2002).

A estrutura do corante é bastante mais complexa quando comparada com outros compostos orgânicos. A formação de cor deve-se à deslocalização dos eletrões pelos sistemas conjugados de ligações simples e duplas, designados de cromóforos, presentes na sua

estrutura (ex. grupos metino $-C=C-$, grupos azo $-N=N-$, grupos carbonilo $C=O$) (Shore, 2002). Estas ligações insaturadas presentes na estrutura dos corantes e pigmentos permite que estes absorvam radiação eletromagnética na faixa da luz visível, 400-720 nm (Figura 1.7) e apresentem cor (Chandraskaran, 2001).

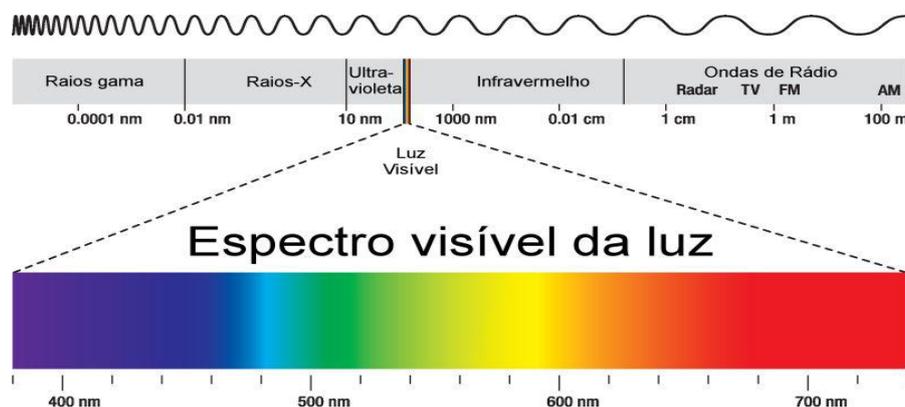


Figura 1.7. Espectro eletromagnético

As propriedades curativas da luz já são conhecidas desde há milhares de anos (Allison *et al.*, 2004), estando descrito, desde tempos antigos, o uso de luz ou compostos ativados por luz no tratamento de uma grande variedade de doenças (Castano *et al.*, 2004). Além da possível aplicação dos corantes como FS em PDT, estes também podem ser usados na bioquímica em limites de detecção extremamente baixos (Kanetkar, 2010).

1.3.1. Cianinas

As cianinas pertencem à classe dos corantes designados polimetínicos. São moléculas planares com ligações duplas conjugadas, compostas por dois anéis heterocíclicos, com átomos de carbono com hibridação sp^2 , ligados por uma cadeia polimetínica (sistema linear de conjugação- π , com número ímpar de átomos de carbono), como representado na figura 1.8 (Kaloyanova *et al.*, 2011; Panigrahi *et al.*, 2012; Wezgowiec *et al.*, 2013). Estas podem ser obtidas por vários métodos de síntese simples, numa larga variedade estrutural, desde monocianinas e tricarbocianinas e cianinas esquarílicas, com estrutura simétrica ou assimétrica, consoante os grupos terminais e os grupos substituintes ligados aos átomos de azoto sejam idênticos ou diferentes (Panigrahi *et al.*, 2012). A sua cor intensa depende do solvente em que se dissolve e está associada à interação de ressonância entre os átomos de azoto, existentes nos dois extremos da cadeia polimetínica, envolvendo a deslocalização da carga positiva (Armitage, 2008).

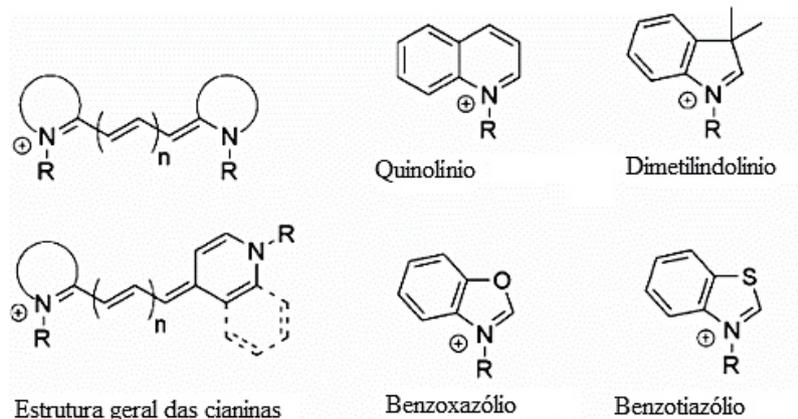


Figura 1.8. Estrutura geral das cianinas e típicos componentes heterocíclicos (adaptado de Armitage, 2008)

A história das cianinas em meados do século XIX, por volta de 1856. O interesse pelo deveu-se à sua aplicação na área da fotografia, mas nunca se perdeu o interesse pela sua síntese (Kaloyanova *et al.*, 2012; Panigrahi *et al.*, 2012). A sua aplicação em várias áreas da ciência e tecnologia tornam esta classe de corantes numa das mais importantes, sobretudo as suas aplicações em biologia molecular e análises clínicas que favoreceu o interesse pelo estudo das cianinas, nas últimas décadas (Kaloyanova *et al.*, 2012; Tatikolov, 2012; Zhang *et al.*, 2012).

Estes compostos são interessantes pelas suas propriedades fotofísicas e fotoquímicas, nomeadamente: i) absorção, com elevado coeficiente de extinção molar, numa ampla zona espectral, compreendida entre o visível e o infravermelho próximo (400-850 nm), ii) fluorescência, dependendo do ambiente molecular, com bom rendimento quântico, e iii) capacidade de geração do estado tripleto (Tatikolov, 2012). Estas propriedades são determinadas pela flexibilidade da cadeia polimetínica. Quando as cianinas se encontram livres em solução podem ocorrer vibrações, torções ou rotações das ligações da cadeia polimetínica que provocam a dissipação de energia não radiativa e excitação da molécula. Por outro lado, quando essa mobilidade é restringida dão-se processos concorrentes aos não radiativos, como a fluorescência (Kaloyanova *et al.*, 2012; Tatikolov, 2012).

A fotodegradação é uma outra característica das cianinas que, na maioria dos casos, é indesejável. No entanto, já têm sido feitos esforços para melhorar a estabilidade destes compostos no que diz respeito à decomposição fotoquímica, procedendo-se a alterações das estruturas ou adicionando grupos funcionais. Contudo, os métodos são complexos e pouco

eficientes, mantendo-se a necessidade de procura de novos corantes ou métodos de minimização da fotodegradação (Zhang *et al.*, 2012).

São várias as aplicações das cianinas. Estas, para além de muito usadas na fotografia são, hoje em dia, utilizadas como sondas de fluorescência e agentes antitumorais ou usadas em sistemas de captação de luz fotossintéticos ou fotovoltaicos, em armazenamento de dados ópticos e materiais laser (Panigrahi *et al.*, 2012; Gromov *et al.*, 2013). Além disso, os corantes do grupo das cianinas são considerados potenciais fotossensibilizadores. No entanto, o estudo do seu potencial como agente efetivo e selectivo para PDT não tem sido explorado, de modo intensivo, nas últimas décadas (Wezgowiec *et al.*, 2013).

1.3.2. Cianinas Esquarílicas

As cianinas esquarílicas, sintetizadas pela primeira vez há mais de 40 anos (citado em Reis *et al.*, 2009), apresentam estruturas polimetínicas, com um recetor central de quatro membros (anel esquarílico) e dadores aromáticos ou anéis heterocíclicos laterais, como ilustra a figura seguinte (Avirah *et al.*, 2012).

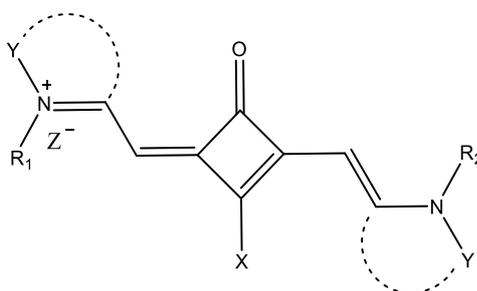


Figura 1.9. Estrutura geral das cianinas esquarílicas onde R₁ e R₂ = grupos alquilo; X = O⁻; OCH₃, NH₂, NHCH₃, etc.; Y = grupos aromáticos; Z⁻ = I; CF₃SO₃, etc.

Estes compostos apresentam elevada estabilidade, possuem bandas de absorção intensas e estreitas entre a região do visível e o infravermelho próximo (600-850 nm), alta absorvidade molar ($> 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) e um rendimento quântico elevado, que os torna apropriados para diversas aplicações biológicas, nomeadamente como FSs, em PDT. O facto de apresentarem emissão de fluorescência tem, também, atraído atenção para a utilização dos corantes esquarílicos como marcadores fluorescentes (Santos *et al.*, 2003; Avirah *et al.*, 2012; Ferreira *et al.*, 2013b; Markova *et al.*, 2013).

Por comparação com as cianinas os corantes esquarílicos apresentam, em solução aquosa, baixos rendimentos quânticos e tempos de vida curtos, talvez devido à propensão das

cianinas esquarílicas para agregarem em meio aquoso. A formação de agregados, além de reduzir a fotoestabilidade, levam à diminuição dos rendimentos quânticos, do tempo de vida de fluorescência e do estado tripleto excitado, o que pode comprometer o potencial das cianinas esquarílicas como FSs (Markova *et al.*, 2013). Mas vários estudos já demonstraram que quando substituídos adequadamente, os corantes esquarílicos apresentam propriedades fotofísicas muito favoráveis que lhes permitem atuar com sensibilizadores em PDT (Avirah *et al.*, 2012).

Segundo Kim e Kwang (1998) a síntese das cianinas esquarílicas é simples podendo obter-se facilmente por reação de condensação de um equivalente molar de ácido esquárico e dois equivalentes molares de bases aromáticas, ricas em elétrons, ou bases metilénicas heterocíclicas, como mostra a figura 1.10 (Kim e Hwang, 1998).

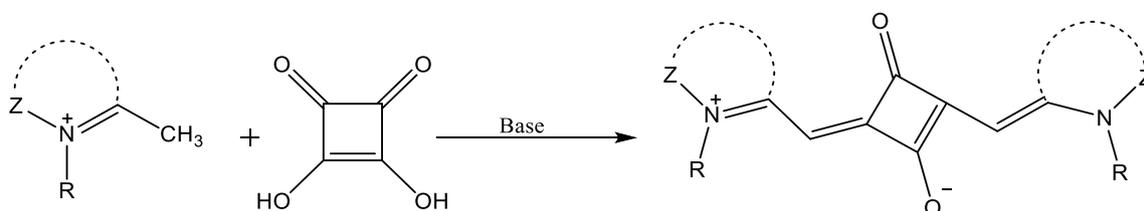


Figura 1.10. Esquema representativo da síntese geral de uma cianina esquarílica onde Z = grupos aromáticos ou heteroaromáticos e R = grupos alquilo

Do ponto de vista prático, é importante que a síntese de corantes seja estável em presença de luz, calor, oxigênio e azoto (Mishra *et al.*, 2000). Por isso, os métodos de síntese destes compostos têm sido, constantemente, revistos, surgindo novas vias sintéticas. Muitas destas novas vias têm permitido modificações estruturais que podem refletir uma alteração nas propriedades fotofísicas e fotoquímicas dos corantes esquarílicos (Santos *et al.*, 2003, Ferreira *et al.*, 2013b; Avirah *et al.*, 2012).

Neste sentido, são vários os investigadores que têm vindo a estudar a influência das diversas alterações estruturais sobre os parâmetros fotofísicos, em busca do FS ideal para aplicação em PDT. Em 2003, Santos e a sua equipa sintetizaram vários compostos esquarílicos que apresentavam modificações estruturais no anel heteroaromático e no comprimento dos grupos alquilo ligados ao átomo de azoto (Figura 1.11) e verificaram que essas alterações influenciavam a produção de oxigênio singuleto, sendo o derivado de benzoselenazole o composto que apresentava um aumento de produção de oxigênio singuleto mais significativo (Santos *et al.*, 2003).

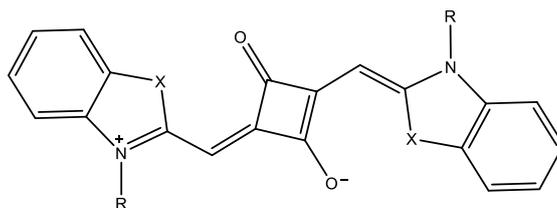


Figura 1.11. Corantes cianínicos esquarfílicos.
R = CH₃, C₂H₅, *n*-C₆H₁₃; X = S, Se, CH=CH (adaptado de Santos *et al.*, 2003)

Mais tarde, em 2009, Reis e seus colaboradores verificaram que a inclusão de aminas ou grupos semelhantes a aminas no anel central de quatro membros (Figura 1.12), dos corantes esquarfílicos, originavam bandas de absorção fortes mais próximas do infravermelho próximo, em comparação com os seus análogos não substituídos (Reis *et al.*, 2009).

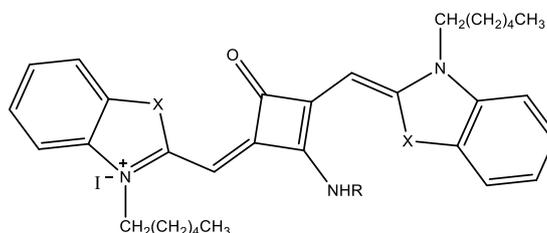


Figura 1.12. Corantes cianínicos esquarfílicos.
R = CH₂C₆H₅, C₆H₅, 3-I-C₆H₄, N(CH₃)₂, CH₂CH₂SO₃⁻; X = S, Se, CH=CH (adaptado de Reis *et al.*, 2009)

Mais recentemente, Ferreira *et al.* (2013) verificou que a introdução de um átomo pesado no anel heteroaromático (Figura 1.13), como enxofre ou selênio, aumenta a geração de oxigênio singuleto e diminui a intensidade de emissão de fluorescência e que a presença do átomo de iodo como contra-íon (efeito do átomo pesado externo) influencia o rendimento quântico de oxigênio singuleto, aumentando-o em, aproximadamente, 20%. Este estudo revelou ainda que a rigidez introduzida pelo ácido esquárico reduz eficientemente a isomerização dos compostos (Ferreira *et al.*, 2013b).

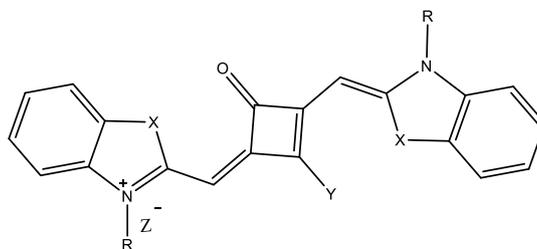


Figura 1.13. Corantes cianínicos esquarfílicos. X = S, Se;
Y = O⁻, NH₂, NHCH₃; Z⁻ = I, CF₃SO₃⁻;
R = CH₂CH₃, C₆H₁₄ (adaptado de Ferreira *et al.*, 2013b)

1.3.2.1. Estudo do potencial dos corantes esquarílicos, para aplicação em PDT, *in vitro* e *in vivo*

Apesar de se conhecerem várias razões que tornam os corantes esquarílicos apropriados para aplicação, como FSs, em PDT os ensaios para verificar o seu potencial não são muito abundantes. No entanto, alguns investigadores interessados nesta área já procederam a alguns ensaios tendo obtido resultados bastante positivos.

Em 2002, Ramaiah e seus colaboradores avaliaram a fototoxicidade do floroglucinol halogenado baseado na estrutura de corantes esquarílicos (Figura 1.14), *in vitro*, após excitação dos corantes com uma lâmpada de halogéneo (1000 W; 337,5 kJ.m⁻²) que emitia radiação de comprimentos de onda compreendidos entre 400-800 nm.

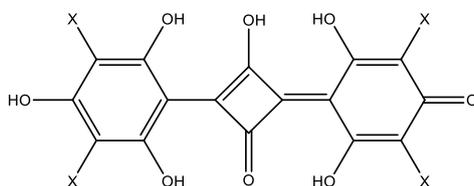


Figura 1.14. Floroglucinol (estrutura baseada em corantes esquarílicos). X = H, Br, I (adaptado de Ramaiah *et al.*, 2002)

Esta equipa verificou que o floroglucinol halogenado inibia a capacidade de clonagem da linha celular AS52 (linha celular de ovário de hamster chinês) e reduzia a capacidade proliferativa da linha celular L5178Y (linfoma de murganho). Além disso, conseguiram perceber que estes compostos produziam citotoxicidade celular ao nível dos componentes das células, incluindo danos no DNA, após irradiação (Ramaiah *et al.*, 2002). O sucesso deste e outros estudos *in vitro*, proporcionaram motivos de interesse e incentivo a novas investigações acerca do potencial fototerapêutico dos corantes esquarílicos *in vivo*. Assim, em 2008, Devi *et al.* testaram o efeito terapêutico do corante esquarílico bis (3,5-di-iodo-2,4,6-tri-hidroxifenilo), representado na figura 1.15.

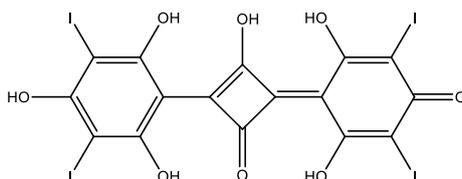


Figura 1.15. bis (3,5-di-iodo-2,4,6- tri-hidroxifenil) (adaptado de Devi *et al.*, 2008)

Para isso, induziram cancro de pele por DMBA (7,12-dimetilbenzoantraceno) em murganhos (albino suíço, macho), injetaram o corante via peritoneal e procederam ao tratamento fotodinâmico com uma lâmpada de halogéneo (1000 W, 120 J.cm⁻²), que emitia radiação entre 400-800 nm. No final do tratamento os investigadores verificaram uma considerável redução do volume tumoral. Além disso, com estudos complementares, constataram que a fotodestruição do tumor foi mediada por mecanismos apoptóticos (Devi *et al.*, 2008).

Mais tarde, outros investigadores estudaram o potencial fotodinâmico de novos corantes esquarílicos. Em 2012, Guerra utilizando corantes aminoesquarílicos, cuja estrutura está representada na figura 1.16, reduziu a viabilidade de células Caco-2 e HepG2 após irradiação com LEDs centrados a 660 nm, sendo que os corantes apresentavam citotoxicidade mínima no escuro.

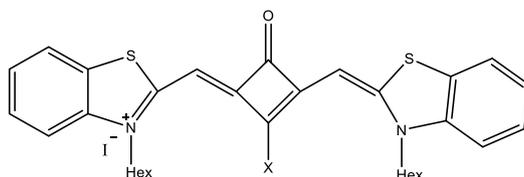


Figura 1.16. Corantes esquarílicos. X = NH₂, NHMe, NHPH (adaptado de Guerra, 2012)

Em 2013, Fagundes aplicou diversos corantes esquarílicos, simétricos e assimétricos (Figura 1.17), em linhas celulares HepG2 e Caco-2, para avaliação do seu potencial como FS para PDT. Verificou que, após irradiação com LEDs centrados a 660 nm, os resultados eram satisfatórios tendo-se observado redução de viabilidade celular. Esta autora concluiu ainda que os corantes assimétricos possuíam uma maior eficácia na redução de viabilidade celular comparando com os resultados obtidos para os corantes simétricos. Além disso, testou a influência da irradiação sobre a viabilidade celular, irradiando as células durante 14 minutos, sem adição de qualquer corante, tendo verificado que a viabilidade das células não foi afetada por fatores capazes de induzir stresse como a irradiação.

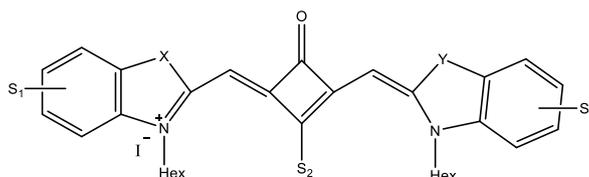


Figura 1.17. Corantes esquarílicos. X=Y; X≠Y = S, Se; S₁ = I, H; S₂ = NH₂, NHMe, NHPH, 3-I-NHPH, NHCH₂CH₂OSO₃⁻ (adaptado de Fagundes, 2013)

1.4. Linhas Celulares: um modelo de estudo *in vitro* para PDT

De modo a conseguir obter o máximo de informação acerca de um tipo de célula individual os biólogos desenvolveram métodos de dissociação de células de vários tipos de tecidos. Estas manipulações resultaram numa população relativamente homogénea que permite a proliferação das células como uma cultura pura (Alberts *et al.*, 2002). Portanto, a cultura de células é um processo de manutenção de células em ambiente artificial favorável que permite o estudo do comportamento celular fora do organismo e em ambiente controlado (Alves e Guimarães, 2010; Verma, 2014).

Em 1900 a cultura de células animais tornou-se uma técnica de laboratório comum e hoje em dia é uma das principais ferramentas em áreas de investigação das ciências da vida (Verma, 2014). As diversas vantagens que apresenta como o rigoroso controlo das condições experimentais, elevada razão entre nº de testes/tempo despendido, redução de ensaios com modelos animais, diminuição de reagentes utilizados, homogeneidade das linhas celulares e conhecimento das suas características, bem como o conhecimento do efeito de substâncias citotóxicas num determinado tipo celular, têm permitido a expansão do uso desta técnica. Porém, sabe-se que, o facto de haver dificuldade em comparar o organismo como um todo e uma linha celular, leva muitas vezes ao uso, obrigatório, de ensaios *in vivo*, isto porque as células que crescem *in vitro* não expressam exatamente o fenótipo das mesmas *in vivo*, devido à alteração do seu microambiente (Freshney, 2010; Verma, 2014). No entanto, o uso de linhas celulares continua a ser importante, principalmente nos ensaios de toxicidade. Isto porque para um determinado composto poder ser comercializado para uso público tem de passar por uma enorme quantidade de ensaios. Se estes forem primeiramente testados *in vitro*, percebe-se qual o seu potencial citotóxico, além de se poder compreender alguns dos seus efeitos ao nível celular e se depois apresentarem as características pretendidas avança-se para ensaios *in vivo* de modo a entender quais os seus efeitos a nível sistémico (Freshney, 2010).

1.4.1. Obtenção de cultura de células e sua manutenção – Cultura primária e subcultura

A cultura de células pode ser obtida a partir de tecido animal, através de remoção direta de células ou dissociação do tecido em suspensão celular por meios enzimáticos ou mecânicos (Freshney, 2010; Gibco, 2014). Posteriormente, estas células são plantadas num recipiente de cultura com meio adequado para que ocorra divisão e crescimento celular (Freshney, 2010). Por outro lado, a cultura de células pode derivar de uma linha ou estirpe celular que já tenha sido estabelecida (Gibco, 2014).

São conhecidas dois tipos de cultura de células, nomeadamente cultura de células primária e cultura de células secundária (Sinha e Kumar, 2008; Verma, 2014).

A cultura de células primária é aquela que é obtida diretamente do tecido ou órgão assepticamente colhido, cujo crescimento celular, *in vitro*, é induzido, após a desintegração mecânica, química ou enzimática do tecido, em frascos de cultura com meio de cultura completo e condições de CO₂, humidade e temperatura adequadas (Sinha e Kumar, 2008; Gibco, 2014; Verma, 2014). Normalmente, esta cultura de células é heterogénea e apresenta uma taxa de crescimento lenta (Sinha e Kumar, 2008; Verma, 2014). No entanto, como estas células apresentam características genótípicas e fenotípicas do tecido de origem, a cultura de células primária pode ser utilizada para estudar o comportamento individual das células de um tecido, *in vitro*, por serem mais representativas dos tipos de células presentes no tecido de origem (Alves e Guimarães, 2010; Verma, 2014). Contudo, as células derivadas de uma cultura primária têm um tempo de vida limitado e, por isso, têm a necessidade de ser subcultivadas, isto é, quando as células ocupam todo o substrato disponível (atingem o nível máximo de confluência) é necessário transferi-las para um novo recipiente com meio de cultura fresco, devido à depleção de nutrientes e acumulação de metabolitos, de modo que as células possam continuar a proliferar (procedimento designado por subcultura ou passagem). Desta forma, obtém-se uma cultura de células secundária (Sinha e Kumar, 2008; Gibco, 2014; Verma, 2014). A subcultura é realizada por digestão enzimática das células aderentes seguida de lavagem e ressuspensão num volume adequado de meio de cultura fresco (Verma, 2014). A partir da primeira passagem começa a existir uma predominância de células com maior capacidade de proliferação, o que resulta numa população com características fenotípicas e genótípicas mais uniformes (Gibco, 2014), e que permite proceder a estudos virológicos, imunológicos e toxicológicos com mais facilidade (Verma, 2014).

1.4.2. Condições para uma cultura de células e morfologia adquirida pelas células em cultura

Para que as células em cultura se mantenham saudáveis é necessário que uma série de condições nutricionais e ambientais sejam respeitadas (Langdon, 2003). No sentido de superar as necessidades das células é adicionado, ao recipiente onde vão ser mantidas, um meio de cultura com ou sem soro, que fornece todos os nutrientes essenciais (aminoácidos, vitaminas, hidratos de carbono e sais) bem como fatores de crescimento, hormonas e os gases essenciais (Gibco, 2014). Este meio de cultura é ainda suplementado com antibióticos e antifúngicos, para que não haja contaminações das células com outros microrganismos (Sinha e Kumar, 2008).

O ambiente físico-químico das células compreende fatores muito importantes que devem ser devidamente controlados de modo a favorecer a proliferação celular *in vitro*. Entre eles a **temperatura**, que corresponde à temperatura de crescimento *in vivo* e é controlada recorrendo a equipamentos termoestabilizados, como por exemplo as incubadoras (Gibco, 2014); o **pH** que deve ser semelhante ao fisiológico (entre 7,0 e 7,4) e que é mantido através da utilização de um tampão alcalino (por exemplo o bicarbonato) ou orgânico (HEPES), dependendo da cultura (Langdon, 2003; Gibco, 2014); finalmente e não menos importante a **osmolaridade** que se não for mantida, pode levar à morte celular, devido ao aumento de pressão osmótica provocada pela evaporação de água existente no meio de cultura (Langdon, 2003).

Assim, mantendo as condições ideais, as células conseguem proliferar *in vitro*, podendo crescer aderentes ao frasco de cultura, formando uma monocamada ou pequenos agregados, ou crescer em suspensão no meio de cultura (Freshney, 2010). No entanto, as células, que crescem *in vitro*, perdem a sua organização histológica e consequentemente algumas funções e estrutura que lhes era característica *in vivo* (Sinha e Kumar, 2008). Deste modo, células que, *in vivo*, apresentam estruturas completamente diferentes, *in vitro*, tomam morfologias muito semelhantes, podendo-se distinguir três tipos básicos de morfologias celulares em cultura: o tipo **epitelial**, cujas células apresentam uma forma achatada e poligonal e crescem aderentes ao recipiente de cultura, formando uma monocamada ou pequenos agregados; o tipo **fibroblasto** que é caracterizado por células finas e alongadas, aderentes ao local de cultura, normalmente orientadas paralelamente, formando uma rede

aberta; e o tipo **linfoblasto** em que as células possuem uma forma esférica e mantém-se em suspensão no meio de cultura (Sinha e Kumar, 2008; Nema e Khare, 2012).

1.4.3. Avaliação da citotoxicidade em cultura de células

Os ensaios de citotoxicidade são, normalmente, utilizados para verificar se determinados compostos influenciam a proliferação celular ou se são diretamente citotóxicas, conduzindo à eventual morte celular (McMillian *et al.*, 2002; Riss *et al.*, 2013). Todos os ensaios baseiam-se nas diversas funções celulares que são particularmente sensíveis ou irreversivelmente inibidas por produtos tóxicos (McMillian *et al.*, 2002).

Existe uma série de testes de citotoxicidade que podem ser utilizados para estimar o número de células viáveis restantes, mas é claro que, o melhor ensaio para avaliar a proliferação e a citotoxicidade em cultura de células tem de ser simples, rápido, eficiente, sensível, de baixo custo e não pode interferir com o composto a ser testado (O'Brien *et al.*, 2000). Os mais utilizados são os ensaios baseados em redutases, como o MTT e Alamar Blue, que requerem células viáveis ou mitocôndrias funcionais para converter um precursor de corante num produto corado ou fluorescente mensurável, por serem testes simples, sensíveis e baratos (McMillian *et al.*, 2002; Riss *et al.*, 2013).

O teste MTT baseia-se na capacidade das células viáveis converterem o tetrazólio (solução de cor amarelada) em formazan (cristais, insolúveis em água, de cor azul-violeta) através de desidrogenases e outros agentes redutores, como ilustrado na figura 1.18 (Stockert *et al.*, 2012).

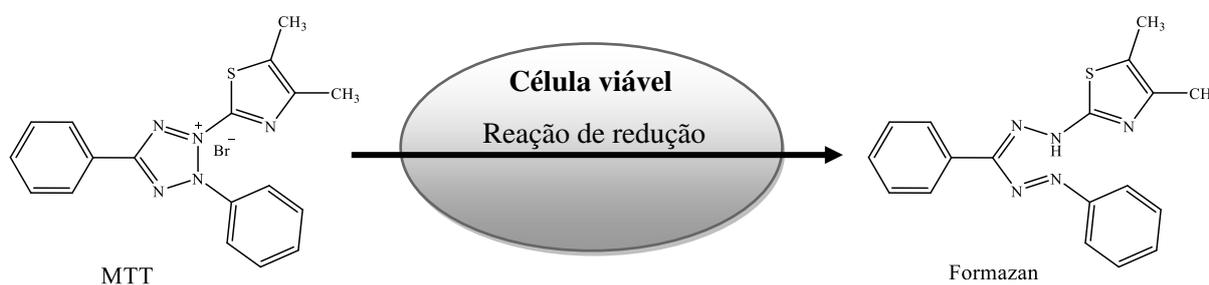


Figura 1.18. Representação da reação de redução do MTT, em células viáveis (adaptado de Riss *et al.*, 2013)

No entanto, o teste MTT necessita de morte celular para quantificar a viabilidade celular, uma vez que o formazan precipita no interior das células e é necessário extraí-lo com

solventes orgânicos, impedindo, desta forma, o contínuo acompanhamento da cultura de células e o seu uso noutros ensaios (Al-Nasiry *et al.*, 2007).

Por sua vez, o teste Alamar Blue baseia-se na redução da rezasurina em resorufina, através de vários agentes redutores presentes em células viáveis (Figura 1.19) (Anoopkumar-Dukie *et al.*, 2005).



Figura 1.19. Representação da reação de redução da rezasurina, em células viáveis (adaptado de Riss *et al.*, 2013)

Esta reação de oxidação-redução é acompanhada pela mudança de cor do meio de cultura de azul índigo (resazurina) para rosa fluorescente (resorufina) podendo ser facilmente medida por espectrofotometria, uma vez que a resazurina absorve a 600 nm e a resorufina absorve a 570 nm (Al-Nasiry *et al.*, 2007; Borra *et al.*, 2009). Como a taxa de redução do Alamar Blue (resazurina) é diretamente proporcional ao número de células viáveis presentes consegue-se, deste modo, obter um índice viabilidade/citotoxicidade conveniente (O'Brien *et al.*, 2000; Anoopkumar-Dukie *et al.*, 2005). Por outro lado, como o Alamar Blue é um corante não tóxico, estável e solúvel em água que permite determinar a viabilidade celular de forma rápida, sem destruir as células, possibilita a monitorização contínua das culturas de células (Al-Nasiry *et al.*, 2007), bem como a execução de outros ensaios paralelos como citogenética, apoptose e imunofenotipagem (Borra *et al.*, 2009). Talvez por isso tem sido considerado superior a outros testes clássicos de avaliação de viabilidade celular, como por exemplo o MTT (Al-Nasiry *et al.*, 2007).

1.5. Principais objetivos do trabalho

A constante procura de compostos que apresentem um ótimo efeito terapêutico e um mínimo efeito colateral faz com que o estudo de novos fotossensibilizadores seja de grande importância. Neste sentido, e na tentativa de encontrar novos compostos orgânicos, tem-se verificado um crescente interesse na investigação dos mesmos a fim de se conseguir um composto eficiente que respeite todos os parâmetros descritos para um FS ideal.

Uma vez que as cianinas esquarílicas apresentam características favoráveis à sua possível utilização em PDT, apresentam-se, como principais objetivos para esta dissertação, os seguintes:

- ✓ Preparação de vários precursores heterocíclicos, a partir de compostos comercialmente disponíveis, derivados de benzotiazole e quinaldina, utilizando métodos previamente descritos na literatura ou adaptados.
- ✓ Síntese, purificação e confirmação estrutural por IV, Visível, RMN de ^1H e de ^{13}C e EMAR de corantes esquarílicos assimétricos (figura 1.20).

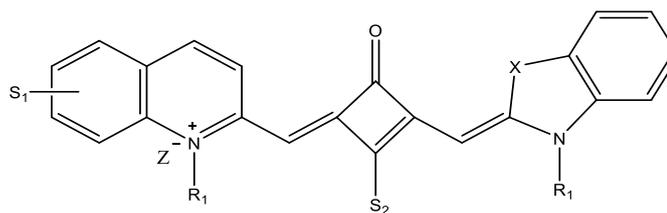


Figura 1.20. Fórmula geral dos corantes esquarílicos a serem sintetizados.

- ✓ Estudo da fotofísica/fotoquímica de cada um dos novos corantes, fundamentalmente, para a determinação do respetivo rendimento quântico do estado tripleto e correspondente tempo de vida, e eficiência na conversão de oxigênio tripleto a singuleto por um método direto medindo o decaimento de luminescência dos corantes na região do infravermelho próximo. Fazendo, assim, uma primeira avaliação do potencial dos novos corantes na aplicação em PDT.
- ✓ Avaliação da citotoxicidade dos corantes aminoesquarílicos ($S_2 = \text{NRR}$), em comparação com os corantes zwitteriônicos (Figura 1.20, $S_2 = \text{O}^-$), *in vitro*, utilizando células em cultura de linhas celulares HepG2 e Caco-2 no escuro e sob irradiação a comprimentos de onda apropriados, de forma a comprovar a eficiência dos novos corantes.

Capítulo 2

PARTE EXPERIMENTAL

Neste capítulo é apresentada uma breve descrição dos equipamentos e dos métodos utilizados em cada etapa do trabalho desenvolvido no laboratório de Química Orgânica e no laboratório de Biologia e Bioquímica Celular da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro. Este capítulo está dividido em duas partes. Na **primeira parte** são apresentados os métodos de síntese de todos os compostos orgânicos, sendo também apresentadas, em detalhe, as respetivas características físicas e espectroscópicas. No geral, para cada composto sintetizado é descrito o ponto de fusão, o comprimento de onda máximo ($\lambda_{\text{máx}}$) do espectro no Visível, as principais bandas do espectro no Infravermelho (IV), os sinais obtidos no espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C e o pico do ião molecular do espectro de Massa (EMAR ou EM ESI-TOF). Na **segunda parte** é descrita toda a metodologia referente à aplicação dos corantes cianínicos esquarílicos zwitteriônicos e seus derivados aminoescuarílicos nas linhas celulares Caco-2 e HepG2, com a respetiva avaliação da sua capacidade citotóxica.

2.1. Procedimento experimental para a síntese de compostos orgânicos

2.1.1. Reagentes e Equipamentos

Os reagentes utilizados, cuja síntese não se encontra descrita são analiticamente puros (p.a.) e foram adquiridos comercialmente.

O CH_2Cl_2 utilizado nas reações de síntese foi pré-seco com CaCl_2 e seco sob CaH_2 a refluxo, durante aproximadamente dois dias, de acordo com os métodos padronizados na literatura (Perrin e Amarego, 1988).

A evolução das reações foi seguida por cromatografia em camada fina (c.c.f.) utilizando placas de sílica-gel (Merck, 60 F₂₅₄, espessura de 0,25 mm). Os eluentes utilizados em c.c.f. foram: CH_2Cl_2 , uma mistura de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (2%), uma mistura de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (5%) ou uma mistura $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (10%). Após eluição, as placas cromatográficas foram observadas sob luz ultravioleta (UV) nos comprimentos de onda (c.d.o) de 366 e/ou 254 nm. As placas onde foram aplicados compostos correspondentes a reações de formação de sais quaternários de amônio e aminas foram, além de observadas sob luz UV, reveladas com solução de Dragendorff (mistura 1/1 (v/v) de nitrato de bismuto 2% em solução aquosa de ácido acético 20% e uma solução aquosa de iodeto de potássio 40%), onde os compostos com azotos básicos desenvolvem uma coloração alaranjada, após a pulverização.

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

Os pontos de fusão (p.f.) foram determinados num microscópio binocular URA com placa aquecida e não foram corrigidos.

Para obter e registrar os espectros no Visível usou-se um espectrofotômetro (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 DMSO ou meio de cultura sem soro (DMEM) e posteriormente colocadas numa célula de quartzo (com 1 cm de percurso ótico) para leitura. Na descrição de cada espectro os dados encontram-se expostos pela seguinte ordem: valor de c.d.o. correspondente ao máximo de absorção ($\lambda_{\text{máx}}$, em nm) e logaritmo do valor do coeficiente de extinção molar (ϵ em $\text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) correspondente a essa banda.

Para a obtenção dos espectros no infravermelho (IV) foi utilizado o espectrofotômetro 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 ($\nu_{\text{máx}}$ 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 (^1H -RMN) e de carbono (^{13}C -RMN) foram registados num espectrómetro Brücker Avance III 400 e Avance III 600 na Universidade da Beira Interior. Os espectros foram realizados nos espectrómetros de 600 MHz ou 400 MHz, estando, em cada caso, devidamente 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 prótons a que corresponde o sinal)]; multiplicidade do sinal [singuleto (*s*), singuleto largo (*sl*), duplete (*d*), tripleto (*t*), tripleto largo (*tl*), quarteto (*q*), quinteto (*quint*) e multiplete (*m*)]; valor da constante de acoplamento (*J*, em Hz); atribuição a prótons da molécula; confirmação de prótons lábeis após agitação da amostra com óxido de deutério (troca com D_2O). Foi utilizado tetrametilsilano (TMS) nos espectros de ^1H -RMN como referência ($\delta = 0,00$ ppm), nos espectros traçados em CDCl_3 e o sinal do próprio solvente como referência nos espectros traçados em DMSO. Nos espectros de ^{13}C -RMN foi usado o sinal do próprio solvente como referência sendo a identificação dos carbonos dos grupos $\underline{\text{C}}\text{H}_2$, $\underline{\text{C}}\text{H}_3$ e $\underline{\text{C}}\text{H}$ feita com base nos espectros DEPT 135 e DEPT 90.

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

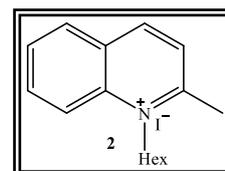
O rendimento quântico de oxigénio singuleto foi medido no Centro de Química-Física Molecular, do Instituto Superior Técnico, Universidade Técnica de Lisboa, pela equipa do Professor Doutor Luís Filipe Vieira Ferreira, utilizando um sistema equipado com um laser de azoto e um sistema de deteção com fotodíodo InGaAs (PDA) (Andor, modelo i-Dus, a 60°C). Este detetor permite a aquisição de sinais na região do infravermelho próximo (700-1700 nm), que não são possíveis de adquirir usando um detetor de UV/Vis normal (cerca de 200 a 800 nm). Para avaliar a eficácia na produção de oxigénio singuleto por parte dos corantes esquarterílicos, os rendimentos quânticos de formação de oxigénio singuleto ($\Phi\Delta$) foram medidos, em clorofórmio a 337 nm, com densidade ótica de 0,6, utilizando como padrão a fenazina.

2.1.2. Síntese de corantes esquarílicos assimétricos derivados do benzotiazole e da quinaldina

2.1.2.1. Sínteses prévias

2.1.2.1.1. Síntese do iodeto de *N*-hexil-2-metilquinolínio (2)

O sal quaternário de amônio **2**, iodeto de *N*-hexil-2-metilquinolínio, foi sintetizado de acordo com o procedimento descrito na literatura (Pardal *et al.*, 2002).

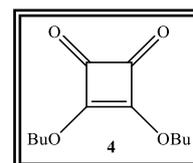


Fez-se reagir 2-metilquinolina (**1**) (5,00 g; 34,96 mmol) e 1-iodo-hexano (15,47 mL; 104,88 mmol) em acetonitrilo (100,00 mL), a refluxo e sob agitação. O progresso da reação foi seguida por c.c.f. (sílica, CH₂Cl₂/MeOH 2%). Após 5 dias, a mistura reacional foi arrefecida em banho de gelo e adicionou-se éter dietílico para precipitar o produto. O precipitado obtido foi recolhido por filtração e lavado com éter dietílico. Ao filtrado, após remoção do éter a pressão reduzida, foi adicionado mais um equivalente molar de 1-iodo-hexano e colocado novamente a refluxo durante 5 dias. Este procedimento foi repetido mais 2 vezes para melhorar o rendimento da reação.

Deste modo, foi obtido o **iodeto de *N*-hexil-2-metilquinolínio (2)** com um rendimento de 93%, na forma de cristais amarelos-esverdeados, apresentando: p.f. 163-164 °C (dec.) [lit. 129-130 °C (Pardal *et al.*, 2002)]; IV $\nu_{\text{máx}}$ (KBr): 3069 (m, ArC-H), 2928 (f, CH-alif.), 2867 (f, CH-alif.), 1603 (f), 1580 (m), 1524 (f, ArC=C), 1463 (m), 1428 (m), 1359 (f), 1219 (fr), 1133 (m), 826 (f), 779 (f) cm⁻¹.

2.1.2.1.2. Síntese de 3,4-dibutoxi-3-ciclobuteno-1,2-diona (4)

O composto 3,4-dibutoxi-3-ciclobuteno-1,2-diona (**4**) foi sintetizado de acordo com o método descrito na literatura (Graça *et al.*, 2014).



Uma mistura de ácido esquárico (**3**) (2,00 g; 17,54 mmol) e butanol (50,00 mL) foi colocada a refluxo, sob agitação durante 3 horas. Decorrido esse tempo, adicionou-se éter à mistura reacional e lavou-se três vezes a fase orgânica: i) fez-se uma primeira lavagem com 100,00 mL de água destilada gelada; ii) lavou-se a fase orgânica com 100,00 mL de uma solução saturada de hidrogenocarbonato de sódio gelada; iii) nova

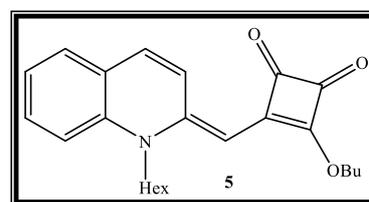
lavagem da fase orgânica com 100,00 mL de água destilada gelada. A fase orgânica foi depois recolhida, seca com Na₂SO₄ anidro e o solvente evaporado a pressão reduzida. Deste modo, obteve-se o **3,4-dibutoxi-3-ciclobuteno-1,2-diona (4)** na forma de um óleo acastanhado, cromatograficamente puro, com um rendimento de 74%.

2.1.2.1.3 Síntese da 3-butoxi-4-[(1-hexilquinolin-2(1H)-ilideno)metil]-3-ciclobuteno-1,2-diona (5)

Método A

O composto 3-butoxi-4-[(1-hexilquinolin-2(1H)-ilideno)metil]-3-ciclobuteno-1,2-diona (**5**) foi sintetizado de acordo com o procedimento descrito por Jyothish *et al.* (2004).

Uma mistura de iodeto de *N*-hexil-2-metilquinolínio (**2**) (1,00 g; 2,82 mmol), ácido esquárico (**3**) (0,321 g; 2,82 mmol) e quinolina (25,00 mL) foi colocada a refluxo numa mistura de *n*-butanol/benzeno (300,00 mL; 1:1) com destilação azeotrópica de água durante 24 horas. A evolução da reação foi seguida por c.c.f. (sílica, CH₂Cl₂). Terminada a reação extraiu-se o produto com éter dietílico. A fase orgânica obtida foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e o solvente removido a pressão reduzida. Como a mistura obtida era muito complexa teve de se abandonar este método.



Método B

A síntese do 3-butoxi-4-[(1-hexilquinolin-2(1H)-ilideno)metil]-3-ciclobuteno-1,2-diona (**5**), por este método B, foi adaptada do procedimento descrito por Kim *et al.* (2010).

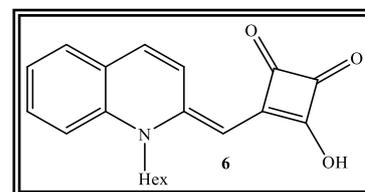
Fez-se reagir uma mistura de iodeto de *N*-hexil-2-metilquinolínio (**2**) (3,14 g; 8,85 mmol) e 3,4-dibutoxi-3-ciclobuteno-1,2-diona (**4**) (2,00 g, 8,85 mmol) em etanol (100,00 mL) e trietilamina (1,36 mL). A mistura reacional foi colocada a refluxo, sob agitação, durante 4 h. A evolução da reação foi controlada por c.c.f. (sílica, CH₂Cl₂) e, uma vez terminada, retirou-se a mistura reacional do refluxo e deixou-se arrefecer à temperatura ambiente. Obteve-se um precipitado que foi filtrado, lavado com etanol gelado e purificado por cromatografia em coluna utilizando com eluente CH₂Cl₂. As frações puras foram recolhidas e o solvente evaporado a pressão reduzida.

Obteve-se o produto, na forma de cristais cor de laranja, cromatograficamente puros, com um rendimento de 54%, apresentando: p.f. 158-159 °C; IV $\nu_{\text{máx}}$ (KBr): 2955 (fr, CH-

alif.), 2930 (fr, CH-alif.), 1758 (fr, C=O), 1691 (m, C=O), 1626 (fr), 1526 (f, ArC=C), 1481 (f), 1446 (m), 1405 (fr), 1343 (f), 1171 (m) cm^{-1} ; ^1H -RMN (600 MHz, CDCl_3) δ : 8,15 (1H, *sl*, Ar-H), 7,52 (1H, *t*, $J = 7,8$ Hz, Ar-H), 7,45 (1H, *d*, $J = 7,8$ Hz, Ar-H), 7,35 (1H, *d*, $J = 9,6$ Hz, Ar-H), 7,30 (1H, *d*, $J = 8,4$ Hz, Ar-H), 7,22 (1H, *t*, $J = 7,5$ Hz, Ar-H), 5,2 (1H, *s*, C=CH), 4,81 (2H, *t*, $J = 6,6$ Hz, $\text{OCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$), 4,06 (2H, *sl*, $\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$), 1,87-1,80 (4H, *m*, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3 + \text{NCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$), 1,57-1,47 (4H, *m*, $\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{CH}_3 + \text{N}(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$), 1,46-1,36 (4H, *m*, $\text{N}(\text{CH}_2)_3(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$), 1,00 (3H, *t*, $J = 7,2$ Hz, $\text{O}(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$), 0,95 (3H, *t*, $J = 6,9$ Hz, $\text{N}(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$) ppm; ^{13}C -RMN (600 MHz, CDCl_3) δ : 192,97, 186,18, 184,83, 173,60, 150,55, 139,49, 133,06 (Ar-CH), 131,13 (Ar-CH), 130,93, 128,74 (Ar-CH), 124,28 (Ar-CH), 123,95, 123,34 (Ar-CH), 114,04 (Ar-CH), 85,84 (C=CH), 73,48 ($\text{OCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$), 47,84 ($\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$), 31,94 (CH_2), 31,27 (CH_2), 26,42 (CH_2), 25,84 (CH_2), 22,58 (CH_2), 18,54 (CH_2), 13,98 (CH_3), 13,76 (CH_3) ppm.

2.1.2.1.4 Síntese de 3-[(1-hexilquinolin-2(1H)-ilideno)metil]-4-hidroxi-3-ciclobuteno-1,2-diona (6)

A síntese do composto 3-[(1-hexilquinolin-2(1H)-ilideno)metil]-4-hidroxi-3-ciclobuteno-1,2-diona (6) foi adaptada do método descrito por Kim *et al.* (2010).



Dissolveu-se o 3-butoxi-4-[(1-hexilquinolin-2(1H)-ilideno)metil]-3-ciclobuteno-1,2-diona (5) (0,951 g; 2,51 mmol) em etanol (60,00 mL) e aqueceu-se a mistura a 90 °C. Posteriormente, adicionou-se 0,58 mL de uma solução aquosa de NaOH (40%) e deixou-se a mistura reacional em banho de óleo a 90 °C, sob agitação, durante 15 min. A evolução da reação foi seguida por c.c.f. (sílica, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 2%). Decorrido esse tempo, arrefeceu-se a mistura reacional à temperatura ambiente, neutralizou-se com uma solução aquosa de HCl 2 M (3,00 mL) e procedeu-se à extração do produto com CH_2Cl_2 . A fase orgânica obtida foi, depois, seca com Na_2SO_4 , filtrada e o solvente removido a pressão reduzida. O produto foi purificado por lavagem com uma mistura de éter dietílico/éter de petróleo (1:1).

Deste modo, obteve-se o 3-[(1-hexilquinolin-2(1H)-ilideno)metil]-4-hidroxi-3-ciclobuteno-1,2-diona (6) na forma de cristais castanhos-avermelhados, cromatograficamente puros, com um rendimento de 78%, apresentando: p.f. 200-202 °C; IV $\nu_{\text{máx}}$ (KBr): 2928 (fr, CH-alif.), 1765 (m, C=O), 1647 (fr), 1538 (f, ArC=C), 1479 (f, ArC=C), 1450 (f), 1401 (f),

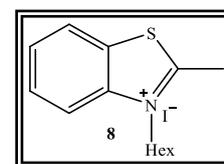
1330 (f), 1295 (f), 1262 (f), 1159 (f), 1133 (f) cm^{-1} ; $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, DMSO) δ : 8,45 (1H, *d*, $J = 8,0$ Hz, Ar-H), 7,57-7,52 (4H, *m*, Ar-H), 7,23 (1H, *t*, $J = 8,0$ Hz, Ar-H), 5,37 (1H, *s*, C=CH), 4,06 (2H, *sl*, $\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$), 1,69-1,67 (2H, *m*, $\text{NCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$), 1,52-1,48 (2H, *m*, $\text{N}(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$), 1,40-1,35 (4H, *m*, $\text{N}(\text{CH}_2)_3(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$), 0,90 (3H, *t*, $J = 6,0$ Hz, $\text{N}(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$) ppm.

2.1.2.1.5. Síntese do iodeto de 3-hexil-2-metilbenzotiazólio (8)

O sal quaternário de amónio **8** foi sintetizado de acordo com o procedimento descrito na literatura (Pardal *et al.*, 2002).

Fez-se reagir 2-metilbenzotiazole (**7**) (5,00 g; 33,56 mmol) e 1-iodo-hexano (14,86 mL; 100,68 mmol) em acetonitrilo (100,00 mL), a refluxo e sob agitação durante 5 dias. A evolução da reação foi seguida por c.c.f. (sílica, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 2%). A mistura reacional obtida foi previamente arrefecida em banho de gelo e adicionou-se éter dietílico para precipitar o produto. Os cristais formados foram recolhidos por filtração a pressão reduzida e lavados com éter dietílico. As fases etéreas foram reunidas e concentradas por evaporação a pressão reduzida. A mistura resultante foi colocada a refluxo durante 5 dias após adição de mais um equivalente molar 1-iodo-hexano. Este procedimento foi repetido mais duas vezes a fim de melhorar o rendimento da reação.

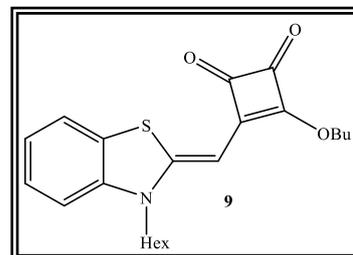
Assim, foi obtido o **iodeto de 3-hexil-2-metilbenzotiazólio (8)** com um rendimento de 96%, na forma de cristais beges, apresentando: p.f. 117-119 °C [lit. 125-126 °C (Pardal *et al.*, 2002)]; IV $\nu_{\text{máx}}$ (KBr): 2954 (m, CH-alif.), 2922 (f, CH-alif), 1519 (fr, ArC=C), 1439 (f), 1337 (m), 763 (f) cm^{-1} .



2.1.2.1.6. Síntese de 3-butoxi-4-[(3-hexilbenzotiazole-2(3H)-ilideno)metil]-3-ciclobuteno-1,2-diona (9)

A síntese do 3-butoxi-4-[(3-hexilbenzotiazole-2(3H)-ilideno)metil]-3-ciclobuteno-1,2-diona (9) foi adaptada do procedimento descrito por Kim *et al.* (2010).

Fez-se reagir uma mistura de iodeto de 3-hexil-2-metilbenzotiazólio (8) (6,21 g; 17,17 mmol) e 3,4-dibutoxi-3-ciclobuteno-1,2-diona (4) (3,88g; 17,17 mmol) em etanol (120,00 mL) e trietilamina (2,63 mL). A mistura reacional foi colocada a refluxo, sob agitação, durante 5 h. A evolução da reação foi controlada por c.c.f. (sílica, CH₂Cl₂). Decorrido esse tempo, retirou-se a mistura reacional do refluxo, deixou-se arrefecer à temperatura ambiente e colocou-se em banho de gelo para precipitar o produto. O precipitado obtido foi filtrado, lavado com etanol gelado e purificado por cromatografia em coluna utilizando com eluente uma mistura de acetato de etilo/éter de petróleo (1:1). As frações puras foram recolhidas e o solvente evaporado a pressão reduzida.

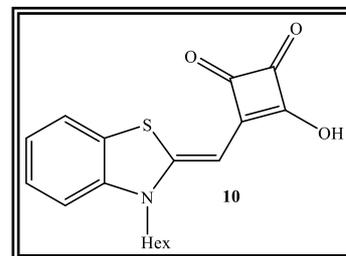


Obteve-se o produto, na forma de cristais amarelos, cromatograficamente puros, com um rendimento de 38%, apresentando: p.f. 119-121 °C; IV $\nu_{\text{máx}}$ (KBr): 2954 (m, CH-alif.), 2930 (fr, CH-alif.), 1702 (f, C=O), 1545 (f ArC=C), 1485 (f), 1415 (f), 1346 (f), 1309 (f), 1187 (m), 749 (m) cm⁻¹; ¹H- RMN (600 MHz, CDCl₃) δ : 7,49 (1H, *d*, *J* = 7,8 Hz, Ar-H), 7,34 (1H, *t*, *J* = 7,8 Hz, Ar-H), 7,16 (1H, *t*, *J* = 7,5 Hz, Ar-H), 7,06 (1H, *d*, *J* = 8,4 Hz, Ar-H), 5,46 (1H, *s*, C=CH), 4,81 (2H, *t*, *J* = 6,9 Hz, OCH₂(CH₂)₂CH₃), 3,97 (2H, *t*, *J* = 7,8 Hz, NCH₂(CH₂)₄CH₃), 1,88-1,83 (2H, *m*, OCH₂CH₂CH₂CH₃), 1,81-1,76 (2H, *m*, NCH₂CH₂(CH₂)₃CH₃), 1,53-1,50 (2H, *m*, N(CH₂)₂CH₂(CH₂)₂CH₃), 1,46-1,42 (2H, *m*, N(CH₂)₃CH₂CH₂CH₃), 1,38-1,33 (4H, *m*, O(CH₂)₂CH₂CH₃ + N(CH₂)₄CH₂CH₃), 1,00 (3H, *t*, *J* = 7,5 Hz, CH₃), 0,91 (3H, *t*, *J* = 6,9 Hz, CH₃) ppm; ¹³C-RMN (600 MHz, CDCl₃) δ : 185,98, 185,57, 159,64, 141,25, 127,06, 126,98, (Ar-CH), 123,61 (Ar-CH), 122,14 (Ar-CH), 111,02 (Ar-CH), 79,02 (C=CH), 73,68 (OCH₂(CH₂)₂CH₃), 45,94 (NCH₂(CH₂)₄CH₃), 32,30 (CH₂), 31,47 (CH₂), 26,86 (CH₂), 26,72 (CH₂), 22,66 (CH₂), 18,90 (CH₂), 14,12 (CH₃), 13,89 (CH₃) ppm; EM-ESI-TOF m/z: 386,18 [M+H]⁺.

2.1.2.1.7. Síntese do 3-[(3-hexilbenzotiazole-2(3H)-ilideno)metil]-4-hidroxi-3-ciclobuteno-1,2-diona (10)

A síntese do composto 3-[(3-hexilbenzotiazole-2(3H)-ilideno)metil]-4-hidroxi-3-ciclobuteno-1,2-diona (**10**) foi adaptada do método descrito por Kim *et al.* (2010).

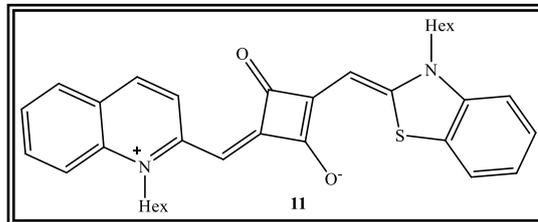
Dissolveu-se o 3-butoxi-4-[(3-hexilbenzotiazole-2(3H)-ilideno)metil]-3-ciclobuteno-1,2-diona (**9**) (1,195 g; 3,10 mmol) em etanol (50,00 mL) e aqueceu-se a mistura a 90 °C. Posteriormente, adicionou-se 0,72 mL de uma solução aquosa de NaOH (40%) e deixou-se a mistura reacional em banho de óleo, a 90°C, sob agitação, durante 25 min. A evolução da reação foi seguida por c.c.f. (sílica, CH₂Cl₂/MeOH 2%). Terminada a reação, arrefeceu-se a mistura reacional à temperatura ambiente e neutralizou-se com uma solução aquosa de HCl 2 M (3,6 mL). A mistura reacional foi colocada em gelo até precipitação do produto. Enquanto a solução turvava foi-se adicionando mais HCl 2 M para garantir que todo o produto precipitava. De seguida, filtrou-se o precipitado obtido e lavou-se várias vezes com água destilada gelada, até as águas de lavagem saírem neutras. No final, procedeu-se a uma lavagem dos cristais com éter dietílico gelado.



Assim, obteve-se o **3-[(3-hexilbenzotiazole-2(3H)-ilideno)metil]-4-hidroxi-3-ciclobuteno-1,2-diona (10)** na forma de cristais cor de laranja, cromatograficamente puros, com um rendimento de 79%, apresentando: p.f. 184-186 °C (dec.); IV $\nu_{\text{máx}}$ (KBr): 2926 (fr, CH-alif.), 1770 (fr, C=O), 1660 (fr, C=O), 1563 (m, ArC=C), 1492 (f, ArC=C), 1458 (m), 1415 (f), 1357 (f), 1267 (f), 1154 (m), 1123 (m) cm^{-1} , ¹H- RMN (600 MHz, CDCl₃) δ : 7,55 (1H, *d*, *J* = 7,2 Hz, Ar-H), 7,38 (1H, *tl*, *J* = 6,9 Hz, Ar-H), 7,22 (1H, *tl*, *J* = 6,9 Hz, Ar-H), 7,14 (1H, *d*, *J* = 7,8 Hz, Ar-H), 5,69 (1H, *s*, C=CH), 4,04 (2H, *sl*, NCH₂), 1,81 (2H, *sl*, NCH₂CH₂(CH₂)₃CH₃), 1,46 (2H, *sl*, N(CH₂)₂CH₂(CH₂)₂CH₃), 1,44-1,33 (4H, *m*, N(CH₂)₃(CH₂)₂CH₃), 0,91 (3H, *t*, *J* = 6,9 Hz, N(CH₂)₅CH₃) ppm; EM-ESI-TOF *m/z*: 330,12 [M+H]⁺.

2.1.2.1.8. Tentativa de síntese 2-[(3-hexilbenzotiazole-2(3*H*)-ilideno)metil]-4-[(1-hexilquinolin-1-*io*-2-*il*)metileno]-3-oxociclobut-1-en-1-olato (11)

Ao composto 3-[(1-hexilquinolin-2(1*H*)-ilideno)metil]-4-hidroxi-3-ciclobuteno-1,2-diona (6) (0,629 g; 1,95 mmol) adicionou-se o iodeto de 3-hexil-2-metilbenzotiazólio (8) (0,704 g; 1,95 g) e fez-se reagir a mistura em 40,00 mL de uma

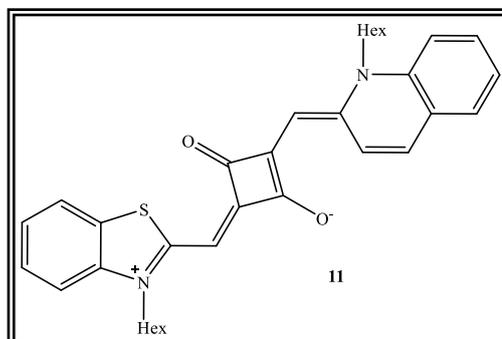


mistura de butanol/piridina (10%), a refluxo e sob agitação durante 24 horas. A evolução da reação foi seguida por c.c.f. (sílica; CH₂Cl₂/MeOH 2%). Terminada a reação procedeu-se à extração do produto com CH₂Cl₂. A fase orgânica obtida foi, depois, seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e o solvente evaporado à secura. O produto obtido foi depois submetido a várias lavagens consecutivas, utilizando vários solventes, na tentativa de purificação do mesmo, tendo-se conseguido obter cristais puros após uma lavagem com uma mistura de metanol/éter de petróleo (1:1).

Deste modo, conseguiu-se obter um produto, que não corresponde ao pretendido, na forma de cristais azuis-escuros, com um rendimento de 8%, apresentando: p.f. 154-157 °C; Visível λ_{máx} (DMSO): 718 nm; IV ν_{máx} (KBr): 3068 (fr, ArC-H), 1760 (fr, C=O), 1602 (fr), 1571 (fr, ArC=C), 1517 (m, ArC=C), 1437 (m), 1345 (f), 1334 (f), 1270 (m, C-O), 1175 (fr), 1130 (fr), 834 (fr), 755 (fr) cm⁻¹; EMAR-ESI-TOF m/z: 628,29245 [M]⁺ (C₃₈H₄₆NO₃S₂⁺, calc. 628,29136). Os espetros de RMN deste composto não são apresentados devido à impossibilidade de obtenção dos mesmos, dado que o composto se mostrou insolúvel nos solventes deuterados disponíveis.

2.1.2.1.9. Síntese de 4-[(3-hexilbenzotiazole-3-*io*-2-*il*)metileno]-2-[(1-hexilquinolin-2(1*H*)-*ilideno*)metil]-3-oxociclobut-1-en-1-olato (11)

Fez-se reagir o 3-[(3-hexilbenzotiazole-2(3*H*)-*ilideno*)metil]-4-hidroxi-3-ciclobuteno-1,2-diona (10) (1,08 g; 3,29 mmol) com o iodeto de *N*-hexil-2-metilquinolínio (2) (1,17 g; 3,29 mmol) em 43,00 mL de uma mistura de butanol/piridina (10%). Deixou-se a mistura reacional a refluxo e sob agitação durante 4 horas. A evolução da reação foi



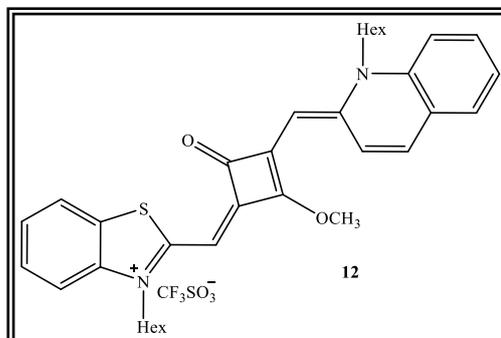
seguida por c.c.f. (sílica, CH₂Cl₂/MeOH 2%). Após o término da reação adicionou-se CH₂Cl₂ à mistura reacional e lavou-se várias vezes a fase orgânica com água destilada gelada. Depois da separação da fase orgânica, esta foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e o solvente removido a pressão reduzida. O produto bruto obtido foi recristalizado com éter dietílico e uma mistura de CH₂Cl₂/MeOH.

Desta forma obteve-se o **4-[(3-hexilbenzotiazole-3-*io*-2-*il*)metileno]-2-[(1-hexilquinolin-2(1*H*)-*ilideno*)metil]-3-oxociclobut-1-en-1-olato (11)** na forma de cristais vermelhos escuros, cromatograficamente puros, com um rendimento de 25%, apresentando: p.f. 282-284 °C (dec.); Visível $\lambda_{\text{máx}}$ (DMSO): 714 nm, $\log \epsilon = 5,06$; IV $\nu_{\text{máx}}$ (KBr): 2925 (fr, CH-alif.), 1584 (m, ArC=C), 1450 (f), 1424 (f), 1339 (m), 1229 (f, C-O), 1165 (m), 1081 (f), 745 (fr) cm⁻¹; ¹H-RMN (600 MHz, CDCl₃ + MeOD) δ : 9,17 (1H, *d*, *J* = 9,6 Hz, Ar-H), 7,62-7,58 (4H, *m*, Ar-H), 7,45 (1H, *d*, *J* = 9,0 Hz, Ar-H), 7,40-7,37 (1H, *m*, Ar-H), 7,32 (1H, *t*, *J* = 7,2 Hz, Ar-H), 7,21 (1H, *t*, *J* = 7,2 Hz, Ar-H), 7,16 (1H, *d*, *J* = 8,4 Hz, Ar-H), 5,87 (1H, *s*, C=CH), 5,83 (1H, *s*, C=CH), 4,27 (4H, *sl*, NCH₂(CH₂)₄CH₃), 1,90-1,80 (4H, *m*, CH₂), 1,6 (2H, *sl*, N(CH₂)₂CH₂(CH₂)₂CH₃), 1,47-1,37 (10H, *m*, CH₂), 0,95 (3H, *t*, *J* = 6,9 Hz, N(CH₂)₅CH₃), 0,91 (3H, *t*, *J* = 7,2 Hz, N(CH₂)₅CH₃) ppm; ¹³C-RMN (600 MHz, CDCl₃ + MeOD) δ : 173,90, 170,21, 158,97, 151,52, 141,54, 139,56, 134,28 (Ar-CH), 131,87 (Ar-CH), 129,24 (Ar-CH), 128,39, 127,35 (Ar-CH), 126,31 (Ar-CH), 125,46, 124,67 (Ar-CH), 124,08 (Ar-CH), 122,37 (Ar-CH), 115,08 (Ar-CH), 111,59 (Ar-CH), 92,64 (C=CH), 84,73 (C=CH), 48,70 (NCH₂), 46,39 (NCH₂), 31,73 (CH₂), 31,71 (CH₂), 27,46 (CH₂), 27,09 (CH₂), 26,77 (CH₂), 26,63 (CH₂), 22,87 (CH₂), 22,75 (CH₂), 14,12 (CH₃), 14,08 (CH₃) ppm; EMAR-ESI-TOF *m/z*: 538,26432 [M]⁺ (C₃₄H₃₈N₂O₂S⁺, calc. 538, 26485).

2.1.2.1.10 Síntese de trifluorometanossulfonato de 3-hexil-2-[(3-[(1-hexilquinolin-2(1*H*)-ilideno)metil]-2-metoxi-4-oxociclobut-2-en-1-ilideno)metil]benzotiazole-3-io (12)

Fez-se reagir o 4-[(3-hexilbenzotiazole-3-io-2-il)metileno]-2-[(1-hexilquinolin-2(1*H*)-ilideno)metil]-3-oxociclobut-1-en-1-olato (11)

(0,634 g; 1,18 mmol) com o $\text{CF}_3\text{SO}_3\text{CH}_3$ (0,400 mL; 3,54 mmol) em CH_2Cl_2 seco. Deixou-se a reação a decorrer em atmosfera de azoto, sob agitação e à temperatura ambiente durante

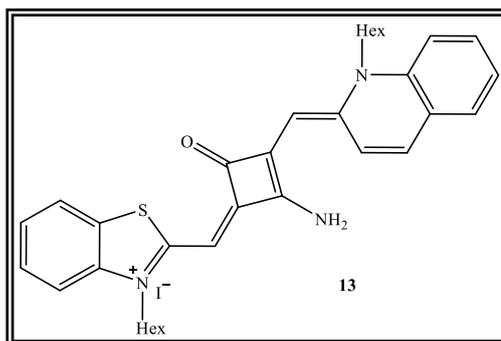


2 h e 30 min, tendo, a evolução da reação, sido controlada por c.c.f. (sílica, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 5%). Terminada a reação fez-se o tratamento da mistura reacional, lavando a fase orgânica, várias vezes, como uma solução aquosa de hidrogenocarbonato de sódio 5% (m/v) e depois com água destilada gelada. A fase orgânica obtida foi, depois, seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e o solvente removido a pressão reduzida. Obteve-se, assim, o **trifluorometanossulfonato de 3-hexil-2-[(3-[(1-hexilquinolin-2(1*H*)-ilideno)metil]-2-metoxi-4-oxociclobut-2-en-1-ilideno)metil]benzotiazole-3-io (12)** na forma de cristais verdes brilhantes, cromatograficamente puros, com um rendimento de 89%, apresentando: p.f. 189-191 °C; Visível $\lambda_{\text{máx}}$ (DMSO): 666 nm; IV $\nu_{\text{máx}}$ (KBr): 2930 (fr, CH-alif.), 1642 (fr, C=O), 1446 (m, ArC=C), 1351 (m), 1257 (f, C-O), 1110 (f) cm^{-1} ; ^1H -RMN (600 MHz, CDCl_3) δ : 8,76 (1H, *sl*, Ar-H), 7,85 (1H, *d*, $J = 9,0$ Hz, Ar-H), 7,71 (1H, *t*, $J = 7,8$ Hz), 7,69 (1H, *d*, $J = 7,8$ Hz, Ar-H), 7,66 (1H, *d*, $J = 9,0$ Hz, Ar-H), 7,59 (1H, *d*, $J = 7,8$ Hz, Ar-H), 7,44 (1H, *t*, $J = 7,8$ Hz, Ar-H), 7,42 (1H, *t*, $J = 7,2$ Hz, Ar-H), 7,31-7,28 (2H, *m*, Ar-H), 6,00 (1H, *s*, C=CH), 5,65 (1H, *s*, C=CH), 4,61 (3H, *s*, OCH_3), 4,39 (2H, *sl*, $\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$), 4,32 (2H, *t*, $J = 7,2$ Hz, $\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$), 1,87 (2H, *quint*, $\text{NCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$), 1,80 (2H, *quint*, $\text{NCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$), 1,58 (2H, *quint*, $\text{N}(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$), 1,44-1,36 (6H, *m*, CH_2), 1,31 (4H, *m*, $\text{N}(\text{CH}_2)_4\text{CH}_2\text{CH}_3$), 0,93 (3H, *t*, $J = 6,9$ Hz, $\text{N}(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$), 0,87 (3H, *t*, $J = 6,9$ Hz, $\text{N}(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$) ppm; ^{13}C -RMN (600 MHz, CDCl_3) δ : 161,36, 151,89, 140,74, 138,74, 137,15 (Ar-CH), 133,01 (Ar-CH), 129,45 (Ar-CH), 127,88 (Ar-CH), 127,73, 125,95 (Ar-CH), 125,38, 125,11 (Ar-CH), 122,22 (Ar-CH), 119,69 (Ar-CH), 115,96 (Ar-CH), 112,84 (Ar-CH), 85,27 (C=CH), 77,20 (C=CH), 61,11 (OCH_3), 49,18 (NCH_2), 46,81 (NCH_2), 31,42 (CH_2), 31,29 (CH_2), 27,64 (CH_2), 27,30 (CH_2), 26,30 (CH_2), 26,22 (CH_2), 22,45 (CH_2), 22,37 (CH_2), 13,91 (CH_3), 13,89 (CH_3) ppm; EM-ESI-TOF m/z: 553,29 $[\text{M}-\text{CF}_3\text{SO}_3]^+$.

2.1.2.2. Síntese de corantes aminoesquarílicos assimétricos derivados do benzotiazole e da quinaldina

2.1.2.2.1. Síntese de iodeto de 2-[(2-amino-3-[(1-hexilquinolin-2(1*H*)-ilideno)metil]-4-oxociclobut-2-en-1-ilideno)metil]-3-hexilbenzotiazole-3-io (13)

Fez-se reagir o trifluorometanossulfonato de 3-hexil-2-[(3-[(1-hexilquinolin-2(1*H*)-ilideno)metil]-2-metoxi-4-oxociclobut-2-en-1-ilideno)metil]benzotiazole-3-io (**12**) (0,200 g; 0,285 mmol) com amônia 2 M, em metanol (0,640 mL; 1,28 mmol) em CH₂Cl₂ seco. A reação decorreu durante 23 h, em atmosfera de azoto, sob agitação e



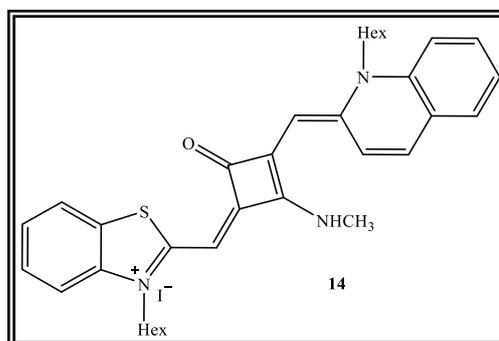
à temperatura ambiente. Seguiu-se a evolução da reação por c.c.f. (sílica; CH₂Cl₂/MeOH 10%). Terminada a reação, lavou-se, várias vezes, a mistura reacional com água destilada gelada. A fase orgânica obtida foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e o solvente removido a pressão reduzida. Posteriormente, o produto obtido foi dissolvido em 10,00 mL de metanol, adicionou-se 10,00 mL de uma solução aquosa de KI (14%) e deixou-se a mistura a reagir, à temperatura ambiente e sob agitação, durante 2 horas. Terminado esse tempo os cristais foram filtrados, lavados com água destilada gelada e depois lavados com éter dietílico. Os cristais obtidos foram recristalizados com CH₂Cl₂/MeOH e éter dietílico, obtendo-se o **iodeto de 2-[(2-amino-3-[(1-hexilquinolin-2(1*H*)-ilideno)metil]-4-oxociclobut-2-en-1-ilideno)metil]-3-hexilbenzotiazole-3-io (13)** na forma de cristais verdes escuros, cromatograficamente puros, com um rendimento de 70%, apresentando: p.f. 277-279 °C (dec.); Visível $\lambda_{\text{máx}}$ (DMSO): 693 nm, $\log \epsilon = 5,25$; IV $\nu_{\text{máx}}$ (KBr): 3098 (fr, ArC-H), 2953 (fr, CH-alif), 2929 (fr, CH-alif), 1633 (fr, C=O), 1517 (fr, ArC=C), 1456 (f), 1418 (m), 1356 (m), 1272 (f), 1252 (f), 1179 (m), 1156 (f), 1093 (fr), 1068 (fr), 980 (fr) cm^{-1} , ¹H-RMN (600 MHz, DMSO) δ : 8,93 (1H, *d*, *J* = 9,6 Hz, Ar-H), 8,75 (1H, *s*, NH, troca com D₂O), 8,62 (1H, *s*, NH, troca com D₂O), 7,96 (1H, *d*, *J* = 9,6 Hz, Ar-H), 7,84 (1H, *d*, *J* = 7,8 Hz, Ar-H), 7,76 (2H, *tl*, *J* = 6,3 Hz, Ar-H), 7,71 (1H, *t*, *J* = 7,5 Hz, Ar-H), 7,55 (1H, *d*, *J* = 7,8 Hz, Ar-H), 7,45-7,41 (2H, *m*, Ar-H), 7,26 (1H, *t*, *J* = 7,5 Hz, Ar-H), 6,01 (1H, *s*, C=CH), 5,87 (1H, *s*, C=CH), 4,31 (2H, *sl*, NCH₂(CH₂)₄CH₃), 4,15 (2H, *tl*, *J* = 7,2 Hz, NCH₂(CH₂)₄CH₃), 1,69 (4H, *quint*, 2CH₂), 1,52 (2H, *quint*, CH₂), 1,40 (2H, *quint*, CH₂), 1,38-1,25 (8H, *m*, 4CH₂), 0,88

(3H, *t*, *J* = 6,9 Hz, CH₃), 0,85 (3H, *t*, *J* = 6,9 Hz, CH₃) ppm; ¹³C-RMN (600 MHz, DMSO) δ: 174,50, 167,34, 159,58, 158,58, 154,92, 151,33, 140,93, 138,84, 136,02 (Ar-CH), 132,69 (Ar-CH), 129,29 (Ar-CH), 127,74 (Ar-CH), 127,46, 125,39 (Ar-CH), 125,07, 124,51 (Ar-CH), 124,47 (Ar-CH), 122,87 (Ar-CH), 116,36 (Ar-CH), 112,98 (Ar-CH), 93,86 (C=CH), 85,60 (C=CH), 48,25 (NCH₂(CH₂)₄CH₃), 46,15 (NCH₂(CH₂)₄CH₃), 31,26 (CH₂), 31,16 (CH₂), 27,20 (CH₂), 27,07 (CH₂), 25,96 (CH₂), 25,85 (CH₂), 22,38 (CH₂), 22,26 (CH₂), 14,11 (CH₃), 14,06 (CH₃) ppm; EMAR-ESI-TOF m/z: 538,28785 [M-I]⁺ (C₃₄H₄₀N₃OS⁺, calc. 538,28866).

2.1.2.2.2. Síntese de iodeto de 3-hexil-2-[(3-[(1-hexilquinolin-2(1*H*)-ilideno)metil]-2-metilamino-4-oxociclobut-2-en-1-ilideno)metil]benzotiazole-3-io (14)

Fez-se reagir o trifluorometanossulfonato de 3-hexil-2-[(3-[(1-hexilquinolin-2(1*H*)-ilideno)metil]-2-metoxi-4-oxociclobut-2-en-1-

ilideno)metil]benzotiazole-3-io (12) (0,200 g; 0,29 mmol) com metilamina 2 M, em THF (0,64 mL; 1,28 mmol) em CH₂Cl₂ seco. Deixou-se a mistura reacional em atmosfera de azoto, com agitação e à



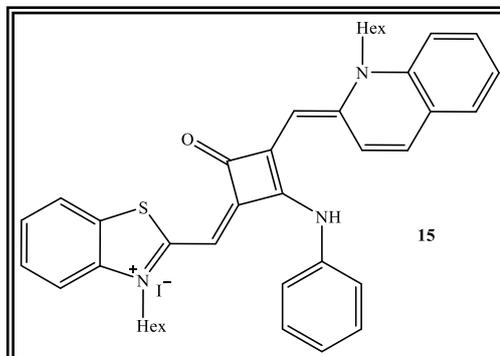
temperatura ambiente durante 30 min, tendo sido, a reação, controlada por c.c.f. (sílica, CH₂Cl₂/MeOH 10%). Após o término da reação, lavou-se, várias vezes, a mistura reacional com água destilada gelada. Depois, a fase orgânica obtida foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e o solvente removido a pressão reduzida. Posteriormente, dissolveu-se o produto obtido em 10 mL de MeOH, adicionou-se 10 mL de uma solução aquosa de KI (14%) e deixou-se a mistura reacional à temperatura ambiente e sob agitação durante 2 h. Decorrido esse tempo, os cristais foram filtrados, lavados com água destilada gelada e depois com éter dietílico, previamente arrefecido. Finalmente, procedeu-se à recristalização dos cristais com CH₂Cl₂ e éter dietílico, tendo-se obtido o **iodeto de 3-hexil-2-[(3-[(1-hexilquinolin-2(1*H*)-ilideno)metil]-2-metilamino-4-oxociclobut-2-en-1-ilideno)metil]benzotiazole-3-io (14)** na forma de cristais roxos escuros, cromatograficamente puros, com um rendimento de 67%, apresentando: p.f. 212-214 °C, Visível λ_{máx} (DMSO): 704 nm, log ε = 5,17; IV υ_{máx} (KBr): 2924 (fr, CH-alif.), 1626 (fr, C=O), 1457 (f), 1348 (m), 1258 (f), 1158 (m), 1109 (m) cm⁻¹; ¹H-RMN (600 MHz, DMSO) δ: 8,88 (1H, *d*, *J* = 9,6 Hz, Ar-H), 8,86 (1H, *d*, *J* = 9,0 Hz, Ar-H), 8,80 (1H, *sl*, NH), 8,70 (1H, *sl*, NH), 8,02 (1H, *d*, *J* = 9,0 Hz, Ar-H), 7,87 (1H, *t*, *J* = 9,3

Hz, Ar-H), 7,83-7,76 (4H, *m*, Ar-H), 7,72 (2H, *sl*, Ar-H), 7,65 (2H, *sl*, Ar-H), 7,57 (1H, *d*, $J = 7,8$ Hz, Ar-H), 7,53 (1H, *d*, $J = 7,8$ Hz, Ar-H), 7,46-7,37 (3H, *m*, Ar-H), 7,28 (1H, *t*, $J = 7,2$ Hz, Ar-H), 7,22 (1H, *t*, $J = 7,2$ Hz, Ar-H), 5,99 (1H, *s*, C=CH), 5,87 (1H, *s*, C=CH), 5,84 (1H, *s*, C=CH), 5,74 (1H, *s*, C=CH), 4,40-4,13 (8H, *m*, NCH₂), 3,29 (3H, *d*, $J = 3,9$ Hz NCH₃), 3,26 (3H, *d*, $J = 3,9$ Hz, NCH₃), 1,67 (8H, *sl*, CH₂), 1,51 (4H, *sl*, CH₂), 1,44 (4H, *sl*, CH₂), 1,36-1,27 (16H, *m*, CH₂), 0,87-0,83 (12H, *m*, N(CH₂)₅CH₃) ppm; ¹H-RMN (400 MHz, DMSO, 90°C) δ : 8,95 (1H, *d*, $J = 9,2$ Hz, Ar-H), 8,02 (1H, *d*, $J = 9,6$ Hz, Ar-H), 7,88-7,84 (3H, *m*, Ar-H), 7,78 (1H, *t*, $J = 8,4$ Hz, Ar-H), 7,56 (1H, *d*, $J = 8,4$ Hz, Ar-H), 7,52-7,47 (2H, *m*, Ar-H), 7,31 (1H, *t*, $J = 7,6$ Hz, Ar-H), 6,03 (1H, *s*, C=CH), 5,97 (1H, *s*, C=CH), 4,46 (2H, *t*, $J = 6,4$ Hz, NCH₂), 4,27 (2H, *t*, $J = 7,4$ Hz, NCH₂), 3,36 (3H, *s*, NCH₃), 1,87-1,74 (4H, *m*, CH₂), 1,56-1,49 (2H, *m*, CH₂), 1,41-1,29 (10H, *m*, CH₂), 0,91-0,85 (6H, *m*, N(CH₂)₅CH₃) ppm; ¹³C-RMN (600 MHz, DMSO) δ : 173,99, 173,88, 165,59, 165,46, 160,26, 158,52, 158,05, 157,55, 154,89, 153,60, 151,51, 150,59, 149,90, 140,92, 140,83, 140,80, 139,04, 138,74, 136,60 (Ar-CH), 135,27 (Ar-CH), 132,86 (Ar-CH), 132,54 (Ar-CH), 129,38 (Ar-CH), 129,09 (Ar-CH), 127,85 (Ar-CH), 127,64 (Ar-CH), 127,56, 125,70 (Ar-CH), 125,29, 125,12 (Ar-CH), 124,80 (Ar-CH), 124,53 (Ar-CH), 124,35 (Ar-CH), 124,29 (Ar-CH), 122,90 (Ar-CH), 122,62 (Ar-CH), 116,59 (Ar-CH), 116,21 (Ar-CH), 113,23 (Ar-CH), 112,80 (Ar-CH), 94,29 (C=CH), 94,00 (C=CH), 86,05 (C=CH), 85,85 (C=CH), 48,50 (NCH₂), 48,37 (NCH₂), 46,34 (NCH₂), 45,64 (NCH₂), 31,26 (CH₂), 31,21 (CH₂), 31,15 (CH₂), 31,09 (CH₂), 30,59 (CH₂), 30,27 (NCH₃), 30,20 (NCH₃), 27,30 (CH₂), 27,23 (CH₂), 26,92 (CH₂), 26,74 (CH₂), 25,93 (CH₂), 25,87 (CH₂), 25,81 (CH₂), 22,37 (CH₂), 22,30 (CH₂), 22,25 (CH₂), 22,19 (CH₂), 14,10 (CH₃), 14,01 (CH₃), 14,06 (CH₃) ppm; EMAR-ESI-TOF m/z : 552,30339 [M-I]⁺ (C₃₅H₄₂N₃OS⁺, calc. 552,30431).

2.1.2.2.3. Síntese de iodeto de 3-hexil-2-[(3-[(1-hexilquinolin-2(1*H*)-ilideno)metil]-4-oxo-2-(fenilamino)ciclobut-2-en-1-ilideno)metil]benzotiazole-3-io (15)

Fez-se reagir o trifluorometanossulfonato de 3-hexil-2-[(3-[(1-hexilquinolin-2(1*H*)-ilideno)metil]-

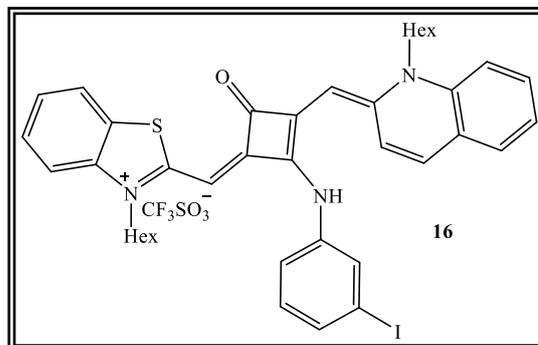
2-metoxi-4-oxociclobut-2-en-1-ilideno)metil]benzotiazole-3-io (**12**) (0,200 g; 0,29 mmol) com anilina (0,129 mL; 1,42 mmol), trietilamina (0,029 mL; 0,205 mmol) e 4-DMAP (0,017 g; 0,142 mmol) em CH₂Cl₂ seco. A reação



decorreu durante 11 dias, em atmosfera de azoto, sob agitação e à temperatura ambiente, tendo, a sua evolução, sido controlada por c.c.f. (sílica, CH₂Cl₂/MeOH 10%). Após o término da reação, a mistura foi lavada, várias vezes com água destilada gelada. Recolheu-se a fase orgânica, secou-se com sulfato de sódio anidro, filtrou-se e removeu-se o solvente a pressão reduzida. Posteriormente, dissolveu-se o produto obtido em 15 mL de MeOH, adicionou-se 15 mL de uma solução aquosa de KI (14%) e deixou-se a reagir à temperatura ambiente e sob agitação durante 2 h. Decorrido esse tempo, os cristais foram filtrados e lavados, várias vezes, com água destilada gelada e depois com éter dietílico. Estes cristais foram, depois, recristalizados com CH₂Cl₂ e éter dietílico, tendo-se obtido o **iodeto de 3-hexil-2-[(3-[(1-hexilquinolin-2(1*H*)-ilideno)metil]-4-oxo-2-(fenilamino)ciclobut-2-en-1-ilideno)metil]benzotiazole-3-io (15)** na forma de cristais castanhos escuros, cromatograficamente puros, com um rendimento de 46%, apresentando: p.f. 227-230 °C; Visível $\lambda_{\text{máx}}$ (DMSO): 691 nm, $\log \epsilon = 5,16$; IV $\nu_{\text{máx}}$ (KBr): 2812 (fr, CH-alif), 1622 (fr, C=O), 1540 (fr, ArC=C) 1453 (f), 1348 (m), 1258 (f), 1154 (f) cm⁻¹; EMAR-ESI-TOF m/z: 614,31807 [M-I]⁺ (C₄₀H₄₄N₃OS⁺, calc. 614,31996). Os espectros de RMN deste composto não são apresentados devido à impossibilidade de obtenção dos mesmos, uma vez que o composto se mostrou insolúvel nos vários solventes deuterados disponíveis.

2.1.2.2.4. Síntese de trifluorometanossulfonato de 3-hexil-2-[(3-[(1-hexilquinolin-2(1H)ilideno)metil]-2-[(3-iodofenil)amino]-4-oxociclobut-2-en-1-ilideno)metil]benzotiazole-3-io (16)

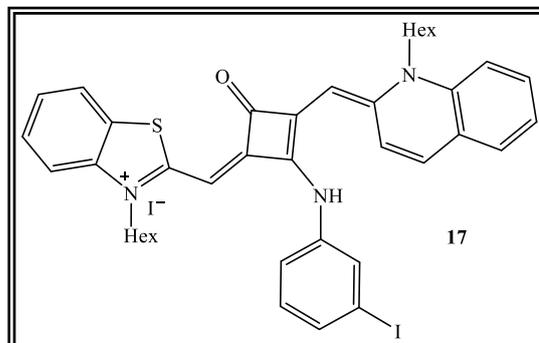
Fez-se reagir o trifluorometanossulfonato de 3-hexil-2-[(3-[(1-hexilquinolin-2(1H)ilideno)metil]-2-metoxi-4-oxociclobut-2-en-1-ilideno)metil]benzotiazole-3-io (**12**) (0,200 g; 0,29 mmol) com iodoanilina (0,172 mL; 1,42 mmol), trietilamina (0,029 mL; 0,21 mmol) e 4-DMAP (0,017 g; 0,14 mmol) em CH₂Cl₂ seco.



Deixou-se a mistura reacional em atmosfera de azoto, sob agitação e à temperatura ambiente durante 17 dias, tendo sido a evolução da reação seguida por c.c.f. (sílica, CH₂Cl₂/MeOH 10%). Terminada a reação procedeu-se à lavagem da mistura reacional com água destilada gelada. A fase orgânica obtida foi, depois, seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e o solvente removido à secura. Posteriormente, o produto obtido foi recristalizado com MeOH/CH₂Cl₂ e éter dietílico. Desta forma, obteve-se o **trifluorometanossulfonato de 3-hexil-2-[(3-[(1-hexilquinolin-2(1H)ilideno)metil]-2-[(3-iodofenil)amino]-4-oxociclobut-2-en-1-ilideno)metil]benzotiazole-3-io (16)** na forma de cristais verdes escuros, cromatograficamente puros, com um rendimento de 17%, apresentando: p.f. 235-237 °C; Visível $\lambda_{\text{máx}}$ (DMSO): 688 nm, $\log \epsilon = 5,08$; IV $\nu_{\text{máx}}$ (KBr): 2954 (fr, CH-alif.), 2931 (fr, CH-alif.), 1628 (fr, C=O), 1565 (fr, ArC=C), 1547 (fr, ArC=C), 1470 (f), 1434 (m), 1349 (m), 1330 (fr), 1265 (m), 1240 (m), 1155 (f), 1028 (fr) cm⁻¹; EMAR-ESI-TOF m/z: 740,21405 [M-CF₃SO₃]⁺ (C₄₀H₄₃IN₃OS⁺, calc. 740,21660). Os espetros de RMN deste composto não são apresentados devido à impossibilidade de obtenção dos mesmos, já que o composto se mostrou insolúvel nos solventes deuterados disponíveis.

2.1.2.2.5. Síntese de iodeto de 3-hexil-2-[(3-[(1-hexilquinolin-2(1H)ilideno)metil]-2-[(3-iodofenil)amino]-4-oxociclobut-2-en-1-ilideno)metil]benzotiazole-3-io (17)

Fez-se reagir o trifluorometanossulfonato de 3-hexil-2-[(3-[(1-hexilquinolin-2(1H)ilideno)metil]-2-metoxi-4-oxociclobut-2-en-1-ilideno)metil]benzotiazole-3-io (**12**) (0,200 g; 0,29 mmol) com iodoanilina (0,172 mL; 1,42 mmol), trietilamina (0,029 mL; 0,21 mmol) e 4-DMAP (0,017 g; 0,14 mmol) em CH₂Cl₂ seco



de acordo com o processo descrito em 2.1.2.2.4. Após tratamento da reação pelo método referido anteriormente, o produto obtido foi dissolvido em 15,00 mL de MeOH, adicionou-se 15,00 mL de uma solução aquosa de KI (14%) e deixou-se a mistura reagir durante 2 h, à temperatura ambiente, sob agitação. Decorrido esse tempo, os cristais foram filtrados e lavados com água destilada gelada e com éter dietílico previamente arrefecido. No final, procedeu-se à lavagem dos cristais com acetonitrilo gelado e depois com éter dietílico, obtendo-se o **iodeto de 3-hexil-2-[(3-[(1-hexilquinolin-2(1H)ilideno)metil]-2-[(3-iodofenil)amino]-4-oxociclobut-2-en-1-ilideno)metil]benzotiazole-3-io (17)** na forma de cristais castanhos avermelhados, cromatograficamente puros, com um rendimento de 31%, apresentando: p.f. 254-255 °C (dec.); Visível $\lambda_{\text{máx}}$ (DMSO): 690 nm, $\log \epsilon = 5,17$; IV $\nu_{\text{máx}}$ (KBr): 2952 (fr, CH-alif.), 2912 (fr, CH-alif.), 1627 (fr, C=O), 1536 (fr, ArC=C), 1460 (f, ArC=C), 1348 (m), 1261 (m), 1156 (m) cm^{-1} ; EMAR-ESI-TOF m/z: 740,21445 [M-I]⁺ (C₄₀H₄₃IN₃OS⁺, calc. 740,21660). Devido à insolubilidade, deste composto, nos solventes deuterados disponíveis, os espectros de RMN não são apresentados devido à impossibilidade de obtenção dos mesmos.

2.1.3. Síntese de corantes esquarílicos assimétricos derivados do benzotiazole e da 6-iodoquinaldina

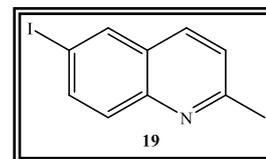
2.1.3.1. Sínteses prévias

2.1.3.1.1. Síntese da 6-iodoquinaldina (19)

Método A

O composto 6-iodoquinaldina (**19**) foi sintetizado segundo a reação Doebner-Miller descrita na literatura (Matsugi *et al.*, 2000).

A uma mistura de 4-iodoanilina (**18**) (1,00 g, 4,50 mmol) em HCl 6 M (22,40 mL) foi adicionado, gota a gota, uma mistura de crotonaldeído (0,74 mL) e tolueno (5,80 mL). Após a adição completa, a mistura reacional foi deixada a refluxo durante 3 h. A evolução da reação foi seguida por c.c.f. (sílica, CH₂Cl₂). Terminada a reação recolheu-se a fase orgânica e adicionou-se solução aquosa de NaOH (6 M) até se obter um pH próximo de 7. O produto foi extraído com éter dietílico, a fase orgânica seca com Na₂SO₄, filtrada e o solvente removido a pressão reduzida. Ao resíduo obtido foi adicionado éter dietílico tendo-se precipitado uma impureza. Às águas de lavagem resultantes foi adicionado *n*-hexano e acetonitrilo tendo obtido a **6-iodoquinaldina (19)** na forma de cristais brancos. No entanto, devido à grande dificuldade de precipitação dos cristais pretendidos teve-se de abandonar este método.



Método B

O composto 6-iodoquinaldina (**19**) foi sintetizado por adaptação do procedimento, para a reação de Doebner-Miller, descrito por Reynolds *et al.* (2010).

A uma mistura de 4-iodoanilina (**18**) (1,00 g, 4,50 mmol) em HCl 6 M (40,00 mL), tolueno (10,00 mL) e TBAF (0,09 mL) foi adicionada, gota a gota, uma mistura de crotonaldeído (0,74 mL) e tolueno (1,00 mL). Após a adição completa, a mistura reacional foi deixada em banho de óleo (80-90 °C) durante 1 h e 30 min. A evolução da reação foi seguida por c.c.f. (sílica, CH₂Cl₂). Terminada a reação adicionou-se solução aquosa de NaOH 6 M até obter um pH próximo de 7. O produto foi extraído com éter dietílico, a fase orgânica seca com Na₂SO₄, filtrada e o solvente removido a pressão reduzida. O produto obtido foi

purificado por cromatografia em coluna usando como eluente o CH_2Cl_2 . As frações puras foram recolhidas e o solvente foi evaporado a pressão reduzida.

Obteve-se a **6-iodoquinaldina (19)** na forma de cristas brancas, cromatograficamente puros, com rendimento 58%, apresentando: p.f. 100-101 °C [lit. 108-109 °C (Jyothish *et al.*, 2007)]; IV $\nu_{\text{máx}}$ (KBr): 3047 (fr, Ar-H), 2909 (fr, CH-alif), 1591 (m, Ar C=C), 1551 (fr, Ar C=C), 1482 (f), 1374 (m), 1297 (m), 1119 (fr), 880 (m); 827 (f), 810 (f), 717 (fr), 629 (fr) cm^{-1} ; $^1\text{H-RMN}$ (600 MHz, CDCl_3) δ : 8,15 (1H, *d*, $J = 2,0$ Hz, Ar-H), 7,93-7,89 (2H, *m*, Ar-H), 7,74 (1H, *d*, $J = 9,2$ Hz, Ar-H), 7,27 (1H, *d*, $J = 8,0$ Hz, Ar-H), 2,73 (3H, *s*, CH_3) ppm.

Método C

O composto 6-iodoquinaldina (**19**) foi sintetizado através de uma adaptação do método descrito por Leir (1977).

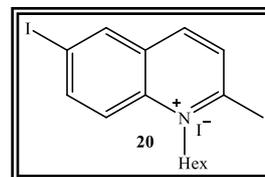
A uma mistura de 4-iodoanilina (**18**) (10,00 g; 46 mmol) com HCl 6 M (50,00 mL) em agitação, foi adicionado, gota a gota, durante 4 h, o crotonaldeído (4,00 mL; 48,00 mmol). Após adição completa, a mistura reacional foi deixada em banho de óleo (80-90°C) e sob agitação vigorosa, durante 2 horas. Decorrido esse tempo, a mistura foi arrefecida à temperatura ambiente e de seguida adicionou-se, lentamente, ZnCl_2 (6,27 g; 46,00 mmol). A mistura ficou em agitação durante 1 h à temperatura ambiente. Posteriormente, a mistura foi arrefecida a 0 °C e deixou-se mais 15 min em banho de gelo e sob agitação vigorosa. O sólido formado, foi filtrado e lavado com HCl 3 M (50,00 mL). De seguida, o precipitado foi transferido para um copo onde se adicionou álcool isopropílico (50,00 mL) e se deixou em agitação vigorosa durante 30 min. Decorrido esse tempo, o precipitado foi filtrado, lavado com álcool isopropílico e depois com éter dietílico. Seguidamente, colocou-se o precipitado numa solução de amónia (15,00 mL) em água destilada (50,00 mL) durante 10 min, a 0 °C. Por fim, procedeu-se à extração do produto pretendido com éter dietílico. A fase orgânica obtida foi depois seca com Na_2SO_4 , filtrada e o solvente removido a pressão reduzida.

O produto obtido foi purificado por cromatografia em coluna usando como eluente éter dietílico/éter de petróleo/ CH_2Cl_2 (1:1:2), cujas frações puras foram recolhidas e o solvente removido a pressão reduzida.

Deste modo, obtiveram-se cristais de **6-iodoquinaldina (19)**, na forma de cristais brancos com um rendimento de 38%.

2.1.3.1.2. Síntese do iodeto de 6-iodo-1-hexilquinaldínio (20)

Fez-se reagir 6-iodoquinaldina (**19**) (4,66 g; 17,26 mmol) e 1-iodo-hexano (6,71 mL; 51,78 mmol) em acetonitrilo (50,00 mL), a refluxo e sob agitação, durante 5 dias. A evolução da reação foi seguida por c.c.f. (sílica, CH₂Cl₂/MeOH 5%). Passados os 5 dias, a mistura

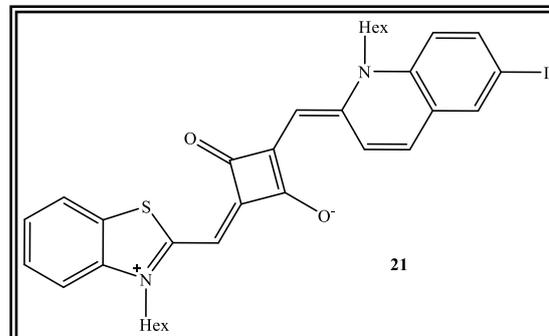


reacional foi previamente arrefecida em banho de gelo e o produto precipitou. Os cristais obtidos foram recolhidos por filtração a pressão reduzida e lavados com éter dietílico. Depois de todas as lavagens, as fases etéreas foram reunidas e o solvente removido a pressão reduzida. À mistura reacional obtida foi adicionado 1 equivalente molar de 1-iodo-hexano e colocada a refluxo durante mais 5 dias. Este procedimento foi repetido mais 2 vezes para melhorar o rendimento da reação.

Assim, foi obtido o **iodeto de 6-iodo-1-hexilquinaldínio (20)** com um rendimento de 77%, na forma de cristais amarelos, apresentando: p.f. 219-220 °C; IV $\nu_{\text{máx}}$ (KBr): 3050 (f, ArC-H), 2953 (f, CH-alif.), 2936 (f, CH-alif.), 1597 (f, ArC=C), 1503 (f, ArC=C), 1460 (m), 1347 (m), 1215 (fr), 1164 (f), 885 (m), 833 (f), 726 (fr), 669 (fr) cm⁻¹; ¹H-RMN (600 MHz, DMSO): 8,97 (1H, *d*, *J* = 8,4 Hz, Ar-H), 8,87 (1H, *d*, *J* = 1,8 Hz, Ar-H), 8,45 (1H, *d*, *J* = 9,6 Hz, Ar-H), 8,35 (1H, *d*, *J* = 9,6 Hz, Ar-H), 8,13 (1H, *d*, *J* = 8,4 Hz, Ar-H), 4,87 (2H, *t*, *J* = 8,1 Hz, NCH₂(CH₂)₄CH₃), 3,08 (3H, *s*, CH₃), 1,88-1,83 (2H, *m*, NCH₂CH₂(CH₂)₃CH₃), 1,55-1,52 (2H, *m*, N(CH₂)₂CH₂(CH₂)₂CH₃), 1,37-1,30 (4H, *m*, N(CH₂)₃(CH₂)₂CH₃), 0,89 (3H, *t*, *J* = 7,2 Hz, N(CH₂)₅CH₃) ppm; ¹³C-RMN (600 MHz, DMSO) δ : 161,18, 144,42 (Ar-CH), 143,05 (Ar-CH), 138,61 (Ar-CH), 137,76, 129,93, 126,66 (Ar-CH), 120,94 (Ar-CH), 96,54, 51,52 (NCH₂), 30,91 (CH₂), 28,20 (CH₂), 25,70 (CH₂), 22,87 (CH₃), 22,16 (CH₂), 14,04 (CH₃) ppm; EM-ESI-TOF *m/z*: 354,07 [M-I]⁺.

2.1.3.1.3. Síntese de 2-[(1-hexil-6-iodoquinolin-2(1H)-ilideno)metil]-4-[(3-hexilbenzotiazole-3-io-2-il)metileno]-3-oxociclobut-1-en-1-olato (21)

Fez-se reagir o 3-[(3-hexilbenzotiazole-2(3H)-ilideno)metil]-4-hidroxi-3-ciclobuten-1,2-diona (10) (0,796 g; 2,43 mmol) com o iodeto de 6-iodo-1-hexilquinaldínio (20) (1,17 g; 2,43 mmol) em 120 mL de uma mistura de butanol/piridina (10%). A mistura reacional foi deixada a refluxo, sob agitação durante

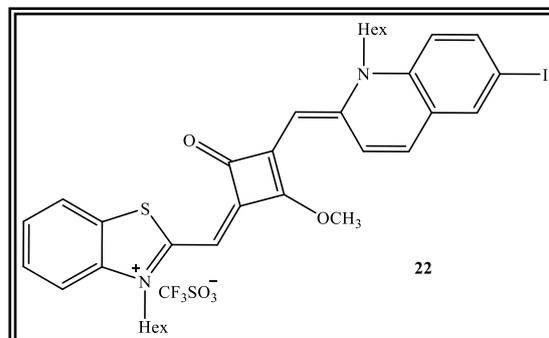


3 h e 20 minutos. A evolução da reação foi controlada por c.c.f. (sílica, CH₂Cl₂/MeOH 5%). Terminada a reação procedeu-se à extração do produto com CH₂Cl₂. Depois, a fase orgânica obtida foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e o solvente removido a pressão reduzida. O produto bruto obtido foi recristalizado com uma mistura CH₂Cl₂/MeOH e éter dietílico. Por fim os cristais obtidos ainda foram sujeitos a uma lavagem com metanol.

Assim, obteve-se o 2-[(1-hexil-6-iodoquinolin-2(1H)-ilideno)metil]-4-[(3-hexilbenzotiazole-3-io-2-il)metileno]-3-oxociclobut-1-en-1-olato (21) na forma de cristais castanhos dourados, cromatograficamente puros, com um rendimento de 53%, apresentando: p.f. 143-144 °C; Visível $\lambda_{\text{máx}}$ (DMSO): 726 nm, $\log \epsilon = 5,26$; IV $\nu_{\text{máx}}$ (KBr): 3052 (fr, ArC-H), 2912 (fr, CH-alif.), 2853 (fr, CH-alif), 1729 (fr, C=O), 1549 (fr ArC=C), 1450 (f, ArC=C), 1304 (fr), 1253 (f, C-O), 1177 (m), 1087 (f), 975 (fr) cm^{-1} ; ¹H-RMN (600 MHz, CDCl₃) δ : 9,28 (1H, *d*, *J* = 7,8 Hz, Ar-H), 7,77 (1H, *s*, Ar-H), 7,72 (1H, *d*, *J* = 8,4 Hz, Ar-H), 7,55 (1H, *d*, *J* = 7,8 Hz, Ar-H), 7,37 (1H, *t*, *J* = 7,5 Hz, Ar-H), 7,28 (1H, *d*, *J* = 7,2 Hz, Ar-H), 7,20 (1H, *t*, *J* = 7,5 Hz, Ar-H), 7,13 (1H, *d*, *J* = 8,4 Hz, Ar-H), 7,02 (1H, *d*, *J* = 9,0 Hz, Ar-H), 5,89 (1H, *s*, C=CH), 5,73 (1H, *s*, C=CH), 4,10-4,06 (4H, *m*, 2(NCH₂)), 1,83-1,80 (4H, *m*, CH₂), 1,53-1,51 (2H, *m*, CH₂), 1,45 (2H, *tl*, *J* = 6,9 Hz, CH₂), 1,42-1,38 (4H, *m*, CH₂), 1,37-1,34 (4H, *m*, CH₂), 0,94 (3H, *t*, *J* = 7,2 Hz, CH₃), 0,91 (3H, *t*, *J* = 6,9 Hz, CH₃) ppm; ¹³C-RMN (600 MHz, CDCl₃) δ : 175,52, 159,20, 149,78, 141,02, 139,18 (Ar-CH), 139,04, 136,66 (Ar-CH), 131,00 (Ar-CH), 128,53, 127,73 (Ar-CH), 126,95 (Ar-CH), 123,83 (Ar-CH), 122,04 (Ar-CH), 116,06 (Ar-CH), 111,26 (Ar-CH), 93,12 (C=CH), 86,86, 85,41 (C=CH), 47,98 (NCH₂), 46,17 (NCH₂), 31,36 (CH₂), 27,22 (CH₂), 26,48 (CH₂), 26,37 (CH₂), 22,55 (CH₂), 22,44 (CH₂), 13,92 (CH₃) ppm; EMAR-ESI-TOF *m/z*: 664,16035 [M]⁺ (C₃₄H₃₇IN₂O₂S⁺, calc. 664,16149).

2.1.3.1.4. Síntese de trifluorometanossulfonato de 3-hexil-2-[(3-[(1-hexil-6-iodoquinolin-2(1H)-ilideno)metil]-2-metoxi-4-oxociclobut-2-en-1-ilideno)metil]benzotiazole-3-io (22)

Fez-se reagir o 2-[(1-hexil-6-iodoquinolin-2(1H)-ilideno)metil]-4-[(3-hexilbenzotiazole-3-io-2-il)metileno]-3-oxociclobut-1-en-1-olato (**21**) (0,800 g; 1,20 mmol) com $\text{CF}_3\text{SO}_3\text{CH}_3$ (0,407 mL; 3,60 mmol) em CH_2Cl_2 seco. A mistura reacional foi deixada em atmosfera de azoto, sob agitação e à

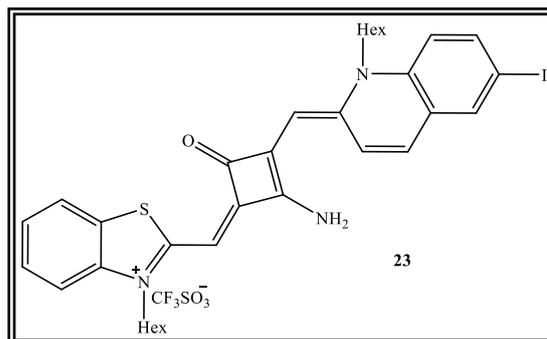


temperatura ambiente durante 28 h, tendo-se controlado a sua evolução por c.c.f. (sílica, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 10%). A mistura reacional obtida foi lavada, várias vezes, com uma solução aquosa de hidrogeno carbonato de sódio a 5% (m/v), seguida de água destilada gelada. Posteriormente, a fase orgânica foi desidratada com sulfato de sódio anidro, filtrada e o solvente removido a pressão reduzida. Após recristalização em MeOH e CH_2Cl_2 , obteve-se o **trifluorometanossulfonato de 3-hexil-2-[(3-[(1-hexil-6-iodoquinolin-2(1H)-ilideno)metil]-2-metoxi-4-oxociclobut-2-en-1-ilideno)metil]benzotiazole-3-io (22)**, na forma de cristais verdes brilhantes, cromatograficamente puros, com um rendimento de 73%, apresentando: p.f. 215-218 °C; Visível $\lambda_{\text{máx}}$ (DMSO): 677 nm; IV $\nu_{\text{máx}}$ (KBr): 2955 (fr, CH-alif.), 2930 (fr, CH-alif.), 1553 (fr, ArC=C), 1506 (m, ArC=C), 1443 (f), 1379 (m), 1352 (m), 1258 (f, C-O), 1184 (fr), 1153 (f), 1119 (f), 1030 (fr) cm^{-1} ; ^1H -RMN (600 MHz, CDCl_3) δ : 8,73 (1H, *sl*, Ar-H), 7,96 (1H, *s*, Ar-H), 7,90 (1H, *d*, $J = 11,4$ Hz, Ar-H), 7,66 (1H, *d*, $J = 7,2$ Hz, Ar-H), 7,61 (1H, *d*, $J = 9,0$ Hz, Ar-H), 7,51 (1H, *t*, $J = 8,1$ Hz, Ar-H), 7,39-7,35 (3H, *m*, Ar-H) 6,20 (1H, *s*, C=CH), 5,60 (1H, *s*, C=CH), 4,65 (3H, *s*, OCH_3), 4,45 (2H, *t*, $J = 7,2$ Hz, NCH_2), 4,32 (2H, *sl*, NCH_2), 1,87-1,82 (4H, *q*, 2(CH_2)), 1,58-1,54 (2H, *m*, CH_2), 1,36-1,34 (6H, *m*, CH_2), 1,31-1,27 (4H, *m*, CH_2), 0,94 (3H, *t*, $J = 7,2$ Hz, CH_3), 0,87 (3H, *t*, $J = 6,9$ Hz, CH_3) ppm; ^{13}C -RMN (600 MHz, CDCl_3) δ : 162,49, 151,44, 140,95 (Ar-CH), 140,76, 138,61, 137,46 (Ar-CH), 134,57 (Ar-CH), 128,16 (Ar-CH), 126,93, 125,63 (Ar-CH), 125,47 (Ar-CH), 122,41 (Ar-CH), 121,91, 119,82, 117,44 (Ar-CH), 113,36 (Ar-CH), 89,44 (C=CH), 86,93 (C=CH), 61,52 (OCH_3), 53,44, 48,97 (NCH_2), 47,29 (NCH_2), 31,47 (CH_2), 31,36 (CH_2), 27,94 (CH_2), 27,08 (CH_2), 26,37 (CH_2), 26,28 (CH_2), 22,51 (CH_2), 22,44 (CH_2), 13,96 (CH_3) ppm; EM-ESI-TOF m/z : 679,18313 [$\text{M}-\text{CF}_3\text{SO}_3$] $^+$ ($\text{C}_{35}\text{H}_{40}\text{IN}_2\text{O}_2\text{S}^+$, calc.679,18497).

2.1.3.2. Síntese de corantes aminoesquarílicos assimétricos derivados do benzotiazole e da 6-iodoquinaldina

2.1.3.2.1. Síntese de trifluorometanossulfonato de 2-[(2-amino-3-[(1-hexil-6-iodoquinolin-2(1H)-ilideno)metil]-4-oxociclobut-2-en-1-ilideno)metil]-3-hexilbenzotiazole-3-io (23)

Fez-se reagir o trifluorometanossulfonato de 3-hexil-2-[(3-[(1-hexil-6-iodoquinolin-2(1H)-ilideno)metil]-2-metoxi-4-oxociclobut-2-en-1-ilideno)metil]benzotiazole-3-io (22) (0,200 g; 0,241 mmol) com amónia 2 M, em metanol (0,540 mL; 1,08 mmol) em CH₂Cl₂ seco. A mistura reacional foi deixada sob atmosfera de



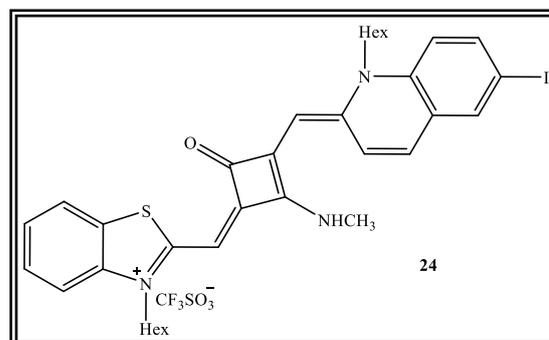
azoto, com agitação permanente e à temperatura ambiente durante 22 h. A evolução da reação foi seguida por c.c.f. (sílica; CH₂Cl₂/MeOH 10%). Terminada a reação, procedeu-se ao tratamento da mistura reacional, lavando-a, várias vezes, com água destilada gelada. Após separação da fase orgânica, esta foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e o solvente removido a pressão reduzida. O produto obtido foi recristalizado com CH₂Cl₂ e MeOH, tendo-se depois, obtido o trifluorometanossulfonato de 2-[(2-amino-3-[(1-hexil-6-iodoquinolin-2(1H)-ilideno)metil]-4-oxociclobut-2-en-1-ilideno)metil]-3-

hexilbenzotiazole-3-io (23) na forma de cristais verdes, cromatograficamente puros, com um rendimento de 65%, apresentando: p.f. 282-285 °C (dec.); Visível $\lambda_{\text{máx}}$ (DMSO): 705 nm, $\log \epsilon = 5,17$; IV $\nu_{\text{máx}}$ (KBr): 3319 (fr, N-H), 3205 (fr, N-H), 2954 (fr, CH-alif), 2929 (fr, CH-alif.), 1643 (fr, C=O), 1553 (fr, ArC=C), 1524 (fr, ArC=C), 1449 (f), 1384 (m), 1354 (m), 1273 (f), 1249 (f), 1170 (f), 1158 (f), 1080 (fr), 1032 (fr), 977 (fr) cm^{-1} ; ¹H-RMN (600 MHz, DMSO) δ : 8,91 (1H, *d*, *J* = 9,6 Hz, Ar-H), 8,81 (1H, *sl*, NH, troca com D₂O), 8,68 (1H, *sl*, NH, troca com D₂O), 8,16 (1H, *s*, Ar-H), 7,95 (1H, *d*, *J* = 9 Hz, Ar-H), 7,93 (1H, *d*, *J* = 8,4 Hz, Ar-H), 7,83 (1H, *d*, *J* = 9,6 Hz, Ar-H), 7,63 (1H, *d*, *J* = 8,4 Hz, Ar-H), 7,55 (1H, *d*, *J* = 9,6 Hz, Ar-H), 7,53 (1H, *t*, *J* = 7,8 Hz, Ar-H), 7,35 (1H, *t*, *J* = 7,8 Hz, Ar-H), 6,10 (1H, *s*, C=CH), 5,85 (1H, *s*, C=CH), 4,23 (4H, *t*, *J* = 7,5 Hz, 2(NCH₂)), 1,76-1,70 (4H, *m*, 2(NCH₂CH₂(CH₂)₃CH₃)), 1,51 (2H, *tl*, *J* = 6,9 Hz, N(CH₂)₂CH₂(CH₂)₂CH₃), 1,43-1,39 (2H, *m*, N(CH₂)₂CH₂(CH₂)₂CH₃), 1,34-1,27 (8H, *m*, N(CH₂)₃(CH₂)₂CH₃), 0,90 (3H, *t*, *J* = 6,9 Hz, N(CH₂)₅CH₃), 0,87 (3H, *t*, *J* = 6,9 Hz, N(CH₂)₅CH₃) ppm; ¹³C-RMN (400 MHz,

DMSO/CDCl₃) δ : 174,47, 167,47, 160,50, 157,98, 156,02, 150,60, 140,86, 140,29 (Ar-CH), 138,49, 137,01 (Ar-CH), 133,89 (Ar-CH), 127,93 (Ar-CH), 127,68, 126,86, 125,47 (Ar-CH), 124,91 (Ar-CH), 122,89 (Ar-CH), 118,16 (Ar-CH), 113,32 (Ar-CH), 93,79 (C=CH), 89,81, 86,24 (C=CH), 48,04 (NCH₂), 46,41 (NCH₂), 31,29 (CH₂), 31,16 (CH₂), 27,33 (CH₂), 26,85 (CH₂), 25,98 (CH₂), 25,82 (CH₂), 22,40 (CH₂), 22,38 (CH₂), 14,12 (CH₃), 14,06 (CH₃) ppm; EMAR-ESI-TOF m/z: 664,18409 [M-CF₃SO₃]⁺ (C₃₄H₃₉IN₃OS⁺, calc. 664,18530).

2.1.3.2.2. Síntese de trifluorometanossulfonato de 3-hexil-2-[(3-[(1-hexil-6-iodoquinolin-2(1*H*)-ilideno)metil]-2-metilamino-4-oxociclobut-2-en-1-ilideno)metil]benzotiazole-3-io (24)

Para obter este composto, fez-se reagir o trifluorometanossulfonato de 3-hexil-2-[(3-[(1-hexil-6-iodoquinolin-2(1*H*)-ilideno)metil]-2-metilamino-4-oxociclobut-2-en-1-ilideno)metil]benzotiazole-3-io (**22**) (0,200 g; 0,24 mmol) com metilamina 2 M, em THF (0,540 mL; 1,08 mmol) em CH₂Cl₂ seco. A

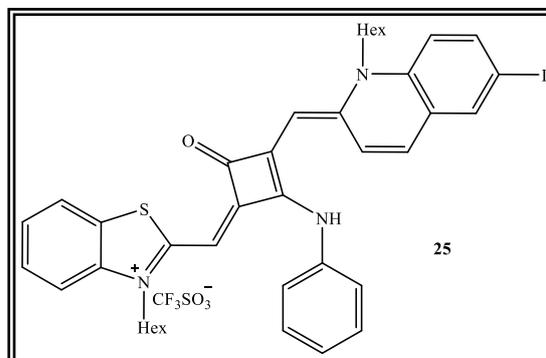


mistura reacional foi deixada a reagir em atmosfera de azoto, sob agitação e à temperatura ambiente durante 2 h, tendo sido a evolução da reação seguida por c.c.f. (sílica, CH₂Cl₂/MeOH 10%). Terminada a reação, procedeu-se à lavagem da mistura reacional com água destilada gelada e à separação da fase orgânica que, posteriormente, foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e o solvente removido a pressão reduzida. O produto obtido foi sujeito a uma lavagem com metanol e depois recristalizado em CH₂Cl₂ e MeOH. Desta maneira, obteve-se o **trifluorometanossulfonato de 3-hexil-2-[(3-[(1-hexil-6-iodoquinolin-2(1*H*)-ilideno)metil]-2-metilamino-4-oxociclobut-2-en-1-ilideno)metil]benzotiazole-3-io (24)** na forma de cristais castanhos, cromatograficamente puros, com um rendimento de 50%, apresentando: p.f. 246-247 °C, Visível $\lambda_{\text{máx}}$ (DMSO): 715 nm, log $\epsilon = 5,18$; IV $\nu_{\text{máx}}$ (KBr): 3240 (fr, N-H), 2953 (fr, CH-alif.), 2930 (fr, CH-alif), 1623 (fr, C=O), 1551 (fr, ArC=C), 1445 (f), 1380 (fr), 1347 (m), 1286 (m), 1242 (f), 1180 (f), 1157 (f), 1112 (f), 1078 (fr), 1029 (fr), 988 (fr) cm⁻¹; ¹H-RMN (600 MHz, DMSO) δ : 8,93 (1H, *d*, *J* = 9 Hz, Ar-H), 8,87-8,83 (2H, *m*, Ar-H + NH), 8,79 (1H, *sl*, NH), 8,17 (1H, *s*, Ar-H), 8,09 (1H, *s*, Ar-H), 7,94 (2H, *sl*, Ar-H), 7,88 (2H, *s*, Ar-H), 7,64 (1H, *d*, *J* = 21,6 Hz, Ar-H), 7,61 (1H, *sl*, Ar-H), 7,55 (1H, *sl*,

Ar-H), 7,53-7,48 (5H, *m*, Ar-H), 7,36 (1H, *tl*, Ar-H), 7,31 (1H, *tl*, Ar-H), 6,08 (1H, *s*, C=CH), 5,97 (1H, *s*, C=CH), 5,83 (1H, *s*, C=CH), 5,75 (1H, *s*, C=CH), 4,20 (4H, *sl*, NCH₂), 4,10 (4H, *s*, NCH₂), 3,23 (3H, *sl*, NCH₃), 3,16 (3H, *s*, NCH₃), 1,64 (8H, *sl*, CH₂), 1,46 (2H, *sl*, CH₂), 1,37 (6H, *sl*, CH₂), 1,26 (16H, *sl*, CH₂), 0,80-0,87 (12H, *m*, N(CH₂)₅CH₃) ppm; ¹H-RMN (400 MHz, DMSO, 90°C) δ: 8,91 (1H, *d*, *J* = 12,0 Hz, Ar-H), 8,18 (1H, *sl*, Ar-H), 7,97 (1H, *d*, *J* = 8,0 Hz, Ar-H), 7,92 (1H, *d*, *J* = 8,0 Hz, Ar-H), 7,84 (1H, *d*, *J* = 8,0 Hz, Ar-H), 7,64 (1H, *d*, *J* = 8,0 Hz, Ar-H), 7,59 (1H, *d*, *J* = 8,0 Hz, Ar-H), 7,53 (1H, *t*, *J* = 8,0 Hz, Ar-H), 7,37 (1H, *t*, *J* = 8,0 Hz, Ar-H), 6,11 (1H, *s*, C=CH), 5,90 (1H, *s*, C=CH), 4,38-4,31 (4H, *m*, NCH₂), 3,37 (3H, *s*, NCH₃), 1,83-1,74 (4H, *m*, CH₂), 1,53-1,49 (2H, *m*, CH₂), 1,43-1,41 (2H, *m*, CH₂), 1,37-1,30 (12H, *m*, CH₂), 0,92-0,86 (6H, *m*, N(CH₂)₅CH₃) ppm; ¹³C-RMN (600 MHz, DMSO) δ: 173,85, 165,58, 161,09, 159,41, 157,43, 156,80, 155,92, 154,72, 150,82, 149,73, 140,80, 140,68, 140,42 (Ar-CH), 140,08 (Ar-CH), 138,67, 138,34, 137,08 (Ar-CH), 136,77 (Ar-CH), 134,37 (Ar-CH), 133,04 (Ar-CH), 128,05 (Ar-CH), 127,89, 127,82 (Ar-CH), 126,99, 126,56, 125,49 (Ar-CH), 125,13 (Ar-CH), 125,20 (Ar-CH), 124,69 (Ar-CH), 124,08, 122,96 (Ar-CH), 122,68 (Ar-CH), 121,95, 122,86, 119,81, 118,29 (Ar-CH), 117,98 (Ar-CH), 113,56 (Ar-CH), 113,15 (Ar-CH), 94,23 (C=CH), 93,86 (C=CH), 90,32, 89,46, 86,81 (C=CH), 86,53 (C=CH), 48,37 (NCH₂), 48,20 (NCH₂), 46,61 (NCH₂), 45,90 (NCH₂), 31,30 (CH₂), 31,17 (CH₂), 31,13 (CH₂), 30,99 (CH₂), 30,50 (NCH₃), 30,26 (NCH₃), 27,44 (CH₂), 27,10 (CH₂), 27,00 (CH₂), 26,50 (CH₂), 25,96 (CH₂), 25,89 (CH₂), 25,83 (CH₂), 22,41 (CH₂), 22,36 (CH₂), 22,30 (CH₂), 22,24 (CH₂), 14,13 (CH₃), 14,07 (CH₃), 14,04 (CH₃), 14,03 (CH₃) ppm; EMAR-ESI-TOF *m/z*: 678,19974 [M-CF₃SO₃]⁺ (C₃₅H₄₁IN₃OS⁺, calc. 678,20095).

2.1.3.2.3. Síntese de trifluorometanossulfonato de 3-hexil-2-[(3-[(1-hexil-6-iodoquinolin-2(1*H*)-ilideno)metil]-4-oxo-2-(fenilamino)ciclobut-2-en-1-ilideno)metil]benzotiazole-3-io (25)

Fez-se reagir o trifluorometanossulfonato de 3-hexil-2-[(3-[(1-hexil-6-iodoquinolin-2(1*H*)-ilideno)metil]-2-metoxi-4-oxociclobut-2-en-1-ilideno)metil]benzotiazole-3-io (**22**) (0,200 g; 0,24 mmol) com anilina (0,110 mL; 1,20 mmol), trietilamina (0,017 mL; 0,12 mmol) e 4-

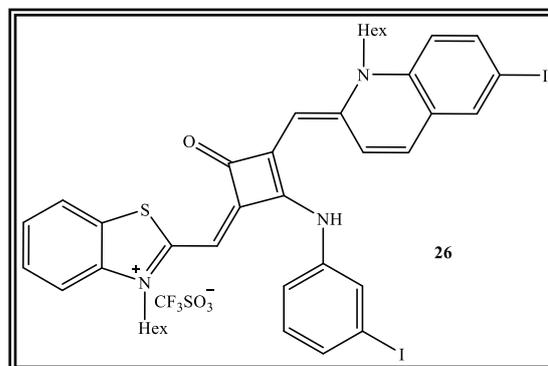


DMAP (0,015 g; 0,12 mmol) em CH_2Cl_2 seco. A mistura reacional foi deixada em atmosfera de azoto, sob agitação e à temperatura ambiente durante 9 dias, tendo sido a evolução da reação controlada por c.c.f. (sílica, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 10%). Quando a reação terminou, lavou-se a mistura reacional com água destilada gelada e separou-se a fase orgânica, que, depois, foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e o solvente removido a pressão reduzida. O produto obtido foi recristalizado com $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ e éter dietílico.

Deste modo, obteve-se o **trifluorometanossulfonato de 3-hexil-2-[(3-[(1-hexil-6-iodoquinolin-2(1*H*)-ilideno)metil]-4-oxo-2-(fenilamino)ciclobut-2-en-1-ilideno)metil]benzotiazole-3-io (25)**, na forma de cristais castanhos avermelhados, cromatograficamente puros, com um rendimento de 38%, apresentando: p.f. 170-172 °C; Visível $\lambda_{\text{máx}}$ (DMSO): 702 nm, $\log \epsilon = 5,08$; IV $\nu_{\text{máx}}$ (KBr): 2952 (fr, CH-alif), 2927 (fr, CH-alif.), 1629 (fr, C=O), 1551 (fr, ArC=C), 1494 (m) 1450 (f), 1381 (fr), 1348 (m), 1259 (f), 1155 (f), 1133 (f), 1079 (fr), 1026 (m) cm^{-1} ; EMAR-ESI-TOF m/z: 740,21415 $[\text{M}-\text{CF}_3\text{SO}_3]^+$ ($\text{C}_{40}\text{H}_{43}\text{IN}_3\text{OS}^+$, calc. 740,21660). Os espectros de RMN deste composto não são apresentados devido à impossibilidade de obtenção dos mesmos, dado que o composto se mostrou insolúvel nos solventes deuterados disponíveis.

2.1.3.2.4. Síntese de trifluorometanossulfonato 3-hexil-2-[(3-[(1-hexil-6-iodoquinolin-2(1*H*)-ilideno)metil]-2-[(3-iodofenil)amino]-4-oxociclobut-2-en-1-ilideno)metil]benzotiazole-3-io (26)

Fez-se reagir o trifluorometanossulfonato de 3-hexil-2-[(3-[(1-hexil-6-iodoquinolin-2(1*H*)-ilideno)metil]-2-metoxi-4-oxociclobut-2-en-1-ilideno)metil]benzotiazole-3-io (**22**) (0,200 g; 0,24 mmol) com iodoanilina (0,146 mL; 1,20 mmol), trietilamina (0,018 mL; 0,17 mmol) e 4-DMAP (0,015 g; 0,12 mmol) em CH₂Cl₂ seco. A reação decorreu em atmosfera de azoto, sob agitação e à temperatura ambiente, durante 17 dias. Tendo sido a evolução da reação seguida por c.c.f. (sílica, CH₂Cl₂/MeOH 10%). Após o término da reação, a mistura foi lavada, várias vezes, com água destilada gelada e separou-se a fase orgânica. Esta foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e o solvente removido a pressão reduzida. O produto obtido foi sujeito a uma série de recristalizações consecutivas tendo-se conseguido purificar com CH₂Cl₂/MeOH e éter dietílico.



Assim, obteve-se o **trifluorometanossulfonato 3-hexil-2-[(3-[(1-hexil-6-iodoquinolin-2(1*H*)-ilideno)metil]-2-[(3-iodofenil)amino]-4-oxociclobut-2-en-1-ilideno)metil]benzotiazole-3-io (26)** na forma de cristais castanhos escuros, cromatograficamente puros, com um rendimento de 15%, apresentando: p.f. 139-142 °C; Visível $\lambda_{\text{máx}}$ (DMSO): 704 nm, $\log \epsilon = 4,65$ e 775 nm, $\log \epsilon = 4,61$; IV $\nu_{\text{máx}}$ (KBr): 2951 (fr, CH-alif), 2926 (fr, CH-alif.), 1550 (m, ArC=C), 1538 (f, ArC=C), 1451 (f), 1380 (fr), 1347 (m), 1308 (m), 1257 (f), 1156 (f), 1133 (m), 1080 (fr) cm⁻¹; EMAR-ESI-TOF m/z: 866,11128 [M-CF₃SO₃]⁺ (C₄₀H₄₂I₂N₃OS⁺, calc. 866,11325). Os espectros de RMN deste composto também não são apresentados devido à impossibilidade de obtenção dos mesmos, uma vez que o composto se mostrou insolúvel nos vários solventes deuterados disponíveis.

2.2. Procedimento experimental para avaliação da citotoxicidade dos corantes esquarílicos em linhas celulares Caco-2 e HepG2

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

2.2.1. Culturas de células utilizadas neste trabalho

Neste trabalho utilizaram-se duas linhas celulares, uma derivada de carcinoma hepatocelular (HepG2) e outra derivada de adenocarcinoma coloretal (Caco-2), para determinar o potencial dos corantes esquarílicos sintetizados, como fotossensibilizadores em PDT.

2.2.1.1. Células Caco-2

As células Caco-2 (Figura 2.1), são oriundas de um adenocarcinoma de colon humano retirado a um indivíduo do sexo masculino com 72 anos de idade, tendo sido isoladas, pela primeira vez, em 1997 por Fog e a sua equipa (Sambuy *et al.*, 2005; ATCC, 2014a), foram adquiridas à empresa CLS (CLS Cell Lines Service GmbH, Alemanha). Estas são caracterizadas por uma morfologia do tipo epitelial e crescem rapidamente, aderidas a um substrato, formando uma monocamada (Sigma-Aldrich, 2014a).

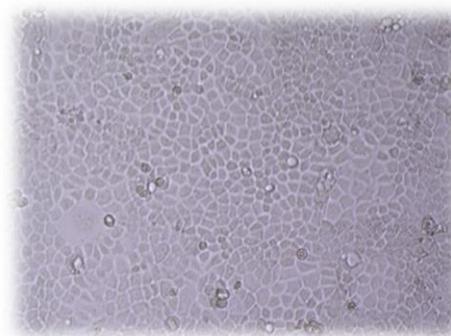


Figura 2.1. Fotografia de células Caco-2, cedida pela Prof. Amélia Silva (ampliação de 100x)

Esta linha celular possui a particularidade de se diferenciar em enterócitos, ao fim de vários dias em cultura e de atingir a confluência, o que lhe permite expressar muitas características morfológicas e bioquímicas do intestino humano (Balimane *et al.*, 2000; Sambuy *et al.*, 2005).

2.2.1.2. Células HepG2

As células HepG2 (Figura 2.2), também caracterizadas por uma morfologia do tipo epitelial, crescem aderentes às caixas de cultura formando monocamadas com pequenos agregados (ATCC, 2014b; Sigma-Aldrich, 2014b). Foram isoladas, pela primeira vez em 1979 por Aden (Bouma *et al.*, 1989), a partir de um carcinoma hepatocelular bem diferenciado, que foi removido de um jovem com cerca de 15 anos de idade (Sigma-Aldrich, 2014b).

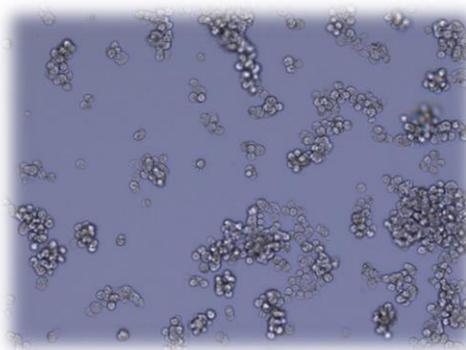


Figura 2.2. Fotografia de células HepG2, cedida pela Prof. Amélia Silva (ampliação de 100x)

Esta linha celular apresenta como principal propriedade o facto de exibir inúmeras funções encontradas nos hepatócitos normais (Bouma *et al.*, 1989). As células usadas no laboratório foram uma oferta do Prof. Carlos Palmeira (CNC, UC).

2.2.2. Preparação do meio de cultura

Na prossecução deste estudo utilizaram-se duas preparações de meio de cultura, uma para manutenção das células em cultura, que foi suplementada com soro, e outra para realização dos ensaios, à qual não foi adicionado soro.

O meio de cultura com soro foi preparado a partir de meio base DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium, Gibco, Ref. 21969), com 4,50 g/L de glicose, 0,11 g/L de piruvato de sódio e vermelho de fenol (indicador de pH), sendo suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (FBS, Gibco), antibióticos (200 U/mL de penicilina e 200 µg/mL de *estreptomicina*, Gibco) e 1,0 mM de *L*-Glutamina (Gibco).

Meio de cultura sem soro, consistiu no meio base DMEM (composição do anterior, mas isento de vermelho de fenol), suplementado com antibióticos (200 U/mL de penicilina e 200 µg/mL de *estreptomicina*, Gibco) e 1,0 mM de *L*-Glutamina (Gibco).

2.2.3. Subcultura e manutenção

As células foram mantidas em meio de cultura com soro, em frascos de cultura ventilados (T25, Orange Scientific), numa incubadora de CO₂ (Figura 2.3), a 37°C, com humidade controlada e CO₂/ar (5:95), de acordo com as normas descritas na literatura (Silva *et al.*, 2013). Quando as células apresentaram um crescimento em estado de confluência entre 80-90% (HepG2) e entre 90-100% (Caco-2), foram tratadas para subcultura e/ou para ensaios. Para tal, removeu-se todo o meio de cultura, com auxílio de uma pipeta de Pasteur estéril, tendo sido descartado para um frasco contendo lixívia. De seguida, adicionou-se a cada frasco 1,0 mL de HBSS (“Hank’s Balanced Salt Solution”, Gibco) para remover o Ca²⁺ do meio e vestígios de soro, lavando as células. Após a lavagem, o HBSS foi removido e adicionou-se 1,0 mL de Tripsina-EDTA 0,05% (Gibco). A reação da tripsina decorreu na incubadora (a 37 °C) durante cerca de 5 min, sendo o processo controlado periodicamente por visualização ao microscópio, após o qual se adicionou 1,0 mL de meio de cultura com soro, para inibir a ação da tripsina. Com a ajuda de uma pipeta de Pasteur procedeu-se à desagregação das células, ainda em grumos ou aderentes ao frasco, com aspirações suaves, para que estas ficassem em suspensão. Desta suspensão retirou-se cerca de $\frac{7}{8}$ do seu volume para um tubo cónico de 15 mL procedendo-se, posteriormente, à contagem das células. Às células remanescentes no frasco de cultura ($\approx 1/8$) foi adicionado 5 mL de meio de cultura com soro e de novo colocadas na incubadora de CO₂ para crescimento (subcultura).



Figura 2.3. Incubadora de CO₂ (Binder CB150)

2.2.4. Contagem de células

As células foram contadas usando um hemocítmetro convencional (câmara de Neubauer) ou utilizando um contador de células automático (TC10 Automated Cell Counter 145-0001 BIO-RAD).

Quando contadas num hemocítmetro convencional, adicionou-se um pequeno volume da suspensão devidamente homogeneizado a uma das sua câmaras e a contagem das células foi feita sob observação ao microscópio ótico.

Em situações que requeriam maior celeridade, usou-se o contador automático (Figura 2.4). Neste caso, um pequeno volume ($\approx 40 \mu\text{L}$) de suspensão celular foi adicionado a uma câmara de uma lâmina de contagem descartável, utilizando uma micropipeta. O equipamento fornece a densidade celular (n° células/mL).



Figura 2.4. Contador de células automático

2.2.5. Plantação das células nas placas

Após a contagem, as células foram diluídas em meio de cultura com soro para obtenção de uma densidade final de $5,0 \times 10^4$ células/mL e plantadas em placas de 96 poços, depositando $100 \mu\text{L}$ /poço ($5,0 \times 10^3$ células/poço), segundo o esquema representado na figura 2.5.

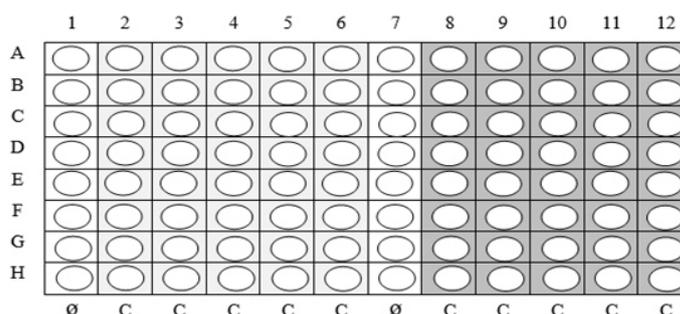


Figura 2.5. Esquema representativo das placas de cultura após a plantação das células, onde ∅ representa os poços sem células e C os poços com células. Na zona a cinzento claro foram depositadas células Caco-2 e na zona a cinza escuro foram depositadas células HepG2.

Após a deposição das células, as placas foram colocadas na incubadora de CO_2 , a 37°C , durante 24 h, para adesão das células às placas. Decorrido este tempo, as células, encontram-se em condições ideais para a adição dos corantes a testar.

2.2.6. Preparação das soluções de corantes a serem testados nas células

As soluções dos corantes a serem testados foram preparados a partir de uma solução-mãe. Cada solução-mãe foi preparada num balão volumétrico de 10 mL, dissolvendo uma determinada quantidade de cristais ($\approx 1,5$ mg) em DMSO. A partir desta solução, de concentração conhecida, na ordem dos 10^{-4} M, foram preparadas quatro novas soluções, às concentrações 0,1 μ M, 1,0 μ M, 5,0 μ M e 10,0 μ M, por diluição desta em meio de cultura sem soro.

Para o composto **11**, a solução-mãe foi preparada num balão volumétrico de 25 mL, dissolvendo 2,01 mg de cristais em DMSO/CH₂Cl₂ (24:1). A partir desta solução ($1,49 \times 10^{-4}$ M) preparam-se as quatro diluições, às concentrações referidas atrás, em meio de cultura sem soro. Para testar o efeito deste solvente nas células, preparam-se soluções do solvente em meio de cultura sem soro, usando um volume de solvente equivalente ao adicionado na preparação de cada concentração de corante.

2.2.7. Aplicação dos corantes às células

Decorridas as 24 horas necessárias para a adesão das células, as placas foram retiradas da incubadora de CO₂ e com uma micropipeta automática multicanal removeu-se todo o meio de cultura. De seguida, adicionou-se, a cada poço das colunas 2 a 5 e 8 a 11 (Figura 2.5, pág. 61), 100 μ L da solução pretendida, 0,1 μ M, 1,0 μ M, 5,0 μ M e 10,0 μ M, respetivamente.

Aos poços referentes ao controlo, contendo células (colunas 6 e 12), apenas se adicionou meio de cultura sem soro. Depois as placas foram novamente colocadas na incubadora durante mais 24 horas, até se proceder à irradiação.

2.2.8. Irradiação das células

Decorridas as 24 horas de contacto das células com os corantes, as placas foram retiradas da incubadora e irradiadas com LEDs centrados a 630 ou 660 nm (comprimentos de onda utilizados com base nos valores de $\lambda_{\text{máx}}$ obtidos nos espectros do Visível), dependendo do corante, emitindo luz à potência de $4,2 \pm 0,4$ mW e $3,5 \pm 0,03$ mW, respetivamente.

Para testar o efeito da irradiação, usaram-se 3 condições diferentes: a) 0 minutos de irradiação, 1 placa de cultura (não irradiada), deixada 14 min à temperatura ambiente e no

escuro; b) 7 min de irradiação, e c) 14 min de irradiação, 1 placa (para cada condição). A irradiação decorreu à temperatura ambiente e ao abrigo da luz ambiente, para que a luz incidente nos poços seja apenas a dos LED.

Após a irradiação, as placas foram colocadas na incubadora onde permaneceram expostas ao corante irradiado, durante 60 min ou 24 h. Decorrido esse tempo, procedeu-se à lavagem dos poços de acordo com o esquema representado na Figura 2.6.

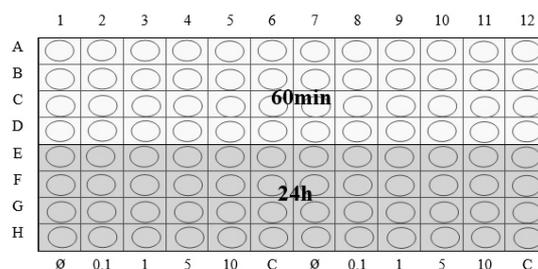


Figura 2.6. Esquema representativo da lavagem das placas decorridos os 60 min ou 24 h de contacto com o corante irradiado.

As lavagens realizaram-se do seguinte modo: aspirou-se o meio que continha o corante, e lavaram-se as células duas vezes com 100 μ L de PBS (solução salina fisiológica (pH 7,4), composta por NaCl 137 mM, KCl 2,4 mM, Na₂HPO₄ 10 mM e KH₂PO₄ 1,76 mM). Após a última lavagem, adicionou-se, a todos os poços, o indicador de viabilidade celular Alamar Blue (10%, v/v) diluído em meio de cultura sem soro, 100 μ L/poço.

Os sistemas de LEDs utilizados nesta etapa foram montados de forma que a temperatura, nas caixas de cultura, se mantivesse constante durante a irradiação e de acordo com o comprimento de onda de absorção máxima de cada corante.

2.2.9. Determinação da viabilidade celular

Neste trabalho, a viabilidade celular foi avaliada utilizando o indicador de viabilidade Alamar Blue. Como referido anteriormente, este composto é um indicador de oxidação-redução baseado na conversão de resazurina em resorufina, por ação de oxirredutases presentes nas células viáveis. Como a resazurina e a resorufina apresentam características espectrais diferentes (a primeira é azul e não fluorescente; a segunda é rosa e fluorescente) a viabilidade celular pode ser seguida por alteração dos valores das absorvâncias medidos a 570 nm (forma reduzida) e 620 nm (forma oxidada).

Deste modo, a determinação da viabilidade celular foi feita através da leitura das absorvâncias a dois comprimentos de onda distintos, 570 nm e 620 nm, num espectrofotómetro de microplacas (Figura 2.7). As leituras foram realizadas 4 h e 24 h após a adição do Alamar Blue às células.



Figura 2.7. Espectrofotómetro de microplacas

A percentagem de redução do Alamar Blue foi calculada pela seguinte equação, de acordo com as indicações descritas na literatura (Al-Nasiry *et al.*, 2007).

$$\% \text{ Redução} = \frac{(\varepsilon_{ox}) \lambda_2 A \lambda_1 - (\varepsilon_{ox}) \lambda_1 A \lambda_2}{(\varepsilon_{red}) \lambda_1 A' \lambda_2 - (\varepsilon_{red}) \lambda_2 A' \lambda_1} \times 100$$

Onde,

ε_{ox} = coeficiente de extinção molar do Alamar Blue oxidado

ε_{red} = coeficiente de extinção molar do Alamar Blue reduzido

A = absorvância dos poços a testar

A' = absorvâncias do branco

λ_1 = 570 nm

λ_2 = 620 nm

2.2.10. Análise e apresentação dos resultados

Os valores de viabilidade celular foram calculados por rotinas dos programas Microsoft Excel™, os gráficos foram elaborados no programa GraphPad Prism (versão 5.01). Os valores de viabilidade celular obtidos são apresentados como o valor médio (n=4) ± desvio padrão (SD).

A análise estatística foi feita com as ferramentas do programa Origin Pro 8 usando teste ANOVA One-Way com intervalo de significância de 95%; considerando-se grupos com diferenças estatisticamente significativas quando $p < 0,05$. A análise estatística envolveu a comparação entre: i) controlo *versus* outras concentrações, na mesma condição de tempo de irradiação e exposição ao corante (denotado por *); ii) diferentes tempos de exposição ao corante irradiado (denotado por #); iii) condição não irradiada *versus* irradiada, às mesmas concentrações e tempo de exposição ao corante irradiado (denotado por **a**); iv) 7 minutos de irradiação *versus* 14 minutos de irradiação, às mesmas concentrações e tempo de exposição ao corante irradiado (denotado por **b**).

Capítulo 3

DISCUSSÃO DA SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO ESPECTROSCÓPICA DE COMPOSTOS ORGÂNICOS

Neste capítulo é feita uma discussão dos métodos de síntese dos corantes cianínicos esquarílicos e aminoesquarílicos, bem como dos seus precursores. É também feita uma breve discussão das principais características físicas e espectroscópicas de todos os compostos sintetizados neste trabalho. No final do capítulo, são apresentadas as principais conclusões no que se refere à síntese dos compostos obtidos, bem como às suas características espectroscópicas.

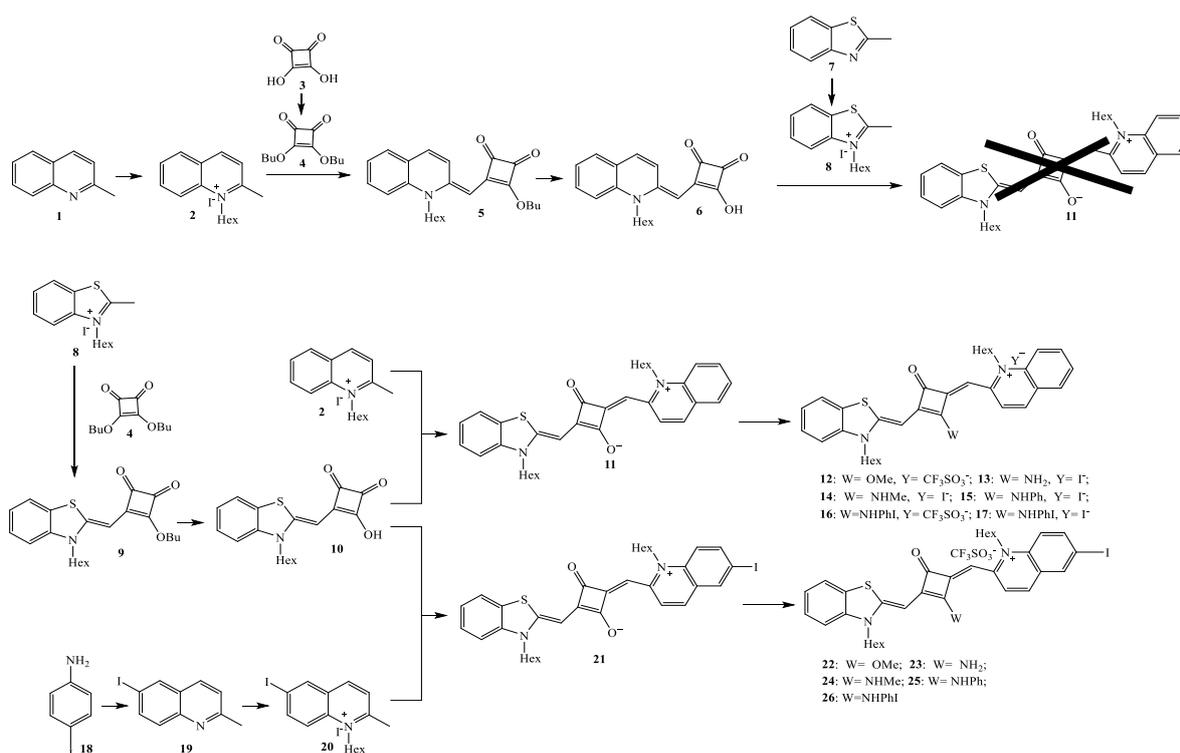
3.1. Síntese de corantes esquarílicos assimétricos

O principal objetivo deste trabalho foi sintetizar novos corantes esquarílicos assimétricos que apresentassem as características ideais de bons fotossensibilizadores, com vista a encontrar potenciais fotossensibilizadores a serem aplicados em PDT do cancro.

Sabe-se, de estudos feitos anteriormente (Santos *et al.*, 2004; Reis *et al.*, 2009), que os corantes derivados de quinaldina apresentam comprimentos de onda de absorção mais elevados que os seus análogos derivados de benzoselenazole e benzotiazole, o que permitirá uma maior penetração da luz nos tecidos aquando a sua aplicação em PDT. Por outro lado, também se sabe que a introdução de átomos pesados na estrutura do corante, como por exemplo o iodo, cloro ou bromo, levam ao aumento do rendimento quântico de formação de oxigénio singuleto, o que teoricamente permitirá uma melhor eficácia em PDT (Avirah *et al.*, 2012; Ferreira *et al.*, 2013b).

Neste trabalho, foram sintetizados dois grupos distintos de corantes esquarílicos assimétricos: o primeiro grupo possui, na sua estrutura, o derivado do benzotiazole e o derivado da quinaldina e o segundo grupo tem na sua constituição o derivado do benzotiazole e o derivado da 6-iodoquinaldina.

A estratégia sintética utilizada para a obtenção de todos os corantes encontra-se resumida no esquema 3.1.



Esquema 3.1. Esquema geral da síntese dos corantes cianínicos esquarílicos assimétricos

3.1.1. Síntese de corantes esquarílicos assimétricos derivados do benzotiazole e da quinaldina

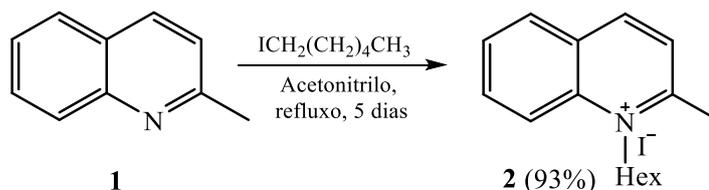
Para sintetizar os corantes assimétricos derivados do benzotiazole e da quinaldina tentou-se iniciar o trabalho através dos derivados da quinaldina. Assim, na tentativa de obter o primeiro corante esquarílico assimétrico sintetizou-se o composto semi-esquarílico **5**, fez-se, de seguida, a sua hidrólise tendo-se obtido o composto **6** ao qual se adicionou, então, o iodeto 3-hexil-2-metilbenzotiazólio (**8**).

No entanto, e como evidenciado no esquema 3.1, não se conseguiu obter o composto pretendido por esta via. Deste modo, tentou-se obter o composto **11** seguindo uma via alternativa, utilizando como material de partida o 2-metil-benzotiazole (**7**). Assim, fez-se reagir o composto **7** com iodo-hexano que originou o sal quaternário **8** e por reação deste com o composto **4** obteve-se o corante semi-esquarílico **9**. Este por sua vez foi hidrolisado, dando origem ao composto **10** que reagiu, posteriormente, com o sal quaternário **2** tendo-se então obtido o corante cianínico esquarílico assimétrico **11**. Posteriormente, este corante foi metilado obtendo-se o corante esquarílico **12** que por reação com aminas apropriadas deu origem aos respetivos corantes amino-esquarílicos assimétricos **13-17**.

Nos pontos seguintes serão discutidos cada um dos passos realizados para a obtenção dos corantes esquarílicos e amino-esquarílicos assimétricos derivados do benzotiazole e da quinaldina, apresentando-se, para cada caso, as principais características físicas e espectroscópicas de cada composto.

3.1.1.1. Síntese do iodeto de *N*-hexil-2-metilquinolínio (**2**)

O sal quaternário de amónio **2** foi facilmente obtido fazendo reagir a base heterocíclica **1** com um excesso de 1-iodohexano, em acetonitrilo, a refluxo, como evidenciado no esquema 3.2.



Esquema 3.2. Síntese do sal quaternário **2**

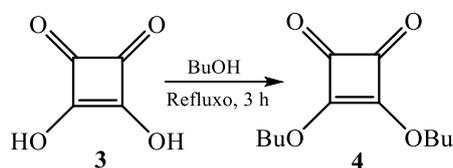
O método de síntese utilizado foi adaptado do método descrito na literatura (Pardal *et al.*, 2002), tendo-se obtido o produto na forma de cristais amarelo-esverdeados, cromatograficamente puros, com um rendimento de 93%.

Este composto foi obtido por precipitação da mistura reacional com éter dietílico. Para que o rendimento fosse maior, procedeu-se à repetição da alquilação das primeiras águas-mães, após remoção do éter dietílico, tendo-se adicionado mais um equivalente molar de 1-iodo-hexano e deixando a mistura reacional a refluxo durante mais 5 dias.

No que diz respeito ao rendimento desta reação (93%), verificou-se que não está de acordo com a literatura (46% (Pardal *et al.*, 2002) e 70% (Ferreira, 2013a)), apresentando-se muito superior. Este facto pode dever-se à repetição da alquilação das primeiras águas-mães, como referido anteriormente. Em relação ao ponto de fusão, que se encontra no intervalo 163-164 °C, mas acompanhado de decomposição, observou-se que este intervalo, embora seja estreito, é bastante superior ao referido na literatura que se encontra no intervalo 129-130 °C (Pardal *et al.*, 2002) e 115-120 °C (Ferreira, 2013a). Como o composto **2** já se encontra descrito na literatura, apenas se caracterizou, para além do ponto de fusão, pelo seu espectro de IV. Verificou-se que este se encontra de acordo com o referido na literatura (Pardal *et al.*, 2002), onde apenas se salientam as bandas de absorção relativas à vibração das ligações C-H aromáticas que aparecem a 3069 cm⁻¹, das ligações C-H alifáticas encontradas entre 2928-2867 cm⁻¹ e das ligações C=C aromáticas a 1524 cm⁻¹.

3.1.1.2. Síntese do 3,4-dibutoxi-3-ciclobuteno-1,2-diona (**4**)

O composto **4** foi obtido por reação do ácido esquárico (**3**) com butanol, a refluxo durante 3 h, como ilustrado no esquema 3.3.



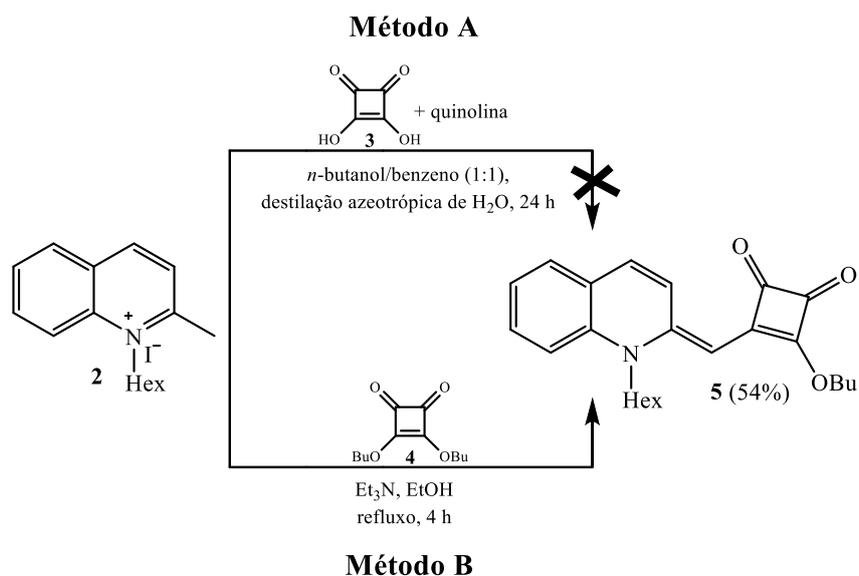
Esquema 3.3. Síntese do composto **4**

O composto foi obtido na forma de um óleo acastanhado, cromatograficamente puro, com um rendimento de 74%. Este composto foi utilizado na reação seguinte sem qualquer purificação ou caracterização posterior.

3.1.1.3. Síntese do 3-butoxi-4-[(1-hexilquinolin-2(1*H*)-ilideno)metil]-3-ciclobuteno-1,2-diona (**5**)

No esquema 3.4 encontram-se evidenciados os dois métodos utilizados para a síntese do composto 3-butoxi-4-[(1-hexilquinolin-2(1*H*)-ilideno)metil]-3-ciclobuteno-1,2-diona (**5**), os quais foram adaptados da literatura (Jyothish *et al.*, 2004 e Kim *et al.*, 2010).

Inicialmente tentou-se obter o composto **5** fazendo reagir o iodeto de *N*-hexil-2-metilquinolínio (**2**) com ácido esvárico (**3**) numa mistura de *n*-butanol e benzeno (1:1), na presença de quinolina (Esquema 3.4 - Método A). A reação ocorreu durante 24 h, com destilação azeotrópica de água, de acordo com o método descrito por Jyothish *et al.* (2004). No entanto, como não se conseguiu obter o produto na forma sólida, e a mistura reacional era muito complexa, este método de síntese teve de ser abandonado.



Esquema 3.4. Síntese do composto **5** através de dois métodos diferentes

Devido ao insucesso do método A, tentou-se obter o composto **5** fazendo reagir o iodeto de *N*-hexil-2-metilquinolínio (**2**) com o 3,4-dibutoxi-3-ciclobuteno-1,2-diona (**4**) em etanol e na presença de trietilamina (Esquema 3.4 – Método B), de acordo com o procedimento descrito na literatura (Kim *et al.*, 2010), para um composto análogo derivado do benzotiazole. A reação decorreu durante 4 h e a refluxo. Por este método, obteve-se uma mistura de produtos que precipitou no meio reacional após arrefecimento. Posteriormente, procedeu-se à purificação do composto por cromatografia em coluna utilizando como eluente o CH_2Cl_2 , tendo-se obtido o composto **5** na forma de cristais cor-de-laranja, cromatograficamente puros e com um

rendimento de 54%. Na síntese de um composto, derivado do benzotiazole, análogo ao **5**, Kim *et al.* em 2010 obtiveram um rendimento de 69%, que é bastante superior ao obtido neste trabalho para o composto **5**, o que pressupõe que o rendimento da reação pode ser otimizado utilizando, por exemplo, outro eluente na separação cromatográfica. No entanto, Fagundes, em 2013, sintetizou um composto derivado do benzoselenazole, análogo ao composto **5**, tendo obtido um rendimento de 58%, o qual já se encontra mais próximo do obtido neste trabalho.

O ponto de fusão do composto **5** é 158-159 °C e indica o elevado grau de pureza do composto, uma vez que a apresenta uma diferença de apenas 1 °C. No entanto, este valor não pode ser comparado com a literatura, porque tanto quanto é do nosso conhecimento este composto ainda não foi descrito.

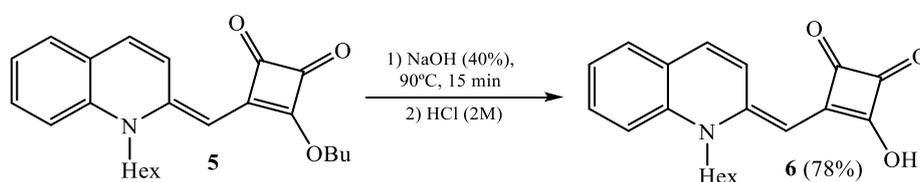
Relativamente às características espectroscópicas, importa salientar, no espectro de IV, as bandas de absorção relativas à vibração das ligações C-H alifáticas (fracas) que aparecem entre 2955-2930 cm^{-1} , da ligação C=O (fraca e média) entre 1758-1691 cm^{-1} e das ligações C=C aromáticas (forte) a 1526 cm^{-1} . No espectro de RMN de ^1H , que apresenta os sinais esperados para a totalidade dos prótons presentes no composto, são de salientar os sinais dos grupos metilo da cadeia *N*-alquílica e *O*-alquílica que surgem aos desvios químicos 0,95 e 1,00 ppm, respetivamente, sob a forma de dois tripletos de três prótons cada. Os sinais referentes aos prótons dos grupos CH_2 das cadeias *N*-alquílica e *O*-alquílica surgem a desvios químicos compreendidos entre 1,36-1,87 ppm, sob a forma de vários multipletos, à exceção dos prótons do grupo CH_2 diretamente ligado ao átomo de azoto que surge a 4,06 ppm, sob a forma de um singuleto largo de dois prótons, e do grupo CH_2 diretamente ligado ao átomo de oxigénio que surge a 4,81 ppm, na forma de um triplete de dois prótons. Finalmente, neste espectro, importa referir o sinal referente ao próton da ligação C=CH da cadeia metínica que surge a 5,2 ppm sob a forma de um singuleto de um próton e os seis sinais correspondentes aos seis prótons aromáticos que surgem a 7,22 ppm sob a forma de um triplete, a 7,30, 7,35 e 7,40 ppm sob a forma de três dupletos, a 7,52 ppm sob a forma de um triplete e a 8,15 ppm sob a forma de um singuleto largo.

No espectro de RMN de ^{13}C observam-se os 24 sinais correspondentes aos 24 carbonos presentes no composto. Destes são de salientar os dois sinais correspondentes aos grupos metilo das cadeias alquílicas, que surgem aos desvios químicos 13,76 e 13,98 ppm, a presença de oito sinais correspondentes aos oito grupos CH_2 das cadeias alquílicas, a desvios químicos entre 18,54-73,48 ppm, sendo que os que se apresentam a campo mais baixo (47,84 e 73,48 ppm) correspondem aos grupos CH_2 ligados diretamente aos átomos de azoto e oxigénio. Importa

também referir a presença do sinal da ligação C=CH da cadeia metínica que aparece ao desvio químico de 85,84 ppm, e os seis sinais, atribuídos aos carbonos C-H aromáticos, que surgem entre os desvios químicos 114,04-133,06 ppm. As atribuições dos carbonos foram feitas com base nos espectros DEPT 90 e DEPT 135.

3.1.1.4. Síntese do 3-[(1-hexilquinolin-2(1H)-ilideno)metil]-4-hidroxi-3-ciclobuteno-1,2-diona (6)

O composto **6** foi obtido através da reação de hidrólise (Esquema 3.5), nas condições descritas por Kim *et al.* (2010) para um composto análogo derivado do benzotiazole.



Esquema 3.5. Síntese do composto **6**

O produto foi obtido na forma de cristais castanhos-avermelhados, com um rendimento de 78%, após purificação por lavagem com uma mistura de éter dietílico/éter de petróleo (1:1). Quanto é do nosso conhecimento este composto é novo, pelo que o seu rendimento não está referido na literatura. No entanto, Fagundes, em 2013, sintetizou um composto análogo ao composto **6**, derivado do benzoselenazole, tendo-o obtido com um rendimento de 96%. Embora este valor seja bastante superior ao obtido neste trabalho, o composto análogo ao **6**, referido no trabalho de Fagundes (2013), não foi sujeito a qualquer purificação posterior, o que pode justificar a diferença de valores nos rendimentos obtidos, uma vez que o composto **6**, no nosso caso, foi sujeito a purificação antes da etapa seguinte o que leva a uma perda de rendimento. Relativamente ao ponto de fusão, que se encontra no intervalo 200-202 °C, indica a elevada pureza do composto devido ao facto de apresentar uma diferença de apenas 2 °C, e tal como aconteceu para o composto **5**, o ponto de fusão não pode ser comparado com a literatura.

No que diz respeito às características espectroscópicas, importa salientar, no espectro de IV, as bandas de absorção relativas à vibração das ligações C-H alifáticas (fracas) que aparecem a 2928 cm⁻¹, da ligação C=O (média) a 1765 cm⁻¹ e das ligações C=C aromáticas (fortes) que se encontram entre 1540-1479 cm⁻¹. No espectro de RMN de ¹H, que apresenta todos os sinais esperados para os prótons presentes no composto, são de salientar o sinal do grupo metilo da

cadeia *N*-alquílica que surge ao desvio químico 0,90 ppm, sob a forma de um tripleto de três prótons. Salientam-se, ainda, os sinais correspondentes aos prótons dos grupos CH₂ da cadeia *N*-alquílica que surgem sob a forma de multipletos a desvios químicos compreendidos entre 1,35-1,69 ppm, com exceção dos dois prótons do grupo CH₂ diretamente ligado ao átomo de azoto que surge a 4,06 ppm, sob a forma de um singuleto largo. É importante também referir o sinal relativo ao próton do grupo CH da cadeia metínica que surge a 5,37 ppm sob a forma de um singuleto e os três sinais correspondentes aos seis prótons aromáticos que surgem a 7,23 ppm na forma de um tripleto de um próton, entre 7,52-7,57 ppm na forma de um multiplete de quatro prótons e a 8,45 ppm sob a forma de um duplete de um próton.

3.1.1.5. Síntese do iodeto de 3-hexil-2-metilbenzotiazólio (8)

Para se conseguir obter o composto esuarílico assimétrico pretendido **11** foi necessário sintetizar, paralelamente, o sal quaternário de amónio derivado do benzotiazole, que depois seria adicionado ao composto **6**, obtido no ponto anterior. Deste modo, o sal quaternário de amónio **8** foi facilmente obtido fazendo reagir a base heterocíclica **7** com um excesso de agente alquilante, 1-iodo-hexano, em acetonitrilo e a refluxo (Pardal *et al.*, 2002), como evidencia o esquema 3.6.



Esquema 3.6. Síntese do composto **8**

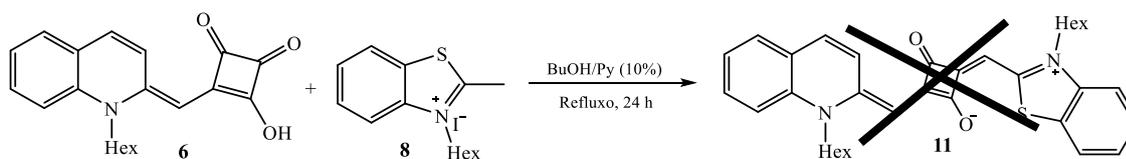
Para obtenção de um rendimento mais elevado, o método, atrás descrito, foi repetido mais duas vezes após isolamento da primeira fração. Obteve-se, assim, o iodeto de 3-hexil-2-metilbenzotiazólio (**8**), na forma de cristais beges, cromatograficamente puros, por precipitação com éter dietílico, apresentando um rendimento de 96%, cujo valor é bastante superior ao referido na literatura (44%) (Pardal *et al.*, 2002). Em 2012, Guerra também sintetizou este sal quaternário de amónio tendo obtido um rendimento mais próximo, embora mais baixo (74%), do obtido neste trabalho.

Relativamente ao ponto de fusão, que se encontra no intervalo entre 117-119 °C, verificou-se que, embora seja estreito, está relativamente próximo mas não completamente de acordo com o referido na literatura (125-126 °C) (Pardal *et al.*, 2002).

Uma vez que o composto **8** já se encontra descrito na literatura (Pardal *et al.*, 2002), apenas se traçou o espectro de IV que se encontra de acordo com o referido na literatura, onde são de salientar as bandas de absorção relativas à vibração das ligações C-H alifáticas que se encontram entre 2954-2922 cm⁻¹ e das ligações C=C aromáticas a 1519 cm⁻¹.

3.1.1.6. Tentativa de síntese do 2-[(3-hexilbenzotiazole-2(3*H*)-ilideno)metil]-4-[(1-hexilquinolin-1-*io*-2-*il*)metileno]-3-oxociclobut-1-en-1-olato (**11**)

Na tentativa de obter o corante esquarílico assimétrico **11** fez-se reagir o iodeto de 3-hexil-2-metilbenzotiazólio (**8**) com o composto **6**, numa mistura de butanol/piridina (10 %), a refluxo durante 24 h, conforme representado no esquema 3.7.



Esquema 3.7. Tentativa de síntese do corante esquarílico **11**

Após tratamento da reação obteve-se um produto, que foi purificado através de lavagens consecutivas com uma mistura de metanol/éter de petróleo, tendo-se conseguido obter o produto na forma de cristais azuis-escuros.

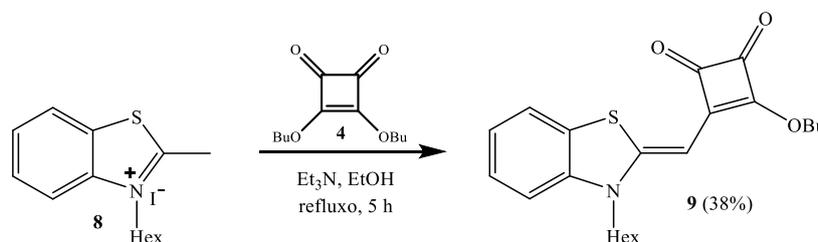
Procedeu-se a uma série de técnicas de caracterização, nomeadamente p.f., Visível, IV e EMAR ESI-TOF para verificar se o produto obtido, por esta via, correspondia ao composto pretendido. No entanto, a massa exata encontrada, para este composto foi de $m/z = 628,29245$ apresentando a fórmula molecular $C_{38}H_{46}NO_3S_2^+$ (calc. 628, 29136), que não se encontra de acordo com a estrutura prevista, pois apresenta três átomos de oxigénio, dois de enxofre e apenas um de azoto, em vez dos esperados dois átomos de azoto, dois de oxigénio e apenas um de enxofre. Mesmo assim, tentou-se identificar o composto traçando os seus espectros de RMN de ¹H e ¹³C uma vez que se verificou, pelo espectro no Visível, que o pico de absorção máxima do composto era 718 nm, valor este que se encontra dentro da chamada “janela fototerapêutica” e que vai ao encontro de um dos parâmetros de FS ideal. Contudo, os espectros de RMN de ¹H

e ^{13}C mostraram-se inconclusivos, devido a insolubilidade do composto nos vários solventes deuterados disponíveis, pelo que não se conseguiu chegar a uma estrutura. No entanto, é de salientar no espectro de IV as bandas de absorção características das vibrações das ligações C-H aromáticas (fraca) que se encontram a 3068 cm^{-1} , da ligação C=O (fraca) a 1760 cm^{-1} e das ligações C=C aromáticas (fracas e médias) que aparecem entre $1571\text{-}1517\text{ cm}^{-1}$. Além disso, o seu ponto de fusão, que se encontra entre $154\text{-}157\text{ }^\circ\text{C}$, indica o elevado grau de pureza do composto, devido ao facto de apresentar uma diferença de apenas $3\text{ }^\circ\text{C}$.

3.1.1.7. Síntese do 3-butoxi-4-[(3-hexilbenzotiazole-2(3H)-ilideno)metil]-3-ciclobuteno-1,2-diona (9)

Devido ao insucesso da obtenção do 2-[(3-hexilbenzotiazole-2(3H)-ilideno)metil]-4-[(1-hexilquinolin-1-ilo-2-il)metileno]-3-oxociclobut-1-en-1-olato (11) a partir do composto semi-esquarílico derivado da quinaldina (6), procedeu-se à síntese do composto 9 e conseqüente hidrólise a fim de tentar obter o corante pretendido 11.

Deste modo, para obter o composto semi-esquarílico 9 fez-se reagir o sal quaternário de amónio 8 com o 3,4-dibutoxi-3-ciclobuteno-1,2-diona (4) em etanol, na presença de trietilamina (Esquema 3.8), de acordo com um método adaptado da literatura (Kim *et al.*, 2010).



Esquema 3.8. Síntese do composto 9

A reação decorreu durante 5 h a refluxo e o composto foi obtido, na forma de cristais amarelos, após purificação por cromatografia em coluna, utilizando como eluente uma mistura de acetato de etilo/éter de petróleo (1:1), com um rendimento de 38%. Na literatura, Kim *et al.*, em 2010, descreveram a síntese deste composto com um rendimento de 69%, que é bastante superior ao obtido neste trabalho. O mesmo autor refere que a reação descrita por este grupo demorou menos tempo (30 min) contrariamente ao verificado no decorrer deste trabalho.

Relativamente ao ponto de fusão deste composto, que se encontra no intervalo $119\text{-}121\text{ }^\circ\text{C}$, que se encontra próximo do descrito na literatura (Graça, 2013).

Quanto às características espectroscópicas, importa salientar, no espectro de IV, as bandas de absorção relativas à vibração das ligações C-H alifáticas (médias e fracas) que aparecem entre 2954-2930 cm^{-1} , da ligação C=O (forte) a 1702 cm^{-1} e das ligações C=C aromáticas (forte) a 1545 cm^{-1} . Este espectro encontra-se de acordo com o descrito na literatura (Graça, 2013).

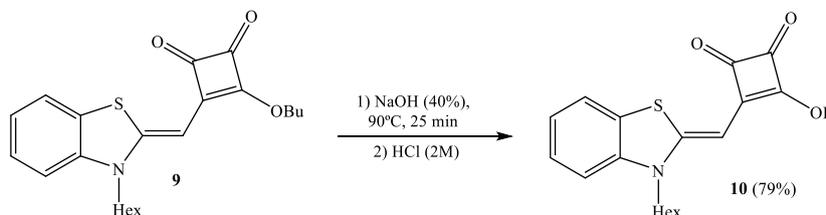
No espectro de RMN de ^1H , aparecem todos os sinais esperados para todos os prótons presentes no composto e encontra-se de acordo com o referido na literatura (Kim *et al.*, 2010; Graça, 2013). Neste espectro são de salientar os sinais dos prótons dos grupos metilo da cadeia *N*-alquílica e *O*-alquílica que surgem aos desvios químicos 0,91 e 1,00 ppm, respetivamente, sob a forma de dois tripletos de três prótons cada. Os sinais referentes aos prótons dos grupos CH_2 das cadeias *N*-alquílicas e *O*-alquílicas surgem entre 1,33-1,88 ppm sob a forma de vários multipletos, excetuando os sinais dos prótons do grupo CH_2 diretamente ligado ao átomo de azoto que aparece a 3,97 ppm sob a forma de um tripleto de dois prótons e os sinais dos prótons do grupo CH_2 diretamente ligado ao átomo de oxigénio que surge, também sob a forma de um tripleto de dois prótons, a 4,81 ppm. Neste espectro é ainda de salientar o sinal referente ao próton da ligação C=CH da cadeia metínica que surge, sob a forma de um singuleto, a 5,46 ppm e os quatro sinais correspondentes aos quatro prótons aromáticos que aparecem a 7,06 sob a forma de um duplete, a 7,16 e 7,34 ppm sob a forma de dois tripletos, e a 7,49 ppm sob a forma de um duplete.

No espectro de RMN de ^{13}C são de salientar os dois sinais correspondentes aos grupos metilo das cadeias alquílicas, que surgem aos desvios químicos 13,89 e 14,12 ppm, a presença de oito sinais correspondentes aos oito grupos CH_2 das cadeias alquílicas, a desvios químicos entre 18,90-73,68 ppm, sendo que os que se apresentam a campo mais baixo (45,94 e 73,68 ppm) correspondem aos grupos CH_2 ligados diretamente aos átomos de azoto e oxigénio. Importa ainda, referir a presença do sinal da ligação C=CH da cadeia alquílica que aparece ao desvio químico 79,02 ppm, bem como, os quatro sinais correspondentes aos carbonos C-H do anel aromático, que surgem entre os desvios químicos 111,02-126,98 ppm. As atribuições dos carbonos foram feitas com base nos espectros DEPT 90 e DEPT 135. Este espectro encontra-se de acordo com o descrito na literatura (Graça, 2013).

O espectro de espectrometria de massa de baixa resolução EM-ESI-TOF apresenta o ião a m/z 386,18, que corresponde ao ião $[\text{M}+\text{H}]^+$ de acordo com a estrutura apresentada.

3.1.1.8. Síntese do 3-[(3-hexilbenzotiazole-2(3*H*)-ilideno)metil]-4-hidroxi-3-ciclobuteno-1,2-diona (**10**)

O composto **10** foi obtido através da reação de hidrólise, descrita por Kim *et al.* (2010), nas condições evidenciadas no esquema 3.9.



Esquema 3.9. Síntese do composto **10**

O produto foi obtido na forma de cristais cor de laranja, cromatograficamente puros, após lavagem com éter dietílico, apresentando um rendimento de 79%. Este composto está descrito na literatura (Kim *et al.*, 2010), no entanto nesse trabalho o composto foi utilizado no passo seguinte sem procederem a qualquer técnica de purificação, não sendo, por isso, indicado o rendimento. Contudo, em 2013, Fagundes obteve, na síntese de um composto análogo (derivado do benzoselenazole) ao composto **10**, um rendimento de 96%. Embora este valor seja ligeiramente superior ao obtido neste trabalho, pode ser explicado pelo facto de o composto **10** ter sido sujeito a várias lavagens, o que leva a perda de rendimento, de modo a que seguisse puro para o passo seguinte, e Fagundes ter usado o seu composto na fase seguinte sem qualquer purificação.

Relativamente ao ponto de fusão deste composto, que se encontra no intervalo 184-186 °C, apenas se pode dizer que o facto de ser estreito indica que o composto apresenta elevada pureza mas, não pode ser comparado, pois na literatura, embora este composto já tenha sido descrito, não se faz referência ao seu ponto de fusão.

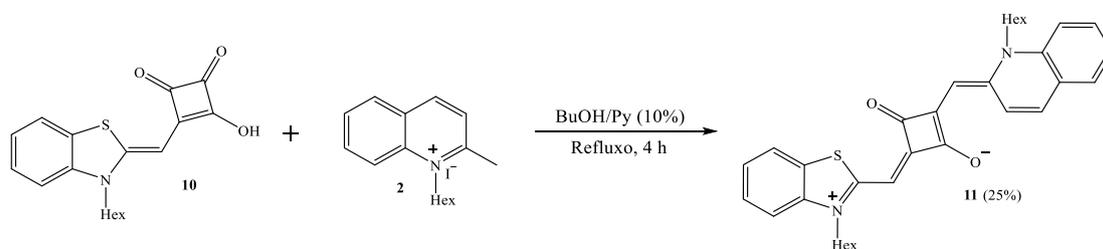
Quanto às características espectroscópicas, são de salientar, no espectro de IV, as bandas de absorção relativas à vibração das ligações C-H alifáticas (fraca) que surgem a 2926 cm⁻¹, das ligações C=O (fracas) a 1770-1660 cm⁻¹ e das ligações C=C aromáticas (médias e fortes) entre 1563-1492 cm⁻¹. No espectro de RMN de ¹H, onde aparecem todos os sinais esperados para a totalidade dos protões presentes no composto, são de salientar o sinal do grupo metilo da cadeia *N*-alquílica que surge ao desvio químico 0,91 ppm, sob a forma de um triplete de três protões, todos os sinais correspondentes aos protões dos grupos CH₂ da cadeia *N*-alquílica que surgem sob a forma de multiplete e vários singuletos largos a desvios químicos compreendidos entre

1,33-1,81 ppm, exceto o sinal correspondente ao próton do grupo CH₂ diretamente ligado ao átomo de azoto que surge a 4,04 ppm, sob a forma de um singuleto largo. De referir, também, o sinal do próton do grupo C=CH da cadeia metínica que surge a 5,69 ppm sob a forma de um singuleto e os quatro sinais correspondentes aos quatro prótons aromáticos que surgem na forma de dois dupletos de um próton cada a 7,14 e 7,55 ppm, e sob a forma de dois tripletos largos de um próton cada a 7,22 e 7,38 ppm. Embora este composto já tenha sido sintetizado por Kim *et al.* (2010), e por Graça em 2013, estes não apresentam a sua caracterização espectroscópica. Deste modo, não é possível fazer uma comparação, dos valores obtidos neste trabalho, com a literatura.

O espectro de espectrometria de massa de baixa resolução EM-ESI-TOF apresenta o ião a m/z 330,12, que corresponde ao ião [M+H]⁺ de acordo com a estrutura apresentada.

3.1.1.9. Síntese de 2-[(3-hexilbenzotiazole-2(3H)-ilideno)metil]-4-[(1-hexilquinolin-1-ilo-2-il)metileno]-3-oxociclobut-1-en-1-olato (11)

Para obter o composto **11** fez-se reagir o composto **10**, obtido no ponto anterior, com o iodeto de *N*-hexil-2-metilquinolínio (**2**) numa mistura de butanol/piridina (10%), a refluxo, durante 4 horas, tal como evidenciado no esquema 3.10.



Esquema 3.10. Síntese do corante esquarílico **11**

Após tratamento da reação e posterior recristalização com éter dietílico e uma mistura de CH₂Cl₂/MeOH obteve-se o produto, cromatograficamente puro, na forma de cristais vermelhos-escuros com um rendimento de 25%.

O composto **11** apresenta um intervalo de fusão compreendido entre 282-284 °C, que apesar de acompanhado de decomposição, indica o elevado grau de pureza do composto, devido ao facto de apresentar uma diferença de apenas 2 °C. Contudo, estes valores não podem ser comparados devido à falta de valores de referência na literatura.

Relativamente aos dados espectroscópicos do composto pode-se salientar, no espectro de IV, as bandas de absorção características relativas à vibração das ligações C-H alifáticas (fraca) a 2925 cm^{-1} , e das ligações C=C aromáticas (média) a 1584 cm^{-1} . Neste espectro é de referir a ausência da banda de absorção característica relativa à vibração da ligação C=O, que normalmente surge na zona dos 1700 cm^{-1} . Esta ausência poderá ser devida ao facto da existência da ressonância apresentada na figura 3.1. No entanto, a banda de absorção característica relativa à vibração da ligação C-O aparece com uma intensidade forte a 1229 cm^{-1} .

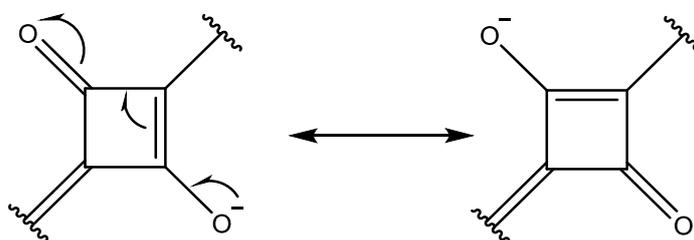


Figura 3.1. Estrutura de ressonância no anel de quatro membros dos corantes esquarílicos zwitteriônicos

No espectro de RMN de ^1H aparecem todos os sinais esperados para a totalidade dos prótons presentes na referida estrutura, sendo de salientar os sinais dos dois grupos metilo das cadeias *N*-alquílicas que surgem entre $0,91\text{-}0,95\text{ ppm}$, sob a forma de dois tripletos de três prótons cada. São, também, de referir os sinais correspondentes aos prótons dos grupos CH_2 das cadeias *N*-alquílicas que aparecem sob a forma de multipletos e singletos largos, entre $1,37\text{-}1,9\text{ ppm}$, exceto o sinal referente aos dois prótons dos grupos CH_2 diretamente ligados ao átomo de azoto de cada uma das cadeias alquílicas, que surge entre a $4,27\text{ ppm}$, sob a forma de um singuleto largo de quatro prótons. Importa, ainda, salientar a presença dos sinais que correspondem aos prótons das duas ligações C=CH da cadeia polimetínica que aparecem a $5,83$ e $5,87\text{ ppm}$ na forma de dois singletos de um próton cada. Finalmente, sobre este espectro, importa realçar os sete sinais que dizem respeito aos dez prótons aromáticos que surgem sob a forma de duplete de um próton a $7,16\text{ ppm}$, dois tripletos de um próton a $7,21$ e $7,32\text{ ppm}$, um multiplete de um próton entre $7,37\text{-}7,40\text{ ppm}$, um duplete de um próton que surge a $7,45\text{ ppm}$, um multiplete de quatro prótons entre $7,58\text{-}7,62\text{ ppm}$ e um duplete de um próton a $9,17\text{ ppm}$.

No espectro de RMN de ^{13}C são de salientar os dois sinais correspondentes aos grupos metilo das cadeias *N*-alquílicas, que surgem aos desvios químicos $14,08$ e $14,12\text{ ppm}$. Os dez sinais correspondentes aos grupos CH_2 das cadeias alquílicas encontram-se a desvios químicos

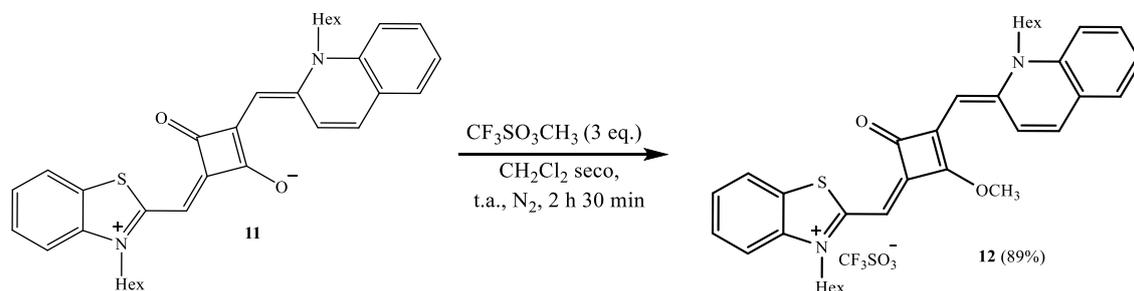
entre 25,75-48,70 ppm, sendo, os que se apresentam a campo mais baixo (46,39 e 48,70 ppm), correspondentes aos grupos CH₂ ligados diretamente aos átomos de azoto de cada uma das cadeias alquílicas. Importa ainda, referir a presença dos sinais das ligação C=CH da cadeia polimetínica que aparecem aos desvios químicos 84,73 ppm e 92,64 ppm, bem como, os dez sinais correspondentes aos carbonos C-H dos anéis aromáticos, que surgem entre os desvios químicos 111,59-134,28 ppm. As atribuições dos carbonos foram feitas com base nos espectros DEPT 90 e DEPT 135.

A massa exata do corante **11** é $m/z = 538,26432$ que corresponde ao ião $[M]^+$ (C₃₄H₃₈N₂O₂S⁺, calc. 538, 26485), estando de acordo com a estrutura apresentada.

3.1.1.10. Síntese do trifluorometanossulfonato de 3-hexil-2-[(3-[(1-hexilquinolin-2(1H)-ilideno)metil]-2-metoxi-4-oxociclobut-2-en-1-ilideno)metil]benzotiazole-3-io (**12**)

Para se conseguir obter os compostos aminoesquarílicos pretendidos foi necessário proceder à metilação do composto zwitteriônico **11**, anteriormente obtido. Assim, o composto **12** foi sintetizado com base na reação de metilação descrita por Reis e seus colaboradores em 2009, para corantes cianínicos esquarílicos simétricos.

Deste modo, para se obter o composto **12**, fez-se reagir o 2-[(3-hexilbenzotiazole-2(3H)-ilideno)metil]-4-[(1-hexilquinolin-1-io-2-il)metileno]-3-oxociclobut-1-en-1-olato com o agente metilante CF₃SO₃CH₃ em diclorometano seco, sob atmosfera de azoto e à temperatura ambiente durante 2 h e 30 min, conforme representado no esquema 3.11.



Esquema 3.11. Síntese do corante esquarílico **12**.

Esta reação envolveu uma proporção de composto **11** e agente metilante de 1:3, tendo-se obtido o composto pretendido, na forma de cristais verdes brilhantes, com rendimento de 89%.

O intervalo de fusão do composto **12** é de 189-191 °C e mostra o elevado grau de pureza do composto devido à diferença de 2 °C. Tal como aconteceu para o composto anterior **11**, estes valores não podem ser comparados devido à falta de valores de referência na literatura.

No que diz respeito aos dados espectroscópicos do composto são de salientar, no espectro de IV, as bandas de absorção características relativas à vibração das ligações C-H alifáticas (fraca) a 2930 cm⁻¹, da ligação C=O (fraca) que aparece a 1642 cm⁻¹, das ligações C=C aromáticas (média) a 1446 cm⁻¹ e da ligação C-O (forte) que surge a 1257 cm⁻¹.

No espectro de RMN de ¹H aparecem todos os sinais esperados para a totalidade dos prótons existentes na molécula, sendo de salientar os sinais dos dois grupos metilo das cadeias *N*-alquílicas que surgem entre 0,87-0,93 ppm, sob a forma de dois tripletos de três prótons cada. De referir também os cinco sinais correspondentes aos prótons dos grupos CH₂ das cadeias *N*-alquílicas que aparecem sob a forma de multipletos e quintetos, entre 1,31-1,87 ppm, e para os dois sinais referentes aos prótons dos grupos CH₂ diretamente ligados ao átomo de azoto de cada uma das cadeias alquílicas, que surgem a 4,32 ppm, sob a forma de um triplete de dois prótons e a 4,39 ppm, sob a forma de um singuleto largo de dois prótons. Neste espectro, verifica-se a presença de um sinal, sob a forma de um singuleto a 4,61, correspondente a três prótons que não é observado no espectro de ¹H do composto **11** (precursor do composto **12**), que corresponde aos prótons do grupo metilo diretamente ligado ao átomo de oxigénio do anel central de quatro membros (OCH₃). Importa, ainda, referir a presença dos sinais que correspondem aos prótons das duas ligações C=CH da cadeia polimetínica que aparecem a 5,65 ppm e 6,00 ppm na forma de dois singuletos de um protão cada. Finalmente, neste espectro, importa salientar nove sinais que surgem a 7,28-7,31 ppm sob a forma de um multiplete de dois prótons, 7,42 e 7,44 ppm sob a forma de dois tripletos de um protão cada, a 7,59, 7,66 e 7,69 ppm sob a forma de três dupletos de um protão cada, a 7,71 ppm sob a forma de um duplete de um protão, a 7,85 ppm sob a forma de um triplete de um protão e a 8,76 ppm sob a forma de um singuleto largo também de um protão e que dizem respeito aos dez prótons aromáticos.

Relativamente ao espectro de RMN de ¹³C são de salientar os dois sinais correspondentes aos grupos metilo das cadeias *N*-alquílicas, que surgem aos desvios químicos 13,89 e 13,91 ppm. Os dez sinais correspondentes aos grupos CH₂ das cadeias alquílicas encontram-se a desvios químicos entre 22,37-49,18 ppm, sendo, os que se apresentam a campo mais baixo (46,81 e 49,18 ppm), correspondentes aos grupos CH₂ ligados diretamente aos átomos de azoto de cada uma das cadeias alquílicas. Neste espectro, é ainda de salientar o sinal do grupo CH₃ diretamente ligado ao átomo de oxigénio do anel central de quatro membros, que

aparece a 61,11 ppm. Importa, também, referir a presença dos dois sinais das ligações C=CH da cadeia polimetínica que aparecem aos desvios químicos 77,20 ppm e 85,27 ppm, bem como, os dez sinais correspondentes aos carbonos C-H dos anéis aromáticos, que surgem entre os desvios químicos 112,84-137,15 ppm. As atribuições dos carbonos foram feitas com base nos espectros DEPT 90 e DEPT 135.

O espectro de massa de baixa resolução EM-ESI-TOF apresenta o ião molecular a $m/z = 553,29$, que corresponde ao ião $[M-CF_3SO_3]^+$ de acordo com a estrutura apresentada.

3.1.1.11. Síntese dos corantes cianínicos aminoescuarílicos assimétricos 13-17

Como já referido anteriormente, o composto derivado *O*-metilado **12** é o precursor de todos os corantes aminoescuarílicos. Assim, estes corantes foram obtidos por reação de substituição nucleófila do grupo OCH_3 , presente no derivado *O*-metilado **12**, usando aminas aromáticas ou alifáticas, apropriadas, como nucleófilos.

Utilizou-se, em todos os casos, um excesso da correspondente amina em relação ao derivado *O*-metilado. Porém, quando se realizou a reação com aminas aromáticas, foi necessário adicionar catalisadores como a trietilamina e a 4-dimetilaminopiridina (4-DMAP), uma vez que as aminas aromáticas são menos nucleófilas que as alifáticas.

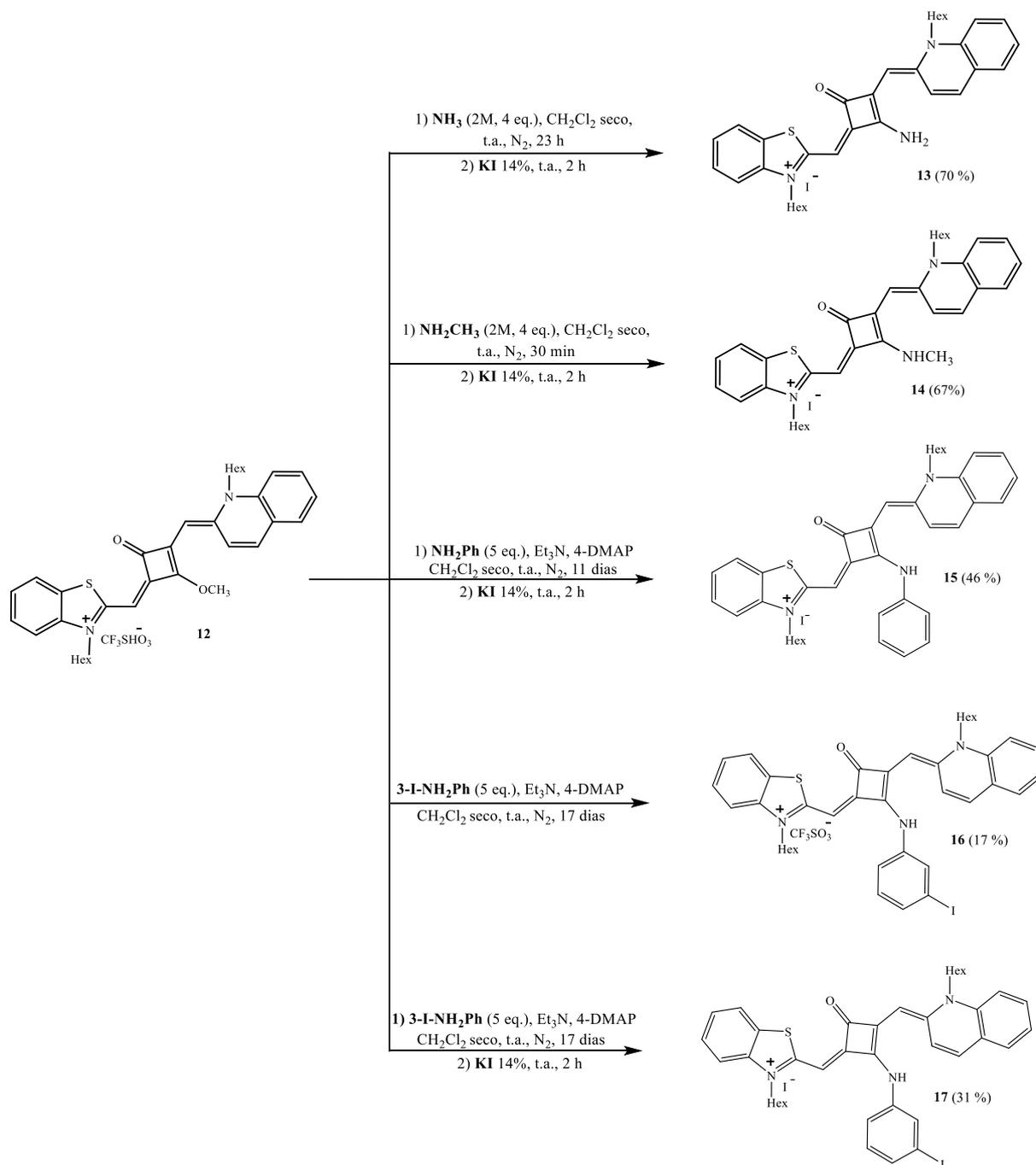
Todos os métodos de síntese utilizados, para a síntese dos corantes cianínicos aminoescuarílicos assimétricos, foram os métodos descritos na literatura, por Reis *et al.* em 2009, para corantes aminoescuarílicos simétricos, e por Fagundes em 2013, para corantes aminoescuarílicos assimétricos.

No esquema 3.12 estão resumidos os métodos sintéticos realizados para obtenção de todos os corantes cianínicos escuarílicos derivados do benzotiazole e da quinaldina.

Os corantes **13** e **14** foram obtidos fazendo reagir o derivado *O*-metilado **12** com amónia e metilamina, respetivamente. Estas duas reações com aminas alifáticas foram relativamente rápidas, apesar de a reação com amónia ter demorado quase um dia a terminar. O tempo de reação superior obtido para a síntese do composto **13** poderá ser explicado pelo facto de a amónia ser um composto volátil que vai evaporando sempre que se abre o frasco. Uma vez que o frasco já tinha sido aberto há algum tempo poderia já haver pouca amónia dissolvida e, por isso a concentração não ser efetivamente 2,0 M, sendo a reação mais demorada.

Por sua vez, os corantes **15** a **17** foram obtidos fazendo reagir o derivado *O*-metilado **12** com anilina e iodoanilina, respetivamente. Nestes casos foram utilizados catalisadores de forma

a acelerar as reações. Mesmo assim, estas reações mostraram-se muito lentas, tendo terminado após 11 dias, no caso do composto **15** e 17 dias, no caso dos compostos **16** e **17**.



Esquema 3.12. Síntese dos corantes aminosquarílicos derivados de quinaldina **13-17**.

Posteriormente, todos os corantes aminosquarílicos, à exceção do corante **16**, foram sujeitos à troca do contra-íon CF_3SO_3^- por I^- no sentido de aumentar a produção de oxigénio singuleto, devido ao efeito do átomo pesado (Ferreira *et al.*, 2013b). O facto de não trocarmos o contra-íon do corante **16** permitir-nos-á comparar o efeito do contra-íon na produção de

oxigénio singuleto, uma vez que o corante **17** é em tudo igual ao corante **16** à exceção do seu contra-íão.

Para efetuar a troca do contra-íão os compostos foram dissolvidos em metanol e depois foi adicionada a essa solução uma solução aquosa de KI 14%, deixando a reação ocorrer, à temperatura ambiente, durante 2 horas. Os rendimentos obtidos, após recristalização, podem ser considerados razoáveis para os compostos **13-15** e **17**, dado que estes se encontram entre 31-70%. Apenas o corante **16** foi obtido com um rendimento menos bom tendo este sido de apenas 17%.

Relativamente às características físicas dos compostos **13-17**, pode-se verificar que o intervalo de fusão de todos os compostos aminoescarílicos derivados do benzotiazole e da quinaldina apresentam diferenças compreendidas entre 1-3 °C, o que mostra o elevado grau de pureza dos compostos. No entanto, e como já referido para os compostos anteriores (**11** e **12**), também para os corantes **13-17** não existem valores de referência na literatura para se poder fazer comparações, uma vez que, tanto quanto é do nosso conhecimento, estes compostos são novos.

No que diz respeito aos dados espectroscópicos dos compostos são de salientar, no espetro de IV, as bandas de absorção características relativas à vibração das ligações C-H alifáticas entre 2912-2954 cm^{-1} , das ligações C=O (fracas) que aparecem entre 1622-1633 cm^{-1} e das ligações C=C aromáticas (fracas ou fortes) que surgem entre 1453-1565 cm^{-1} . O facto de a banda do grupo carbonilo aparecer com intensidade fraca poderá ter origem na presença do átomo de azoto da amina, cujo carácter eletrodoador origina duas estruturas de ressonância (Figura 3.2), fazendo com que a ligação C-O adquira um carácter intermédio entre o de ligação covalente dupla e o de ligação covalente simples.

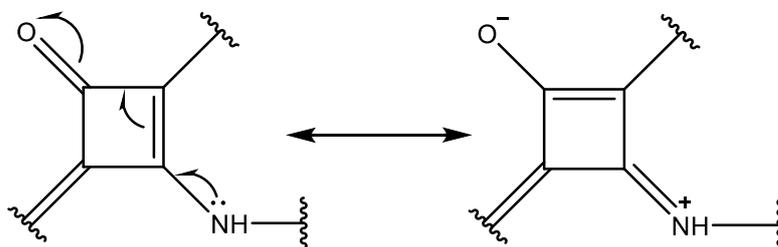


Figura 3.2 Estrutura de ressonância do anel de quatro membros dos corantes aminoescarílicos.

Relativamente aos espetros de RMN de ^1H e ^{13}C dos compostos **15-17** não foi possível a sua obtenção com boa resolução, devido a insolubilidade dos mesmos, em vários solventes deuterados testados o que impossibilitou a sua caracterização. No entanto, pelos seus espetros

de EMAR-ESI-TOF foi possível confirmar que estávamos perante os compostos pretendidos, uma vez que a massa exata encontrada bem como a fórmula molecular estão de acordo com as estruturas moleculares propostas, sendo $m/z = 614,31807$ $[M-I]^+$, ($C_{40}H_{44}N_3OS^+$; calc. 614,31996) para o corante **15**, $m/z = 740,21405$ $[M-CF_3SO_3]^+$, ($C_{40}H_{43}IN_3OS^+$; calc. 740,21660) para o corante **16** e $m/z = 740,21445$ $[M-I]^+$, ($C_{40}H_{43}IN_3OS^+$; calc. 740,21660) para o corante **17**.

Nos espetros de RMN de 1H dos compostos **13** e **14** observam-se todos os sinais referentes a todos os prótons previstos para as estruturas apresentadas. No espectro do composto **13** é de salientar a presença dos sinais correspondentes aos prótons lábeis que surgem aos desvios químicos 8,62 e 8,75 ppm sob a forma de dois singuletos de um próton cada, que trocam com D_2O e que foram atribuídos aos prótons do grupo amino. Neste espectro deve-se ainda salientar a presença dos sinais correspondentes aos prótons das ligações $C=CH$ da cadeia polimetínica que surgem sob a forma de dois singuletos de um próton cada aos desvios químicos 5,87 ppm e 6,01 ppm. Importa, também, referir a presença de seis sinais correspondentes ao vinte prótons das cadeias *N*-alquílicas que surgem entre 1,25-4,31 ppm, sendo os que se apresentam a campo mais baixo (4,15 e 4,31 ppm) os sinais correspondentes aos prótons dos grupos CH_2 diretamente ligados aos átomos de azoto e os sinais que se encontram a campo mais elevado (0,85 e 0,88 ppm) os sinais correspondentes aos prótons dos grupos metilo. Finalmente, deve-se salientar a presença de oito sinais correspondentes aos dez prótons aromáticos que surgem sob a forma de dois tripletos de um próton cada a 7,26 e 7,71 ppm, um multipletto de dois prótons entre 7,41-7,45 ppm, quatro dupletos de um próton cada a 7,55, 7,84, 7,96 e 8,93 ppm e um tripleto largo de dois prótons a 7,76 ppm.

O espectro do composto **14** apresenta o dobro dos sinais para os prótons existentes na molécula. O aumento do número de sinais neste espectro sugere uma perda de simetria molecular, tal como é claramente indicado pela separação dos sinais correspondentes aos prótons da cadeia polimetínica ($C=CH$), os quais surgem, neste espectro, aos os desvios químicos 5,74 ppm e 5,99 ppm sob a forma de quatro singuletos de um próton cada, contrariamente ao observado nos espetros dos seus percursores, e que colapsam a dois singuletos, de um próton cada, após aquecimento (Figura 3.3).

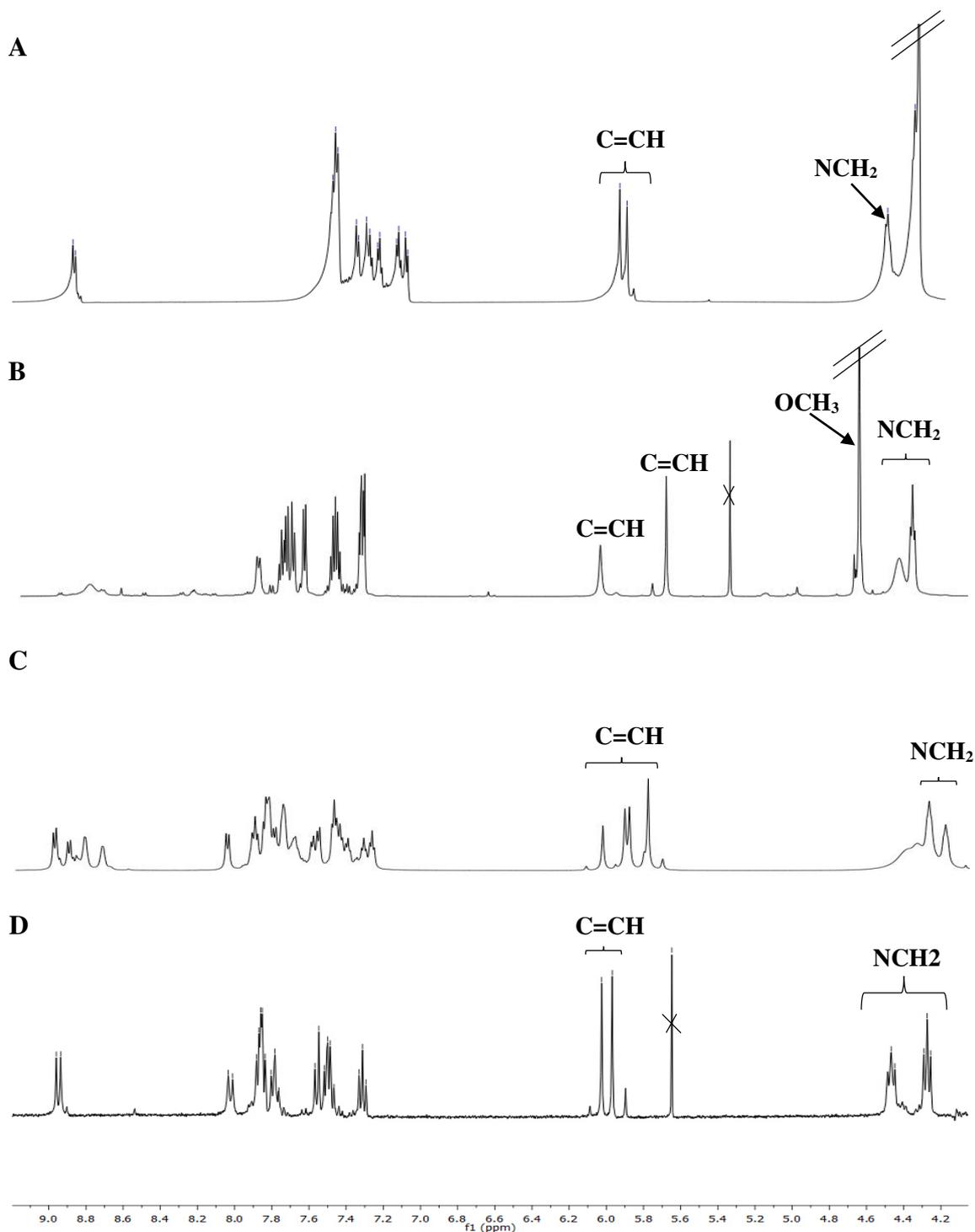


Figura 3.3. Espectros parciais de RMN de ^1H dos compostos **11**, **12** e **14**. A: espectro do composto **11** em $\text{CDCl}_3+\text{MeOD}$ (600 MHz); B: espectro do composto **12** em CDCl_3 (600 MHz); C: espectro do composto **14** em DMSO (600 MHz); D: espectro do composto **14** em DMSO (400 MHz) a 90°C . Os picos assinalados com um x correspondem a uma contaminação do solvente.

A não equivalência de ambientes químicos deve-se ao impedimento à livre rotação do grupo NHCH_3 , decorrente do carácter parcial da ligação dupla entre o átomo de azoto e o átomo de carbono do anel central de quatro membros como anteriormente referido, originando um campo magnético local não homogêneo (Santos *et al.*, 2010). A falta de assimetria molecular

que conduz à não equivalência magnética dos vários picos, sendo também visível nos sinais dos prótons metilénicos dos grupos CH₂ diretamente ligados ao átomo de azoto (Figura 3.3). Este efeito já foi observado por Guerra, em 2012, para compostos aminoescarílicos simétricos, derivados de benzotiazole, com o grupo NHCH₃ e o grupo NHPH. Em 2013, Fagundes também verificou este efeito em corantes aminoescarílicos assimétricos que tinham os grupos NHCH₃, NHPH e 3-I-NHPH no anel central de quatro membros. Por outro lado, no espetro de RMN de ¹H do composto **14** destacam-se ainda os dois sinais correspondentes aos prótons metílicos do grupo NHCH₃, que surgem a 3,26 ppm e 3,29 ppm, sob a forma de dois singuletos largos de três prótons cada, e que passa a um singuleto de três prótons após aquecimento.

Nos espetros de RMN de ¹³C dos corantes **13** e **14**, verificam-se todos os sinais correspondentes a todos os carbonos presentes nas estruturas propostas e, tal como se observou no espetro de ¹H, o corante **14** apresenta no seu espetro de ¹³C o dobro dos sinais, o que indica a presença das duas conformações da molécula. As atribuições dos carbonos foram feitas com base nos espetros DEPT 90 e DEPT 135. Nestes espetros são de salientar os sinais dos grupos metilo das cadeias *N*-alquílicas que surgem, em ambos os casos, entre 14,06-14,11 ppm, os sinais correspondentes aos grupos CH₂ diretamente ligados ao átomo de azoto das cadeias *N*-alquílicas que aparecem entre 46,15-55,11 ppm e os sinais correspondentes aos grupos CH da ligação C=CH das cadeias polimetínicas que surgem entre 85,60-94,29 ppm. Nos espetros de ¹³C destes corantes deve-se ainda referir a presença de todos os sinais correspondentes aos grupos CH aromáticos que surgem, em ambos os casos, entre 112,80-136,60 ppm, bem como a presença dos sinais correspondentes a todos os carbonos dos grupos CH₂ alifáticos que aparecem entre 22,19-45,64 ppm. Além disso, no espetro do corante **14** deve-se salientar a presença dos sinais correspondentes ao grupo CH₃ da amina que surgem entre 30,27-30,45 ppm, e que estão ausentes no espetro do corante **13**.

Nos espetro de EMAR-ESI-TOF dos corantes **13** e **14** a massa exata encontrada está de acordo com as estruturas propostas sendo $m/z = 538,28785 [M-I]^+$; (C₃₄H₄₀N₃OS⁺, calc. 538, 28866), para o corante **13**, e $m/z = 552,30339 [M-I]^+$; (C₃₅H₄₂N₃OS⁺, calc. 552, 30431), para o corante **14**.

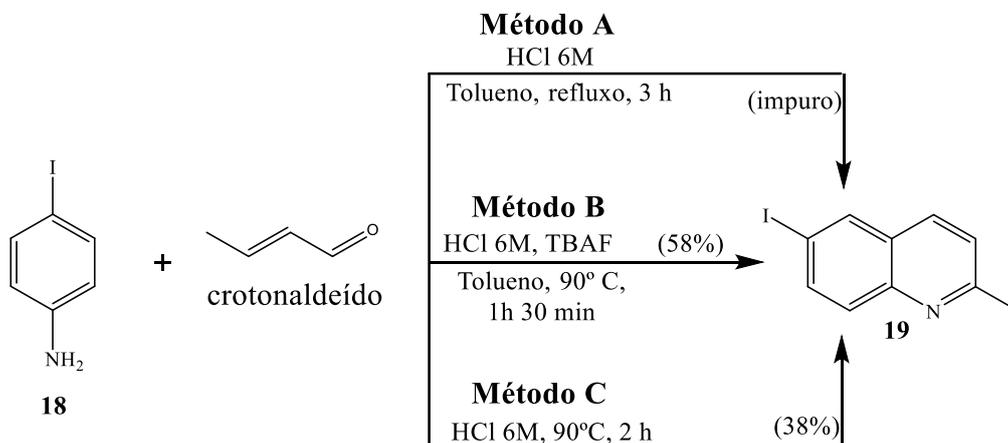
3.1.2. Síntese de corantes esquarílicos assimétricos derivados do benzotiazole e da 6-iodoquinaldina

Na continuação deste trabalho procedeu-se à síntese de corantes aminoesquarílicos assimétricos derivados do benzotiazole e da 6-iodoquinaldina. Como se pôde observar no esquema geral (Esquema 3.1, página 67), para obter o primeiro corante esquarílico **21**, deste grupo, fez-se reagir o composto **10**, uma vez que a sua síntese já tinha sido otimizada, com o iodeto de 6-iodo-1-hexilquinaldínio (**20**). Posteriormente, o corante **21** foi metilado, obtendo-se o corante esquarílico **22** e de seguida o grupo OCH₃ foi substituído por aminas apropriadas permitindo assim a obtenção dos respetivos corantes cianínicos aminoesquarílicos **23-26**.

Nos pontos seguintes serão discutidas as etapas seguidas para obtenção dos corantes pretendidos.

3.1.2.1. Síntese da 6-iodoquinaldina (**19**)

A síntese deste composto foi realizada por três métodos distintos, conforme o representado no esquema 3.13. Todos os métodos têm por base a reação de Doebner-Miller envolvendo a reação de *p*-iodoanilina e o crotonaldeído, na presença de HCl.



Esquema 3.13. Síntese da 6-iodo-quinaldina (**19**) por três métodos diferentes

Pelo **método A** tentou-se obter o composto **19** fazendo reagir 4-iodoanilina (**18**) com o crotonaldeído na presença de HCl 6 M em tolueno. Este método, adaptado da literatura (Matsugi *et al.*, 2000), não se mostrou eficaz para a obtenção do produto pretendido, uma vez que a sua purificação se mostrou muito difícil. Assim, tentou-se a obtenção do composto **19** utilizando outras vias sintéticas.

O **método B**, por sua vez, faz uso de um catalisador de transferência de fase, o TBAF, uma vez que a reação se dá num meio constituído por duas fases, uma aquosa e uma orgânica (tolueno). Relativamente ao método A, o método B, descrito por Reynolds *et al.* em 2010, apresenta duas diferenças: a temperatura, que é um pouco mais baixa, e a presença de um catalisador de transferência de fase. No entanto, neste método, foi necessário recorrer a uma coluna cromatográfica para obter o composto **19** puro, tendo-se conseguido obter o composto com o melhor rendimento (58%), entre todos os métodos sintéticos executados.

O **método C**, descrito por Leir em 1977, embora se tenha mostrado mais demorado, devido ao tratamento da mistura reacional, e tenha apresentado um menor rendimento (38%), permitiu obter o composto **19**, puro, sem recorrer a cromatografia em coluna. Para aumentar o rendimento deste método seria necessário proceder a pequenas alterações/ajustamentos do protocolo de modo a melhorá-lo, objetivo que não foi possível alcançar devido à falta de tempo.

Depois de se obter o composto **19** puro, na forma de cristais brancos, procedeu-se a diversas técnicas de caracterização nomeadamente p.f., IV e ^1H -RMN.

Relativamente ao ponto de fusão, cujo intervalo é 100-101 °C, pode-se verificar que este está relativamente próximo do referido na literatura, 108-109 °C (Jyothish *et al.*, 2007).

No que diz respeito aos dados espectroscópicos do composto, são de salientar, no espetro de IV, as bandas de absorção relativas à vibração das ligações C-H aromáticas (fraca) que surgem a 3047 cm^{-1} , das ligações C-H alifáticas (fraca) que aparecem a 2909 cm^{-1} e das ligações C=C aromáticas (médias e fracas) que surgem entre 1591-1551 cm^{-1} . No espetro de RMN de ^1H , onde se observa a totalidade dos sinais previstos para a estrutura molecular apresentada, são de salientar o sinal do grupo metilo ligado ao anel que surge a 2,73 ppm sob a forma de um singuleto de três prótons e os sinais referentes aos cinco prótons aromáticos que surgem entre 7,27-8,15 ppm, sob a forma de cinco dupletos de um próton cada.

3.1.2.2. Síntese do iodeto de 6-iodo-1-hexilquinaldínio (20)

Para se obter o sal quaternário de amônio **20** fez-se reagir a base heterocíclica **19**, obtida no ponto anterior, com um excesso de 1-iodo-hexano, em acetonitrilo, a refluxo, como evidenciado no esquema 3.14.



Esquema 3.14. Síntese do sal quaternário de amônio **20**

A reação ocorreu durante 5 dias sob condições reacionais que envolveram uma proporção de base heterocíclica **19** e de 1-iodo-hexano de 1:3 e aquecimento da mistura reacional a refluxo em acetonitrilo.

Para obtenção de um bom rendimento, e tal como se procedeu para os sais quaternários análogos sintetizados, o método, foi repetido mais duas vezes após isolamento da primeira fração. Assim, obteve-se o iodeto de 6-iodo-1-hexilquinaldínio (**20**), na forma de cristais amarelos, cromatograficamente puros, por precipitação em acetonitrilo, com um rendimento de 77%. Pacheco (2014) sintetizou no seu trabalho de estágio este sal quaternário de amônio tendo obtido um rendimento ligeiramente superior (85%) ao obtido neste trabalho.

Relativamente ao ponto de fusão que se encontra no intervalo de 219-220 °C, está próximo do obtido por Pacheco (2014), que foi 219-221 °C, e sendo um intervalo estreito mostra que o composto apresenta elevado grau de pureza.

No que diz respeito à caracterização espectroscópica do composto, salientam-se, no espectro de IV, as bandas de absorção relativas à vibração das ligações C-H aromáticas (fortes) que surgem a 3050 cm⁻¹, das ligações C-H alifáticas (fortes) que aparecem entre 2953-2936 cm⁻¹ e das ligações C=C aromáticas (fortes) entre 1597-1503 cm⁻¹.

No espectro de RMN de ¹H, que evidencia a totalidade dos sinais previstos para a estrutura molecular proposta para o composto **20**, salientam-se o sinal do grupo metilo da cadeia *N*-alquílica que surge a 0,89 ppm sob a forma de um singuleto de três prótons e os sinais correspondentes aos prótons dos grupos CH₂, da cadeia *N*-alquílica, que surgem na forma de vários multipletos, a desvios químicos compreendidos entre 1,30-1,88 ppm, com exceção do grupo CH₂ diretamente ligado ao átomo de azoto que surge a 4,87 ppm, sob a forma de um

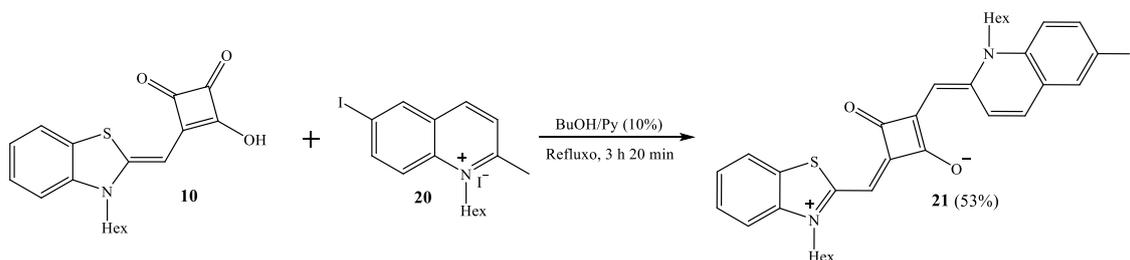
tripleto de dois prótons. Importa, ainda, referir a presença do sinal do grupo metilo ligado ao anel aromático que surge 3,08 ppm sob a forma de um singlete de três prótons e os sinais referentes aos cinco prótons aromáticos que surgem entre 8,13-8,97 ppm, sob a forma de cinco dupletos de um próton cada.

No espectro de RMN de ^{13}C é de salientar o sinal correspondente ao grupo metilo da cadeia *N*-alquílica, que surge a 14,04 ppm, a presença de cinco sinais correspondentes aos cinco grupos CH_2 da cadeia *N*-alquílica, que surgem a desvios químicos entre 22,16-51,52 ppm, sendo o pico que se apresenta a campo mais baixo (51,52 ppm) correspondente ao grupo CH_2 ligado diretamente ao átomo de azoto. O sinal que corresponde ao grupo metilo, diretamente ligado ao anel surge ao desvio químico de 22,87 ppm. Para este espectro, importa, ainda, referir a presença dos cinco sinais correspondentes aos grupos CH do anel aromático, que surgem entre os desvios químicos 120,94-144,42 ppm. As atribuições dos carbonos foram feitas com base nos espectros DEPT 90 e DEPT 135.

O espectro de espectrometria de massa de baixa resolução EM-ESI-TOF apresenta o íon molecular a $m/z = 354,07$, que corresponde ao íon $[\text{M}-\text{I}]^+$ de acordo com a estrutura apresentada.

3.1.2.3. Síntese do 2-[(1-hexil-6-iodoquinolin-2(1*H*)-ilideno)metil]-4-[(3-hexilbenzotiazole-3-*io*-2-*il*)metileno]-3-oxociclobut-1-en-1-olato (**21**)

Para obter o composto **21** fez-se reagir o corante semi-esquarílico **10** com o iodeto de 6-iodo-1-hexilquinaldínio (**20**) numa mistura de butanol/piridina (10%), a refluxo, durante 3 h e 20 min, tal como evidenciado no esquema 3.15.



Esquema 3.15. Síntese do corantes esquarílico **21**

Após tratamento da reação e recristalização com éter dietílico e uma mistura de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, seguida de uma lavagem dos cristais com metanol obteve-se o produto cromatograficamente puro com rendimento de 53%.

O composto **21** apresenta um intervalo de fusão de 143-144 °C que indica o elevado grau de pureza do composto, devido ao facto de apresentar uma diferença de apenas 1 °C. Contudo, estes valores não podem ser comparados devido à falta de valores de referência na literatura, uma vez que tanto quanto é do nosso conhecimento se trata de um composto novo.

Relativamente aos dados espectroscópicos do composto pode-se salientar, no espectro de IV, as bandas de absorção características relativas à vibração das ligações C-H aromáticas (fracas) que surgem a 3052 cm⁻¹, das ligações C-H alifáticas (fracas) entre 2912-2853 cm⁻¹ e das ligações C=C aromáticas (fraca e forte) entre 1549-1450 cm⁻¹. Contrariamente ao observado para o composto análogo **11**, derivado do benzotiazole e da quinaldina, é de notar que o espectro do composto **21** apresenta a banda de absorção característica relativa à vibração da ligação C=O, que aparece na zona dos 1729 cm⁻¹. Neste espectro deve-se ainda salientar a presença da banda de absorção característica relativa à vibração da ligação C-O (forte) que surge a 1253 cm⁻¹.

No espectro de RMN de ¹H aparecem todos os sinais esperados para a totalidade dos prótons presentes no referido composto. Neste espectro são de salientar os sinais dos dois grupos metilo das cadeias *N*-alquílicas que surgem a 0,91 ppm e a 0,94 ppm, sob a forma de dois tripletos de três prótons cada, respetivamente. Os sinais referentes aos prótons dos grupos CH₂ das cadeias *N*-alquílicas aparecem sob a forma de vários multipletos e um triplete largo a desvios químicos compreendidos entre 1,34-1,83 ppm, à exceção do pico correspondente aos prótons dos grupos CH₂ diretamente ligados ao átomo de azoto que surge sob a forma de um multiplete de quatro prótons entre 4,06-4,10 ppm. Deve-se também fazer referência à presença dos dois sinais que surgem, sob a forma de singuletos de um próton cada, a 5,73 ppm e 5,79 ppm, que correspondem aos prótons dos grupos C=CH da cadeia polimetínica, além dos sinais correspondentes aos nove prótons aromáticos que aparecem sob a forma de seis dupletos de um próton cada a 7,02, 7,13, 7,28, 7,55, 7,72 e 9,28 ppm, dois tripletos de um próton cada a 7,20 ppm e 7,37 ppm e de um singuleto de um próton a 7,77 ppm.

No espectro de RMN de ¹³C, cujas atribuições dos carbonos foram feitas com base nos espectros DEPT 90 e DEPT 135, são de salientar o sinal correspondente aos grupos metilo das cadeias *N*-alquílicas, que surge (por coincidência) ao desvio químico 13,92 ppm. Os sinais correspondentes aos grupos CH₂ das cadeias alquílicas encontram-se entre 22,44-47,98 ppm, sendo, os que se apresentam a campo mais baixo (46,17 e 47,98 ppm), correspondentes aos grupos CH₂ ligados diretamente aos átomos de azoto de cada uma das cadeias alquílicas. Importa ainda, referir a presença dos dois sinais das ligação C=CH da cadeia polimetínica que

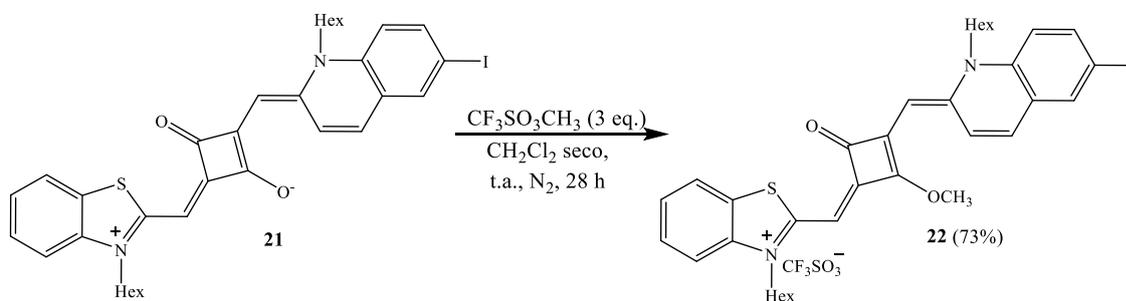
aparecem aos desvios químicos 85,41 ppm e 93,12 ppm, bem como, os nove sinais correspondentes aos dez carbonos C-H do anel aromático, que surgem entre os desvios químicos 111,26-139,18 ppm.

A massa exata encontrada para o corante **21** é $m/z = 664,16035$, corresponde ao ião molecular $[M]^+$; ($C_{34}H_{37}IN_2O_2S^+$, calc. 664,16149) e está de acordo com a estrutura apresentada.

3.1.2.4. Síntese de trifluorometanossulfonato de 3-hexil-2-[(3-[(1-hexil-6-iodoquinolin-2(1*H*)-ilideno)metil]-2-metoxi-4-oxociclobut-2-en-1-ilideno)metil]benzotiazole-3-íon (**22**)

O composto **22** foi sintetizado com base na reação de metilação descrita por Reis *et al.* em 2009, para corantes cianínicos esuarílicos simétricos e por Fagundes em 2013, para corantes assimétricos.

Assim, para se obter o composto **22** fez-se reagir o composto zwitteriônico **21**, anteriormente obtido, com o agente metilante $CF_3SO_3CH_3$, em diclorometano seco, sob atmosfera de azoto e à temperatura ambiente durante 28 h, conforme representado no esquema 3.16.



Esquema 3.16. Síntese do corante esuarílico **22**.

Esta reação envolveu uma proporção de composto **21** e agente metilante de 1:3, tendo-se obtido o composto pretendido, na forma de cristais castanho dourado, com rendimento de 73%.

O intervalo de fusão do composto **22** é 215-218 °C e não pode ser comparado devido à falta de valores de referência na literatura, por se tratar de um composto novo.

No que diz respeito aos dados espectroscópicos do composto são de salientar, no espectro de IV, as bandas de absorção características relativas à vibração das ligações C-H alifáticas (fracas) que aparecem entre 2955-2930 cm^{-1} , das ligações C=C aromáticas (fraca) a 1553 cm^{-1} e da ligação C-O (forte) que surge a 1258 cm^{-1} .

No espectro de RMN de ^1H observam-se todos os sinais correspondentes aos quarenta prótons existentes no composto. São de salientar os sinais dos prótons correspondentes aos dois grupos metilo das cadeias *N*-alquílicas que surgem a 0,87 ppm e 0,94 ppm, sob a forma de dois tripletos de três prótons cada. Os sinais referentes aos prótons correspondentes aos grupos CH_2 das cadeias *N*-alquílicas aparecem entre 1,27-1,87 ppm, sob a forma de multipletos e um quinteto, excetuando os quatro prótons correspondentes aos grupos CH_2 diretamente ligados ao átomo de azoto, da respetiva cadeia alquílica, que surgem a 4,32 ppm, sob a forma de um singuleto largo de dois prótons e, a 4,45 ppm sob a forma de um triplete também dois prótons. Neste espetro, é importante salientar ainda o sinal dos três prótons correspondentes ao grupo metilo diretamente ligado ao átomo de oxigénio do anel central de quatro membros (OCH_3), que surge a 4,65 ppm, sob a forma de um singuleto de três prótons. Este sinal é relevante porque marca a diferença entre o composto **21** e **22**. Deve-se ainda referenciar os dois sinais correspondentes aos prótons da ligação $\text{C}=\text{CH}$ da cadeia polimetínica que surgem a 5,60 ppm e 6,20 ppm, sob a forma de dois singuletos de um próton cada, para além dos sete sinais referentes aos nove prótons aromáticos que surgem sob a forma de um multiplete de três prótons entre 7,35-7,39 ppm, um triplete de um próton a 7,51 ppm, três dupletos de um próton cada a 7,61, 7,66 e 7,90 ppm, um singuleto de um próton a 7,96 ppm e um singuleto largo de um próton a 8,73 ppm.

Relativamente ao espectro de RMN de ^{13}C é de salientar os sinal correspondente aos grupos metilo das cadeias *N*-alquílicas, que, por coincidência, surgem a 13,96 ppm e os dez sinais correspondentes aos grupos CH_2 das cadeias alquílicas que se encontram entre 22,44-48,97 ppm, sendo aqueles que se apresentam a campo mais baixo (47,29 e 48,97 ppm) os correspondentes aos grupos CH_2 diretamente ligados aos átomos de azoto de cada uma das cadeias *N*-alquílicas. Neste espetro, importa ainda referir a presença do sinal referente ao grupo metilo correspondente ao grupo OCH_3 que surge a 61,52 ppm, além dos dois sinais das ligações $\text{C}=\text{CH}$ da cadeia polimetínica que aparecem aos desvios químicos 113,36 ppm e 117,44 ppm. Neste espetro deve-se, também salientar a presença dos nove sinais correspondentes aos nove carbonos das ligações $\text{C}-\text{H}$ do anel aromático, que aparecem entre os desvios químicos 122,41-140,95 ppm. As atribuições dos carbonos foram feitas com base nos espectros DEPT 90 e DEPT 135.

A massa exata encontrada para o corante **22**, é $m/z = 679,18313$ que corresponde ao ião molecular $[\text{M}-\text{CF}_3\text{SO}_3]^+$; ($\text{C}_{35}\text{H}_{40}\text{IN}_2\text{O}_2\text{S}^+$, calc. 679,18497) e está de acordo com a estrutura apresentada.

3.1.2.5. Síntese dos corantes cianínicos aminoescuarílicos assimétricos 23-26

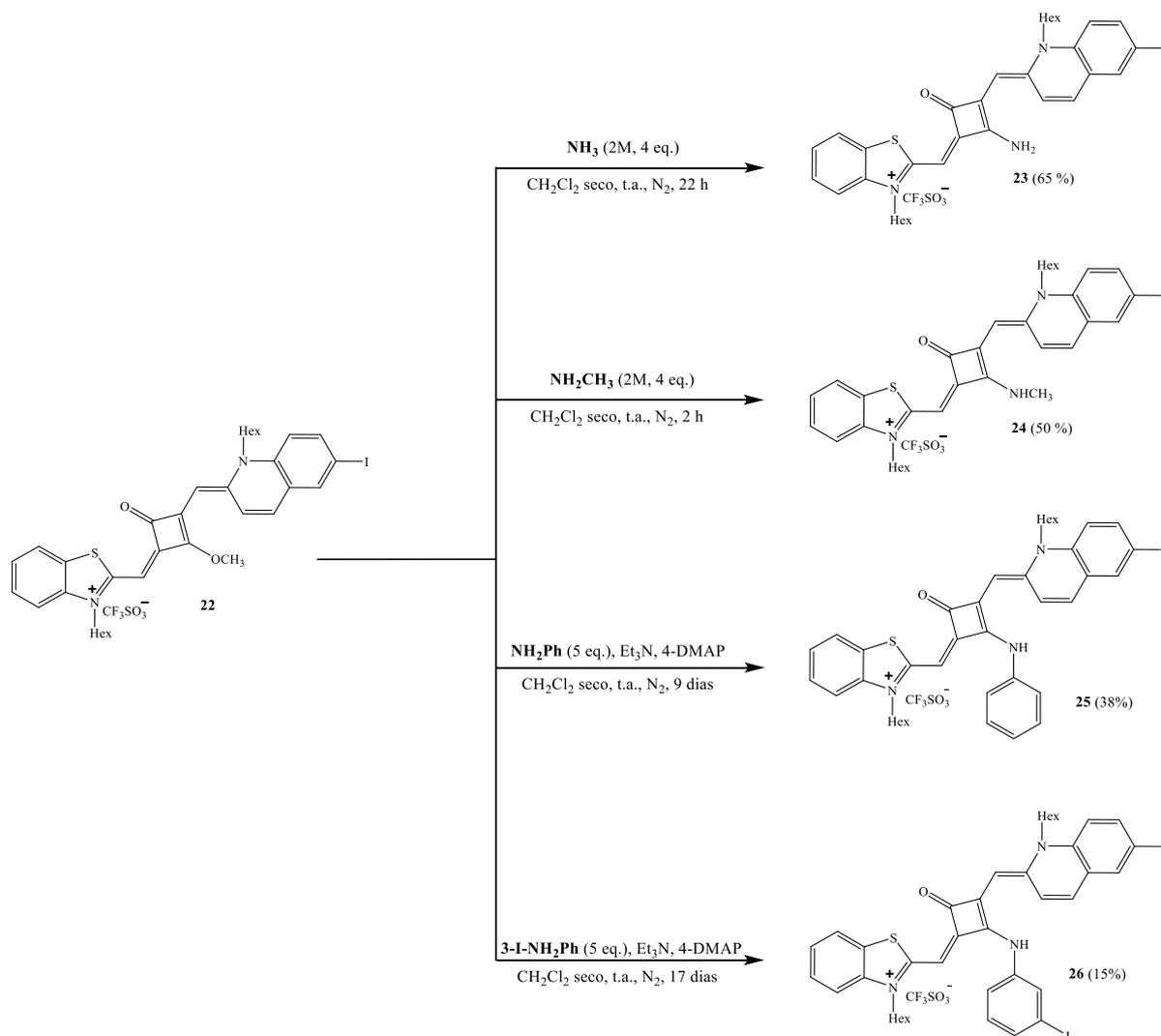
Tal como procedido para a síntese dos corantes derivados do benzotiazole e da quinaldina, todos corantes aminoescuarílicos derivados do benzotiazole e da 6-iodoquinaldina pretendidos (**23-26**) foram obtidos fazendo reagir o seu derivado *O*-metilado (neste caso, composto **22**) com as amins apropriadas (Esquema 3.17).

Em todos os casos, foi utilizado um excesso da correspondente amina em relação ao derivado *O*-metilado e nas reações com amins aromáticas, adicionaram-se os catalisadores trietilamina e 4-DMAP.

As condições reacionais para a obtenção dos corantes aminoescuarílicos **23-26** foram muito idênticas: CH₂Cl₂ seco, temperatura ambiente, atmosfera de azoto, e excesso de amina apropriada.

Os corantes **23** e **24** foram obtidos fazendo reagir o derivado *O*-metilado **22** com amónia e metilamina, respetivamente. Estas duas reações com amins alifáticas foram relativamente rápidas, apesar de a reação com amónia ter demorado quase um dia a terminar, tal como aconteceu na síntese do seu análogo derivado do benzotiazole e da quinaldina (**14**).

Por outro lado os corantes **25** e **26** foram obtidos fazendo reagir o derivado *O*-metilado **22** com anilina e iodoanilina, respetivamente. Nestes dois casos foram utilizados os catalisadores Et₃N e 4-DMAP de forma a acelerar as reações. No entanto e, porque as amins aromáticas são menos nucleófilas, estas reações mostraram-se muito demoradas, chegando a ultrapassar os 10 dias de reação, à temperatura ambiente. Comparativamente à síntese dos corantes análogos derivados do benzotiazole e da quinaldina (**15-17**), sintetizados neste trabalho, os tempos de reação são bastante semelhantes. Posteriormente, tentou-se efetuar a troca do contra-íão, uma vez que está descrito na literatura que a substituição do contra-íão CF₃SO₃⁻ pelo I⁻ aumenta a produção de oxigénio singuleto (Ferreira *et al.*, 2013b). No entanto, não foi possível efetuar a troca do contra-íão porque todos os corantes aminoescuarílicos derivados da 6-iodoquinaldina se mostraram insolúveis em metanol. Assim, após recristalização, obtiveram-se os compostos **23-25** com rendimentos considerados razoáveis, dado que estes se encontram entre 38-65%. Apenas o corante **26** foi obtido com um rendimento menos bom tendo este sido de apenas 15%. Estes rendimentos estão relativamente próximos dos obtidos para os corantes assimétricos análogos (**15-17**), derivados do benzotiazole e da quinaldina, descritos no ponto 3.1.1.11, nomeadamente o do corante **16**, análogo ao **26**, que apresenta o mesmo contra-íão.



Esquema 3.17. Síntese dos corantes aminosquarílicos **23-26**.

Relativamente às características físicas dos compostos **23-26**, pode-se verificar que o intervalo de fusão de todos os compostos aminosquarílicos derivados do benzotiazole e da 6-iodoquinaldina apresentam diferenças compreendidas entre 1-3 °C, o que mostra o elevado grau de pureza dos compostos. No entanto, e como já referido para os compostos anteriores (**21** e **22**), não existem valores de referência na literatura para se poder fazer comparações, uma vez que estes compostos são novos.

No que diz respeito aos dados espectroscópicos dos compostos são de salientar, no espetro de IV, as bandas de absorção características relativas à vibração das ligações C-H alifáticas entre 2926-2954 cm^{-1} , das ligações C=O (fracas) que aparecem entre 1623-1643 cm^{-1} , e das ligações C=C aromáticas (fracas, médias ou fortes) que surgem 1445-1553 cm^{-1} . Nos espetros de IV dos corantes **23** e **24** deve-se, salientar as bandas de absorção

características relativas à vibração da ligação N-H que surgem entre 3205-3319 cm^{-1} e que, curiosamente, não se verificam nos espectros dos corantes **25** e **26**. Sobre este espectro importa dizer que o facto de a banda do grupo carbonilo aparecer com intensidade fraca poderá ter origem na presença do átomo de azoto da amina, cujo carácter eletrodoador origina duas estruturas de ressonância fazendo com que a ligação C-O adquira um carácter intermédio entre o de ligação covalente dupla e o de ligação covalente simples, como referido no ponto 3.1.11 para os corantes aminoesquarílicos assimétricos derivados do benzotiazole e da quinaldina.

Relativamente aos espectros de RMN de ^1H dos corantes **25** e **26**, não foi possível proceder à caracterização espectroscópica, pelas mesmas razões descritas no ponto 3.1.11 para os compostos **15** a **17**. No entanto, pelos seus espectros de EMAR-ESI-TOF foi possível confirmar que estávamos perante os compostos pretendidos, uma vez que a massa exata encontrada está de acordo com as estruturas moleculares propostas, sendo $m/z = 740,21415$ correspondente ao ião molecular $[\text{M}-\text{CF}_3\text{SO}_3]^+$, ($\text{C}_{40}\text{H}_{43}\text{IN}_3\text{OS}^+$; calc. 740,21660) para o corante **25** e $m/z = 866,11128$ que corresponde ao ião molecular $[\text{M}-\text{CF}_3\text{SO}_3]^+$, ($\text{C}_{40}\text{H}_{42}\text{I}_2\text{N}_3\text{OS}^+$; calc. 866,11325) para o corante **26**.

Nos espectros de RMN de ^1H dos compostos **23** e **24** observam-se todos os sinais referentes a todos os protões previstos para as estruturas apresentadas. No espectro do corante **23** é de salientar a presença dos sinais correspondentes aos protões lábeis que surgem a 8,81 e 8,68 ppm, sob a forma de sois singuletos largos de um protão cada e que trocam com D_2O , tendo sido atribuídos aos protões do grupo amino. Importa ainda referir a presença dos sinais correspondentes aos protões das ligações C=CH da cadeia polimetínica que surgem sob a forma de dois singuletos de um protão cada a 5,85 e 6,10 ppm bem como a presença dos sinais de todos os protões das cadeias *N*-alquílicas que surgem entre 0,87-4,23 ppm, sendo o que se apresenta a campo mais baixo 4,23 ppm, sob a forma de um tripleto de quatro protões) correspondente aos protões dos grupos CH_2 diretamente ligados aos átomos de azoto e os sinais que se encontram a campo mais elevado (0,87 e 0,90 ppm, na forma de dois tripletos de 3 protões cada) os sinais correspondentes aos protões dos grupos metilo. Finalmente, deve-se salientar a presença dos sinais correspondentes a todos os protões aromáticos que surgem sob a forma de dois tripletos de um protão cada a 7,35 e 7,53 ppm, seis dupletos de um protão cada a 7,55, 7,63, 7,83, 7,93, 7,95 e 8,91 ppm e um singuleto de um protão a 8,16 ppm.

O espectro do composto **24** apresenta o dobro dos sinais para os protões existentes na molécula, o que se deve ao impedimento à livre rotação do grupo NHCH_3 , decorrente do carácter parcial da ligação dupla entre o átomo de azoto e o átomo de carbono do anel central

de quatro membros onde se liga, como já referido e verificado, no ponto 3.1.1.11, para os corantes assimétricos derivados do benzotiazole e da quinaldina.

Esse aumento do número de sinais neste espectro sugere uma perda de simetria molecular, tal como é claramente indicado pela separação dos sinais correspondentes aos prótons da cadeia polimetínica (C=CH), os quais surgem, neste espectro, entre os desvios químicos 5,75 ppm e 6,08 ppm sob a forma de quatro singuletos de um próton cada, contrariamente ao observado nos espectros dos seus precursores, e que colapsam a dois singuletos, de um próton cada, após aquecimento (Figura 3.4). A falta de assimetria molecular que conduz à não equivalência magnética dos vários picos é também visível nos sinais dos prótons metilénicos dos grupos CH₂ diretamente ligados ao átomo de azoto (Figura 3.4), que neste caso aparecem sob a forma de um singuleto largo de oito prótons a 1,64 ppm.

Uma grande diferença encontrada no espectro de RMN de ¹H do composto **24**, em comparação com o do corante **23** é a presença dos dois sinais correspondentes aos prótons metílicos do grupo NHCH₃, que surgem a 3,16 ppm e 3,23 ppm, sob a forma de um singuleto de três prótons e um singuleto largo também de três prótons, e que se convertem em apenas um singuleto de três prótons após aquecimento.

Tal como esperado, os espectros de RMN de ¹H dos compostos **23** e **24** são muito parecidos aos espectros dos corantes **13** e **14**, isto porque de facto as estruturas moleculares são muito semelhantes. A maior diferença observada entre eles é a ausência de um próton aromático nos espectros dos corantes **23** e **24** devido à existência do átomo de iodo ligado ao anel aromático na posição 6 da iodoquinaldina.

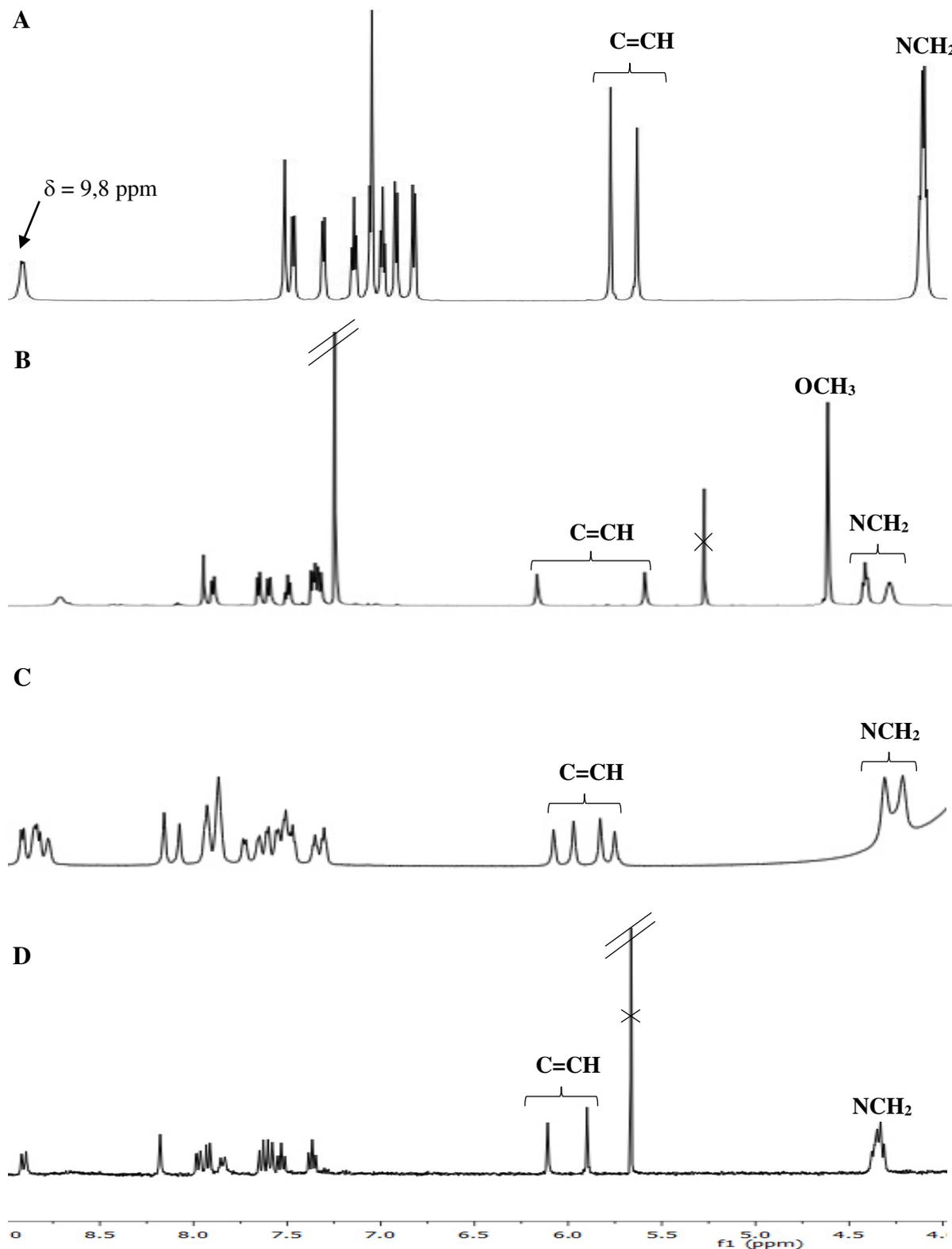


Figura 3.4. Espectros parciais de RMN de ^1H dos compostos **21**, **22** e **24**. A: espectro do corante **21** em CDCl_3 (600 MHz); B: espectro do corante **22** em CDCl_3 (600 MHz); C: espectro do corante **24** em DMSO (600 MHz); D: espectro do corante **24** em DMSO (400 MHz) a 90°C . Os picos assinalados com um x correspondem a uma contaminação do solvente.

Nos espectros de RMN de ^{13}C dos corantes **23** e **24**, verificam-se todos os sinais correspondentes a todos os carbonos presentes nas estruturas propostas e, tal como se observou no espectro de ^1H , o corante **24** apresenta no seu espectro de ^{13}C o dobro dos sinais, indicando a presença das duas conformações da molécula. As atribuições dos carbonos foram feitas com base nos espectros DEPT 90 e DEPT 135. Nestes espectros são de salientar os sinais dos grupos metilo das cadeias *N*-alquílicas que surgem, em ambos os casos, entre 14,03-14,13 ppm, os sinais correspondentes aos grupos CH_2 diretamente ligados ao átomo de azoto das cadeias *N*-alquílicas que aparecem entre 46,41-48,80 ppm e os sinais correspondentes aos grupos CH da ligação $\text{C}=\text{CH}$ das cadeias polimetínicas que surgem entre 86,24-94,23 ppm. Nos dois espectros deve-se ainda referir a presença de todos os sinais correspondentes aos grupos CH aromáticos que surgem, em ambos os casos, entre 113,15-140,42 ppm, bem como a presença dos sinais correspondentes a todos os carbonos dos grupos CH_2 alifáticos que aparecem entre 22,24-48,37 ppm, sendo que os sinais que se apresentam a campo mais baixo são correspondentes aos grupos CH_2 diretamente ligados ao átomo de azoto. No espectro do corante **24** deve-se ainda salientar a presença dos sinais correspondentes ao grupo CH_3 da amina que surgem a 30,26 ppm e a 30,50 ppm, e que estão, como seria de esperar, ausentes no espectro do corante **23**. São ainda de notar as semelhanças destes espectros com os espectros de ^{13}C dos respetivos corantes análogos, **13** e **14**, derivados do benzotiazole e da quinaldina, onde a maior diferença encontrada é a ausência de um sinal correspondente a um grupo CH aromático, devido à presença do átomo de iodo ligado ao anel aromático na posição 6 da iodoquinaldina.

Nos espectro de EMAR-ESI-TOF dos corantes **23** e **24** a massa exata encontrada está de acordo com as estruturas apresentadas, sendo $m/z = 664,18409$ e que corresponde ao ião molecular $[\text{M}-\text{CF}_3\text{SO}_3]^+$, ($\text{C}_{34}\text{H}_{39}\text{IN}_3\text{OS}^+$; calc. 664,18530) para o corante **23**, e $m/z = 678,19974$ que corresponde ao ião molecular $[\text{M}-\text{CF}_3\text{SO}_3]^+$; ($\text{C}_{35}\text{H}_{41}\text{IN}_3\text{OS}^+$, calc. 678,20095) para o corante **24**.

3.2. Espetros no Visível

Como já foi referido anteriormente, um dos principais requisitos para que um corante seja considerado um potencial fotossensibilizador para PDT é este possuir uma forte e intensa absorção na região do visível e infravermelho próximo (600 – 850 nm), zona também designada por “janela fototerapêutica” (Castano *et al.*, 2004; O’Connor *et al.*, 2009; Robertson *et al.*, 2009; Avirah *et al.*, 2012; Ormond e Freeman, 2013). Deste modo, traçou-se o espectro de absorção no Visível de todos os corantes a fim de tentar perceber se estes preenchem, ou não, este requisito.

Foram traçados espectros usando dois solventes diferentes para cada composto: um em DMSO, a diferentes concentrações, para se poder calcular a absorvidade molar pela lei de Beer-Lambert e, outro em DMEM para determinar o comprimento de onda de emissão dos LED a serem, posteriormente, utilizados na irradiação das células.

3.2.1. Espetros no Visível dos corantes esquarílicos assimétricos derivados do benzotiazole e da quinaldina

Na figura 3.5 encontram-se os espectros de absorção no Visível dos corantes esquarílicos assimétricos derivados do benzotiazole e da quinaldina sintetizados (**11-17**), usando como solvente o DMSO.

Como se pode observar na figura 3.5, os corantes deste grupo apresentam valores para o comprimento de onda máximo que variam entre 666-714 nm, com bandas de absorção estreitas. Além disso, estes compostos apresentam valores de absorvidade molar bastante elevados, cujo $\log \epsilon$ varia entre 5,06-5,25. Os valores de comprimento de onda de absorção obtidos situam-se dentro da chamada janela fototerapêutica, respeitando um dos parâmetros a ter em conta na seleção de um composto como fotossensibilizador para PDT. No entanto, pela análise da figura 3.5, pode-se ainda verificar que todos os compostos amino-esquarílicos derivados do benzotiazole e da quinaldina, apresentam um desvio hipsocrómico, em relação ao correspondente composto zwitteriónico **11**, sendo o derivado *O*-metilado **12** o composto que apresenta um desvio mais acentuado, tal como verificado em 2009 por Reis *et al.* para corantes esquarílicos simétricos derivados da quinaldina. No entanto, a mesma autora verificou que em corantes simétricos derivados de benzotiazole ou benzoselenazole com a metilamina como substituinte do anel central de quatro membros apresentavam desvios batocrómico em relação

aos respetivos corantes zwitteriônicos (Reis *et al.*, 2009). Assim, com estes resultados apenas podemos ver que, neste caso, a presença do grupo amina se manifesta através de um ligeiro efeito hipsocrômico.

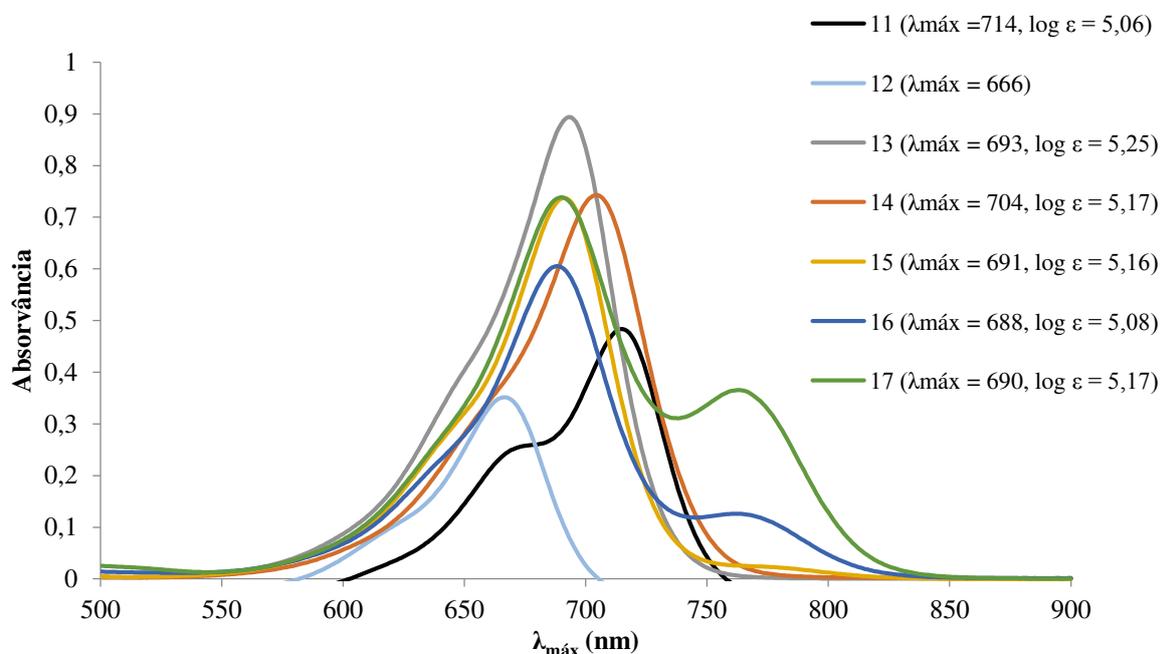


Figura 3.5. Espectros de absorção no Visível dos corantes esquarílicos assimétricos derivados do benzotiazole e da quinaldina em DMSO

Na literatura são reportados comprimentos de onda de absorção semelhantes (≈ 700 nm) para compostos esquarílicos simétricos derivados da quinaldina (Ferreira, 2013a) e ligeiramente mais baixos (≈ 660 nm) para compostos esquarílicos simétricos derivados do benzotiazole (Guerra, 2012), bem como para compostos esquarílicos assimétricos derivados do benzoselenazole e do 6-iodobenzotiazole (≈ 680 nm; Fagundes, 2013).

Quando dissolvidos em DMEM (Figura 3.6) os corantes apresentam um comportamento diferente daquele que se observa quando dissolvidos em DMSO. Em DMEM as bandas de absorção são largas e menos intensas, o que pode ser explicado pela eventual formação de agregados em meio aquoso (Macdonald e Dougherty, 2001). Verifica-se ainda que o composto **13** (que tem o grupo NH_2 como substituinte no anel central de quatro membros) apresenta um ligeiro efeito hipsocrômico em relação ao corante zwitteriônico **11**. Os compostos **16** e **17** (que têm uma amina aromática com um átomo de iodo e apenas diferem no seu contra-íão) mostram um ligeiro desvio batocrômico em relação ao composto zwitteriônico. Para os restantes corantes não se registam alterações significativas dos desvios em relação ao corante zwitteriônico **11**.

Todos os corantes cianínicos esquarílicos derivados do benzotiazole e da quinaldina, quando dissolvidos em DMEM, apresentam comprimentos de onda de absorção mais baixo, compreendidos entre 630-660 nm. No entanto, este comportamento dos corantes cianínicos esquarílicos, quando dissolvidos em DMEM, também foi verificado por Fagundes (2013) para compostos esquarílicos assimétricos derivados do 6-iodobenzotiazole e do benzoselenazole e por Ferreira (2013a), para compostos esquarílicos simétricos derivados da quinaldina.

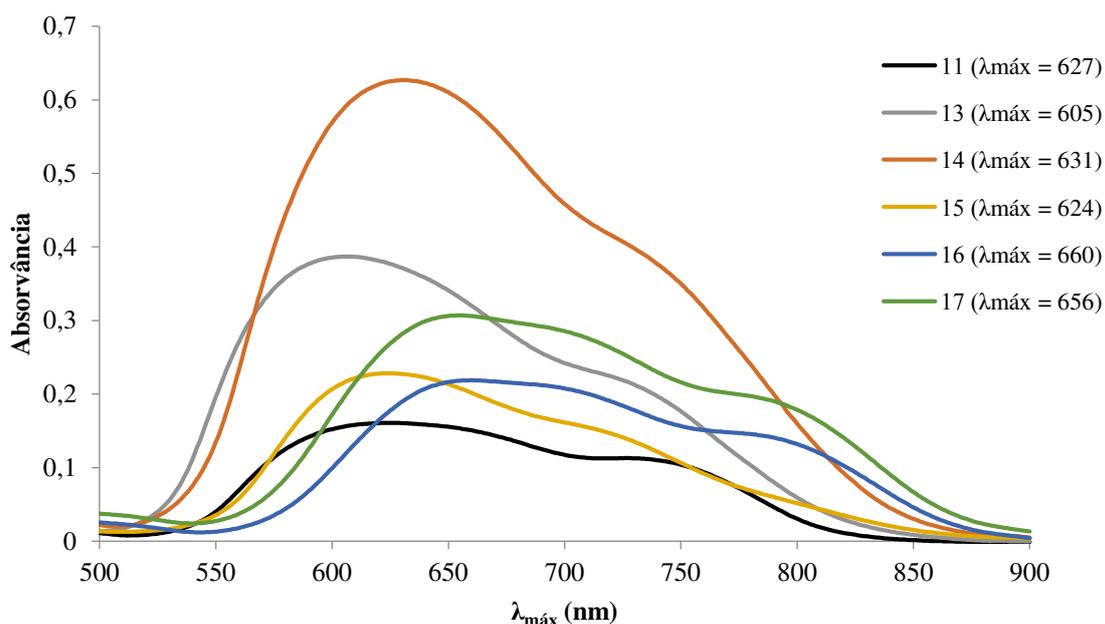


Figura 3.6. Espectros de absorção no Visível dos corantes esquarílicos assimétricos derivados do benzotiazole e da quinaldina, em DMEM

Como, neste caso, os valores dos picos de absorção máxima variam entre 605-660 nm escolheu-se como comprimentos de onda de emissão dos LEDs para irradiação 630 nm para os compostos **11**, **13**, **14** e **15** e 660 nm para os compostos **16** e **17**.

3.2.2. Espectros no Visível dos corantes esquarílicos assimétricos derivados do benzotiazole e da 6-iodoquinaldina

Na figura 3.7 encontram-se os espectros de absorção no Visível dos corantes esquarílicos assimétricos derivados do benzotiazole e da 6-iodoquinaldina sintetizados (**21-26**), usando como solvente o DMSO. Quando dissolvidos em DMSO, os corantes **21-26** apresentam o mesmo comportamento observado para os corantes esquarílicos assimétricos derivados do benzotiazole e da quinaldina. Observam-se bandas de absorção estreitas dentro da “janela fototerapêutica”, sendo que os valores de comprimento de onda de absorção máxima registrados

variam entre 677-726 nm. Além disso, todos os compostos apresentam valores de absorvidade molar elevada, estando os $\log \epsilon$ entre 4,65-5,26. Pode-se ainda verificar que todos os compostos apresentam um ligeiro desvio hipsocrômico relativamente ao corante zwitteriônico **21**. No entanto, esse desvio é mais acentuado para o derivado *O*-metilado **22**, tal como verificado para os corantes **11-17**.

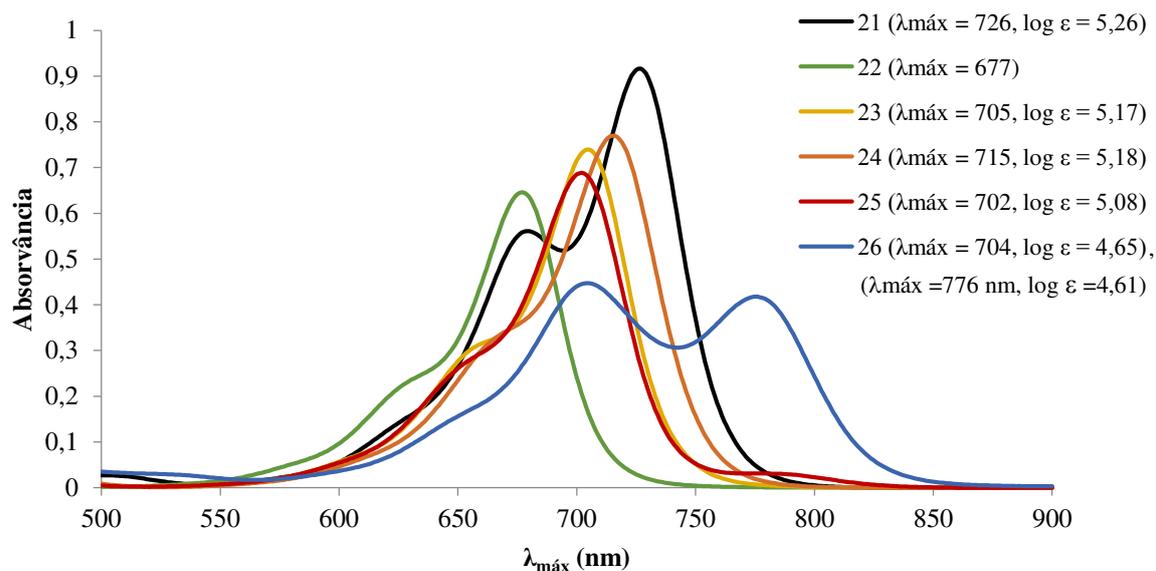


Figura 3.7. Espectros de absorção no Visível dos corantes esquarílicos assimétricos derivados do benzotiazole e da 6-iodoquinaldina em DMSO

Por outro lado, e contrariamente ao esperado, o corante **26**, que apresenta, como substituinte no anel central de quatro membros, uma amina aromática com um átomo de iodo, exibe, no seu espectro de absorção no Visível, dois picos de absorção máxima a comprimentos de onda distintos (704 nm e 776 nm), com absorvidade molar semelhante (4,65 e 4,61, respetivamente).

Na literatura são reportados valores comprimentos de onda de absorção superiores (739-755 nm) para compostos esquarílicos simétricos derivados da 6-iodoquinaldina (Pacheco, 2014). No entanto, para compostos esquarílicos simétricos derivados do benzotiazole os valores reportados na literatura são bastante mais baixos (650-663 nm) que os obtidos neste trabalho (Guerra, 2012). Por outro lado, Fagundes (2013) sintetizou corantes esquarílicos assimétricos derivados do benzoselenazole e do 6-iodobenzotiazole, e verificou que os seus compostos absorviam a comprimentos de onda próximos (671-689 nm) dos obtidos para os corantes esquarílicos assimétricos derivados do benzotiazole e da 6-iodoquinaldina **21-26**.

Posteriormente, para se determinar o comprimento de onda de emissão a ser escolhido, para a construção dos LEDs, traçaram-se os espectros de absorção no Visível de todos os compostos a serem aplicados nas células, usando como solvente o DMEM (Figura 3.8).

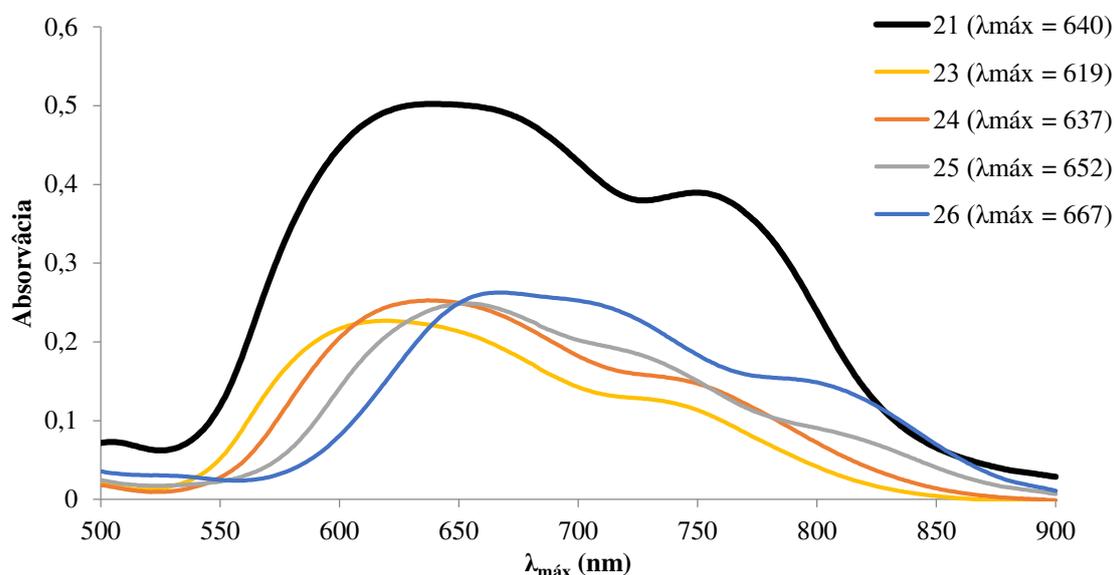


Figura 3.8. Espectros de absorção no Visível dos corantes esuarfílicos assimétricos derivados do benzotiazole e da 6-iodoquinaldina em DMEM

À semelhança dos corantes derivados do benzotiazole e da quinaldina, para os corantes derivados do benzotiazole e da 6-iodoquinaldina observaram-se bandas de absorção largas quando dissolvidos em DMEM. Verifica-se, também, que o corante **23** apresenta um ligeiro desvio hipsocrómico e os corantes **25** e **26** mostram um ligeiro desvio batocrómico em relação ao corante zwitteriónico **21**. Apenas para o corante **24** não foram registadas alterações significativas do desvio em relação ao corante zwitteriónico **21**. Estes corantes cianínicos esuarfílicos, derivados do benzotiazole e da 6-iodoquinaldina, também apresentam comprimentos de onda de absorção mais baixo, quando dissolvidos em DMEM, tal como verificado para os compostos análogos **11-17**, derivados do benzotiazole e da quinaldina.

Uma vez que os valores de absorção máxima destes corantes, em DMEM, variam entre 619-667 nm, escolheu-se como comprimento de onda de emissão dos LEDs 630 nm para irradiação dos compostos **21**, **23** e **24**, e 660 nm para irradiação dos compostos **25** e **26**.

3.3. Avaliação da capacidade de formação de oxigénio singuleto (1O_2) por parte de todos os corantes esquarílicos assimétricos sintetizados

Como já referido anteriormente, considera-se que, na PDT, a formação de 1O_2 , após irradiação do corante, é a principal causa de dano celular, que leva à destruição do tecido lesado (Konan *et al.*, 2002; Allison e Moghissi, 2013). Deste modo, procedeu-se à avaliação da capacidade de formação de 1O_2 por parte dos corantes esquarílicos zwitteriónicos **11** e **21** e dos corantes aminoesquarílicos **13-17** e **23-26** sintetizados, de forma a tentar perceber qual o seu potencial para aplicação em PDT.

Na tabela 3.16 encontram-se representados os valores do rendimento quântico ($\Phi\Delta$) de formação de 1O_2 de cada corante cianínico esquarílico assimétrico sintetizado.

Tabela 3.1. Rendimentos quânticos de formação de oxigénio singuleto por parte dos corantes cianínicos esquarílicos e aminoesquarílicos assimétricos sintetizados

<i>Estrutura do composto</i>	<i>Nº do composto</i>	<i>X⁻</i>	<i>Y</i>	<i>W</i>	$\Phi\Delta$
	11	-	H	O ⁻	0,03
	13	I	H	NH ₂	0,05
	14	I	H	NHMe	0,04
	15	I	H	NHPh	0,08
	16	CF ₃ SO ₃	H	3-I-NHPh	0,02
	17	I	H	3-I-NHPh	0,11
	21	-	I	O ⁻	0,03
	23	CF ₃ SO ₃	I	NH ₂	0,03
	24	CF ₃ SO ₃	I	NHMe	0,05
	25	CF ₃ SO ₃	I	NHPh	0,03
	26	CF ₃ SO ₃	I	3-I-NHPh	0,04

Tal como previsto, o corante **11** foi o que apresentou um menor rendimento quântico de formação de 1O_2 , uma vez que não apresenta nenhum átomo de iodo na sua estrutura. No entanto e contrariamente ao esperado, quando se introduziu um átomo de iodo na estrutura (corante **23**), não se registou nenhum aumento do rendimento quântico de formação de 1O_2 .

A introdução de grupos amino no anel central de quatro membros dos compostos derivados do benzotiazole e da quinaldina aumentou ligeiramente o rendimento quântico de formação de 1O_2 , sendo o valor mais elevado registado quando se introduziu o átomo de iodo no anel de benzeno (composto **17**). Este registo era espectável uma vez que, no conjunto dos compostos derivados do benzotiazole e da quinaldina, o corante **17** é o que apresenta o maior número de átomos de iodo na estrutura, confirmando assim a teoria de quanto maior o número de átomos pesados introduzidos na estrutura molecular, maior é o seu rendimento quântico de formação de 1O_2 (Avirah *et al.*, 2012). Resultados semelhantes, embora com valores de rendimento quântico de formação de 1O_2 ligeiramente superiores (0,14-0,26), para corantes esquarílicos assimétricos derivados de benzoselenazole e 6-iodobenzotiazole, foram descritos na literatura (Fagundes, 2013). Curiosamente, nos compostos derivados do benzotiazole e da 6-iodoquinaldina, a introdução de grupos amino no anel central de quatro membros não influenciou o rendimento quântico de formação de 1O_2 . Porém, como estes compostos apresentam um átomo de iodo na sua estrutura deveriam apresentar rendimentos quânticos superiores aos verificados para os compostos análogos derivados do benzotiazole e da quinaldina. Além disso, era esperado que o corante **26** apresentasse um rendimento quântico de formação de 1O_2 , pelo menos, semelhante ao obtido para o corante **17**, uma vez que o número de átomos de iodo presente nas duas moléculas é igual. No entanto, o contra-íão presente nos dois grupos de compostos é diferente, o que por si só, pode influenciar o rendimento quântico de formação de 1O_2 , tal como se pode constatar com os compostos **16** e **17** e tal como Ferreira *et al.* (2013b) verificou em corantes amino-esquarílicos simétricos derivados de benzotiazole. Além disso, Pacheco (2014) registou valores da mesma ordem de grandeza para corantes amino-esquarílicos simétricos derivados de 6-iodoquinaldina com o mesmo contra-íão dos corantes amino-esquarílicos assimétricos, derivados do benzotiazole e da 6-iodoquinaldina, sintetizados neste trabalho. Contudo, os baixos rendimentos quânticos registados, neste trabalho, poderão ser explicados pela propensão destes compostos para a formação de agregados (Macdonald e Dougherty, 2001) ou por rigidez da molécula que impeça a transferência de energia pelo cruzamento intersistema e assim reduza o rendimento quântico de formação de 1O_2 (Kaloyanova *et al.*, 2012; Tatikolov, 2012).

3.4. Conclusões

Face ao acima exposto podemos concluir que embora a obtenção do corante **11** *via* quinaldina se tenha mostrado fracassada, o método de síntese utilizado para a obtenção dos corantes esquarílicos assimétricos *via* benzotiazole se mostrou bastante eficaz na obtenção dos mesmos. Mesmo assim, para a obtenção, nomeadamente, do corante zwitteriônico **11**, o método sintético *via* benzotiazole necessita de ser otimizada em várias etapas, de modo a conseguir obter os compostos com melhor rendimento.

A utilização do método de síntese dos corantes amino-esquarílicos assimétricos *via* intermediário *O*-metilado mostrou-se efetiva na obtenção dos compostos tendo-se conseguido obter os corantes pretendidos com rendimentos bastante razoáveis, sendo que apenas os corantes **16** e **17**, **25** e **26** foram obtidos com rendimentos mais baixos.

Relativamente à caracterização física e espectroscópica dos corantes podemos concluir que os dados estavam de acordo com as estruturas moleculares propostas e que, no geral, os dados possíveis de comparação estavam concordantes os valores encontrados na literatura.

Foi possível, ainda, verificar que todos os corantes esquarílicos e amino-esquarílicos sintetizados cumprem um dos principais requisitos de FS para aplicação em PDT, visto que todos apresentam os picos de absorção máxima a comprimentos de onda próximos de 700 nm (quando dissolvidos em DMSO). Apesar de os compostos possuírem picos de absorção máxima próximos de 630 ou 660 nm quando dissolvidos em DMEM, ainda se encontram dentro da “janela fototerapêutica”.

No que diz respeito ao rendimento quântico de formação de oxigénio singuleto não se conseguiu comprovar que a introdução do átomo de iodo (átomo pesado) na estrutura molecular induz aumento de produção de oxigénio singuleto. Contudo, foi possível verificar que o contra-íon influencia esses valores, sugerindo que na possibilidade de trocar o contra-íon CF_3SO_3^- por I^- , em todos os corantes amino-esquarílicos derivados do benzotiazole e da 6-iodoquinaldina, os valores de produção de oxigénio singuleto poderão aumentar.

Capítulo 4

APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS DE CITOTOXICIDADE

Neste capítulo são apresentados os resultados de citotoxicidade dos corantes esquarílicos e aminoescuarílicos assimétricos sintetizados. Avaliou-se o potencial destes corantes para aplicação em PDT, expondo as células aos compostos e fazendo ensaios com diferentes tempos de irradiação e diferentes tempos de exposição aos corantes irradiados. A aplicação de várias concentrações permite avaliar o intervalo de segurança. No final deste capítulo são apresentadas as principais conclusões no que se refere ao potencial fototerapêutico dos corantes sintetizados.

4.1. Avaliação do potencial fototerapêutico dos corantes esquarílicos e aminoesquarílicos assimétricos em linhas celulares Caco-2 e HepG2

Neste trabalho foram sintetizados vários corantes esquarílicos e aminoesquarílicos com o intuito de avaliar o seu potencial como FS para aplicação em PDT do cancro. Estes corantes foram sintetizados de acordo com os métodos descritos no Capítulo 2 e serão designados, ao longo deste capítulo pelos números anteriormente atribuídos. Os compostos estão divididos em dois grupos: i) derivados do benzotiazole e da quinaldina (corantes **11-17**); ii) derivados do benzotiazole e da 6-iodoquinaldina (corantes **21-26**). No Anexo A (página 152) encontra-se uma tabela resumo com as principais características de todos os compostos a serem testados.

Para determinar o potencial fototerapêutico dos corantes sintetizados, fez-se um ensaio *in vitro* com duas linhas celulares (Caco-2 e HepG2), onde se aplicaram várias concentrações dos corantes às células e se usaram várias condições de irradiação.

Após 24 h de incubação das células com os compostos, a diferentes concentrações, diluídos em meio de cultura sem soro, as células foram sujeitas a três condições de irradiação distintas: i) sem irradiação (0 min), onde a placa de cultura foi retirada da incubadora e deixada à temperatura ambiente e ao abrigo da luz natural durante 14 min, para que todas as células fossem expostas às mesmas condições de temperatura durante o ensaio de irradiação; ii) irradiação durante 7 min, ao abrigo da luz natural, para que a luz incidente nas células fosse apenas a dos LEDs, e à temperatura ambiente; e iii) irradiação durante 14 min, também ao abrigo da luz natural e à temperatura ambiente.

Neste ensaio ainda se testou o efeito da exposição das células ao corante irradiado. Após o ensaio de irradiação, deixaram-se as células em contacto com os corantes irradiados durante 1 h ou 24 h. Decorrido esse tempo, o meio com o corante foi removido, as células foram lavadas duas vezes com PBS e adicionou-se, a cada poço, 100 µL de uma solução de Alamar Blue a 10% (v/v) em meio de cultura sem soro.

No final, após 4 a 5 h de incubação das células com Alamar Blue, as absorvâncias foram registadas a 570 e 620 nm, para posteriormente quantificar a viabilidade celular, através do cálculo da percentagem de redução do Alamar Blue, de acordo com o descrito na secção 2.2.9.

4.1.1. Efeito citotóxico dos corantes esquarílicos e aminoesquarílicos assimétricos

Um dos pré-requisitos para um FS ideal é este ser não tóxico no escuro (Alisson *et al.*, 2004; O'Connor *et al.*, 2009; Avirah *et al.*, 2012). Deste modo, neste trabalho avaliou-se a citotoxicidade dos corantes sem estes serem irradiados. Para isso, expôs-se as células a várias concentrações dos corantes não sujeitos à irradiação, mas mantendo todas as outras variáveis.

4.1.1.1. Efeito citotóxico dos corantes esquarílicos e aminoesquarílicos assimétricos derivados de quinaldina

Após exposição das células aos corantes **11** a **17**, pôde observar-se que, na linha celular Caco-2 (Figura 4.1 A e B), todos os compostos derivados do benzotiazole e da quinaldina apresentaram citotoxicidade no escuro, na concentração mais alta (10,0 μM). No entanto, os corantes **11**, **16** e **17** não apresentaram uma perda total de viabilidade celular. Contudo, pelas normas Gras Status estes corantes são considerados tóxicos, para a concentração de 10,0 μM , uma vez que reduzem a viabilidade celular em mais de 30% (International Organization for Standardization, 2009).

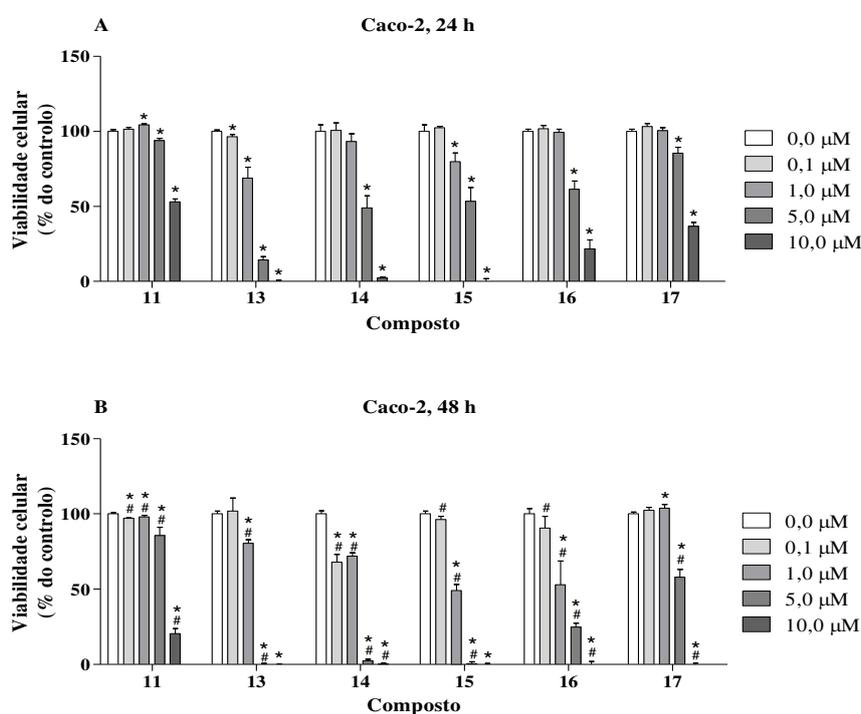


Figura 4.1. Efeito citotóxico dos corantes esquarílico **11** e aminoesquarílicos **13** a **17** derivados do benzotiazole e da quinaldina na linha celular Caco-2, após exposição aos corantes durante 24 h (A) e 48 h (B). Os símbolos acima das barras correspondem às diferenças encontradas após análise estatística, sendo: * controlo vs outras concentrações; # diferentes tempos de exposição ao corante.

Quando as células Caco-2 foram expostas aos corantes **11** e **17**, durante 24 h (Figura 4.1 A), não se verificou perda de viabilidade até à concentração de 5,0 μM , indicando que não são tóxicos para estas células até essa concentração. No entanto, quando as células foram expostas a 5,0 μM do corante **17**, durante 48 h (Figura 4.1 B), a viabilidade das células Caco-2 reduziu para aproximadamente 50%, indicando aumento da toxicidade com o tempo de exposição. Os corantes **14** e **16** não apresentaram toxicidade no escuro, para as células Caco-2, até à concentração de 1,0 μM (Figura 4.1 A), em condição de 24 h de exposição, mas induziram morte celular quando se prolongou o tempo de exposição para 48 h (Figura 4.1 B).

Para a linha celular HepG2 (Figura 4.2 A e B) os compostos derivados do benzotiazole e da quinaldina mostraram-se mais citotóxicos. No geral, todos os compostos reduziram a viabilidade celular das células HepG2, em quase 100%, à concentração de 10,0 μM , às 24 e 48 h de exposição.

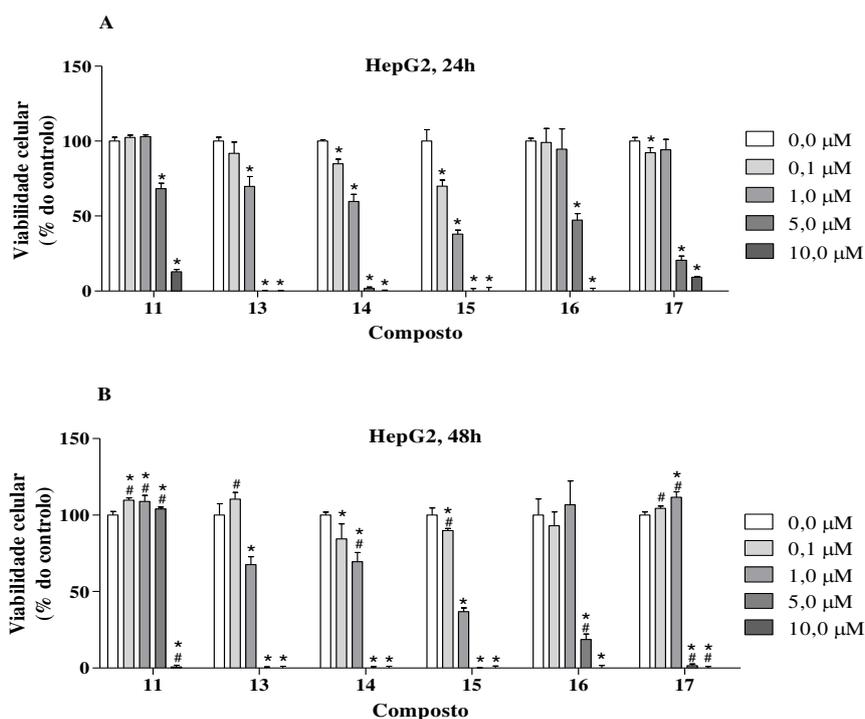


Figura 4.2. Efeito citotóxico dos corantes esquarílico **11** e aminoesquarílicos **13-17** derivados do benzotiazole e da quinaldina na linha celular HepG2, após exposição aos corantes durante 24 h (A) e 48 h (B). Os símbolos acima das barras correspondem às diferenças encontradas após análise estatística, sendo: * controlo vs outras concentrações; # diferentes tempos de exposição ao corante.

A concentração de 5,0 μM também se mostrou muito tóxica, nomeadamente para corantes **13**, **14**, **15** e **17**, reduzindo a viabilidade para valores próximos de 0% (Figura 4.2 A e B). Apenas o corante **11** se mostrou não tóxico à concentração de 5,0 μM , apesar de este induzir

uma ligeira redução de viabilidade celular (cerca de 30%), para 24 h de exposição (Figura 4.2 A). Contudo para 48 h de exposição (Figura 4.2 B) a concentração de 5,0 μM não induziu redução da viabilidade celular, comparando com o controlo. Este fenómeno pode ser explicado por uma possível adaptação das células ao corante, isto é, como as células HepG2 são originárias de um hepatocarcinoma e expressam características dos hepatócitos, podem de alguma forma, conseguir metabolizar o corante, degradando-o em metabolitos não tóxicos, o que permitirá a multiplicação celular, após um determinado tempo de adaptação (Wilkening *et al.* 2003).

Os corantes **11**, **16** e **17** não induziram perda de viabilidade até à concentração de 1,0 μM , sendo que a viabilidade celular não foi negativamente influenciada com o aumento do tempo de exposição das células HepG2 aos três corantes (Figura 4.2 A e B), contrariamente ao observado para as células Caco-2 que, quando expostas ao corante **16**, durante 48 h (Figura 4.1 B), perderam cerca de 50 % da sua viabilidade.

Com estes resultados, pode-se então verificar que a linha celular HepG2 é mais suscetível aos corantes esquarílicos e amino-esquarílicos derivados do benzotiazole e da quinaldina, uma vez que, no geral, a viabilidade celular foi bastante mais afetada que na linha celular Caco-2. Por outro lado, os corantes, que apresentaram o comportamento esperado no escuro, só poderão ser considerados potenciais FS, para aplicação em PDT do cancro, se às concentrações a que não são tóxicos no escuro apresentarem citotoxicidade após serem ativados por luz. No caso dos corantes **16** e **17**, que não apresentam citotoxicidade no escuro, para as células Caco-2, até às concentrações de 1,0 μM e 5,0 μM , respetivamente, o período de incubação até à irradiação não poderá exceder as 24 h, uma vez que ultrapassando esse tempo o corante torna-se tóxico. Para o corante **11**, é necessário avaliar o efeito, na viabilidade celular, do solvente utilizado na sua dissolução (uma vez que este foi diferente do usado nos restantes compostos), para podermos então concluir sobre a toxicidade do corante. Mas, estes efeitos serão analisados mais à frente.

4.1.1.2. Efeito citotóxico dos corantes esquarílicos e aminoesquarílicos derivados do benzotiazole e da 6-iodoquinaldina

Depois de se exporem as células aos corantes **21** a **26** verificou-se que, no geral, os corantes derivados do benzotiazole e da 6-iodoquinaldina induziram uma ligeira toxicidade no escuro, para as células Caco-2 (Figura 4.3 A e B) e HepG2 (Figura 4.4 A e B). Para as 24 h de exposição, o corante **25** não se apresentou tóxico para as células Caco-2 (Figura 4.3 A) à concentração de 10,0 μM . Os restantes, apesar de serem muito tóxicos para as células Caco-2, a essa concentração, não reduziram a viabilidade celular em 100%. Contudo, quando se prolongou o tempo de exposição para 48 h (Figura 4.3 B), verificou-se uma perda acentuada da viabilidade celular, sendo que o corante **25** passou a ser tóxico para as células e os corantes **23**, **24** e **26** aboliram a viabilidade das células Caco-2.

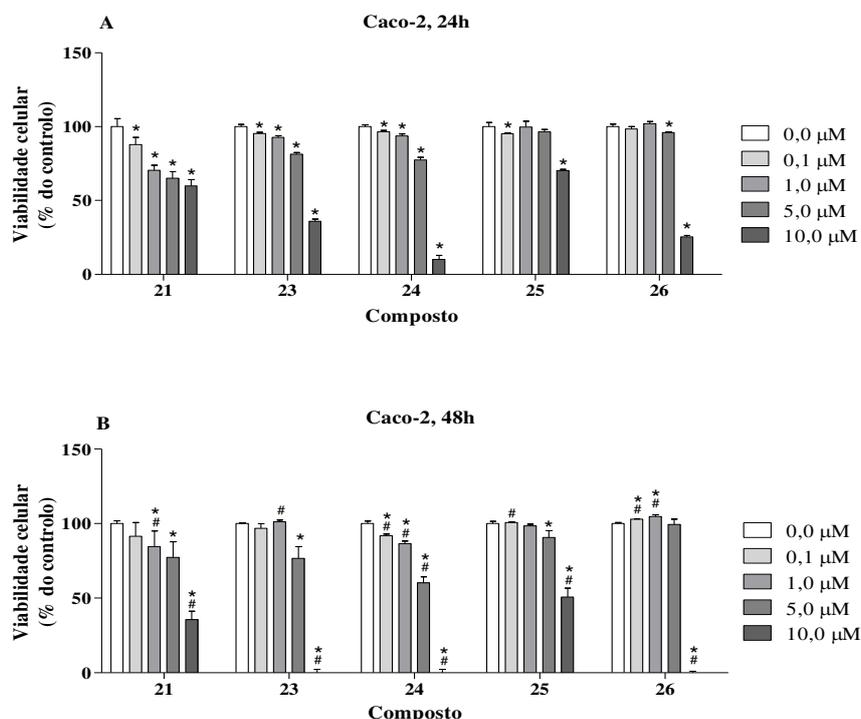


Figura 4.3. Efeito citotóxico dos corantes esquarílicos **21** e aminoesquarílicos **23-26** derivados do benzotiazole e da 6-iodoquinaldina na linha celular Caco-2, após exposição aos corantes durante 24 h (A) e 48 h (B). Os símbolos acima das barras correspondem às diferenças encontradas após análise estatística, sendo: * controle vs outras concentrações; # diferentes tempos de exposição ao corante.

Nenhum dos corantes, à exceção do **21**, reduz a viabilidade celular até à concentração de 5,0 μM , para exposições de 24 h (Figura 4.3 A). No entanto, quando se prolongou o tempo de exposição até às 48 h, os corantes **23**, **24** e **25** incrementaram a perda da viabilidade celular, sendo que para os corantes **23** e **25** essa perda de viabilidade não foi significativa ($p > 0,05$), em

comparação com os efeitos observados aquando uma exposição durante 24 h. Pelo contrário, a exposição por 48 h ao corante **24**, passou a ser tóxica para as células, à concentração de 5,0 µM, quando se prolongou o tempo de exposição ao corante. Curiosamente, o corante **21** deixa de ser citotóxico à concentração de 5,0 µM, para as condições em questão. Porém, este fenómeno poderá ser explicado por uma possível adaptação das células ao corante, ou seja, como as células Caco-2 são oriundas de um adenocarcinoma de colon humano, expressam características morfológicas dos enterócitos, nomeadamente os transportadores ABC, que extruem xenobióticos de volta para o lúmen do intestino (citado em Chan *et al.*, 2004). Além disso sabe-se que as células cancerígenas tendem a sobre expressar estes transportadores (Chan *et al.*, 2004), o que poderá funcionar como um mecanismo de defesa contra xenobióticos e, que permitirá a proliferação celular, causando, em muitos casos, resistência ao tratamento, tal como já foi verificado no estudo de vários medicamentos utilizados na quimioterapia (citado em Leslie *et al.*, 2005; Fukuda e Schuetz, 2012).

No geral, para as células HepG2 (Figura 4.4 A e B) os corantes esquarílicos derivados do benzotiazole e da 6-iodoquinaldina apresentaram-se ligeiramente mais citotóxicos no escuro que para as células Caco-2 (Figura 4.3 A e B). Após 24 h de exposição das células aos corantes (Figura 4.4 A) **23** e **24** à concentração de 10,0 µM verificou-se 100% de perda de viabilidade e aos corantes **25** e **26** observou-se redução da viabilidade das células HepG2 entre 80-90%. À concentração de 5,0 µM apenas os corantes **23**, **24** e **25** se apresentam citotóxicos, registando-se perda de viabilidade celular entre 60-90 %. O corante **21** foi o único que, apesar de reduzir ligeiramente a viabilidade celular à concentração de 10,0 µM, não foi considerado citotóxico no escuro para as células HepG2, uma vez que a toxicidade induzida foi cerca de 20%, e segundo as normas Gras Status esse está dentro dos limites aceitáveis para que um composto se considere seguro (International Organization for Standardization, 2009). Para 48 h de exposição (Figura 4.4 B), notou-se um ligeiro decréscimo da viabilidade celular ($p < 0,05$) para quase todas as concentrações aplicadas, do corante **21**. O corante **25**, ao contrário do esperado, registou um aumento da viabilidade celular à concentração de 5,0 µM, tal como verificado para o corante **11** (Figura 4.2). Nos restantes casos não foram verificadas grandes alterações.

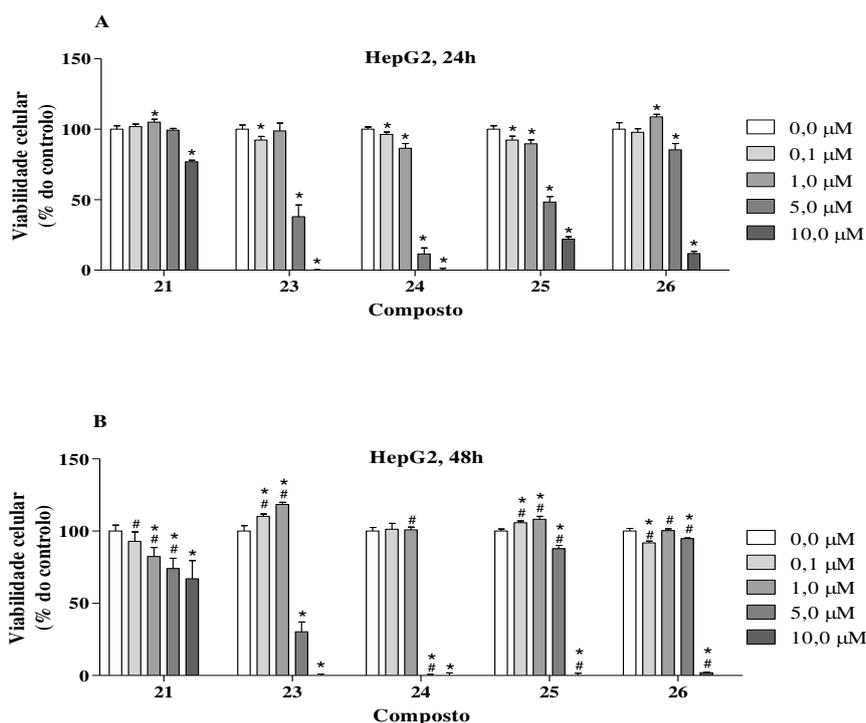


Figura 4.4. Efeito citotóxico dos corantes esquarílico **21** e aminoesquarílicos **23-26** derivados do benzotiazole e da 6-iodoquinaldina na linha celular HepG2, após exposição aos corantes durante 24 h (A) e 48 h (B). Os símbolos acima das barras correspondem às diferenças encontradas após análise estatística, sendo: * controle vs outras concentrações; # diferentes tempos de exposição ao corante.

Com estes resultados, verificou-se que ambas as linhas celulares foram afetadas de forma semelhante pelos corantes esquarílicos e aminoesquarílicos derivados do benzotiazole e da 6-iodoquinaldina, embora as células HepG2 se tenham mostrado mais suscetíveis aos corantes **23**, **24** e **25** na concentração de 5,0 µM. Assim, neste conjunto de corantes poderão vir a ser potenciais candidatos a FS para aplicação em PDT do cancro os compostos **23**, **24**, **25** e **26**, uma vez que não apresentam toxicidade no escuro para as células Caco-2 até 5,0 µM. Nas células HepG2, o corante que apresentou o melhor perfil de toxicidade no escuro foi o composto **21**, seguido do **26** que não é tóxico até 5,0 µM e por último os corantes **23** e **24** que apresentaram o comportamento esperado até 1,0 µM. No entanto, os corantes, que apresentaram o comportamento esperado no escuro, só poderão ser considerados potenciais FS, para aplicação em PDT do cancro, se às concentrações a que não são tóxicos no escuro apresentarem citotoxicidade após serem ativados por luz, a comprimento de onda adequado.

4.1.2. Efeito citotóxico dos corantes esquarílicos e aminoesquarílicos assimétricos após irradiação, nas linhas celulares Caco-2 e HepG2

Para que um corante seja um bom FS, para aplicação em PDT do cancro, é necessário que, para além de não apresentar toxicidade no escuro, apenas se apresente citotóxico quando ativado por luz, a um comprimento de onda apropriado (Alisson *et al.*, 2004; O'Connor *et al.*, 2009; Avirah *et al.*, 2012). Neste sentido, depois de avaliada a citotoxicidade no escuro de cada composto, avaliou-se o efeito citotóxico de cada um dos corantes após a irradiação com LEDs centrados a 660 nm ou 630 nm, dependendo do corante. Por outro lado, com este ensaio, tentou-se perceber se o tempo da irradiação e o tempo da exposição ao corante irradiado tem alguma influência na viabilidade celular. Para tal, escolheram-se três tempos de irradiação 0, 7 e 14 minutos. As placas não irradiadas (0 minutos) foram retiradas da incubadora durante 14 minutos e colocadas no escuro, à temperatura ambiente, para ficarem sujeitas às mesmas condições de temperatura que as outras células. Após a irradiação as células foram recolocadas na incubadora até à etapa seguinte.

Para todos os compostos foram selecionados os resultados de exposição aos corantes durante 1 h e 24 h. Após este tempo (tal como descrito nos métodos), as células foram lavadas duas vezes com PBS (100 µL por poço), depois de ter sido retirado o composto ativado, e posteriormente adicionou-se solução de AB. Todos os resultados de viabilidade foram analisados e comparados com o controlo não exposto e não irradiado, sendo estes apresentados em termos de viabilidade celular (% do controlo). Quando, no caso da placa de cultura que não foi irradiada, se fala em 1 h e 24 h de exposição refere-se ao tempo que decorreu depois de as células terem sido recolocadas na incubadora.

4.1.2.1. Avaliação do potencial fototerapêutico do corante 11

Para avaliar o efeito da irradiação as células foram irradiadas, após terem sido pré-incubadas com o corante **11** durante 24 h, durante 7 ou 14 minutos, com LEDs centrados a 630 nm.

Tal como descrito no ponto 2.2.6 (Capítulo 2, página 62), o solvente usado na preparação das soluções do corante **11** foi diferente do utilizado para os restantes corantes (DMSO/CH₂Cl (25:1) em vez de DMSO), devido a insolubilidade do corante em DMSO. Por isso, foi necessário realizar um ensaio onde apenas se aplicou o solvente para averiguar o seu efeito citotóxico. Para isso, numa placa de cultura foram adicionados, às células, volumes de

solvente equivalentes aos usados na aplicação do corante **11** e posteriormente seguiu-se o mesmo procedimento descrito para a placa não irradiada, deixando, as células em contacto com o solvente durante 24 h ou 48 h. Verificou-se que este não apresenta qualquer tipo de citotoxicidade, para as células Caco-2, até à concentração de 1,0 μM (Figura 4.5 D). A 5,0 μM observou-se um ligeiro decréscimo da viabilidade celular ($\approx 20\%$), que não foi acentuado com o aumento do tempo de exposição ao solvente ($p>0,05$). Mas, para 10,0 μM a redução da viabilidade foi superior a 50%, o que indica elevada toxicidade do solvente nesta concentração.

Relativamente à ação do composto **11**, pode-se dizer que este não é tóxico, no escuro, para as células Caco-2 e que o decréscimo da viabilidade é efeito do solvente (ver Figura 4.5 A e D).

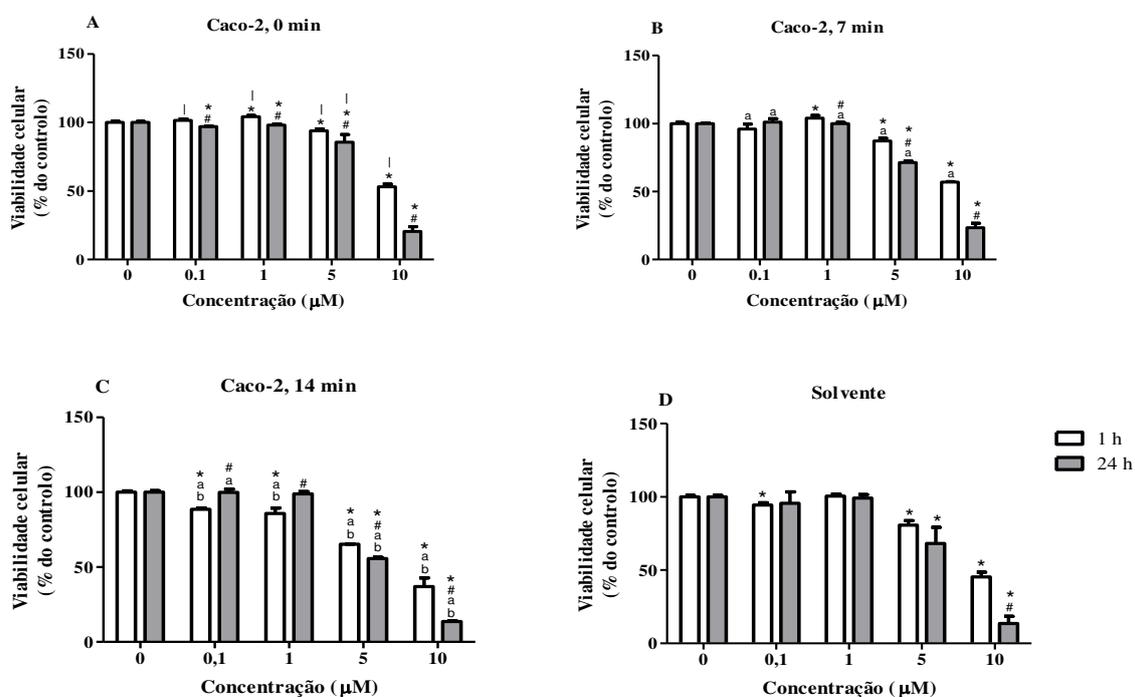


Figura 4.5. Efeito citotóxico do corante esqarfílico **11** nas linhas celulares Caco-2, em função da concentração e do tempo de irradiação, e efeito do solvente utilizado na dissolução do corante. Os símbolos acima das barras correspondem às diferenças encontradas após análise estatística, sendo: * controlo vs outras concentrações; # diferentes tempos de exposição ao corante; a condição não irradiada vs irradiada; b 7 minutos de irradiação vs 14 minutos de irradiação; l efeito do solvente vs o efeito do corante + solvente.

Apenas na concentração de 10,0 μM se verificou redução de viabilidade de aproximadamente 50%, para 1 h de exposição ao corante, após ensaio de irradiação, e de 80%, quando se prolongou o tempo de exposição para 24 h após a irradiação. Contudo estes resultados são muito idênticos aos observados para o solvente, sendo que onde se verificam

diferenças ($p < 0,05$; denotadas por l), estas são relativas a uma viabilidade ligeiramente superior no caso das células em contato com o corante **11**. Após o ensaio de irradiação verificou-se decréscimo da viabilidade celular nas concentrações de $5,0 \mu\text{M}$ e $10,0 \mu\text{M}$, para a condição de 14 minutos de irradiação, observando-se que o composto passou a ser tóxico para as células. No entanto, a redução de viabilidade celular não foi total.

No que diz respeito à aplicação do corante **11** nas células HepG2 pode-se observar, que este não apresenta citotoxicidade no escuro até à concentração de $5,0 \mu\text{M}$ (Figura 4.6 A). Contudo, a concentração de $10,0 \mu\text{M}$ induz uma redução de viabilidade celular bastante acentuada. No entanto, quando se comparam estes resultados com os obtidos no ensaio efetuado com o solvente verifica-se que estes seguem a mesma tendência (ver Figura 4.6 A e D), sendo que apenas foram encontradas diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) para as concentrações de $10,0 \mu\text{M}$, onde ambos são citotóxicos e $1,0 \mu\text{M}$ (1 h de exposição), onde, apesar de se ter verificado uma ligeira perda de viabilidade celular provocada pelo solvente, ambos são considerados não tóxicos.

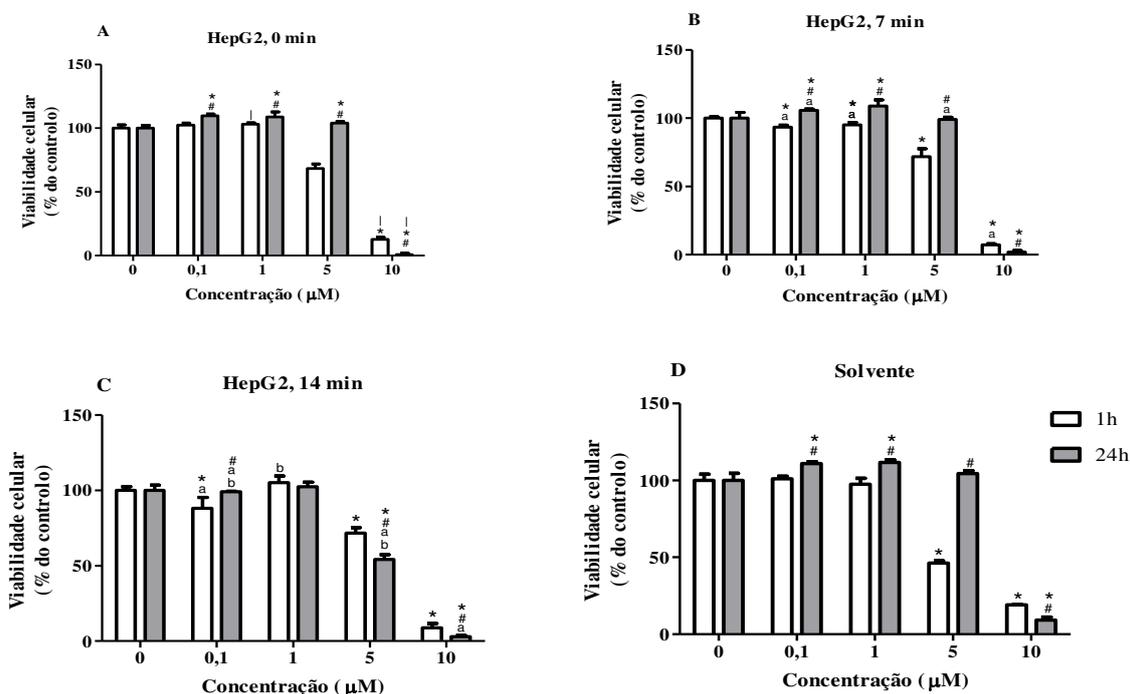


Figura 4.6. Efeito citotóxico do corante esquarterílico **11** nas linhas celulares HepG2, em função da concentração e do tempo de irradiação, e efeito do solvente utilizado na dissolução do corante. Os símbolos acima das barras correspondem às diferenças encontradas após análise estatística, sendo: * controlo vs outras concentrações; # diferentes tempos de exposição ao corante; a condição não irradiada vs irradiada; b 7 minutos de irradiação vs 14 minutos de irradiação; l efeito do solvente vs o efeito do corante + solvente.

Após o ensaio de irradiação não se verificaram grandes alterações de viabilidade celular para ambos os tempos de irradiação. No entanto, verificou-se que a viabilidade das células HepG2, expostas à concentração de 5,0 μM , foi afetada pelo tempo de irradiação, nomeadamente aos 14 minutos (Figura 4.6 C) onde se verificou um decréscimo da viabilidade celular de cerca de 50%, quando as células foram expostas ao corante irradiado durante 24 h, o que tornou esta concentração do corante **11** citotóxica para as células HepG2.

Com estes resultados verificou-se que o corante **11** não será um potencial candidato a FS para aplicação em PDT do cancro. No entanto, o facto de o corante **11** não ter ficado totalmente dissolvido pode ser uma explicação para a não efetividade na redução da viabilidade celular, uma vez que a concentração, do corante, aplicada às células, poderia não corresponder à esperada aquando uma completa dissolução. Por outro lado, deveriam ser testados outros solventes de modo a que estes não afetassem a viabilidade das células e permitissem uma melhor dissolução do composto de modo a tentar perceber se de facto este corante tem potencial para ser aplicado como FS em PDT do cancro.

4.1.2.2. Avaliação do potencial fototerapêutico do corante 13

Para avaliar o efeito da irradiação com o corante **13** escolheram-se LEDs centrados a 630 nm.

Como já verificado anteriormente (Figura 4.1), o corante **13** já induz toxicidade no escuro a partir de 5,0 μM , nas células Caco-2. A 1,0 μM a viabilidade celular também foi ligeiramente reduzida nas condições de escuro ($p < 0,05$), no entanto esta redução (cerca de 30%), pelas normas Gras Status, é considerada pouco tóxica (International Organization for Standardization, 2009). No entanto, após irradiação verificou-se redução da viabilidade celular, sendo mais acentuada para 14 minutos de irradiação (Figura 4.7 A e C), onde o corante **13** passou a ser citotóxico ($p < 0,05$, relativamente a 7 minutos de irradiação e não irradiação), à concentração de 1,0 μM , reduzindo a viabilidade das células Caco-2 para aproximadamente 40%.

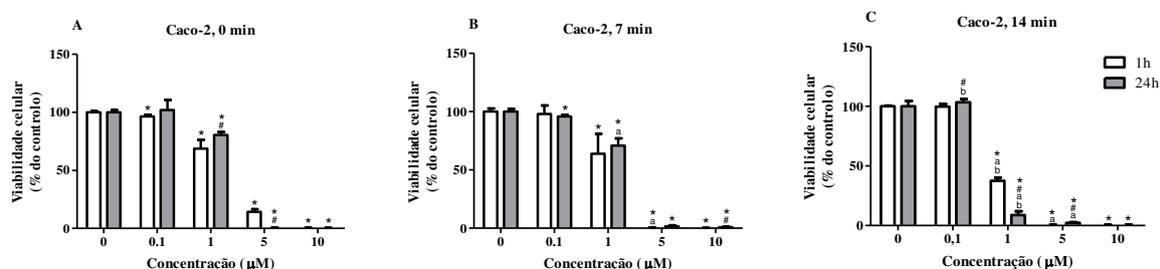


Figura 4.7. Efeito citotóxico do corante **13** na linha celular Caco-2, em função da concentração e do tempo de irradiação. Os símbolos acima das barras correspondem às diferenças encontradas após análise estatística, sendo: * controlo vs outras concentrações; # diferentes tempos de exposição ao corante; **a** condição não irradiada vs irradiada; **b** 7 minutos de irradiação vs 14 minutos de irradiação.

Por outro lado, o tempo exposição das células ao corante irradiado, não parece ter afetado a viabilidade celular, apenas na figura 4.7 C, irradiação durante 14 minutos, na concentração de 1,0 μM , se notam diferenças significativas na exposição ao composto irradiado por 1 h e 24 h.

No que se refere à exposição das células HepG2 ao corante **13**, verificou-se que esta linha celular é um pouco mais sensível que a Caco-2. Neste caso a viabilidade celular foi reduzida, na totalidade, para as concentrações de 5,0 μM e 10,0 μM em condições de não irradiação (Figura 4.8 A). Na concentração de 1,0 μM também se verificou cerca de 30% de redução da viabilidade.

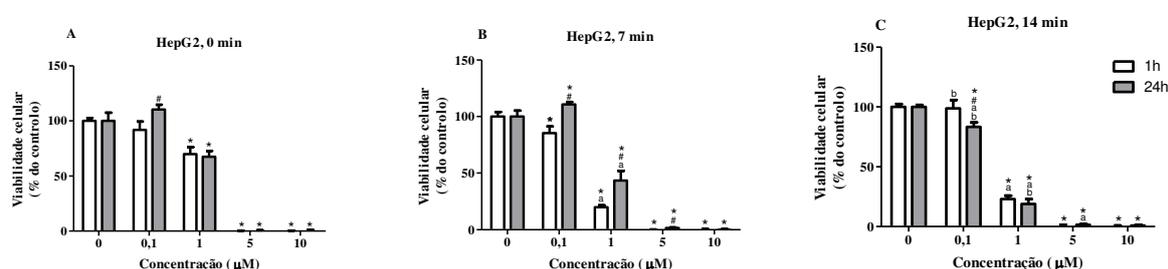


Figura 4.8. Efeito citotóxico do corante **13** na linha celular HepG2, em função da concentração e do tempo de irradiação. Os símbolos acima das barras correspondem às diferenças encontradas após análise estatística, sendo: * controle vs outras concentrações; # diferentes tempos de exposição ao corante; a condição não irradiada vs irradiada; b 7 minutos de irradiação vs 14 minutos de irradiação.

Após irradiação apenas se observa efeito negativo na viabilidade celular ($p < 0,05$) para a concentração de 1,0 μM (Figura 4.7 B e C), sendo o efeito dependente do tempo de irradiação, apresentando maior toxicidade para 14 minutos de irradiação (Figura 4.7 C), onde a viabilidade das células HepG2 só é de cerca de 20%.

Com estes resultados verificou-se que o corante **13** é muito tóxico para ambas as linhas celulares quando aplicado às concentrações 5,0 μM e 10,0 μM . Contudo para ambos os casos a concentração de 1,0 μM não se mostrou citotóxica no escuro e, apesar de não reduzir totalmente a viabilidade celular, apresentou uma boa resposta após a irradiação. Mesmo assim, este corante poderia vir a ser utilizado como FS para PDT do cancro, em situação de tratamento faseado. Por outro lado, poderia ser feito um estudo da toxicidade numa gama de concentrações entre 0,1 μM e 1,0 μM , uma vez que poderá haver uma boa resposta fototerapêutica.

4.1.2.3. Avaliação do potencial fototerapêutico do corante 14

Com o corante **14** foram utilizados LEDs centrados a 630 nm.

Analisando os resultados obtidos, pode ver-se, na Figura 4.9 A, que o corante **14** apresenta citotoxicidade no escuro para as células Caco-2, nas concentrações de 5,0 e 10,0 μM . Para 0,1 e 1,0 μM , apenas se verificou um ligeiro decréscimo da viabilidade celular após as células terem sido mantidas em contacto com o corante durante 24 h. No entanto, este decréscimo de aproximadamente 30%, segundo as normas *Gras Status*, está dentro dos limites aceitáveis para considerar o corante pouco tóxico (International Organization for Standardization, 2009).

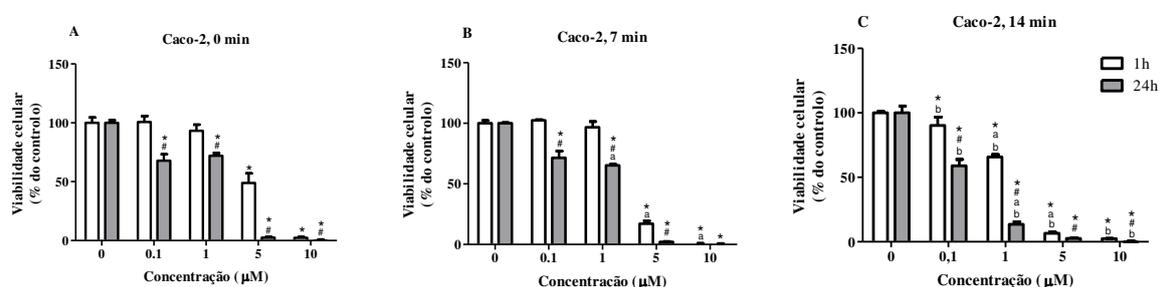


Figura 4.9. Efeito citotóxico do corante **14** na linha celular Caco-2, em função da concentração e do tempo de irradiação. Os símbolos acima das barras correspondem às diferenças encontradas após análise estatística, sendo: * controlo vs outras concentrações; # diferentes tempos de exposição ao corante; a condição não irradiada vs irradiada; b 7 minutos de irradiação vs 14 minutos de irradiação.

Relativamente ao tempo de irradiação (Figura 4.9 B e C), quase não se verifica incremento da toxicidade nesta linha celular. Apenas é notório um decréscimo da viabilidade celular, à concentração de 1,0 μM , nas células irradiadas durante 14 minutos, sendo que a toxicidade foi mais acentuada na condição de 24 h de exposição. No entanto, a 0,1 μM a redução na viabilidade das células Caco-2 ($p < 0,05$), após irradiação de 14 minutos e mantidas em contacto com o corante irradiado durante 24 h (Figura 4.9 C), foi ligeiramente acentuada.

Para as células HepG2 o corante **14** mostrou-se um pouco mais citotóxico (Figura 4.10 A-C). Para esta linha celular, além de o composto se apresentar muito tóxico no escuro nas concentrações de 5,0 e 10,0 μM (100% de morte celular), a concentração de 1,0 μM também já é ligeiramente tóxica no escuro (Figura 4.40 A). No entanto, foi para 1,0 μM que se verificou efeito da irradiação, nomeadamente para 14 minutos de irradiação (Figura 4.10 C), onde a viabilidade celular foi reduzida em relação à condição de não irradiação ($p < 0,05$), cerca de 30%.

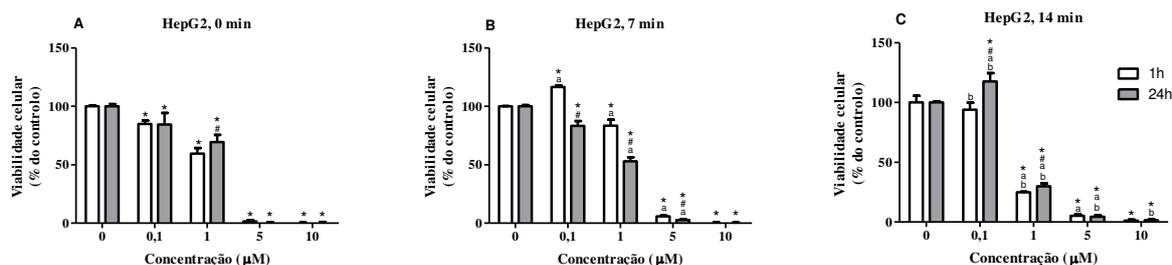


Figura 4.10. Efeito citotóxico do corante **14** na linha celular HepG2, em função da concentração e do tempo de irradiação. Os símbolos acima das barras correspondem às diferenças encontradas após análise estatística, sendo: * controle vs outras concentrações; # diferentes tempos de exposição ao corante; a condição não irradiada vs irradiada; b 7 minutos de irradiação vs 14 minutos de irradiação.

Por outro lado, a concentração de 0,1 µM não se mostrou citotóxica nas células HepG2, mas esta também não foi influenciada pela irradiação.

Com estes resultados pode-se verificar que a viabilidade de ambas as linhas celulares foi bastante afetada pelo corante **14**. Porém, as células HepG2 mostraram-se ainda mais suscetíveis que as células Caco-2. No entanto, para estas últimas a concentração de 1,0 µM poderá vir a ser aplicada em tratamentos faseados. Isto porque não se apresenta citotóxica no escuro e responde de forma esperada à irradiação, embora não reduza a viabilidade celular na sua totalidade. Contudo, para se verificarem efeitos são necessários 14 minutos de irradiação e 24 h de exposição ao corante irradiado ou testar outros tempos de irradiação. Para as células HepG2, o corante **14** poderia ser aplicado numa gama de concentrações entre 0,1 e 1,0 µM de modo a tentar encontrar uma concentração que apresente uma boa resposta fototerapêutica.

4.1.2.4. Avaliação do potencial fototerapêutico do corante **15**

No corante **15** também foram utilizados LEDs centrados a 630 nm.

A partir dos resultados obtidos podemos verificar que o composto **15** é citotóxico no escuro, para as células Caco-2, nas concentrações 5,0 e 10,0 µM (Figura 4.11 A) e também a 1,0 µM onde se verifica redução da viabilidade celular em cerca de 50% quando as células foram expostas ao corante durante 24 h. Apesar de se ter verificado um ligeiro decréscimo de aproximadamente 20% ($p < 0,05$) da viabilidade das células Caco-2 para concentração de 1,0 µM, após 1 h de exposição ao corante, não foi suficiente para que o corante fosse considerado citotóxico para as células (Figura 4.11 A).

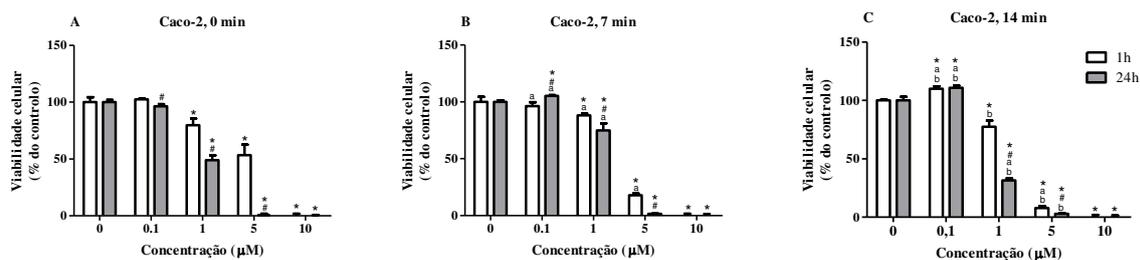


Figura 4.11. Efeito citotóxico do corante **15** na linha celular Caco-2, em função da concentração e do tempo de irradiação. Os símbolos acima das barras correspondem às diferenças encontradas após análise estatística, sendo: * controle vs outras concentrações; # diferentes tempos de exposição ao corante; **a** condição não irradiada vs irradiada; **b** 7 minutos de irradiação vs 14 minutos de irradiação.

Após a irradiação verificou-se que esta não teve grande influência na citotoxicidade do composto **15** nas células Caco-2 (Figura 4.11 B e C). Contrariamente ao esperado, nas células irradiadas durante 7 minutos (Figura 4.11 B) verificou-se, na concentração de 1,0 µM, um ligeiro aumento da viabilidade celular ($p < 0,05$). Mas nas células irradiadas durante 14 minutos (Figura 4.11 C), à mesma concentração, nota-se ligeiro decréscimo da viabilidade celular ($p < 0,05$, relativamente à condição de 7 minutos de irradiação).

Relativamente ao efeito do corante **15** nas células HepG2, através dos resultados obtidos (Figura 4.12 A), também se verificou que estas células são mais sensíveis ao corante. Neste caso, além de se registar perda total de viabilidade celular para as concentrações e 5,0 e 10,0 µM, para 1,0 µM também se observou redução da viabilidade superior a 50%. Além disso, observou-se redução de viabilidade celular entre 10-30%, no escuro, para a concentração de 0,1 µM.

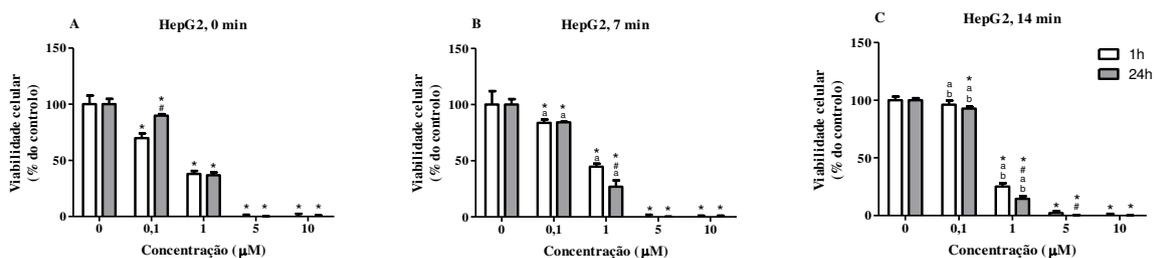


Figura 4.12. Efeito citotóxico do corante **15** na linha celular HepG2, em função da concentração e do tempo de irradiação. Os símbolos acima das barras correspondem às diferenças encontradas após análise estatística, sendo: * controle vs outras concentrações; # diferentes tempos de exposição ao corante; **a** condição não irradiada vs irradiada; **b** 7 minutos de irradiação vs 14 minutos de irradiação.

Com irradiação, apenas se verificaram ligeiros efeitos ($p < 0,05$) na concentração de 1,0 µM, após irradiação durante 14 minutos (Figura 4.12 C). Para 0,1 µM registou-se um ligeiro aumento da viabilidade celular, quando se comparou estes resultados com os obtidos em condições de não irradiação (Figura 4.12 A e C). Este efeito não era esperado, mas pode ser

explicado pela possível fotodegradação do composto em produtos não tóxicos, que permitem a multiplicação celular. Ou por outro lado, uma adaptação das células, podendo estas ter utilizado mecanismos de defesa, como a metabolização do composto irradiado em subprodutos não tóxicos e deste modo possibilitar a proliferação celular (Wilkening *et al.* 2003). Esta última hipótese explicaria o facto de no escuro (Figura 4.12 A), a viabilidade celular aumentar aquando uma exposição prolongada (24 h) das células ao composto a 0,1 μM

Com estes resultados pode-se dizer que o composto **15** é muito tóxico para ambas as linhas celulares e não se observa uma boa resposta fototerapêutica para nenhuma das concentrações aplicadas.

4.1.2.5. Avaliação do potencial fototerapêutico dos corantes 16 e 17

Os corantes **16** e **17** apresentam a mesma estrutura química, apenas diferem no seu contra-íão. Enquanto o corante **16** tem o CF_3SO_3^- como contra-íão, o corante **17** tem o I^- . A presença de contra-íões diferentes pode influenciar a capacidade citotóxica do corante, tanto no escuro como após a sua ativação por luz. Por isso, fez-se este ensaio para tentar perceber qual a influência do contra-íão na atividade fototerapêutica do corante.

Neste caso, foram usados LEDs centrados a 660 nm.

Com base nos resultados obtidos verificou-se que o corante **16** não é tóxico, no escuro, para as células Caco-2 até à concentração de 0,1 μM (Figura 4.13 A). No entanto, a concentração de 1,0 μM só se apresenta citotóxica, no escuro, quando as células estiveram em contacto com o corante durante 24 h. Contudo à concentração de 5,0 μM (Figura 4.13 A) o composto revelou-se tóxico, no escuro, para as células Caco-2, tendo-se verificado perda de viabilidade 40% e 75% para exposição de 1 h e 24 h, respetivamente (Figura 4.13 A). A 10,0 μM a citotoxicidade foi superior, chegando a reduzir totalmente a viabilidade das células Caco-2 após 24 h de exposição ao corante. Por sua vez, o corante **17** não é tóxico no escuro, para as células Caco-2, até à concentração de 1,0 μM , para ambos os tempos de exposição ao corante (Figura 4.13 D). Para 5,0 μM verificou-se redução de viabilidade celular no escuro, cerca de 15% e 50% quando as células estiveram expostos ao corante durante 1 h e 24 h, respetivamente.

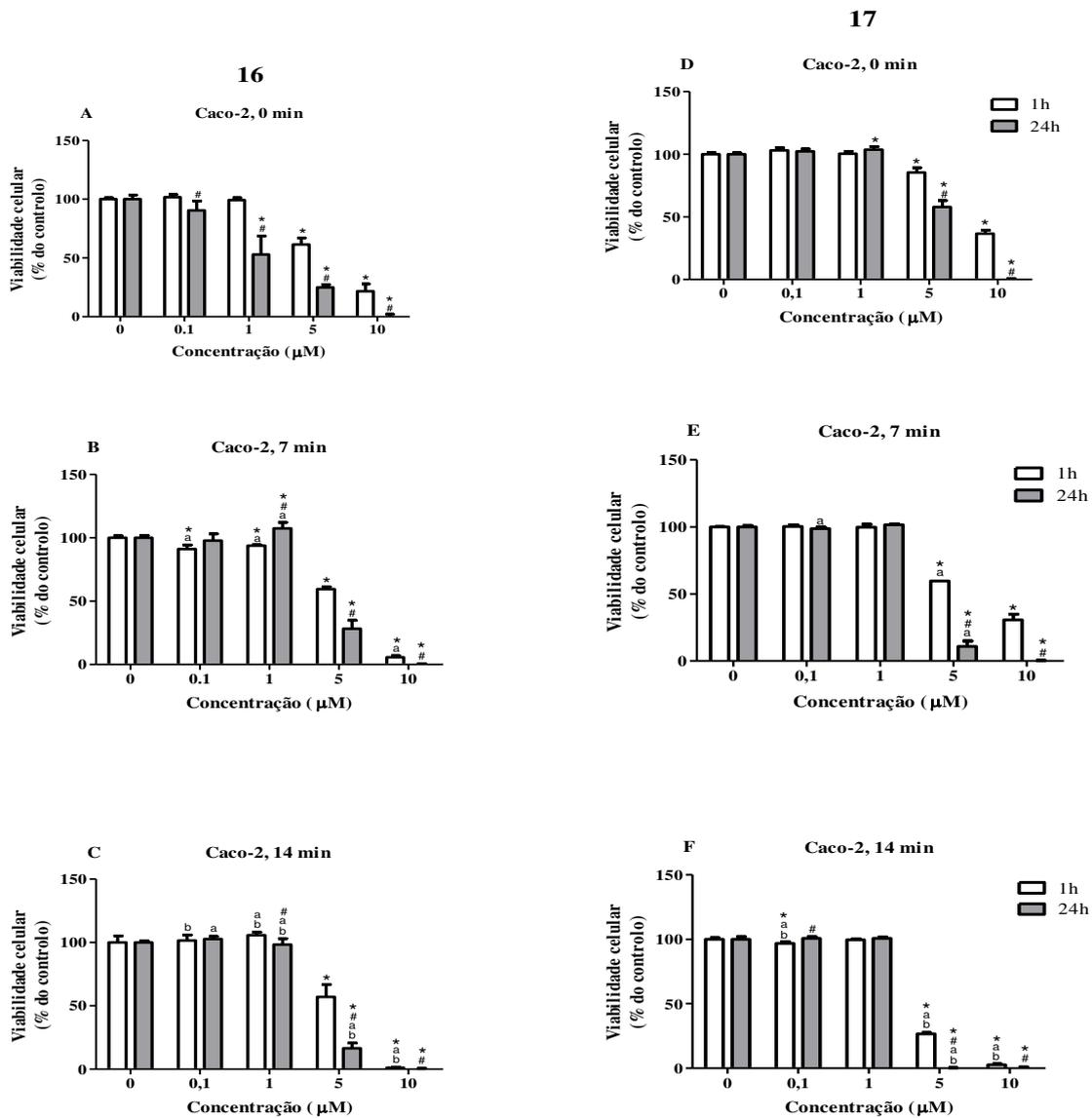


Figura 4.13. Efeito citotóxico do corante **16** ou **17** na linha celular Caco-2, em função da concentração e do tempo de irradiação. Os símbolos acima das barras correspondem às diferenças encontradas após análise estatística, sendo: * controlo vs outras concentrações; # diferentes tempos de exposição ao corante; **a** condição não irradiada vs irradiada; **b** 7 minutos de irradiação vs 14 minutos de irradiação.

Aquando a aplicação de irradiação, nas células pré-incubadas com o corante **16**, apenas se notou uma ligeira redução da viabilidade celular na concentração de 5,0 µM ($p < 0,05$) para a condição de 14 minutos de irradiação e 24 h de exposição ao corante **16** irradiado (Figura 4.13 C). Contrariamente ao esperado, na concentração de 1,0 µM, após 7 minutos de irradiação (Figura 4.13 B), a viabilidade celular aumentou ($p < 0,05$), deixando de ser tóxico. No entanto, este facto pode ser explicado pela fotodegradação do composto, o que permitiria a posterior multiplicação celular. No caso do corante **17** a irradiação apenas induziu redução de viabilidade celular ($p < 0,05$) na concentração de 5,0 µM, passando a ser tóxica para as células na condição

de 1 h de exposição ao corante irradiado (Figura 4.13 E). No entanto, essa redução foi acentuada ($p < 0,05$) quando se aumentou o tempo de irradiação para 14 minutos (Figura 4.13 F).

Relativamente ao efeito dos corantes **16** e **17** na linha celular HepG2 verificou-se que ambos os corantes não são tóxicos no escuro até a concentração de $1,0 \mu\text{M}$ (Figura 4.14 A e D, respetivamente).

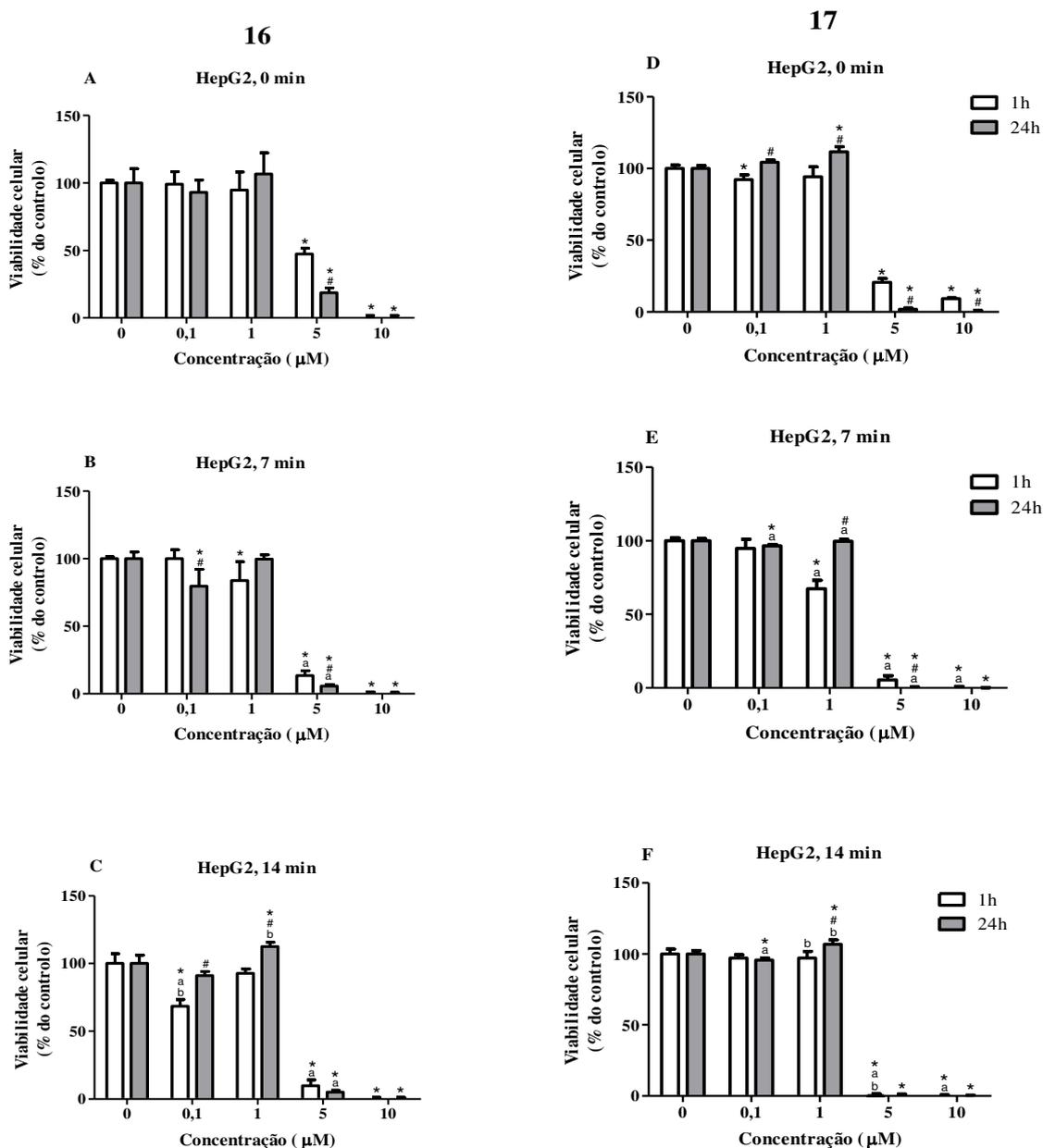


Figura 4.14. Efeito citotóxico do corante **16** ou **17** na linha celular HepG2, em função da concentração e do tempo de irradiação. Os símbolos acima das barras correspondem às diferenças encontradas após análise estatística, sendo: * controlo vs outras concentrações; # diferentes tempos de exposição ao corante; **a** condição não irradiada vs irradiada; **b** 7 minutos de irradiação vs 14 minutos de irradiação.

O corante **16** já é tóxico a 5,0 μM , reduzindo a viabilidade das células HepG2 em aproximadamente 50%, após 1 h de contacto com o corante, e incrementou a toxicidade ($p < 0,05$) quando se prolongou o tempo de exposição para 24 h (Figura 4.14 A). Para este corante a concentração de 10 μM induziu total perda de viabilidade celular. Por sua vez, o corante **17**, apresentou toxicidade superior, para as células HepG2, no escuro (Figura 4.14 D). Para 5,0 μM , reduziu a viabilidade das células HepG2 em cerca de 80%, depois de 1 h de contacto com o corante, e 100% para 24 h de exposição. À semelhança do corante **16**, a concentração de 10,0 μM do corante **17** mostrou-se muito citotóxica para linha celular HepG2, reduzindo a sua viabilidade quase na totalidade.

Após a irradiação das células expostas ao corante **16** apenas se registou um ligeiro decréscimo da viabilidade ($p < 0,05$) para a concentração de 5,0 μM (Figura 4.14 B e C), que não sofreu alteração com o aumento do tempo de irradiação ($p > 0,05$). Porém esta concentração já era muito tóxica no escuro. No caso do corante **17**, verificou-se efeito na viabilidade das células HepG2 após irradiação durante 7 minutos (Figura 4.14 E), registando-se perda de aproximadamente 30% da viabilidade, para a concentração de 1,0 μM quando se mantiveram as células 1 h expostas ao corante irradiado. Contudo, este efeito parece ter sido reversível porque quando se prolongou o tempo de exposição para 24 h a viabilidade celular voltou a subir, mantendo-se igual ao controlo ($p > 0,05$). Este fenómeno poderá ser explicado por uma adaptação das células HepG2, sendo que estas poderão ter conseguido metabolizar o composto, degradando-o em metabolitos não tóxicos e assim permitir a multiplicação celular (Wilkening *et al.*, 2003). Por outro lado, quando se aumentou o tempo de irradiação para 14 minutos (Figura 4.14 F), não se registou diminuição da viabilidade celular, o que também poderá ser explicado pelo fenómeno de fotodegradação do corante.

Com estes resultados verificou-se que ambos os corantes são bastante tóxicos para as duas linhas celulares na concentração mais alta (10,0 μM). No entanto, as células HepG2 mostraram-se mais sensíveis a ambos os corantes sendo a sua viabilidade bastante afetada também na concentração de 5,0 μM . Para a linha celular HepG2 nenhum dos corantes mostrou o perfil fototerapêutico pretendido. Contudo, nas células Caco-2 o corante **17** apresentou um perfil de citotoxicidade pré- e pós-irradiação próximo do pretendido para a concentração de 5,0 μM , porém seria necessário estudar a gama de concentrações entre 1,0 e 5,0 μM de modo a encontrar uma concentração que apresente uma melhor resposta fototerapêutica. Além disso, com estes resultados constatou-se que o contra-íão não tem influência na viabilidade das células, uma vez que os dois corantes apresentaram um comportamento semelhante em todas

as condições. No entanto, era esperado que o corante **17** apresentasse uma boa resposta fototerapêutica uma vez que este corante apresenta o rendimento quântico mais elevado em relação a todos os outros corantes assimétricos, derivados de quinaldina, sintetizados neste trabalho.

4.1.2.6. Avaliação do potencial fototerapêutico do corante 21

O corante **21** difere do corante **11** numa das suas bases metilénicas. Enquanto o corante **11** apresenta na sua estrutura o benzotiazole e a quinaldina (que contém um átomo de hidrogénio no carbono nº 6), o corante **21** tem o benzotiazole e na vez da quinaldina, a 6-iodoquinaldina (onde o átomo de hidrogénio ligado ao carbono nº 6 foi substituído por um átomo de iodo). Mas, será que este átomo de iodo poderá influenciar o potencial fototerapêutico do corante? Para se tentar responder a esta questão e perceber se o átomo de iodo, na posição 6 da quinaldina, aumentaria a eficácia fototerapêutica do corante fez-se um ensaio onde se aplicou o corante **21** às duas linhas celulares em estudo e no final compararam-se os resultados obtidos com os resultados registados para o corante **11**.

No corante **21**, procedeu-se à irradiação das células com LEDs centrados a 630 nm.

Por análise dos resultados obtidos, verificou-se que o corante **21** quase não induz citotoxicidade no escuro nas células Caco-2 (Figura 4.15 A). Apenas à concentração mais alta (10,0 μM) induziu redução de viabilidade celular em cerca de 40% (após 1 h de exposição das células ao corante) e de 65% quando se aumentou o tempo de exposição para 24 h. Na concentração de 5,0 μM (para 1 h de exposição) observou-se redução da viabilidade celular de mais de 30%. A concentração de 1,0 μM também induziu uma ligeira redução de viabilidade celular ($\approx 30\%$), após 1 h de exposição. No entanto, quando se irradiaram as células durante 7 minutos (Figura 4.15 B) a viabilidade celular sofreu um ligeiro aumento em relação à condição de não irradiação, o que não era o esperado. Porém, para a concentração de 5,0 μM foi observado efeito da irradiação havendo redução da viabilidade celular com irradiação de 7 minutos e 1 h de exposição ao corante irradiado ($p < 0,05$), sendo que o decréscimo da viabilidade foi mais acentuado quando se prolongou o tempo de exposição ao corante irradiado para 24 h ($p < 0,05$). Na concentração de 10 μM também se observou perda de viabilidade celular após irradiação, acentuando a toxicidade já observada no escuro.

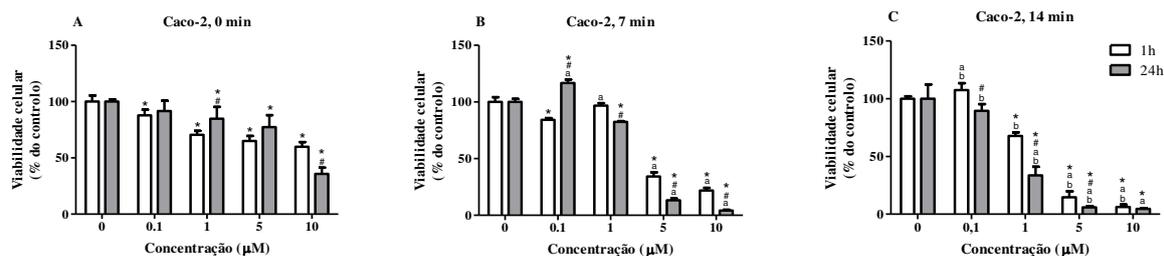


Figura 4.15. Efeito citotóxico do corante **21** na linha celular Caco-2, em função da concentração e do tempo de irradiação. Os símbolos acima das barras correspondem às diferenças encontradas após análise estatística, sendo: * controle vs outras concentrações; # diferentes tempos de exposição ao corante; **a** condição não irradiada vs irradiada; **b** 7 minutos de irradiação vs 14 minutos de irradiação.

Quando se prolongou o tempo de irradiação para 14 minutos (Figura 4.15 C) observou-se uma intensificação da redução da viabilidade das células Caco-2 para 5,0 e 10,0 μM . Além disso, 1,0 μM também se mostrou citotóxica ($p < 0,05$), nomeadamente quando se prolongou o tempo de exposição ao corante irradiado até 24 h (Figura 4.15 C).

Relativamente ao efeito do corante **21** na linha celular HepG2, pode verificar-se que este corante apresenta baixa toxicidade no escuro (Figura 4.16 A). Embora se note uma ligeira redução da viabilidade celular para uma exposição prolongada (24 h) ao corante à concentração de 1,0 μM , 5,0 μM e 10,0 μM observando-se redução de viabilidade de 20%, 25% e 30%, respetivamente.

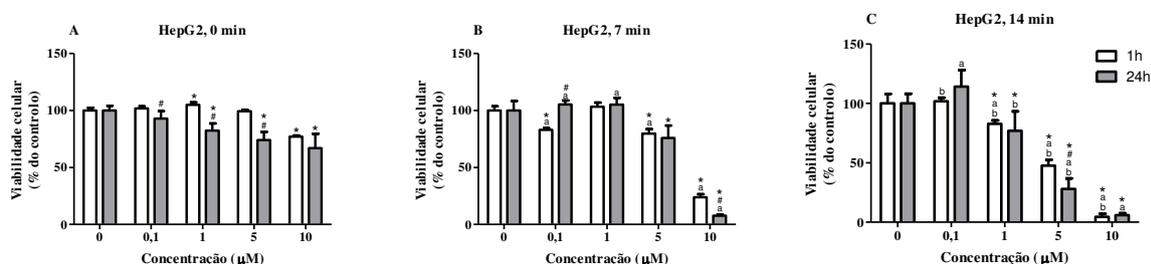


Figura 4.16. Efeito citotóxico do corante **21** na linha celular HepG2, em função da concentração e do tempo de irradiação. Os símbolos acima das barras correspondem às diferenças encontradas após análise estatística, sendo: * controle vs outras concentrações; # diferentes tempos de exposição ao corante; **a** condição não irradiada vs irradiada; **b** 7 minutos de irradiação vs 14 minutos de irradiação.

Quando as células foram irradiadas durante 7 minutos (Figura 4.16 B) verificou-se ligeira redução da viabilidade celular ($p < 0,05$) para a concentração de 5,0 μM , nomeadamente de aproximadamente 20% para os dois tempos de exposição. A 10,0 μM o efeito da irradiação foi intensificado, tendo o composto reduzido a viabilidade em 75% e 90%, para 1 h e 24 h de exposição ao corante, respetivamente. Quando se irradiou durante 14 minutos (Figura 4.16 C), verificou-se uma redução mais acentuada ($p < 0,05$), da viabilidade das células HepG2, para as duas concentrações mais altas (5,0 e 10 μM), sendo que neste caso a concentração de 5,0 μM

reduziu em mais de 50% a viabilidade celular. Para 1,0 μM também se verificou diminuição da viabilidade, com irradiação durante 14 minutos (Figura 4.16 C), de cerca de 20% ($p < 0,05$).

Com estes resultados pode-se verificar que o corante **21** apresenta pouca toxicidade no escuro para ambas as linhas celulares. No entanto, para as células Caco-2 as duas concentrações mais altas mostraram-se ligeiramente tóxicas. Contudo, para este corante, verificou-se uma boa resposta fototerapêutica para as concentrações de 5,0 e 10,0 μM , nomeadamente nas células HepG2. Para as células Caco-2 também se observou uma boa resposta fototerapêutica na concentração de 1,0 μM , principalmente para a condição 24 h de exposição ao corante irradiado. Comparando, estes resultados com os obtidos para o corante **11**, pode-se verificar que o corante **21** apresenta uma melhor resposta fototerapêutica em ambas as linhas celulares.

4.1.2.7. Avaliação do potencial fototerapêutico do corante 23

Com o corante **23**, foram usados LEDs centrados a 630 nm, para irradiar as células expostas ao corante.

A partir dos resultados obtidos pode-se verificar que o corante **23** não apresenta citotoxicidade no escuro, para as células Caco-2 (Figura 4.17 A), até à concentração de 1,0 μM . Para 5,0 μM verifica-se um ligeiro decréscimo da viabilidade celular no escuro, cerca de 20% a 25%. A concentração de 10,0 μM apresentou toxicidade bastante elevada, tendo induzido perda de 65% da viabilidade celular após exposição das células ao corante durante 1 h e uma perda total de viabilidade quando se mantiveram as células em contacto com o corante durante 24 h.

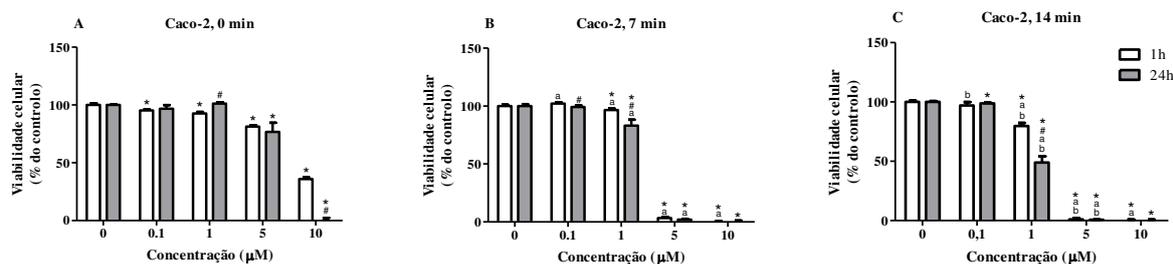


Figura 4.17. Efeito citotóxico do corante **23** na linha celular Caco-2, em função da concentração e do tempo de irradiação. Os símbolos acima das barras correspondem às diferenças encontradas após análise estatística, sendo: * controlo vs outras concentrações; # diferentes tempos de exposição ao corante; a condição não irradiada vs irradiada; b 7 minutos de irradiação vs 14 minutos de irradiação.

Quanto ao efeito da irradiação, com 7 minutos (Figura 4.17 B) notou-se um ligeiro decréscimo da viabilidade celular na concentração de 1,0 μM ($p < 0,05$), quando se mantiveram as células expostas ao corante irradiado, durante 24 h. Na concentração de 5,0 μM houve total redução da viabilidade celular, após 7 minutos de irradiação, para ambos os tempos de

exposição. Quando se prolongou o tempo de irradiação para 14 minutos (Figura 4.17 C) a perda de viabilidade foi acentuada para a concentração de 1,0 μM ($p < 0,05$).

No que diz respeito ao efeito do corante **23** nas células HepG2, verificou-se que este não é citotóxico, no escuro, até à concentração de 1,0 μM (Figura 4.18 B). A concentração de 5,0 μM reduz viabilidade das células HepG2, no escuro, para aproximadamente 40% em ambos os tempos de exposição. Por sua vez, a concentração de 10,0 μM induziu total morte celular.

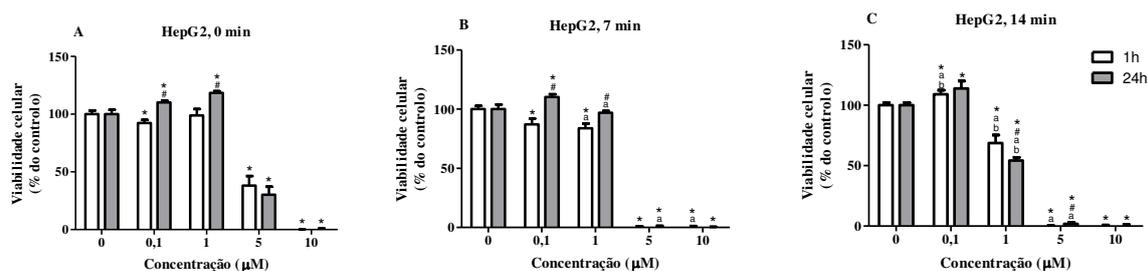


Figura 4.18. Efeito citotóxico do corante **23** na linha celular HepG2, em função da concentração e do tempo de irradiação. Os símbolos acima das barras correspondem às diferenças encontradas após análise estatística, sendo: * controle vs outras concentrações; # diferentes tempos de exposição ao corante; **a** condição não irradiada vs irradiada; **b** 7 minutos de irradiação vs 14 minutos de irradiação.

Após irradiação das células durante 7 minutos (Figura 4.18 B), verificou-se perda total da viabilidade celular para concentração de 5,0 μM , para ambos os tempos de exposição ao corante irradiado. Na concentração de 1,0 μM notou-se uma ligeira redução da viabilidade celular, quando as células estiveram 1 h expostas ao corante irradiado. Quando se aumentou o tempo de irradiação para 14 minutos (Figura 4.18 C), a perda de viabilidade das células HepG2, na concentração de 1,0 μM , acentuou-se para ambos os tempos de exposição.

Com estes resultados verificou-se que o corante **23** não é tóxico, no escuro, para células Caco-2 até à concentração 5,0 μM e que esta concentração foi a que obteve melhor resposta fototerapêutica, reduzindo toda a viabilidade celular logo após 7 minutos de irradiação. Por outro lado, as células HepG2 mostraram-se mais sensíveis ao corante **23**, sendo que a concentração de 5,0 μM já era tóxica no escuro. No entanto, para esta linha celular poderia ser estudada uma gama de concentrações compreendida entre 1,0 e 5,0 μM , uma vez que para a concentração de 1,0 μM já se verificou uma resposta fototerapêutica bastante satisfatória, mesmo que a redução da viabilidade não tenha sido total, após a irradiação.

4.1.2.8. Avaliação do potencial fototerapêutico do corante 24

Depois de as células estarem 24 h em contacto com o corante **24**, procedeu-se à irradiação das mesmas com LEDs centrados a 630 nm, durante 7 ou 14 minutos.

Ao analisar os resultados obtidos, verifica-se que o corante **24** não apresenta citotoxicidade no escuro, para as células Caco-2 (Figura 4.19 A), até à concentração de 1,0 μM . Embora para 5,0 μM , se tenha registado uma pequena redução da viabilidade ($p < 0,05$) de cerca de 23% e 40%, para 1 h e 24 h de exposição ao corante irradiado, respetivamente. A concentração de 10 μM é citotóxica no escuro, tendo reduzido a viabilidade das células Caco-2, quase na totalidade (Figura 4.19 A).

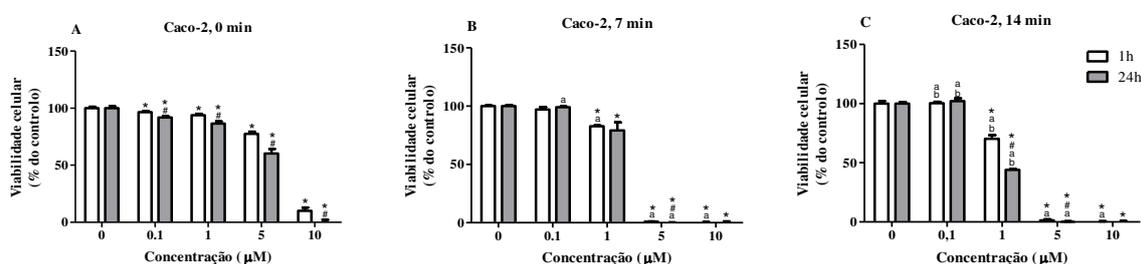


Figura 4.19. Efeito citotóxico do corante **24** na linha celular Caco-2, em função da concentração e do tempo de irradiação. Os símbolos acima das barras correspondem às diferenças encontradas após análise estatística, sendo: * controlo vs outras concentrações; # diferentes tempos de exposição ao corante; a condição não irradiada vs irradiada; b 7 minutos de irradiação vs 14 minutos de irradiação.

Após 7 minutos de irradiação (Figura 4.19 B) são notórias algumas diferenças. A concentração de 5,0 μM aboliu a viabilidade celular, para ambos os tempos de exposição. Com 1,0 μM foram registados ligeiros decréscimos da viabilidade ($\approx 20\%$). Quando se prolongou o tempo de irradiação para 14 minutos (Figura 4.19 C) verificou-se que 1,0 μM induziu uma perda de viabilidade mais acentuada, sendo esta dependente do tempo exposição ao corante irradiado.

No que toca ao efeito do corante **24**, na linha celular HepG2 verificou-se que este composto não apresenta citotoxicidade no escuro até à concentração de 1,0 μM (Figura 4.20 A). Contudo, 5,0 μM e 10,0 μM induziram quase, e total, perda de viabilidade, respetivamente.

Quando se irradiaram as células durante 7 minutos (Figura 4.20 B) registou-se o comportamento esperado, à concentração de 1,0 μM . Esta concentração que não é citotóxica no escuro, agora induziu perda de viabilidade celular, aproximadamente 50%, para ambos os tempos de exposição ao corante irradiado. Contudo, a irradiação de 14 minutos (Figura 4.20 C) não incrementou apreciavelmente a toxicidade, embora se registassem diferenças significativas

($p < 0,05$), na concentração de $1,0 \mu\text{M}$, entre as condições de 7 minutos e 14 minutos de irradiação.

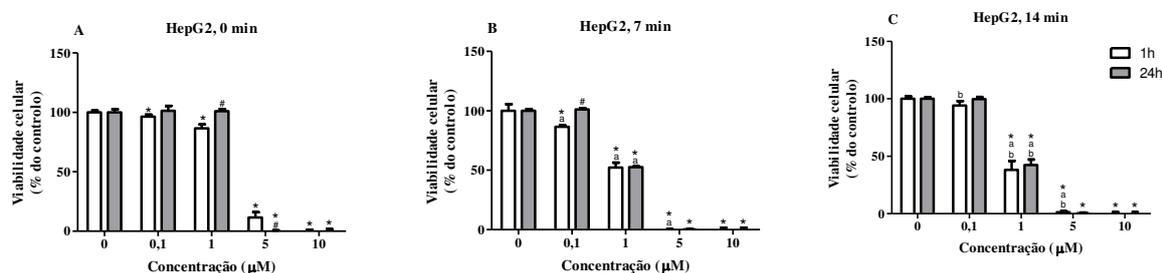


Figura 4.20. Efeito citotóxico do corante **24** na linha celular HepG2, em função da concentração e do tempo de irradiação. Os símbolos acima das barras correspondem às diferenças encontradas após análise estatística, sendo: * controle vs outras concentrações; # diferentes tempos de exposição ao corante; a condição não irradiada vs irradiada; b 7 minutos de irradiação vs 14 minutos de irradiação.

Com estes resultados verificou-se que o corante **24** é mais citotóxico para as células HepG2. No entanto, apresentou boa resposta fototerapêutica para ambas as linhas celulares, nomeadamente para a concentração $5,0 \mu\text{M}$ nas células Caco-2 e a concentração de $1,0 \mu\text{M}$ para os dois tipos de células. Porém, para as células HepG2 o efeito citotóxico da concentração de $1,0 \mu\text{M}$ seja observado após 7 minutos de irradiação, enquanto nas células Caco-2 esse efeito só é verificado na condição de 24 h de exposição ao corante irradiado durante 14 minutos. Por outro lado, nas células HepG2 poderiam ser testadas várias gamas de concentrações entre 0,1 e $1,0 \mu\text{M}$, bem como entre $1,0$ e $5,0 \mu\text{M}$, de modo a tentar encontrar uma concentração que apresente uma melhor resposta fototerapêutica. O mesmo poderia ser realizado para as células Caco-2, onde a gama de concentrações a ser estudada estaria entre $1,0$ e $5,0$ tratamentos faseados. Contudo, a concentração de $1,0 \mu\text{M}$, poderia vir a ser aplicada, no caso das células HepG2, em tratamentos faseados, sendo que o tratamento seria repetido várias vezes até que o tumor desaparecesse.

4.1.2.9. Avaliação do potencial fototerapêutico do corante 25

Ao fim de 24 h de incubação das células com o corante **25**, procedeu-se à irradiação com LEDs centrados a 660 nm .

Após análise dos resultados verificou-se que o corante **25** não induziu citotoxicidade no escuro, para as células Caco-2, até à concentração de $5,0 \mu\text{M}$ (Figura 4.21 A). A concentração de $10 \mu\text{M}$ reduziu a viabilidade celular em ambos os tempos de exposição ($p < 0,05$), na condição de 24 h de exposição em cerca de 50% e na de 1 h em cerca de 30%.

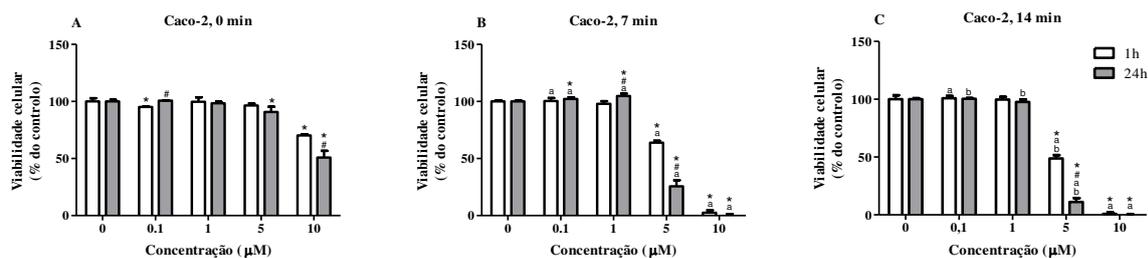


Figura 4.21. Efeito citotóxico do corante 25 na linha celular Caco-2, em função da concentração e do tempo de irradiação. Os símbolos acima das barras correspondem às diferenças encontradas após análise estatística, sendo: * controle vs outras concentrações; # diferentes tempos de exposição ao corante; a condição não irradiada vs irradiada; b 7 minutos de irradiação vs 14 minutos de irradiação.

Após 7 minutos de irradiação (Figura 4.21 B), o corante **25** induziu redução total da viabilidade das células Caco-2 à concentração de 10,0 µM. Também, para a concentração de 5,0 µM se verificou uma redução de viabilidade de 35% e 75% para 1 h e 24 h de exposição ao corante irradiado, respectivamente. Contudo, aumentando o tempo de irradiação para 14 minutos (Figura 4.21 C) apenas se registou um ligeiro aumento da perda de viabilidade ($p < 0,05$). Todo o resto manteve-se inalterado.

Quando se expuseram as células HepG2 ao corante **25** verificou-se que esta linha celular é um pouco mais suscetível que a Caco-2. Neste caso, registou-se perda de viabilidade no escuro (Figura 4.22 A) à concentração de 5,0 µM e 10,0 µM, para ambos os tempos de exposição, tendo, a 10,0 µM, sido aquela que reduziu a viabilidade das células HepG2 quase na totalidade.

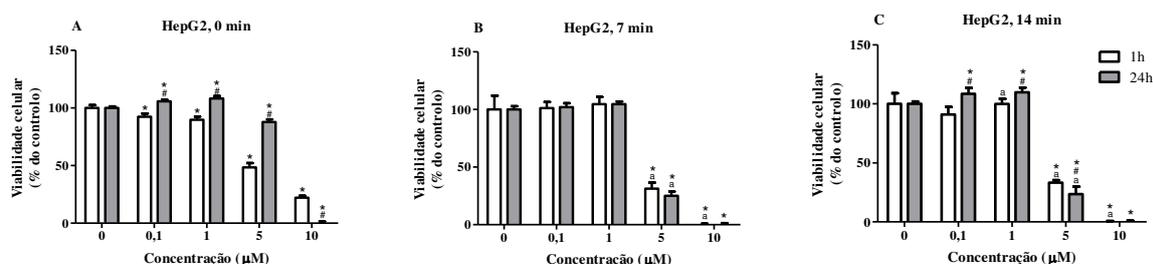


Figura 4.22. Efeito citotóxico do corante 25 na linha celular HepG2, em função da concentração e do tempo de irradiação. Os símbolos acima das barras correspondem às diferenças encontradas após análise estatística, sendo: * controle vs outras concentrações; # diferentes tempos de exposição ao corante; a condição não irradiada vs irradiada; b 7 minutos de irradiação vs 14 minutos de irradiação.

No entanto, após 7 minutos de irradiação (Figura 4.22 B) verificou-se redução acentuada da viabilidade celular, para concentração de 5,0 µM, nomeadamente para a condição de 24 h de exposição ao corante irradiado, que no escuro não era considerada citotóxica ($\approx 75\%$ de redução da viabilidade). Porém, o aumento do tempo de irradiação para 14 minutos (Figura

4.22 C) não provocou qualquer alteração na viabilidade celular, relativamente à condição de 7 minutos de irradiação, para qualquer concentração aplicada ($p > 0,05$).

Com estes resultados é possível verificar que o corante **25**, afeta um pouco mais a viabilidade das células HepG2, sendo completamente tóxico na concentração de 10,0 μM . No entanto, verificou-se uma boa resposta fototerapêutica, nas células Caco-2, nomeadamente para a concentração de 10,0 μM (1 h de exposição ao corante irradiado) e para a concentração de 5,0 μM , onde apesar de não haver total redução de viabilidade após irradiação, poderia ser aplicado em situações de tratamento faseado.

4.1.2.10. Avaliação do potencial fototerapêutico do corante 26

Para ativação do corante **26** foram utilizados LEDs centrados a 660 nm.

Ao analisar os resultados obtidos para a linha celular Caco-2 (Figura 4.23 A) verifica-se que o corante **26** só se apresenta citotóxico, no escuro, para a concentração de 10,0 μM , que promoveu a redução da viabilidade celular quase na sua totalidade, em ambos os tempos de exposição ao corante. Após irradiação (Figura 4.23 B e C) verificou-se que esta não foi eficaz, apenas se observou um ligeiro decréscimo ($p < 0,05$) da viabilidade celular para a concentração de 5,0 μM , quando se irradiaram as células durante 14 minutos (Figura 4.23 C).

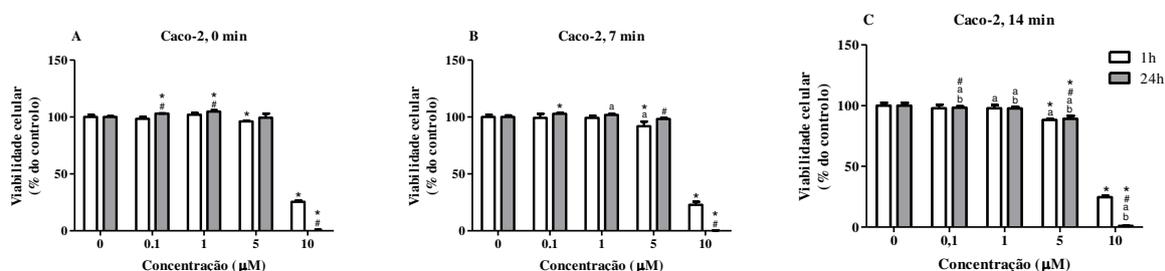


Figura 4.23. Efeito citotóxico do corante 26 na linha celular Caco-2, em função da concentração e do tempo de irradiação. Os símbolos acima das barras correspondem às diferenças encontradas após análise estatística, sendo: * controlo vs outras concentrações; # diferentes tempos de exposição ao corante; a condição não irradiada vs irradiada; b 7 minutos de irradiação vs 14 minutos de irradiação.

Quanto ao efeito do corante **26** nas células HepG2, pode verificar-se que o composto mantém o nível de citotoxicidade, no escuro, semelhante ao descrito para as células Caco-2 (comparar Figura 4.23 A com Figura 4.24 A). O corante **26** não é tóxico no escuro, para as células HepG2, até à concentração de 5,0 μM (Figura 4.24 A), mas a 10,0 μM é extremamente tóxica no escuro, reduzindo a viabilidade das células HepG2 praticamente na sua totalidade.

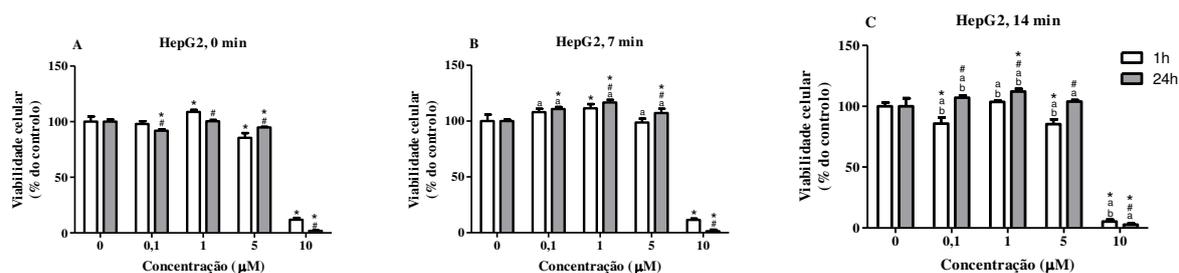


Figura 4.24. Efeito citotóxico do corante **26** na linha celular HepG2, em função da concentração e do tempo de irradiação. Os símbolos acima das barras correspondem às diferenças encontradas após análise estatística, sendo: * controle vs outras concentrações; # diferentes tempos de exposição ao corante; **a** condição não irradiada vs irradiada; **b** 7 minutos de irradiação vs 14 minutos de irradiação.

A irradiação durante 7 minutos (Figura 4.24 B) não produziu qualquer efeito negativo na viabilidade das células, para todas as concentrações aplicadas e para ambos os tempos de exposição ao corante irradiado, comparando com as células não irradiadas. No entanto, quando se irradiou durante 14 minutos (Figura 4.24 C), são notórias algumas variações ($p < 0,05$), ainda que ligeiras. Nomeadamente, para 0,1 µM, que induziu redução de cerca de 15% da viabilidade celular, nas células expostas ao corante irradiado durante 1 h, e 5,0 µM também induziu decréscimo de 15% da viabilidade para 1 h de exposição ao corante irradiado.

Com estes resultados verificou-se que o corante **26** apenas apresentou toxicidade para ambas as linhas celulares na concentração de 10,0 µM. No entanto, este corante não apresentou resposta fototerapêutica significativa, para qualquer tempo de irradiação e concentração, pelo que não poderá ser aplicado como FS, nestas linhas celulares.

4.1.3. Avaliação do potencial dos corantes escurílicos e aminoescuarílicos derivados do benzotiazole e da quinaldina e do benzotiazole e da 6-iodoquinaldina para aplicação como FS em PDT – comparação de resultados

Como já foi anteriormente referido, para que um corante possa ser considerado um potencial FS, para aplicação em PDT do cancro, tem de respeitar diversos parâmetros tais como não ser tóxico no escuro e só apresentar toxicidade após a sua ativação, através de irradiação a comprimento de onda adequado (Alisson *et al.*, 2004; O'Connor *et al.*, 2009; Avirah *et al.*, 2012).

No sentido de encontrar novos FS, com potencial para aplicação em PDT do cancro, foram, para este trabalho, sintetizadas várias cianinas escurílicas assimétricas e o seu potencial fototerapêutico foi testado em duas linhas celulares (Caco-2 e HepG2). Com os resultados de citotoxicidade obtidos verificou-se que a maioria dos compostos sintetizados apresenta toxicidade no escuro para as duas concentrações mais altas (5,0 µM e 10,0 µM).

No geral, os compostos derivados do benzotiazole e da quinaldina mostraram-se mais citotóxicos no escuro para ambas as linhas celulares em estudo. Contudo, independentemente, do tipo de corante aplicado, as células HepG2 foram normalmente as mais afetadas. Fagundes (2013), também verificou maior suscetibilidade das células HepG2 quando testou corantes esquarílicos assimétricos derivados do 6-iodobenzotiazole e do benzoselenazole, assim como Ferreira (2013a) quando aplicou corantes esquarílicos simétricos derivados da quinaldina, nas mesmas linhas celulares utilizadas neste estudo. Em 2014, Pacheco também verificou maior suscetibilidade por parte das células HepG2, em relação às Caco-2, após a avaliação do potencial fototerapêutico de corantes esquarílicos simétricos derivados da 6-iodoquinaldina. No entanto, este facto não invalida a possível aplicação, de vários dos compostos sintetizados, como FS para PDT de cancro, pois tal como foi verificado, neste trabalho, para as concentrações mais baixas foram registadas boas respostas fototerapêuticas, para ambas as linhas celulares.

No conjunto dos corantes esquarílicos assimétricos derivados do benzotiazole e da quinaldina verificou-se boa resposta fototerapêutica para o corante **13**, na concentração de 1,0 μM onde a viabilidade das células Caco-2 foi reduzida após 14 minutos de irradiação e se verificou redução da viabilidade das células HepG2 após 7 minutos de irradiação. Para o corante **14**, que induziu perda de viabilidade das células Caco-2 após 14 minutos de irradiação, apresentando maior intensidade na condição de 24 horas de exposição ao corante irradiado. E para o corante **17** que reduziu a viabilidade celular das células Caco-2, na concentração de 5,0 μM após 14 minutos de irradiação, na condição de 1 h de exposição ao corante irradiado. No entanto, para o corante **17** era esperada uma resposta fototerapêutica mais eficiente, visto que este foi o corante que apresentou melhor rendimento quântico de formação de $^1\text{O}_2$ singuleto ($\Phi\Delta = 0,11$). Para os restantes, era esperada uma menor resposta fototerapêutica uma vez que os seus rendimentos quânticos eram muitos próximos de 0. Isto indica que os corantes, deste conjunto, que apresentaram boa resposta fototerapêutica podem ter atuado, não através da reação do tipo II, mas sim através da indução da reação do tipo I ou do tipo III. Para o corante **15**, que tem como substituinte no anel central de quatro membros uma anilina, e que apresentou um rendimento quântico de formação de $^1\text{O}_2$ razoável ($\Phi\Delta = 0,08$) era esperada uma melhor resposta fototerapêutica. Mas este não correspondeu às nossas expectativas, induzindo elevada toxicidade no escuro e não respondendo de forma muito eficaz à irradiação.

Dentro do conjunto dos corantes esquarílicos assimétricos derivados do benzotiazole e da 6-iodoquinaldina os que apresentaram melhor resposta fototerapêutica foram o **21**, seguido do **23** e **24**. O corante zwitteriónico **21** foi o corante deste conjunto que mostrou a melhor

resposta fototerapêutica para ambas as linhas celulares, não se mostrando tóxico no escuro para qualquer concentração e reduzindo a viabilidade das células quase na totalidade após a irradiação, essencialmente às concentrações de 5,0 e 10,0 μM . Segue-se o corante **23** que não se mostrou tóxico no escuro, para as células Caco-2 até à concentração de 5,0 μM e que reduziu totalmente a sua viabilidade para essa concentração após 7 minutos de irradiação. Finalmente, o corante **24** que não se apresentou tóxico no escuro para as células Caco-2 até à concentração de 5,0 μM (1 h de exposição ao corante) e que não só reduziu totalmente a sua viabilidade a essa concentração, após 7 minutos de irradiação, como também induziu perda de viabilidade na concentração de 1,0 μM , após 14 minutos de irradiação. Além disso, o corante **24** também reduziu eficazmente, embora não completamente, a viabilidade das células HepG2, na concentração de 1,0 μM , que não era citotóxica no escuro, após 7 minutos de irradiação.

Comparando o efeito da irradiação entres os compostos análogos sintetizados, na viabilidade das células, verificou-se que no geral os corantes derivados do benzotiazole e da 6-iodoquinaldina apresentam melhor resposta fototerapêutica. Por exemplo, o composto **21** apresentou melhor resposta fototerapêutica que o seu análogo **11**, que não respondeu à irradiação e cuja toxicidade era induzida pelo solvente usado na sua dissolução. Apesar disso, resultados semelhantes aos obtidos para o composto **11** foram encontrados na literatura para o corante simétrico análogo derivado da quinaldina (Ferreira, 2013a), embora o solvente utilizado na dissolução desse corante (MeOH/CH₂Cl₂ (99:1)), se tenha mostrado não tóxico para as células Caco-2 e HepG2, contrariamente ao verificado neste trabalho cujo solvente utilizado (DMSO/CH₂Cl₂ (25:1)), se mostrou citotóxico para ambas as linhas celulares na concentração mais alta (10,0 μM). No entanto, o corante **21** apresentou um perfil idêntico ao observado para o corante esuarílico assimétrico zwitteriônico derivado de 6-iodobenzotiazole e benzoselenazole, sintetizado por Fagundes, em 2013. Porém, o corante obtido por Fagundes (2013), apresentou uma melhor resposta fototerapêutica e menor toxicidade no escuro para as células Caco-2 e HepG2. Também o corante **25** apresentou melhores características de FS que o seu análogo **15**, sendo o seu efeito muito semelhante ao verificado por Fagundes, em 2013, para o corante assimétrico derivado de 6-iodobenzotiazole e benzoselenazole com o grupo NHPH no anel central de quatro membros. Contudo, o corante **25** não induziu morte celular, tão eficazmente, após irradiação, como o corante análogo sintetizado por Fagundes (2013), para a concentração de 1,0 μM . Os corantes **23** e **26** apresentaram perfis de toxicidade muito semelhantes, aos encontrados para compostos análogos que apresentavam os mesmos

substituintes no anel central de quatro membros (NH₂ e 3-I-NHPh, respetivamente), descritos na literatura (Fagundes, 2013), para as células Caco-2 e HepG2.

Para os corantes **16**, **17** e **26** era esperada uma melhor resposta fototerapêutica por serem os compostos que apresentam mais átomos de iodo na sua estrutura. Porém, os compostos **16** e **26**, devido ao seu contra-íão, não apresentaram rendimentos quânticos de formação de oxigénio singuleto elevados, pelo que já se especulavam resultados menos positivos. Ainda assim, o facto de o corante **17** não ter apresentado o perfil fototerapêutico esperado pode ser explicado por alguma incompatibilidade da estrutura da molécula com a membrana das células que não permitisse a sua passagem para o meio intracelular.

4.1.4. Conclusões

A partir dos resultados obtidos pode-se concluir que as células HepG2 são mais afetadas pelos corantes que as células Caco-2. Também se pôde verificar que os corantes derivados do benzotiazole e da 6-iodoquinaldina apresentaram melhores respostas fototerapêuticas, em comparação com o grupo de compostos derivados do benzotiazole e da quinaldina.

Foi também possível concluir que estes compostos atuam nas células por outra via que não a reação do tipo II, uma vez que no geral o rendimento quântico de formação do oxigénio singuleto foi próximo de zero, à exceção dos corantes **15** e **17**. Contudo, estes dois corantes que apresentam o melhor rendimento quântico (0,08 e 0,11, respetivamente), não foram os corantes que apresentaram as melhores respostas fototerapêuticas.

Relativamente à citotoxicidade induzida pelos compostos pode-se concluir que a concentração de 10 µM geralmente é muito tóxica no escuro, tendo-se verificado, na maioria dos casos, perda total da viabilidade celular, em ambas as linhas celulares. Concluiu-se também que os corantes derivados do benzotiazole e da quinaldina são mais tóxicos (para ambas as linhas celulares) que os corantes derivados do benzotiazole e da 6-iodoquinaldina. Além disso, conclui-se que o aumento do tempo de exposição das células aos corantes derivados do benzotiazole e da quinaldina incrementam a perda de viabilidade.

É verificado efeito da irradiação para os compostos **13**, **14**, **17**, **21**, **23**, **24** e **25**. No entanto, para as células Caco-2 os corantes que apresentaram melhores respostas fototerapêuticas, e que por isso poderão ser considerados potenciais FS para aplicação em PDT do cancro, foram os corantes **13**, **21**, **23** e **25** e para as células HepG2 os corantes **21** e **24**.

Capítulo 5

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Referências Bibliográficas

- Agostinis, P., Berg, K., Cengel, K. A., Foster, T. H., Girotti, A. W., Gollnick, S. O., Hahn, S.M., Hamblin, M.R., Juzemiene, A., Kessel, D., Korbelik, M., Moan, J., Mroz, P., Nowis, D., Piette, J., Wilson, B.C., e Golab, J. (2011). Photodynamic Therapy of Cancer: An Update. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 61, pp. 250-281.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Keith, R., e Walter, P. (2002). Isolating cells and growing them in culture. Em B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, R. Keith, e P. Walter, *Molecular Biology of the Cell* (4 ed.). Garland Science. Acedido a 9 de Julho de 2014, de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26851>
- Alisson, R. R., e Sibata, C. H. (2010). Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: A clinical review. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 7, pp. 61-75.
- Alisson, R. R., Downie, G. H., Cuenca, R., Hu, X.-H., Childs, C. J., e Sibata, C. H. (2004). Photosensitizers in clinical PDT. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 1, pp. 27-42.
- Allison, R. R., e Moghissi, K. (2013). Oncologic photodynamic therapy: Clinical strategies that modulate mechanisms of action. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 10, pp. 331-341.
- Allison, R. R., Mota, H. C., e Sibata, C. H. (2004). Clinical PD/PDT in North America: An historical. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 1, pp. 263-277.
- Almeida, R. D., Manadas, B. J., Carvalho, A. P., e Duarte, C. B. (2004). Intracellular signaling mechanisms in photodynamic therapy. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1704, pp. 59-86.
- Al-Nasiry, S., Geusens, N., Hanssens, M., Luyten, C., e Pijnenborg, R. (2007). The use of Alamar Blue assay for quantitative analysis of viability, migration and invasion of choriocarcinoma cells. *Human Reproduction*, 22, pp. 1304–1309.
- Alves, E. A., e Guimarães, A. C. (2010). Cultivo celular. Em E. Molinaro, L. Caputo, & R. Amendoeira, *Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratório de saúde* (Vol. 2, pp. 215-252). Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio/Fundação Oswaldo Cruz.
- Anantharaman, A., Subramanian, B., Chandrasekaran, R., Seenivasan, R., e Siva, R. (2014). Colorants an cancer: A review. *Industrial Crops and Products*, 53, pp. 167-186.
- Anoopkumar-Dukie, S., Carey, J. B., Conere, T., O’Sullivan, E., Pelt, F. N., e Allshire, A. (2005). Resazurin assay of radiation response in cultured cells. *The British Journal of Radiology*, 78, pp. 945–947.

- Armitage, B. A. (2008). Cyanine dye - Nucleic Acid Interactions. In L. Strekowski, *Heterocyclic polymethine dyes: synthesis, properties and applications* (Vol. 14, pp. 11-29). Springer. Acedido a 30 de Abril de 2014, de <http://www.doc88.com/p-075309319155.html>
- ATCC. (2014a). *Caco2 [Caco2] (ATCC® HTB37™) - Product Sheet*.
- ATCC. (2014b). *Hep G2 [HEPG2] (ATCC® HB8065™) - Product Sheet*.
- Avirah, R. R., Jayaram, D. T., Adarsh, N., e Ramaiah, D. (2012). Squaraine dyes in PDT: from basic design to in vivo demonstration. *Org. Biomol. Chem*, 10, pp. 911-920.
- Balimane, P. V., Chong, S., e Morrison, R. A. (2000). Current methodologies used for evaluation of intestinal permeability and absorption. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 44, pp. 301-312.
- Bazylińska, U., Pietkiewicz, J., Saczko, J., Nattich-Rak, M., Rossowska, J., Garbiec, A., e Wilk, K. A. (2012). Nanoemulsion-templated multilayer nanocapsules for cyanine-type photosensitizer delivery to human breast carcinoma cells. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 47, pp. 406–420.
- Berrios, R. L., e Arbiser, J. L. (2011). Novel antiangiogenic agents in dermatology. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 508, pp. 222-226.
- Bertram, J. S. (2001). The molecular biology of cancer. *Molecular Aspects of Medicine*, 21, pp. 167-223.
- Bonnett, R. (1995). Photosensitizers of the Porphyrin and Phthalocyanine Series for Photodynamic Therapy. *Chemical Society Reviews*, 24, pp. 19-33.
- Borra, R. C., Lotufo, M. A., Gaglioti, S. M., Barros, F. M., e Andrade, P. M. (2009). A simple method to measure cell viability in proliferation and cytotoxicity assays. *Brazilian Oral Research*, 23, pp. 255-262.
- Bouma, M.-E., Rogier, E., Verthier, N., Labarre, C., e Feldmann, G. (1989). Further Cellular Investigation of the Human Hepatoblastoma-Derived Cell Line HepPG2: Morphology and Immunocytochemical Studies of Hepatic-Secreted Proteins. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*, 25, pp. 267-275.
- Buytaert, E., Dewaele, M., e Agostinis, P. (2007). Molecular effectores of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1776, pp. 86-107.
- Castano, A. P., Demidova, T. N., e Hamblin, M. R. (2004). Mechanisms in photodynamic therapy: part one - Photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 1, pp. 279-293.

- Chan, L. M., Lowes, S., e Hirst, B. H. (2004). The ABCs of drug transport in intestine and liver: efflux proteins limiting drug absorption and bioavailability. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 21, pp. 25-51.
- Chandraskaran, J. (2001). Chemistry of colours. *Resonance*, 6, pp. 66-75.
- Delaey, E., van Laar, F., De Vos, D., Kamuhabwa, A., Jacobs, P., e de Witte, P. (2000). A comparative study of the photosensitizing characteristics of some cyanine dyes. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 55, pp. 27–36.
- Devi, D. G., Cibir, T., 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. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 92, 153–159.
- Dougherty, T. J., Kaufman, J. E., Goldfarb, A., Weishaupt, K. R., Boyle, D., e Mittleman, A. (1978). Photoradiation Therapy for the Treatment of Malignant Tumors. *Cancer Research*, 38, pp. 2628-2635.
- Ethirajan, M., Chen, Y., Joshi, P., e Pandey, R. K. (2011). The role of porphyrin chemistry in tumor imaging and photodynamic therapy. *Chemical Society Reviews*, 40, pp. 340–362.
- Ethirajan, M., Saenz, C., Gupta, A., Dobhal, M. P., e Pandey, R. K. (2008). Photosensitizers for photodynamic Therapy and Imaging. Em M. Hamblin, e P. Mroz, *Advances in Photodynamic therapy*. Artech House.
- Fagundes, S. (2013). *Corantes esquarílicos com potencial utilização em terapia fotodinâmica do cancro*. Dissertação de mestrado no 2º ciclo em Bioquímica, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro.
- Ferlay, J., Foucher, E., Tieulent, J., Rosso, S., Coebergh, J., Comber, H., Forman, D., e Bray, F. (2013). Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012. *European Journal of Cancer*, 49, pp. 1374-1403.
- Ferreira, A. M. (2013a). *Síntese, caracterização espectroscópica de corantes aminoesquarílicos derivados da quinaldina e sua eficácia na viabilidade e proliferação celular nas linhas celulares Caco-2 e HepG2*. Relatório de final de Estágio em Bioquímica (1º Ciclo), Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro.
- Ferreira, D. P., Conceição, D. S., Ferreira, V. R., Graça, V. C., Santos, P. F., e Ferreira, L. F. (2013b). Photochemical properties of squarylium cyanine dyes. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 12, pp. 1948–1959.
- Freshney, R. I. (2010). *A culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications* (6 ed.). John Wiley & Sons.
- Fukuda, Y., e Schuetz, J. D. (2012). ABC transporters and their role in nucleoside and nucleotide drug resistance. *Biochemical Pharmacology*, 83, pp. 1073-1083.

- Gibco. (2014). *Cell culture basics*. Thermo Fisher Scientific Inc. Obtido de http://www2.lubio.ch/uploads/tx_pdforder/Cell-Culture-Basics-plus-Transfection_01.pdf
- Graça, V. (2013). *Síntese de Corantes Esquarílicos para Cromatografia de Afinidade de Biomoléculas*. Dissertação de mestrado no 2º ciclo em Bioquímica, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro.
- Graça, V. S., Silva, M. S., Reis, L. V., Sousa, F., Almeida, P., Queiroz, J. A., e Santos, P. F. (2014). Ethylenediamine-Derived Chromatographic Ligand to Separate BSA, Lysozyme, and RNase A. *Chromatographia*, 77, pp. 1529–1537.
- Gromov, S. P., Fomina, M. V., Nikiforov, A. S., Vedernikov, A. I., Kuz'mina, L. G., e Howard, J. A. (2013). Synthesis of symmetrical cyanine dyes with two N-ammonioalkyl groups. *Tetrahedron*, 69, pp. 5898-5907.
- Guerra, S. (2012). *Síntese e caracterização espectroscópica de corantes esquarílicos e sua avaliação na proliferação e viabilidade das linhas celulares HepG-2 e Caco-2*. Relatório final de Estágio em Bioquímica (1º ciclo), Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro.
- International Organization for Standardization. (2009). *ISO 10993-5:2009 Biological Evaluation of Medical Devices Part 5: Tests for in Vitro Cytotoxicity*.
- Janku, F., McConkey, D. J., Hong, D. S., e Kurzrock, R. (2011). Autophagy as a target for anticancer therapy. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 8, pp. 528–539.
- Jyothish, K., Arun, K. T., e Ramaiah, D. (2004). Synthesis of novel quinaldine-based squaraine dyes: effect of substituents and role of electronic factors. *Organic Letters*, 6, pp. 3965-3968.
- Jyothish, K., Avirah, R. R., e Ramaiah, D. (2007). Development of squaraine dyes for photodynamic therapeutical applications: synthesis and study of electronic factors in the dye formation reaction. *ARKIVOC*, 8, pp. 296-310.
- Kaatsch, P. (2012). Epidemiology of Childhood Cancer. *Cancer Treatment Reviews*, 36, pp. 277-285.
- Kalka, K., Merk, H., e Mukhtar, H. (2000). Photodynamic therapy in dermatology. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 42, pp. 389–413.
- Kaloyanova, S., Crnolatac, I., Lesev, N., Piantanida, I., e Deligeorgiev, T. (2012). Synthesis and study of nucleic acids interactions of novel monomethine cyanine dyes. *Dyes and Pigments*, 92, pp. 1184-1191.

- Kaloyanova, S., Trusova, V. M., Gorbenko, G. P., e Deligeorgiev, T. (2011). Synthesis and fluorescence characteristics of novel asymmetric cyanine dyes for DNA detection. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 217, pp. 147–156.
- Kanetkar, V. R. (2010). Colour: History and Advancements. *Resonance*, 15, pp. 794-803.
- Kashef, N., Abadi, G. R., e Djavid, G. E. (2012). Photodynamic inactivation of primary human fibroblasts by methylene blue and toluidine blue O. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 9, pp. 355-358.
- Kim, S. H., e Hwang, S. H. (1998). Electrochromic Properties of Functional Squarylium Dyes. *Dyes and Pigment*, 36, pp. 139-148.
- Kim, S., Mor, G. K., Paulose, M., Varghese, O. K., Baik, C., e Grimes, C. A. (2010). Molecular Design of Near-IR Harvesting Unsymmetrical Squaraine Dyes. *Langmuir*, 26, pp. 13486-13492.
- Kobayashi, T., Du, J., e Kida, Y. (2012). Ultrafast real-time vibrational dynamics in J-aggregates. Em T. Kobayashi, *J-aggregates* (Vol. 2). Word Scientific.
- Konan, Y. N., Gurny, R., e Allémann, E. (2002). State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 66, pp. 89-106.
- Kudinova, N. V., e Berezov, T. T. (2010). Photodynamic Therapy of Cancer: Search for ideal photosensitizer. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry*, 4, pp. 95-103.
- Langdon, S. P. (2003). Basic Principles of Cancer Cell Culture. Em S. P. Langdon, *Cancer Cell Culture: Methods and Protocols* (Vol. 88). Humana Press.
- Leir, C. M. (1977). An improvement in the Doebner-Miller synthesis of quinaldine. *Journal of Organic Chemistry*, 42, pp. 911-913.
- Leslie, E. M., Deeley, R. G., e Cole, S. P. (2005). Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 204, pp. 216 – 237.
- Lim, C.-K., Heo, J., Shin, S., Jeong, K., Seo, Y. H., Jang, W.-D., Park, C. R., Park, S. Y., Kim, S. H., e Kwon, I. C. (2013). Nanophotosensitizers toward advanced photodynamic therapy of Cancer. *Cancer Letters*, 334, pp. 176–187.
- Lim, M. E., Lee, Y.-I., Zhang, Y., e Chu, J. J. (2012). Photodynamic inactivation of viruses using upconversion nanoparticles. *Biomaterials*, 33, pp. 1912-1920.
- Luksiene, Z. (2003). Photodynamic therapy: mechanism of action and ways to improve the efficiency of treatment. *Medicina*, 39, pp. 1137-1150.

- Macdonald, I. J., e Dougherty, T. J. (2001). Basic principles of photodynamic therapy. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, 5, pp. 105–129.
- Machado, A. E. (2000). Terapia Fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. *Química Nova*, 23, pp. 237-243.
- Master, A., Livingston, M., e Gupta, A. S. (2013). Photodynamic nanomedicine in the treatment of solid tumors: Perspectives and challenges. *Journal of Controlled Release*, 168, pp. 88-102.
- Matsugi, M., Tabusa, F., e Minamikawa, J.-i. (2000). Doebner–Miller synthesis in a two-phase system: practical preparation of quinolines. *Tetrahedron Letters*, 41, pp. 8523–8525.
- McMillian, M. K., Li, L., Parker, J. B., Patel, L., Zhong, Z., Gunnett, J. W., Powers, W. J., e Johnson, M. D. (2002). An improved rezasurin-based cytotoxicity assay for hepatic cells. *Cell Biology and Toxicology*, 18, pp. 157-173.
- Mishra, A., Behera, R. K., Behera, P. K., Mishra, B. K., e Behera, G. B. (2000). Cyanines during the 1990s: A Review. *Chemical Reviews*, 100, pp. 1973-2011.
- Moor, A. C. (2000). Signaling pathways in cell death and survival after photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 57, pp. 1-13.
- Mroz, P., Yaroslavsky, A., Kharkwal, G. B., e Hamblin, M. R. (2011). Cell Death Pathways in Photodynamic Therapy of Cancer. *Cancers*, 3, pp. 2516-2539.
- Nema, R., e Khare, S. (2012). An animal cell culture: Advance technology for modern research. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 3, pp. 219-226.
- O'Connor, A. E., Gallagher, W. M., e Byrne, A. T. (2009). Porphyrin and Nonporphyrin Photosensitizers in Oncology: Preclinical and Clinical Advances in Photodynamic Therapy. *Photochemistry and Photobiology*, 85, pp. 1053–1074.
- O'Brien, J., Wilson, I., Orton, T., e Pognan, F. (2000). Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *European Journal of Biochemistry*, 267, pp. 5421-5426.
- Ormond, A. B., e Freeman, H. S. (2013). Dye Sensitizers for Photodynamic Therapy. *Materials*, 6, pp. 817-840.
- Pacheco, M. L. (2014). *Síntese e caracterização espectroscópica de corantes esquarílicos derivados da 6-iodoquinaldina e seu efeito nas linhas celulares Caco-2 e HepG2*. Relatório final de Estágio em Bioquímica (1º Ciclo), Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro.
- Panigrahi, M., Dash, S., Patel, S., e Mishra, B. K. (2012). Syntheses of cyanines: a review. *Tetrahedron*, 68, pp. 781-805.

- Pardal, A. C., Ramos, S. S., Santos, P. F., Reis, L. V., e Almeida, P. (2002). Synthesis and Spectroscopic Characterisation of N-Alkyl Quaternary Ammonium Salts Typical Precursors of Cyanines. *Molecules*, 7, pp. 320-330.
- Paszko, E., Ehrhardt, C., Senge, M. O., Kelleher, D. P., e Reynolds, J. V. (2011). Nanodrug applications in photodynamic therapy. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 8, pp. 14—29.
- Perrin, D. D., e Armarego, W. L. (1988). *Purification of laboratory chemicals* (3 ed.). Oxford: Pergamon Press.
- Perussi, J. R. (2007). Inativação Fotodinâmica de Microrganismos. *Química Nova*, 30, pp. 988-994.
- Photolitec. (2013). Acedido a 3 de Novembro de 2013, de http://www.photolitec.org/Tech_PDT.html
- Pinheiro, P. S., Tyckynski, J. E., Bray, F., Amado, J., Matos, E., e Parkin, D. M. (2003). Cancer incidence and mortality in Portugal. *European Journal of Cancer*, 39, pp. 2507-2520.
- Preuß, A., Saltsman, I., Mahammed, A., Pfitzner, M., Goldberg, I., Gross, Z., e Röder, B. (2014). Photodynamic inactivation of mold fungi spores by newly developed charged corroles. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2014.02.013>
- Ramaiah, D., Eckert, I., Arun, K. T., Weidenfeller, L., e Epe, B. (2002). Squaraine Dyes for Photodynamic Therapy: Study of Their Cytotoxicity and Genotoxicity in Bacteria and Mammalian Cells. *Photochemistry and Photobiology*, 76, 672–677.
- Reeves, K. J., Reed, M., e Brown, N. J. (2009). Is nitric oxide important in photodynamic therapy? *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 95, pp. 141-147.
- Reis, L. V., Serrano, J. P., Almeida, P., e Santos, P. F. (2009). The synthesis and characterization of novel, aza-substituted squarylium cyanine dyes. *Dyes and Pigments*, 81, pp. 197-202.
- Reynolds, K. A., Young, D. J., e Loughlin, W. A. (2010). Limitation of the "Two-Phase" Doebner-Miller Reaction for the Synthesis of Quinolines. *Synthesis*, 10, pp. 1-4.
- Ribeiro, J. N., Jorge, R. A., Silva, A. R., Flores, A. V., Ronchi, L. M., e Tedesco, A. C. (2007). Avaliação da atividade fotodinâmica de porfirinas para uso em terapia fotodinâmica através da fotoxidação de triptofano. *Eclética Química*, 32, pp. 7-14.
- Riss, T. L., Moravec, R. A., Niles, A. L., Benink, H. A., Worzella, T. J., e Minor, L. (2013). Cell Viability Assays. Em G. S. Sittampalan, N. P. Coussens, H. Nelson, M. Arrin, D. Auld, C. Austin, B. Bjecek, M. Glicksman, J. Inglese, V. Lemmon, Z. Li, J. McGee, O. McManus, L. Minor, A. Napper, T. Riss, O. J. Trask, e J. Weidner, *Assay Guidance*

- Manual*. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and The National Center for Advancing Translational Sciences. Obtido de www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/
- Robertson, C. S., Evans, D. H., e Abrahamse, H. (2009). Photodynamic therapy (PDT): A short review on celular mechanisms and cancer research applications for PDT. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 96, pp. 1-8.
- Sambuy, Y., De Angelis, I., Ranaldi, G., Scarino, M. L., Stammati, A., e Zucco, F. (2005). The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. *Cell Biology and Toxicology*, 21, pp. 1-26.
- Santos, P. F., Reis, L. V., Almeida, P., Serrano, J. P., Oliveira, A. S., e Ferreira, L. F. (2004). Efficiency of singlet oxygen generation of aminosquarylium cyanines. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 163, pp. 267–269.
- Santos, P. F., Reis, L. V., Almeida, P., e Lynch, D. E. (2011). Crystal structures of a benzoselenazole-derived squarylium cyanine dye and three derivatives substituted at the central squaric ring. *Crystal Engineering Communications*, 13, pp. 1333-1338.
- Santos, P., Reis, L., Almeida, P., Oliveira, A., e Ferreira, L. V. (2003). Singlet oxygen generation ability of squarylium cyanine dyes. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 160, pp. 159–161.
- Shi, G., Monro, S., Hennigar, R., Colpitts, J., Fong, J., Kasimova, K., Yin, H., DeCoste, R., Spencer, C., Chamberlain, L., Mandel, A., Lilge, L., e McFarland, S. A. (2015). Ru(II) dyads derived from alfa-oligothiophenes: A new class of potent and versatile photosensitizers for PDT. *Coordination Chemistry Reviews*. 282-283, pp. 127-138
- Shore, J. (2002). *Colorants and auxiliaries (Organic chemistry and application properties)* (2^a ed., Vol. 1). Society of Dyers and Colourists.
- Sigma-Aldrich. (2014a). *CACO-2 Cell Line human*. Acedido em 25 de Agosto de 2014, em <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/86010202?lang=pt®ion=PT>
- Sigma-Aldrich. (2014b). *Hep G2 Cell Line human*. Acedido em 25 de Agosto de 2014, em <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/85011430?lang=pt®ion=PT&gclid=CLCtiKzCwMACFS0Ewwod7o0AHA>
- 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. *Applied Biochemistry Biotechnology*, 169, pp. 1919-1926.
- Sinha, B. K., e Kumar, R. (2008). *Principles of Animal Cell Culture*. International Book Distributing Co.

- Souza, M. V. (2004). Novos produtos naturais capazes de atuar na estabilização de microtúbulos, um importante alvo no combate ao câncer. *Química Nova*, 27, pp. 308-312.
- Stockert, J. C., Blázquez-Castro, A., Canete, M., Horobin, R. W., e Villanueva, Á. (2012). MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. *Acta Histochemica*, 114, pp. 785-796.
- Tatikolov, A. S. (2012). Polymethine dyes as spectral-fluorescent probes for biomacromolecules. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*, 13, pp. 55-90.
- Teiten, M. H., Gaascht, F., Dicato, M., e Diederich, M. (2013). Anticancer bioactivity of compounds from medicinal plants used in European medieval traditions. *Biochemical Pharmacology*, 86, pp. 1239-1247.
- Unnati, S., Ripal, S., Sanjeev, A., e Niyati, A. (2013). Novel anticancer agents from plant sources. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 11, pp. 16-23.
- Verma, A. (2014). Animal tissue culture: principles and applications. Em A. Verma, e A. Singh, *Animal Biotechnology (Models in discovery and translation)* (pp. 211-231). Academic Press.
- Wainwright, M. (2014). In defence of "dye therapy". *International Journal of Antimicrobial Agents*, 44, pp. 26-29.
- Wezgowiec, J., Kotulska, M., Sacsco, J., Derylo, M. B., Teissie, J., Rols, M.-P., Orio, J., Garbiec, A., e Kulbacka, J. (2013). Cyanines in photodynamic reaction assisted by reversible electroporation – in vitro study on human breast carcinoma cells. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 10, pp. 490-502.
- Wild, C. P., Law, G. R., e Roman, E. (2002). Molecular epidemiology and cancer: promising areas for future research in post-genomic era. *Mutation Research*, 499, pp. 3-12.
- Wilkening, S., Stahl, F., e Augustinus, B. (2003). Comparison of primary human hepatocytes and hepatoma cell line HEPG2 with regard to their biotransformation properties. *Drug Metabolism and Disposition*, 31, pp. 1035-1042.
- Yoo, J.-O., e Ha, K.-S. (2012). New insights into the mechanisms for Photodynamic Therapy-induced cancer cell death. Em K. Jean, *International Review of cell and molecular biology* (Vol. 295). Academic Press.
- Zhang, H., Liu, L., Gao, C., Sun, R., e Wang, Q. (2012). Enhancing photostability of cyanine dye by cucurbituril encapsulation. *Dyes and Pigments*, 94, pp. 266-270.
- Zhu, T. C., e Finlay, J. C. (2008). The role of photodynamic therapy (PDT) physics. *Medical physics*, 35, pp. 3127-3136.

Anexos

ANEXO A - Corantes esquráficos e aminoesquráficos aplicados nas linhas celulares Caco-2 e HepG2, e respectivos $\lambda_{\text{máx}}$ e $\Phi\Delta$

Corantes derivados do benzotiazole e da quinaldina	Nº do corante	Estrutura	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm) (DMSO)	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm) (DMEM)	$\Phi\Delta$
	11		714 (log $\epsilon = 5,06$)	627	0,03
	13		693 (log $\epsilon = 5,25$)	605	0,05
	14		704 (log $\epsilon = 5,17$)	631	0,04
	15		691 (log $\epsilon = 5,16$)	624	0,08
	16		688 (log $\epsilon = 5,08$)	660	0,02
	17		690 (log $\epsilon = 5,17$)	656	0,11

Corantes derivados do benzotiazole e da 6-iodoquinaldina	Nº do corante	Estrutura	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm) (DMSO)	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm) (DMEM)	$\Phi\Delta$
	21		726 (log $\epsilon = 5,26$)	640	0,03
	23		705 (log $\epsilon = 5,17$)	619	0,03
	24		715 (log $\epsilon = 5,18$)	637	0,05
	25		702 (log $\epsilon = 5,08$)	652	0,03
	26		704 (log $\epsilon = 4,65$) e 776 (log $\epsilon = 4,61$)	667	0,04

ANEXO B - Publicações no âmbito deste trabalho

Comunicações em Pannel

- **Friães, S. M. P.**, Marques, T. F. C., Boto, R. E., Almeida, P., Fernandes, J. R., Silva, A. M. and Reis, L. V. (2014). Unsymmetrical aminosquarylium cyanine dyes and their cytotoxic evaluation in HepG2 and Caco-2 cells for potential application in photodynamic therapy. **XVIII Congress of the Portuguese Biochemical Society.** , 17-20 de Dezembro. Coimbra, Portugal. Pág. 137
- **Friães, S. M. P.**, Boto, R. E. F., Almeida, P. e Reis, L. V. (2014). Síntese e caracterização de um novo corante esquarílico assimétrico com potencial aplicação em PDT. **III Encontro em Técnicas de Caracterização e Análise Química.** 6 de Junho, Braga, Portugal. Pág. 47

Comunicações Orais

- **Friães, S. M. P.**, Boto, R. E., Almeida, P., Fernandes, J. R., Silva, A. M. e Reis, L. V. (2015). “Síntese, caracterização e aplicação, *in vitro*, de um corante esquarílico, avaliando o seu potencial para Terapia Fotodinâmica”. **8ª Jornadas de Bioquímica.** , 15 a 16 de Abril, UTAD, Vila Real, Portugal. Pág. 16
- **Friães, S. M. P.**, Marques, T., Boto, R. E., Almeida, P., Fernandes, J. R., Silva, A. M. e Reis, L. V. (2014). “Avaliação citotóxica em células Caco-2 e HepG2 com vista à potencial aplicação de corantes aminoesquarílicos assimétricos em Terapia Fotodinâmica”. **XX Encontro Luso-Galego de Química.** 26-28 de Novembro, Porto, Portugal. Pág. 343