

UNIVERSIDADE DE TRÁS-OS-MONTES E ALTO DOURO

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO ESPECTROSCÓPICA DE
NOVOS CORANTES ESQUARÍLICOS ASSIMÉTRICOS E
AVALIAÇÃO DO SEU POTENCIAL NA TERAPIA
FOTODINÂMICA, USANDO AS LINHAS CELULARES
MCF-7 E BT-474**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOQUÍMICA

SUSANA CLÁUDIA CONCEIÇÃO SANTOS

Orientadora: Professora Doutora Amélia M. Lopes Dias da Silva

Co-orientadora: Professora Doutora Lucinda Vaz Reis



Vila Real, 2015

UNIVERSIDADE DE TRÁS-OS-MONTES E ALTO DOURO

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO ESPECTROSCÓPICA DE
NOVOS CORANTES ESQUARÍLICOS ASSIMÉTRICOS E
AVALIAÇÃO DO SEU POTENCIAL NA TERAPIA
FOTODINÂMICA, USANDO AS LINHAS CELULARES
MCF-7 E BT-474**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOQUÍMICA

SUSANA CLÁUDIA CONCEIÇÃO SANTOS

Orientadora: Professora Doutora Amélia M. Lopes Dias da Silva

Co-orientadora: Professora Doutora Lucinda Vaz Reis



Vila Real, 2015

UNIVERSIDADE DE TRÁS-OS-MONTES E ALTO DOURO

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO ESPECTROSCÓPICA DE
NOVOS CORANTES ESQUARÍLICOS ASSIMÉTRICOS E
AVALIAÇÃO DO SEU POTENCIAL NA TERAPIA
FOTODINÂMICA, USANDO AS LINHAS CELULARES
MCF-7 E BT-474**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOQUÍMICA

SUSANA CLÁUDIA CONCEIÇÃO SANTOS

Orientadora: Professora Doutora Amélia M. Lopes Dias da Silva

Co-orientadora: Professora Doutora Lucinda Vaz Reis

Composição do Júri:

Vila Real, 2015

Declaração

Eu, Susana Cláudia Conceição Santos, 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, 31 de Julho de 2015

(Susana Cláudia Conceição Santos)

“Se eu vi mais longe, foi por estar sobre ombros de gigantes”

(Issac Newton)

Agradecimentos

Antes de tudo, agradeço a Deus, que me deu força física e psicológica para conseguir finalizar mais uma etapa na minha vida, tendo sido concretizada com muito esforço, da qual me orgulho. Agradeço-Lhe por ter encontrado pessoas fantásticas pelas quais tenho um grande carinho e expresso os meus sinceros agradecimentos:

À Professora Doutora Amélia Lopes da Silva, Orientadora, e à Professora Doutora Lucinda Vaz Reis, Co-Orientadora, exemplos de competência e dedicação, cujo entusiasmo e dinamismo foram fatores determinantes para o bom termo deste trabalho. Obrigada pela excelente orientação demonstrada, pelos ensinamentos incutidos ao longo do ano de estágio, proporcionando-me a oportunidade de aprender e trabalhar nos seus laboratórios. Um enorme, sincero e carinhoso obrigado pela vossa amizade, pela força que me deram, não me deixando desistir e continuar em frente.

À Professora Doutora Carla Amaral, diretora do Mestrado em Bioquímica e à Professora Doutora Maria Manuel Oliveira, anterior diretora, um sincero obrigado pelo apoio incondicional e disponibilidade demonstrado ao longo destes três anos de Mestrado, bem como o privilégio de ter frequentado este mestrado que muito contribuiu para o enriquecimento da minha formação académica e científica.

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 contribuíram para a realização e 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 das 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 as minhas amostras, nomeadamente na determinação do rendimento quântico de produção do oxigénio singuleto.

Um enorme e carinhoso obrigado aos meus colegas de laboratório Marlene, Tiago, Sofia e Vanessa, agradeço a amizade construída e que mantemos, a boa disposição, companhia e força que me deram durante a realização deste trabalho. À Céu, um grande obrigado por estar sempre presente na realização deste trabalho, exemplo de dedicação, pelas muitas e valiosas sugestões ao longo deste estágio.

Um obrigado do tamanho do mundo, a ti Tiago, e ainda assim é insuficiente para agradecer tudo que fizeste e que fazes por mim! Não há palavras suficientes para descrever a minha gratidão, que contém nelas o reconhecimento, agradecimento, carinho e amor que sinto. Obrigado pelo teu carinho, amor, por estares sempre do meu lado, pelo teu apoio incondicional e força que sempre deste para seguir em frente! Nunca vou esquecer tudo o que tu fizeste por mim...

Agradeço a toda a minha família, pais, irmãos e sobrinhos pelo amor, apoio e força que me deram ao longo destes anos, apesar de estarmos longe, foram importantes para mim. À minha avó Lucinda da Conceição que sempre me deu força para concluir esta etapa na minha vida.

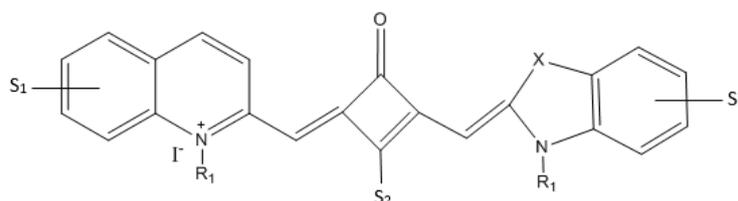
Por fim, um obrigado, às minhas colegas de trabalho Ana Valente e Bárbara Cardoso que também tudo fizeram para que eu conseguisse conciliar o trabalho com a realização da dissertação.

Um obrigado a todos do fundo do coração, sem vocês nada seria possível!

Resumo

O principal objetivo deste trabalho consistiu na síntese de novos corantes cianínicos esquarterílicos assimétricos (Figura 1), a sua caracterização espectroscópica e a avaliação como potenciais FSs para terapia fotodinâmica do cancro da mama, usando as linhas celulares tumorais MCF-7 e BT-474.

Esta dissertação encontra-se dividida em três capítulos. No primeiro é apresentada uma revisão bibliográfica sobre a etiologia do cancro, a doença maligna da mama, a terapia fotodinâmica-PDT, as cianinas e cianinas esquarterílicas. No segundo capítulo é apresentada uma descrição de todos os métodos experimentais utilizados para a síntese dos compostos pretendidos, bem como a sua caracterização espectroscópica detalhada. É também apresentada uma descrição das técnicas usadas no estudo do potencial fototerapêutico dos corantes, nas linhas celulares MCF-7 e BT-474. No terceiro capítulo, são apresentados e discutidos os resultados experimentais obtidos sobre a síntese e caracterização estrutural de todos os corantes esquarterílicos assimétricos. Os compostos sintetizados foram caracterizados a partir de técnicas de ponto de fusão (p.f), espectros no visível (Vis), espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C e espectros de massa de alta ou baixa resolução. Neste mesmo capítulo também são apresentados e discutidos os valores de rendimento quântico de formação do oxigénio singuleto, obtidos para todos os corantes esquarterílicos assimétricos sintetizados e os resultados de citotoxicidade dos corantes, no escuro, e após irradiação com LEDs centrados a 630 ou 660 nm, durante 7 ou 14 minutos. Pela análise dos resultados obtidos, os corantes ($\text{S}_2 = \text{NHPH}$ e NH_2) reúnem as melhores condições necessárias para serem utilizados como FS em PDT do cancro.



X= Se; $\text{S}_1 = \text{H}$; $\text{S}_2 = \text{O}$; OCH_3 ; NHCH_3 ; NH_2 ; NHPH e 3-I-NHPH; $\text{R}_1 = \text{Hex}$

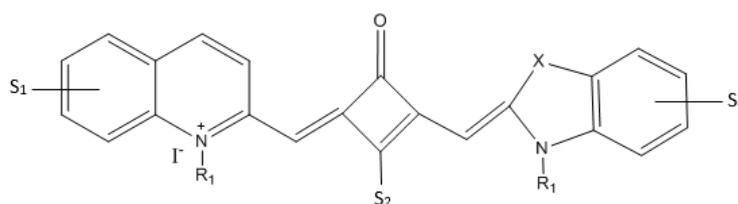
Figura 1 - Fórmula geral dos corantes cianínicos esquarterílicos sintetizados.

Palavras-Chave: Doença maligna da mama, Terapia fotodinâmica, cianinas esquarterílicas, oxigénio singuleto, MCF-7, BT-474.

Abstract

The main purpose of this work was the synthesis of new asymmetric squarylium cyanine dyes (Figure 1), its spectroscopic characterization and evaluation as potential PSs for photodynamic therapy of breast cancer using tumor MCF-7 and BT-474 cell lines.

This dissertation is divided into three chapters. The first is presented a literature review on the etiology of cancer, malignant breast disease, photodynamic therapy-PDT, the cyanines and squarylium cyanines. The second chapter is a description of all experimental methods used for the synthesis of the desired compounds, as well as the detailed spectroscopic characterization. It also gives a description of techniques used to study the phototherapeutic potential of the dyes in the MCF-7 and BT-474 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 synthesized compounds were characterized from techniques such as melting point (mp), visible spectra (Vis), nuclear magnetic resonance spectra (NMR) of ^1H and ^{13}C and mass spectra of high or low resolution. In this chapter are also presented and discussed the quantum yield values of singlet oxygen formation, obtained for all synthesized asymmetric squarylium dyes and the results of dyes cytotoxicity, in the dark, and after irradiation with LEDs centered at 630 or 660 nm, during 7 or 14 minutes. From the analysis of the results, the dyes (S2 = NHPH and NH₂) are the best candidates needed to be used as PS for PDT of cancer.



X= Se; S₁= H; S₂= O; OCH₃; NHCH₃; NH₂; NHPH e 3-I-NHPH; R₁= Hex

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

Key-Words: Malignant breast disease, photodynamic therapy, squarylium cyanines, singlet oxygen, MCF-7, BT-474.

Índice Geral

Índice de Figuras	xv
Índice de Esquemas	xviii
Índice de Tabelas	xix
Lista de abreviaturas, siglas e símbolos.....	xix
Capítulo 1 - INTRODUÇÃO	1
1.0 Nota introdutória	2
1.1 Etiologia do cancro.....	2
1.2 Doença maligna da mama.....	3
1.2.1 Etiologia do cancro da mama.....	4
1.3 Terapia fotodinâmica.....	5
1.3.1 Perspetiva histórica	5
1.3.2 Princípios básicos.....	7
1.3.3 Mecanismos anti-tumorais	11
1.4 Fatores envolvidos na fotossensibilização.....	11
1.5 Fotossensibilizadores utilizados na PDT e suas características.....	13
1.5.1 Fotossensibilizadores utilizados na prática clínica	15
1.5.2 Parâmetros de um Fotossensibilizador ideal para utilização na PDT	16
1.6 Aplicações da PDT	18
1.7 Estudos da terapia fotodinâmica <i>in vitro</i> e <i>In vivo</i>	19
1.8 Corantes	22
1.9 Cianinas	23
1.9.1 Cianinas esquarílicas.....	24
1.10 Avaliação da citotoxicidade em culturas de células - Indicador de viabilidade celular (Alamar Blue).....	27

1.11	Objetivos do trabalho	28
Capítulo 2 - PARTE EXPERIMENTAL.....		30
2.1	Reagentes e Equipamentos	31
2.2	Síntese dos corantes esquarílicos assimétricos derivados da quinaldina e do benzoselenazole	33
2.2.1	Síntese prévia	33
2.2.1.1	Síntese do iodeto de 1-hexil-2-metilquinolínio (2)	33
2.2.1.2	Síntese do iodeto de 3-hexil-2-metilbenzoselenazólio (4).....	34
2.2.1.3	Síntese do 3,4-dibutoxi-3-ciclobuten-1,2-diona (6).....	35
2.2.1.4	Síntese do 3-butoxi-4-[(1-hexilquinolin-2(1 <i>H</i>)-ilideno)metil]-3-ciclobuteno-1,2-diona (7)	35
2.2.1.5	Síntese de 3-[(1-hexilquinolin-2(1 <i>H</i>)-ilideno)metil]-4-hidroxi-3-ciclobuteno-1,2-diona (8)	39
2.2.1.6	Síntese do 2-[(3-hexilbenzoselenazole-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 (9)	42
2.2.1.7	Síntese do trifluorometanossulfonato de 3-hexil-2-[(3-[(1-hexil-6-quinolin-2(1 <i>H</i>)-ilideno)metil]-2-metoxi-4-oxociclobut-2-en-1-ilideno)metil]benzoselenazole-3- <i>io</i> (10).....	47
2.2.2	Síntese dos corantes cianínicos aminoesquarílicos assimétricos	49
2.2.2.1	Síntese do iodeto de 2-[(2-amino-3-[(1-hexilquinolin-2(1 <i>H</i>)-ilideno)metil]-4-oxociclobuten-2-en-1-ilideno)metil]-3-hexilbenzoselenazole-3- <i>io</i> (11)	49
2.2.2.2	Síntese do iodeto de 3-hexil-2-[(3-[(1-hexilquinolin-2(1 <i>H</i>)-ilideno)metil]-2-metilamino-4-oxociclobut-2-en-1-ilidenometil]benzoselenazole-3- <i>io</i> (12)	51
2.2.2.3	Síntese do iodeto de 3-hexil-[(3-(1-hexilquinolin-2(1 <i>H</i>)-ilideno)metil]-4-oxo-2-[(fenilamino)ciclobut-2-en-1-ilideno)metil]benzoselenazole-3- <i>io</i> (13) ...	53

2.2.2.4 Síntese do iodeto 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]benzoselenazole-3-io (14).....	55
2.3 Aplicação dos corantes esquarílicos nas linhagens celulares	57
2.3.1 Preparação de meio de cultura	57
2.3.2 Cultura de células	57
2.3.2.1 Linha celular MCF-7 e BT-474 e sua manutenção	57
2.3.2.2 Subcultura e tripsinização	58
2.3.3 Contagem de células	58
2.3.4 “Plantação” das células em placas de cultura e aplicação dos corantes esquarílicos assimétricos derivados da quinaldina e benzoselenazole	59
2.3.4.1 Preparação das soluções dos corantes a serem aplicados nas células	60
2.3.4.2 Aplicação dos corantes nas células	60
2.3.5 Irradiação das células	61
2.3.6 Determinação da viabilidade celular	61
2.3.6.1 Aplicação do indicador de viabilidade: Alamar Blue	62
2.3.7 Análise e apresentação dos resultados	63
Capítulo 3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	64
3.1 Preâmbulo.....	65
3.2 Síntese dos corantes cianínicos esquarílicos assimétricos derivados da quinaldina e do benzoselenazole	65
3.2.1 Síntese prévia	67
3.2.1.1 Síntese do iodeto de 1-hexil-2-metilquinolínio (2)	67
3.2.1.2 Síntese do iodeto de 3-hexil-2-metilbenzoselenazólio (4)	68
3.2.1.3 Síntese do 3,4-dibutoxi-3-ciclobuten-1,2-diona (6)	69

3.2.1.4 Síntese do 3-butoxi-4-[(1-hexilquinolin-2(1 <i>H</i>)-ilideno)metil]-3-ciclobuteno-1,2-diona (7)	70
3.2.1.5 Síntese do 3-[(1-hexilquinolin-2(1 <i>H</i>)-ilideno)metil]-4-hidroxi-3-ciclobuteno-1,2-diona (8)	73
3.2.1.6 Síntese do 2-[(3-hexilbenzoselenazole-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 (9)	76
3.2.1.7 Síntese do trifluorometanossulfonato de 3-hexil-2-[(3-[(1-hexil-6-quinolin-2(1 <i>H</i>)-ilideno)metil]-2-metoxi-4-oxociclobut-2-en-1-ilideno)metil]benzoselenazole-3- <i>io</i> (10).....	79
3.2.2 Síntese dos corantes cianínicos aminoescarílicos assimétricos	81
3.2.2.1 Síntese do iodeto de 2-[(2-amino-3-[(1-hexilquinolin-2(1 <i>H</i>)-ilideno)metil]-4-oxociclobuten-2-en-1-ilideno)metil]-3-hexilbenzoselenazole-3- <i>io</i> (11)	81
3.2.2.2 Síntese do iodeto de 3-hexil-2-[(3-[(1-hexilquinolin-2(1 <i>H</i>)-ilideno)metil]-2-metilamino-4-oxociclobut-2-en-1-ilidenometil]benzoselenazole-3- <i>io</i> (12)	83
3.2.2.3 Síntese do iodeto de 3-hexil-[(3-(1-hexilquinolin-2(1 <i>H</i>)-ilideno)metil]-4-oxo-2-[(fenilamino)ciclobut-2-en-1-ilideno)metil]benzoselenazole-3- <i>io</i> (13) ...	86
3.2.2.4 Síntese do iodeto 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]benzoselenazole-3- <i>io</i> (14).....	87
3.3 Espectros no VIS dos corantes cianínicos escurílicos assimétricos derivados da quinaldina e do benzoselenazole	89
3.4 Avaliação da capacidade de formação de oxigénio singuleto (¹ O ₂) por parte dos corantes cianínicos escurílicos assimétricos sintetizados	91
3.5 Avaliação do potencial fototerapêutico dos corantes cianínicos escurílicos e aminoescarílicos assimétricos em células MCF-7 e BT-474	93

3.5.1 Efeito do tempo de irradiação e do tempo de exposição dos compostos após irradiação nas células MCF-7	93
3.5.1.1 Efeito do corante cianínico esquarílico 9	93
3.5.1.2 Efeito do corante cianínico aminoesquarílico 11	95
3.5.1.3 Efeito do corante cianínico aminoesquarílico 12	97
3.5.1.4 Efeito do corante cianínico aminoesquarílico 13	98
3.5.1.5 Efeito do corante cianínico aminoesquarílico 14	100
3.5.2 Efeito do tempo de irradiação e do tempo de exposição dos compostos após irradiação nas células BT-474	101
3.5.2.1 Efeito do corante cianínico esquarílico 9	101
3.5.2.2 Efeito do corante cianínico esquarílico 11	103
3.5.2.3 Efeito do corante cianínico aminoesquarílico 12	105
3.5.2.4 Efeito do corante cianínico aminoesquarílico 13	107
3.5.2.5 Efeito do corante cianínico aminoesquarílico 14	108
3.5.3 Avaliação do potencial fototerapêutico dos corantes cianínicos esquarílicos e aminoesquarílicos assimétricos em células MCF-7 e BT-474 – comparação de resultados	110
3.6 Conclusões	112
Capítulo 4 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	116

Índice de Figuras

Figura 1.1 - Estimativa da incidência do cancro da mama, em Portugal (Fonte:Globocan, 2012).....	3
Figura 1.2 - Estrutura química do alaranjado de acridina (adaptada de Perussi, 2007). .	5
Figura 1.3 - Estrutura química da eosina (adaptada de Perussi, 2007).Erro! Marcador não definido.	
Figura 1.4 - Principais vias de morte celular ativadas pela PDT (adaptado de Ortel <i>et al.</i> , 2009).....	7
Figura 1.5 - Ilustração esquemática do mecanismo geral da ação da PDT, <i>in vivo</i> , usando a via intravenosa (adaptada de Mroz <i>et al.</i> , 2011 e Yano <i>et al.</i> , 2011).	8
Figura 1.6 - Ilustração esquemática da ação fotodinâmica por um Diagrama de Jablonski Modificado: geração de estados excitados, ROS e $^1\text{O}_2$ (adaptada de Agostinis <i>et al.</i> , 2011 e Gupta <i>et al.</i> , 2013).	9
Figura 1.7 - Diodo Emissor de Luz (adaptado de Corazza, 2005).	13
Figura 1.8 - Representação da estrutura química da porfirina (A) hematoporfirina (B) e Photofrin® na forma de éter (C) (adaptada de Machado, 2000; Perussi, 2007; Josefsen & Boyle, 2008).	14
Figura 1.9 - Representação da estrutura química de alguns fotossensibilizadores da segunda geração utilizados em PDT (adaptada de Josefsen & Boyle, 2008).....	14
Figura 1.10 - Representação da estrutura química da Chlorin-H (adaptada de Yan <i>et al.</i> , 2010).....	20
Figura 1.11 - Estrutura química de Mauveína (adaptada de Broadbent, 2001).....	22
Figura 1.12 - Estrutura e classificação geral das cianinas, sendo n= 0 (cianina); n= 1 (carbocianina); n= 2 (dicarbocianina) e n= 3 (tricarbocianina); X= S, Se, O, N, C(CH ₃) ₂ ...; Y= grupos heterocíclicos terminais; R ₁ e R ₂ = CH ₃ , C ₂ H ₅ , C ₃ H ₇ , C ₆ H ₁₃ , C ₁₀ H ₂₁ ... e Z= Cl ⁻ , I ⁻ , ... (Adaptado de Fagundes, 2013).....	23
Figura 1.13 - Representação da estrutura geral dos corantes esquarílicos, sendo R ₁ e R ₂ = grupo alquilo...; X = O ⁻ , OCH ₃ , NH ₂ , NHCH ₃ ...; Z= I ⁻ , Cl ⁻ , CF ₃ SO ₃ ⁻ ...; Y = grupo aromático (Adaptado de Torres, 2010).....	25

Figura 1.14 - Fórmula geral dos corantes cianínicos esquarílicos sintetizados.....	26
Figura 1.15 - Fórmula geral dos corantes cianínicos esquarílicos sintetizados.....	26
Figura 1.16 - Representação da reação de redução da rezasurina, em células viáveis (adaptado de Riss <i>et al.</i> , 2013).	27
Figura 1.17 - Fórmula geral dos corantes cianínicos esquarílicos sintetizados.....	28
Figura 2.1 - Fotografia das células MCF-7 (A) e BT-474 (B) cedidas pela Prof. Doutora Amélia Silva (ampliação de 100x).	58
Figura 2.2 - Processo de contagem das células: no hemocitómetro (câmara de Neubauer) (A) ou no contador automático (B).....	59
Figura 2.3 - Exemplo de uma placa de cultura após 24 h da adição do Alamar Blue...	62
Figura 2.4 - Equação de percentagem de redução do Alamar Blue (ϵ_{ox} : coeficiente de extinção molar do AB oxidado; ϵ_{red} : coeficiente de extinção molar do AB reduzido; A: absorvância dos poços a testar; A': absorvância dos poços brancos; λ_1 : 570 nm e λ_2 : 620 nm).....	62
Figura 2.5 - Espectrofotómetro de leitura de placas de 96 poços.....	63
Figura 3.1 - Espectro de ^1H -RMN do composto 9.....	77
Figura 3.2 - Espectro de ^{13}C -RMN do composto 9.	78
Figura 3.3 - Espectros de absorção no Vis dos corantes 9-14 em DMSO à concentração de $0,5 \times 10^{-6}$ μm , exceto o corante 10 (qualitativo).....	89
Figura 3.4 - Espectros de absorção no Vis dos corantes 9, 11-14 em meio de cultura (DMEM).	90
Figura 3.5 - Viabilidade celular (% de controlo) em função da concentração do corante 9, registada em células MCF-7 sem irradiação (A), com irradiação por 7 minutos (B) e 14 minutos (C). Leituras efetuadas 1 h e 24 h após irradiação das células pré-incubadas com o corante. Valores referem-se à média \pm SD (n= 4). (* diferenças estatisticamente significativas (p <0,05) comparadas relativamente ao controlo, do mesmo ensaio).....	94
Figura 3.6 - Viabilidade celular (% de controlo) em função da concentração do corante 11, registada em células MCF-7 sem irradiação (A), com irradiação por 7 minutos (B) e 14 minutos (C). Leituras efetuadas 1 h e 24 h após irradiação das células pré-incubadas	

com o corante. Valores referem-se à média \pm SD (n= 4). (* diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) comparadas relativamente ao controlo, do mesmo ensaio)...... **96**

Figura 3.7 - Viabilidade celular (% de controlo) em função da concentração do corante 12, registada em células MCF-7 sem irradiação (A), com irradiação por 7 minutos (B) e 14 minutos (C). Leituras efetuadas 1 h e 24 h após irradiação das células pré-incubadas com o corante. Valores referem-se à média \pm SD (n= 4). (* diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) comparadas relativamente ao controlo, do mesmo ensaio)...... **98**

Figura 3.8 - Viabilidade celular (% de controlo) em função da concentração do corante 13, registada em células MCF-7 sem irradiação (A), com irradiação por 7 minutos (B) e 14 minutos (C). Leituras efetuadas 1 h e 24 h após irradiação das células pré-incubadas com o corante. Valores referem-se à média \pm SD (n= 4). (* diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) comparadas relativamente ao controlo, do mesmo ensaio)...... **99**

Figura 3.9 - Viabilidade celular (% de controlo) em função da concentração do corante 14, registada em células MCF-7 sem irradiação (A), com irradiação por 7 minutos (B) e 14 minutos (C). Leituras efetuadas 1 h e 24 h após irradiação das células pré-incubadas com o corante. Valores referem-se à média \pm SD (n= 4). (* diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) comparadas relativamente ao controlo, do mesmo ensaio)..... **101**

Figura 3.10 - Viabilidade celular (% de controlo) em função da concentração do corante 9, registada em células BT-474 sem irradiação (A), com irradiação por 7 minutos (B) e 14 minutos (C). Leituras efetuadas 1 h e 24 h após irradiação das células pré-incubadas com o corante. Valores referem-se à média \pm SD (n= 4). (* diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) comparadas relativamente ao controlo, no mesmo ensaio)..... **102**

Figura 3.11 - Viabilidade celular (% de controlo) em função da concentração do corante 11, registada em células BT-474 sem irradiação (A), com irradiação por 7 minutos (B) e 14 minutos (C). Leituras efetuadas 1 h e 24 h após irradiação das células pré-incubadas com o corante. Valores referem-se à média \pm SD (n= 4). (* diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) comparadas relativamente ao controlo, do mesmo ensaio)..... **104**

Figura 3.12 - Viabilidade celular (% de controlo) em função da concentração do corante 12, registada em células BT-474 sem irradiação (A), com irradiação por 7 minutos (B) e 14 minutos (C). Leituras efetuadas 1 h e 24 h após irradiação das células pré-incubadas com o corante. Valores referem-se à média \pm SD (n= 4). (* diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) comparadas relativamente ao controlo, do mesmo ensaio)..... **106**

Figura 3.13 - Viabilidade celular (% de controlo) em função da concentração do corante 13, registada em células BT-474 sem irradiação (A), com irradiação por 7 minutos (B) e 14 minutos (C). Leituras efetuadas 1 h e 24 h após irradiação das células pré-incubadas com o corante. Valores referem-se à média \pm SD (n= 4). (* diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) comparadas relativamente ao controlo, do mesmo ensaio)..... **107**

Figura 3.14 - Viabilidade celular (% de controlo) em função da concentração do corante 14, registada em células BT-474 sem irradiação (A), com irradiação por 7 minutos (B) e 14 minutos (C). Leituras efetuadas 1 h e 24 h após irradiação das células pré-incubadas com o corante. Valores referem-se à média \pm SD (n= 4). (* diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) comparadas relativamente ao controlo, do mesmo ensaio)..... **109**

Índice de Esquemas

Esquema 3.1 - Síntese dos vários corantes cianínicos esquarílicos assimétricos.....	66
Esquema 3.2 - Síntese do composto 2.....	67
Esquema 3.3 - Síntese do composto 4.....	68
Esquema 3.4 - Síntese do composto 6.....	69
Esquema 3.5 - Síntese do composto 7.....	70
Esquema 3.6 - Síntese do composto 7.....	71
Esquema 3.7 - Síntese do composto 8.....	73
Esquema 3.8 - Síntese do corante esquarílico 9.....	76
Esquema 3.9 - Síntese do corante esquarílico 10.....	79
Esquema 3.10 - Síntese do corante aminoesquarílico 11.....	82
Esquema 3.11 - Síntese do corante aminoesquarílico 12.....	84
Esquema 3.12 - Síntese do corante aminoesquarílico 13.....	86
Esquema 3.13 - Síntese do corante aminoesquarílico 14.....	88

Índice de Tabelas

Tabela 1.1 - Mecanismos anti-tumorais na PDT (adaptada de Mroz <i>et al.</i> , 2011).....	11
Tabela 1.2 - Fotosensibilizadores aprovados clinicamente e promissores para utilização na PDT para o tratamento do cancro (adaptada de Agostinis <i>et al.</i> , 2011).	16
Tabela 2.1 - Esquema representativo da aplicação das células nas placas de cultura de 96 poços (Ø: poços sem células (o branco); C: poços com células; Ctrl: poços com células (controlo)). Cada placa utilizada apresentava apenas a “plantação” de uma linha celular.	60
Tabela 2.2 - Representativo da aplicação dos compostos nas placas de cultura de 96 poços (Ø: poços sem células/corante (o branco); 0,1; 1,0; 5,0 e 10,0: as concentrações dos diferentes corantes (em µM); Ctrl: poços com células mas sem corante (controlo). A verde está representado a aplicação de um corante e a azul está representado a aplicação de um outro corante.	61
Tabela 3.1 - Rendimentos quânticos de formação de oxigénio singuleto por parte dos compostos cianínicos esquirfílicos assimétricos sintetizados.	91

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

A431 - “*human epithelial carcinoma cell line*”
(linha celular de carcinoma epitelial humano)

A549 - “*carcinomic human alveolar basal epithelial cell line*” alveolar basal epithelial
(adenocarcinoma humano de células epiteliais basais alveolares)

A.B. - Alamar Blue (indicador de viabilidade celular)

ALA - ácido 5-aminolevulínico

AlClFt - alumínio-cloro-ftalocianina

AlPcS₄ - alumínio (III) cloreto de ftalocianina tetrasulfonato

alif. - alifática

Ar - aromático

AR - artrite reumatoide

ATCC - *American Type Culture Collection*

Bcl-2 - “*B-cell lymphoma 2*” (linfoma de células B 2)

BT-474 - “*human breast tumor cell line*” (linha celular de tumor de mama humano)

BSA - albumina do soro bovino (do inglês *Bovine Serum Albumin*)

°C - Graus centígrados

Caco-2 - “*cell line derived from colorectal*” (linha celular derivada de colo-rectal)

Calc. - Calculado

CC - Colangiocarcinoma Irresecável

c.c.f. - cromatografia em camada fina

c.d.o - comprimento de onda

CIS - carcinoma *in situ*

¹³C- RMN - Ressonância Magnética Nuclear de Carbono

d - duplete

DCFDA - 2',7'-diclorofluoresceína diacetato

dec. - decomposição

DEPT 90 – *distortionless enhancement by polarization 90°*

4-DMAP - 4,4-N-dimetilaminopiridina

DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DMRI - degeneração macular relacionada com idade

DMSO – dimetilsulfóxido

DNA – ácido desoxirribonucleico (do inglês *Deoxyribonucleic Acid*)

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

FDA - “*Food and Drug Administration*”

fr - fraca

FS - Fotossensibilizador

fr – fraca

HBSS – *Hank’s Balanced Salt Solution*

HepG2 - “*cell line derived from liver hepatocellular carcinoma*” (linha celular derivada de carcinoma hepatocelular de fígado)

H₂O₂ - peróxido de hidrogénio

HpD - derivado de hematoporfirina

¹H-RMN - ressonância magnética nuclear de próton

HT29 - “*human colorectal adenocarcinoma cell line*” (linha celular de adenocarcinoma colo-rectal humano)

HPB - hiperplasia prostática benigna

Hz - Hertz

IC - “*internal conversion*” (conversão interna)

ISC - “*crossing intersystem*” (cruzamento intersistema)

J - constante de acoplamento

J - joules

LED - “*light emitting diode*” (diodo emissor de luz)

lit. - literatura

M - molaridade

m - média

m - multiplete

[M⁺] - ião molecular

Me - Metil

MCF-7 - “*human breast adenocarcinoma cell line*” (linha celular de adenocarcinoma de mama humano)

MeOH - metanol

min. - minuto

m/v – percentagem massa por volume

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

mTOR - “*mammalian target of rapamycin*” (alvo da rapamicina em mamíferos)

mW - mili watts

NF-κB - “nuclear factor kappa B” (fator nuclear kappa B)

³O₂ - oxigénio no estado fundamental

¹O₂ - oxigénio no estado excitado singuleto

¹O₂ - Oxigénio singuleto

O₂[•] - radical anião superóxido

OH[•] - radical hidroxilo

OMS - Organização Mundial de Saúde

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

Ph a - feoforbida *a*

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

sI - singuleto largo

S_n - fotossensibilizador no estado excitado singuleto

S_n^ˆ - sub-níveis vibracionais

S₀ - fotossensibilizador no estado fundamental

S₁ - fotossensibilizador no primeiro estado excitado singuleto

t - tripleto

t.a. - temperatura ambiente

T₁ - fotossensibilizador no primeiro estado excitado tripleto

tI - tripleto largo

TFD-AICIFt - alumínio-cloro-ftalocianina em formulação lipossomal

τ - tempo de semi-vida

THF - tetra-hidrofurano

UV - ultravioleta

v/v - percentagem volume por volume

ε - coeficiente de absorvidade molar

λ - comprimento de onda

λ_{máx} – comprimento de onda máximo de uma banda de absorção no Visível (nm)

π - ligação pi

δ - desvio químico

ν_{máx} – número de onda máximo numa banda de absorção no IV (cm⁻¹)

Φ_Δ - rendimento quântico na formação de oxigénio singuleto

η - rendimento

Capítulo 1

INTRODUÇÃO

1.0 Nota introdutória

Os avanços na medicina, ocorridos nos últimos anos possibilitaram a descoberta de formas de tratamento mais eficazes para as doenças do foro oncológico, contudo, o cancro continua a ser uma das doenças mais temidas nos dias de hoje e uma das principais causas de morte a nível mundial (Hill, 2001).

À semelhança do que ocorreu com a evolução científica, os avanços tecnológicos realizados nas últimas décadas na área da oncologia, têm proporcionado a implementação de um diagnóstico precoce e de tratamentos ajustados a cada doente. Assim, a doença oncológica deixou de ser considerada como uma doença fatal, passando a ser vista como uma doença crónico-degenerativa (Solana, 2005). Deste modo, algumas estratégias importantes na luta contra esta doença e a favor da qualidade de vida do paciente já foram encontradas (Costa, 2001).

1.1 Etiologia do cancro

A palavra “etiologia” deriva da palavra grega “aitiologia”. Esta é a ciência que estuda a causa, neste caso é a ciência que estuda a causa do cancro (Apolinário, 2012).

O cancro é uma doença que se caracteriza por um crescimento anormal de células, que provoca um desequilíbrio entre a proliferação celular e a morte celular (Ruddon, 2007), devido à deficiência ou ausência de mecanismos reguladores (Apolinário, 2012), evoluindo para uma população de células tumorais que podem invadir tecidos e metastizar à distância levando a um agravamento da doença que, se não tratada, pode levar à morte do hospedeiro (Ruddon, 2007).

Do ponto de vista clínico, o cancro é uma doença, que varia na idade de aparecimento, taxa de crescimento, estado de diferenciação celular, detetabilidade, grau de invasão, potencial de metastização, resposta ao tratamento e prognóstico (Ruddon, 2007).

Do ponto de vista biológico e molecular, esta doença é causada por defeitos moleculares num variado número de funções celulares, resultantes de alterações comuns que não são reparadas. E, por último, o cancro é uma doença de expressão de genes anómalos, sendo que existem inúmeros mecanismos pelos quais ocorrem estas alterações de genes. Estas podem ocorrer por via direta, danos ocorridos no ácido desoxirribonucleico (DNA, do inglês *deoxyribonucleic acid*), como por exemplo,

mutações de genes, amplificações, deleções, ou por mecanismos resultantes de uma transcrição ou translação anómala (Ruddon, 2007).

Outros autores descrevem que, os fatores responsáveis pelo cancro, em geral, podem enquadrar-se em três grupos: os carcinogénicos ambientais (químicos, físicos ou biológicos), as características hereditárias e a acumulação de mutações somáticas (Apolinário, 2012).

1.2 Doença maligna da mama

O cancro da mama tornou-se uma doença da atualidade, uma vez que o número de novos casos tem vindo a aumentar de ano para ano. Segundo a última estatística da OMS, é o segundo tipo de cancro mais comum no mundo (o do pulmão é o mais comum), e de longe, o cancro mais frequente entre em mulheres, com uma estimativa de 1,67 milhões de novos casos de cancro diagnosticados em 2012, com uma taxa de 25 % relativamente a todos os cancros e todas idades. A Europa acompanha a situação mundial com uma taxa de 28,8 % (Globocan, 2012).

Em Portugal, o cancro da mama na mulher, também é a neoplasia com maior incidência, com uma taxa de 29,4 %, como podemos observar na figura 1.1 (Globocan, 2012).

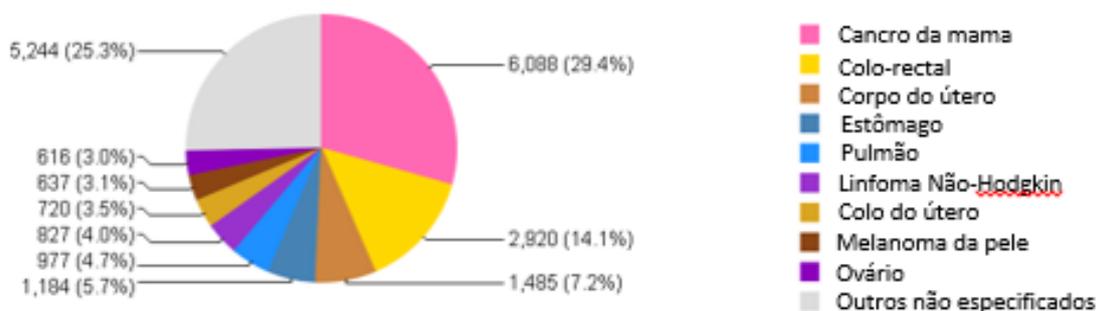


Figura 1.1 - Estimativa da incidência do cancro da mama, em Portugal (Fonte:Globocan, 2012).

Como tal, a preocupação dos especialistas para este problema tem sido cada vez maior e a busca para a cura desta doença tem sido imparável por parte dos investigadores, de modo a conseguir cada vez mais casos de sucesso. Seguidamente, faz-se uma breve descrição da etiologia do cancro da mama para dar a conhecer a importância do estudo desta doença.

1.2.1 Etiologia do cancro da mama

A neoplasia mamária é definida como um tumor maligno que se desenvolve a partir das células do tecido mamário (Fernandes, 2009). É uma doença extremamente heterogénea, o que pressupõe que a sua etiologia é provavelmente multifatorial, incluindo fatores hereditários e adquiridos tais como, história familiar e pessoal de saúde, história ginecológica, mutações em determinados genes, raça, idade e hábitos alimentares (Ellsworth *et al.*, 2010). A interação destes fatores pode originar a patologia como também levar ao aparecimento de uma variedade de alterações genéticas, que originam alterações biológicas diferentes de um indivíduo para outro, o que torna impossível generalizar as questões acerca do comportamento do cancro da mama (Carlson & Stockdale, 1988).

Alguns autores descrevem que as causas mais efetivas de desenvolvimento de cancro da mama são de origem hormonal e genética. A maior parte dos diagnósticos do cancro da mama ocorre entre os 45 e os 74 anos de idade. Assim sendo, o diagnóstico antes dos 45 anos é mais escasso. Tais dados sugerem a hipótese das hormonas femininas terem um papel protetor neste tipo de patologia na mulher pois, a partir dos 45 anos, é quando se inicia o processo de menopausa, ou seja, quando os níveis de estrogénios se encontram diminuídos (Apolinário, 2012).

Holm e colaboradores (2010) e Aboussekhra (2011) acrescentam que os carcinomas mamários resultam principalmente do acúmulo de alterações genéticas, como mutações, rearranjos, variações no número de cópias e alterações epigenéticas, como a metilação do promotor e modificação das histonas, em células epiteliais da glândula mamária.

A terapia fotodinâmica tem sido muito utilizada para o tratamento do cancro pois oferece múltiplas vantagens em relação às terapias convencionais, nomeadamente a cirurgia, quimio e radioterapia (Yano *et al.*, 2011; Nyman & Hynninem, 2004), podendo assim constituir uma alternativa a estas modalidades terapêuticas (Pervaiz & Olivo, 2006). Seguidamente, é apresentada uma revisão bibliográfica desta terapia.

1.3 Terapia fotodinâmica

1.3.1 Perspetiva histórica

A terapia fotodinâmica (PDT, do inglês *Photodynamic Therapy*) é um tratamento clínico (Ribeiro *et al.*, 2004), sendo considerado um modelo terapêutico inovador de elevada seletividade na destruição de células tumorais de determinados tipos de cancro e também de doenças não-neoplásicas (Agostinis *et al.*, 2011; Yano *et al.*, 2011).

A origem desta terapia remonta ao tempo do antigo Egito, Grécia e Índia (Josefsen & Boyle, 2008). Segundo o livro sagrado Indiano, Atharva Veda (que remonta aos anos 1400 a.C) estes povos utilizavam a luz solar em combinação com uma planta fotossensibilizadora para curar várias doenças de pele. No entanto, só a partir do início do séc. XX que a PDT contemporânea começou a desenvolver-se como modalidade terapêutica, devendo-se, em grande parte, ao trabalho realizado por Oscar Raab, um estudante de medicina alemão que (trabalhando com o professor Herman von Tappeiner em Munich) observou que pré-expondo o microrganismo *Paramécia* a baixas concentrações do corante alaranjado de acridina (figura 1.2) em presença de luz solar, levava à morte deste microrganismo unicelular. Raab, ainda observou que este efeito tóxico era dependente da dose de corante e da duração de exposição à luz (Raab, 1990) e três anos mais tarde, o mesmo grupo publicou o primeiro tratamento em doentes (Kubler, 2005).

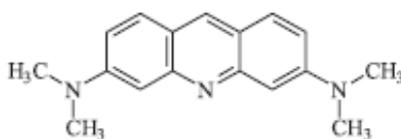


Figura 1.2 - Estrutura química do alaranjado de acridina (adaptada de Perussi, 2007).

As primeiras tentativas visando a aplicação do efeito fotodinâmico no tratamento de tumores em humanos foram realizadas por von Tappeiner e Jesionek em 1903, utilizando a eosina (figura 1.3) como fotossensibilizador (FS) e a partir daí, introduziram o termo “reação fotodinâmica” para descrever reações tecidulares, dependentes de oxigénio e irradiação (von Tappeiner & Jesionek, 1903).

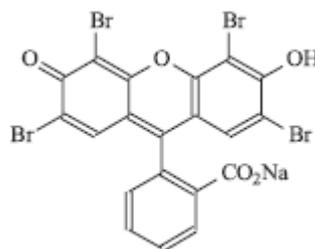


Figura 1.3 - Estrutura química da eosina (adaptada de Perussi, 2007).

Em 1924, Policard observou que uma elevada concentração de porfirinas podem ser encontradas em tumores malignos. Estas porfirinas são completamente atóxicas, mas em presença de luz visível e de oxigénio, estas tornam-se altamente tóxicas para o tecido vivo (Policard, 1924). Contudo, o atual interesse na PDT como terapia do cancro começou com Lipson e Schwartz por volta de 1960, a partir da utilização de uma mistura de porfirinas, como localizadores fluorescentes tumorais, denominado por derivado de hematoporfirina (HpD) (Schwartz, 1955; Lipson, 1961). No final dos anos 60, Lipson e colaboradores também reportaram um caso de tratamento bem-sucedido de cancro de mama, empregando os HpD e irradiação seletiva do tumor com luz visível (Lipson *et al.*, 1966). A partir de então, vários compostos tais como o Photofrin®, purpurinas, xantinas, ftalocianinas, oxazinas, cianinas, clorinas, entre outros, têm sido testados *in vitro* e *in vivo*, com algum sucesso (Pervaiz, 2001; Pervaiz & Olivo, 2006).

Em 1976, Weishaupt e seus colaboradores postularam que o oxigénio singuleto (1O_2), gerado na PDT, a partir da transferência de energia do FS no estado tripleto excitado para o oxigénio molecular no estado fundamental, era o agente citotóxico responsável pela destruição das células tumorais (Weishaupt *et al.*, 1976).

No fim dos anos 70, Dougherty e colaboradores (1978) mostraram vários resultados de sucesso obtidos em doentes tratados com a PDT (Dougherty *et al.*, 1978). Estes resultados levaram à intensificação dos estudos relacionados com esta terapia, e vários casos clínicos foram publicados, mostrando as suas potencialidades no tratamento de diversos tipos de tumores, como o cancro da bexiga, tumores cerebrais, tumores intraoculares, cancro do pâncreas, do fígado, entre outras patologias (Nyman & Hynninen, 2004; Hamblin & Mróz, 2008).

Por fim, a PDT foi aprovada pela primeira vez em 1993, no Canadá, usando o FS Photofrin® para o tratamento de cancro de bexiga (Gupta *et al.*, 2013).

1.3.2 Princípios básicos

O princípio da PDT baseia-se fundamentalmente na administração intravenosa ou tópica de um FS (Perussi, 2007), composto químico que após a sua administração consegue acumular-se preferencialmente nos tecidos alvos (Ribeiro *et al.*, 2004). Pode ser definida como uma reação fotoquímica, dependente de oxigénio, na qual a ativação de um corante (conhecido como FS), por uma luz visível de c.d.o. (comprimento de onda) específico do espectro de absorção do FS (Maisch, 2007), leva à formação de espécies reativas de oxigénio (ROS, do Inglês *reactive oxygen species*), e espécies com elevada toxicidade (Avirah *et al.*, 2012) que são responsáveis pela morte celular, por apoptose; necrose (Agostinis *et al.*, 2011; Yano *et al.*, 2011; Nawalanya *et al.*, 2012; Wan & Lin, 2014) e autofagia ou resultar da combinação de todas estas vias de morte celular, que estão representadas na figura 1.4 (Ortel *et al.*, 2009).

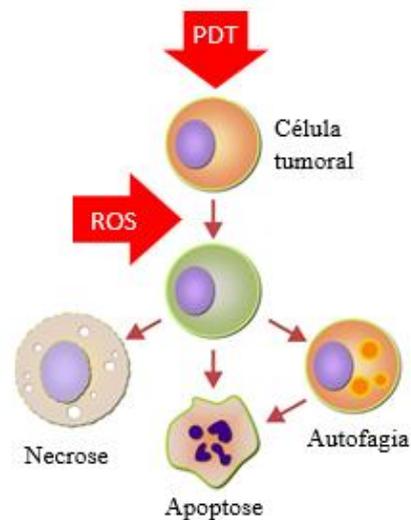


Figura 1.4 - Principais vias de morte celular ativadas pela PDT (adaptado de Ortel *et al.*, 2009).

A ilustração esquemática do mecanismo geral da ação da PDT, *in vivo*, encontra-se apresentada na figura 1.5. Numa primeira fase o FS é administrado ao paciente (1) que após um determinado período de incubação, é absorvido por todas as células do organismo (2) (Avirah *et al.*, 2012). No entanto, devido à sua farmacocinética, irá permanecer por um maior período de tempo nas células tumorais relativamente às células normais (3) (Perussi, 2007). Numa segunda fase, o FS presente nos tecidos tumorais é irradiado por uma fonte de luz com um c.d.o. específico que promove a excitação do FS

(4). Esta ativação vai desencadear a formação de espécies citotóxicas e ROS, que reagem com biomoléculas, tais como proteínas, aminoácidos, ácidos nucleicos, lípidos, etc... interferindo com o seu normal funcionamento, causando assim a destruição seletiva das células alvo e consequente destruição do tumor (5) (Avirah *et al.*, 2012).

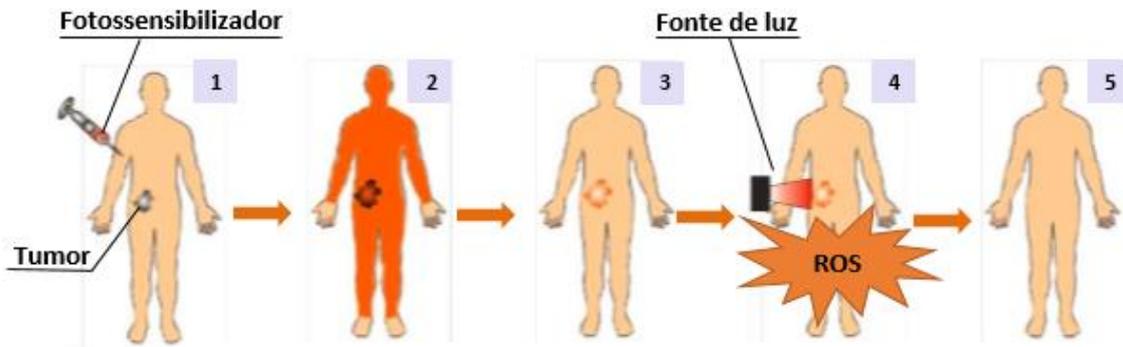


Figura 1.5 - Ilustração esquemática do mecanismo geral da ação da PDT, *in vivo*, usando a via intravenosa: (1) FS é administrado ao paciente; (2) absorvido por todas as células do organismo; (3) permanece por um maior período de tempo nas células tumorais; (4) é irradiado por uma fonte de luz; (5) destruição do tumor (adaptada de Mroz *et al.*, 2011 e Yano *et al.*, 2011).

Na figura 1.6, está representado o mecanismo de citotoxicidade da PDT e as reações fotofísicas que levam à formação das ROS e de outras espécies citotóxicas.

A ativação do FS por absorção de luz de c.d.o. adequado provoca a sua passagem do estado fundamental (S_0), para um estado excitado de curta duração, da ordem dos nanossegundos (ns), designado por estado excitado singuleto (S_n), o qual é formado por vários sub-níveis vibracionais (S_n'). Neste estado, o FS perde rapidamente a sua energia decaindo através dos vários subníveis até ao primeiro estado excitado singuleto (S_1) por conversão interna (IC, do inglês *internal conversion*). Neste estado, o FS pode passar por dois tipos de processos: um radiativo e outro não radiativo. No processo radiativo, o FS regressa ao S_0 , por emissão de fluorescência ou por dissipação de calor. No processo não radiativo, os eletrões do FS sofrem uma inversão de spin, processo designado de cruzamento intersistema (ISC, do inglês *crossing intersystem*), passando ao primeiro estado excitado tripleto (T_1) (Hendrickx, 2006; Robertson *et al.*, 2009; Agostinis *et al.*, 2011; Mroz *et al.*, 2011), uma forma de elevada energia (Pervaiz, 2001). A produção deste estado no FS determina os seus efeitos fototerapêuticos e a probabilidade de formação do T_1 a partir do fóton absorvido, é referida como sendo o rendimento quântico ($\Phi\Delta$) tripleto do FS. Deste modo, uma elevada formação do T_1 é requerida para uma elevada eficácia

do FS. Neste estado, o FS pode dissipar a sua energia e regressar ao S_0 através de um processo de emissão radiativa, designado de fosforescência, ou pode sofrer *queching* (processos de desexcitação não radiativos) (Robertson *et al.*, 2009; Yano *et al.*, 2011).

Os mecanismos de *queching* do T_1 ocorrem segundo dois tipos de reações fotodinâmicas diferentes, da qual resultam as ROS e as espécies citotóxicas: reação do Tipo I e do Tipo II. Na reação do Tipo I, o FS no estado T_1 reage diretamente com o/os substrato/s, tais como membranas das células ou moléculas e transfere um próton (H^+) ou um eletrão (e^-) para formar um radical anião ou radical catião, respetivamente (Perussi, 2007; Robertson *et al.*, 2009; Mroz *et al.*, 2011; Yano *et al.*, 2011; Wan & Lin, 2014). Como estes radicais livres são espécies altamente instáveis (Josefsen & Boyle, 2008) e em presença de oxigénio endógeno das células dão origem a reações em cadeia de radicais livres, a maioria reage instantaneamente para produzir o radical anião superóxido ($O_2^{\cdot-}$). Este radical pode criar espécies altamente reativas, tais como, radicais hidroxilo (OH^{\cdot}) por reação com peróxido de hidrogénio (H_2O_2) (Josefsen & Boyle, 2008; Agostinis *et al.*, 2011). Estes radicais uma vez produzidos pode desencadear uma série de eventos citotóxicos, levando ao dano e consequentemente a morte celular (Josefsen & Boyle, 2008).

Na reação do Tipo II, o FS no estado T_1 pode transferir a sua energia diretamente ao oxigénio molecular, cujo estado fundamental por si só é também um estado tripleto (3O_2), produzindo o estado excitado do oxigénio, oxigénio singuleto (1O_2) (Pervaiz & Olivo, 2006; Josefsen & Boyle, 2008; Wan & Lin, 2014).

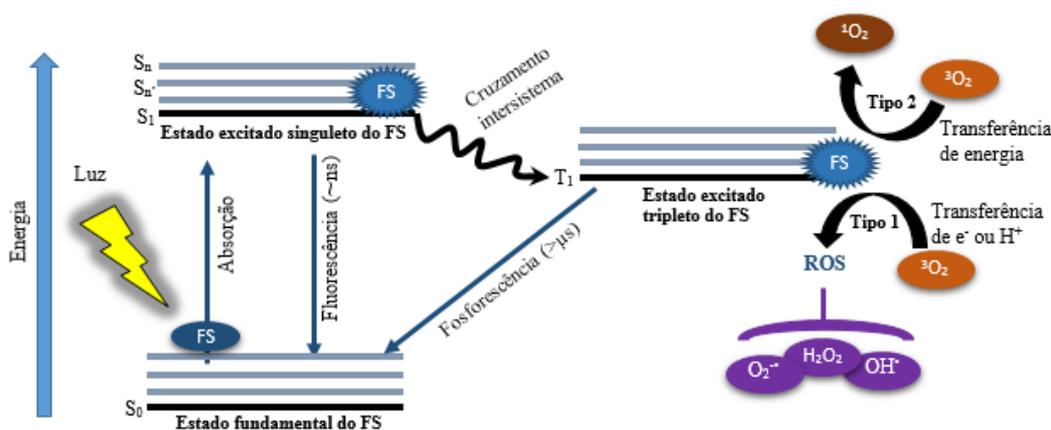


Figura 1.6 - Ilustração esquemática da ação fotodinâmica por um Diagrama de Jablonski Modificado: geração de estados excitados, ROS e 1O_2 (adaptada de Agostinis *et al.*, 2011 e Gupta *et al.*, 2013).

O 1O_2 é uma espécie altamente reativa, com um tempo de semi-vida (τ_T) muito curto em sistemas biológicos, cerca de 10 a 320 ns, que reage diretamente com moléculas

biológicas próximas do seu local de formação, dentro de um raio de ação cerca de 10 a 55 nm (Agostinis *et al.*, 2011). Outros autores referem que o τ_T do 1O_2 ronda os 6 μ s e que o raio de difusão, *in vivo*, é aproximadamente de 300 nm (Cló *et al.*, 2007; Josefsen & Boyle, 2008).

Teoricamente, o 1O_2 só pode interagir com moléculas próximas e estruturas que se encontrem dentro do raio de ação, (Konan *et al.*, 2002; Josefsen & Boyle, 2008; Yano *et al.*, 2011), no entanto, reage com quase todos os componentes celulares, uma vez que os compostos orgânicos insaturados são, em geral, suscetíveis à sua ação (Perussi, 2007).

Os principais alvos para a PDT em células de mamíferos, além da vascularização do tumor, são os lisossomas, mitocôndrias, núcleos e membranas plasmáticas (Pervaiz, 2001; Perussi, 2007; Nawalanya *et al.*, 2012) e como a primeira barreira para o 1O_2 temos a membrana celular que contém lípidos insaturados que podem ser danificados, ocorre danos celulares (Perussi, 2007).

Por sua vez, a reatividade das ROS com moléculas orgânicas não é específica pois, qualquer macromolécula (proteínas e lípidos) dentro da célula pode ser um alvo potencial na PDT. Assim, a multiplicidade de alvos torna mais difícil as células desenvolverem resistência celular e consequentemente resulta a morte celular (Perussi, 2007).

O 1O_2 é considerado a principal espécie citotóxica formada durante o processo fotodinâmico (Konan, 2002; Santos *et al.*, 2003; Yano *et al.*, 2011). Ambas as reações (tipo I e tipo II) ocorrem em simultâneo (Ribeiro *et al.*, 2004; Josefsen & Boyle, 2008) e a razão entre elas depende do tipo de FS usado, da concentração de substrato e da quantidade de oxigénio disponível. Há evidências de que a reação do tipo II predomina na indução das lesões celulares, uma consequência da interação entre o FS irradiado e o oxigénio molecular (Josefsen & Boyle, 2008). A eficiência desta reação depende da duração (τ_T) do estado tripleto e do $\Phi\Delta$ do estado tripleto do FS (Pervaiz & Olivo, 2006; Josefsen & Boyle, 2008). Ambos os parâmetros têm sido referidos na eficácia do FS, estando também envolvidos na distinção dos dois tipos de reações fotodinâmicas (Josefsen & Boyle, 2008). Então, para aumentar a eficiência da reação tipo II torna-se necessário uma modificação do FS para reforçar a eficiência do seu ISC, aumentar o $\Phi\Delta$ do estado tripleto e, posteriormente, a produção de 1O_2 (Avirah *et al.*, 2012).

Um ISC eficiente é normalmente conseguido através da introdução de átomos pesados, como por exemplo, bromo e iodo, dentro da estrutura molecular, que resulta numa perturbação da orbital-spin (Avirah *et al.*, 2012).

1.3.3 Mecanismos anti-tumorais

A informação disponível na literatura sugere que não há claramente um único caminho que leve à morte celular após PDT (Mroz *et al.*, 2011). Os efeitos anti-tumorais da PDT resultam de três mecanismos inter-relacionados: danos diretos sobre as células tumorais; destruição da vasculatura do tumor, que prejudica o fornecimento de sangue para a área tratada provocando um colapso vascular e indução de uma reação inflamatória que pode levar ao desenvolvimento de imunidade sistêmica e conseqüentemente a morte celular (Agostinis *et al.*, 2011). Estes efeitos biológicos da PDT estão limitados às áreas específicas de tecidos expostos à luz (Mroz *et al.*, 2011). Seguidamente, apresenta-se uma tabela resumo, tabela 1.1, dos diferentes mecanismos ativados e bem como os principais agentes que controlam a morte celular relacionados com a PDT.

Tabela 1.1 - Mecanismos de morte celular ativados pela PDT (adaptada de Mroz *et al.*, 2011).

Mecanismos anti-tumorais na PDT		
	Organelos	Processos
Danos diretos nas células	Mitocôndria: ➤ Liberação citocromo c ➤ Danos na Bcl-2	Apoptose
	Citoplasma: ➤ Danos no complexo proteico NF-kB	
	Reticulo endoplasmático: ➤ Beclin 1 ➤ Ativação da mTOR	Autofagia
	Desintegração da membrana celular	Necrose
Colapso vascular	Esgotamento de oxigênio e nutrientes	Apoptose Necrose Autofagia
Ativação da resposta imunológica	Células T citotóxicas	Apoptose mediada por granzima

1.4 Fatores envolvidos na fotossensibilização

A maioria dos FSs são absorvidos por todas as células do organismo (Avirah *et al.*, 2012) e como já referido, estes compostos conseguem acumular-se preferencialmente nos tecidos alvos (Ribeiro *et al.*, 2004; Perussi, 2007), contudo o mecanismo ainda não está totalmente esclarecido (Dolmans *et al.*, 2003). No entanto, existem alguns fatores

responsáveis por esta retenção seletiva, tais como alteração da permeabilidade da membrana das células tumorais; aumento da permeabilidade dos vasos sanguíneos (Nowis *et al.*, 2005; Issa & Manela-Azulay, 2010); aumento da proliferação e produção de fibras de colagénio imaturas pelas células tumorais, que permite uma grande capacidade de ligação pelas porfirinas, constituindo assim um local de absorção e acumulação do FS (Nowis *et al.*, 2005). Outros fatores, como presença de macrófagos, ausência ou diminuição de drenagem linfática e diminuição do pH intracelular e no fluido intersticial (o pH baixo no fluido intersticial do tumor facilita a biodistribuição seletiva dos FSs) favorecem o aumento da concentração do FS nas células tumorais (Nowis *et al.*, 2005, Issa & Manela-Azulay, 2010).

Outro fator importante na PDT é a fonte de luz (Henderson & Dougherty, 1992). A melhor fonte de luz tem sido descrita como sendo a que possui características espectrais adequadas que coincidam com o c.d.o. de absorção máxima do FS utilizado (Wan & Lin, 2014), isto é, na região do espectro na qual a luz pode excitar o FS de forma a produzir o máximo de ROS (Robertson *et al.* 2009) para gerar efeito terapêutico (Wan & Lin, 2014). Esta deve também apresentar um baixo custo, simplicidade e ausência de efeitos térmicos significativos (Machado, 2000).

As fontes de radiação geralmente utilizadas são os lasers ou Diodos Emissores de Luz (LEDs, do inglês *Light Emitting Diode*). As principais vantagens dos lasers como fonte de luz são a estabilidade, coerência e previsibilidade do c.d.o. de emissão, contudo são muito dispendiosos. Por sua vez, os LEDs, figura 1.7, apesar de apresentarem uma potência inferior aos lasers, possuem c.d.o e características físico-químicas necessárias para a adequada aplicabilidade da PDT (Rocha, 2010), isto é, são uma fonte de luz fria que emitem radiação numa faixa ampla do espectro relativamente ao laser, mas com um c.d.o predominante; podem ser implementados numa variedade de formas geometrias e tamanhos, apresentam baixo custo (Pervaiz & Olivo, 2006) e são simples de instalar (Agostinis *et al.*, 2011).

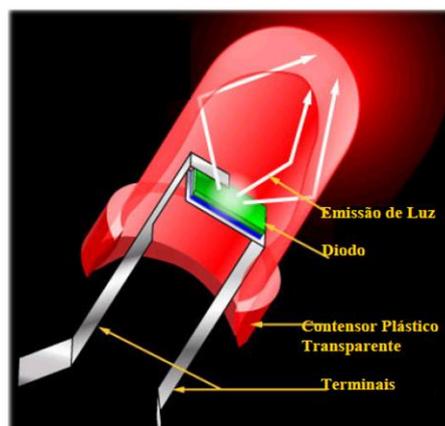


Figura 1.7 - Diodo Emissor de Luz (adaptado de Corazza, 2005).

Em suma, a eficácia da PDT depende da natureza química do FS, da sua concentração nos tecidos, da fonte de luz compatível com as características espectrais do FS, do tempo entre a administração e irradiação (Machado, 2000; Perussi, 2007), da dose e do tempo de exposição à luz (Agostinis *et al.*, 2011), das características anatómicas do tumor ou no caso experimental, da linhagem celular tumoral utilizada e da disponibilidade de oxigênio molecular para a célula tumoral durante todo o processo (Machado, 2000; Perussi, 2007).

1.5 Fotossensibilizadores utilizados na PDT e suas características

Um grande número de FSs foram testados *in vivo* e *in vitro* em procedimentos relacionados com a PDT, contudo, poucos têm mostrado propriedades ideais e por esta razão os estudos recentes são centrados no desenvolvimento de novos FSs eficazes (Robertson *et al.*, 2009).

A maior parte dos FSs usados na terapia do cancro apresentam uma estrutura tetrapirrole (Agostinis *et al.*, 2011) sendo estes habitualmente divididos em três gerações (Allison & Sibata, 2010). Os de primeira geração são do tipo porfirínico, incluindo a hematoporfirina e seus derivados (Allison & Sibata, 2010). O desenvolvimento do Photofrin®, um HpD, foi um dos FSs extensivamente estudado e também o primeiro a ser aprovado, para o qual as primeiras autorizações legais para utilização clínica, foram obtidas para uma variedade de tipos de cancro, em vários países (Machado, 2000; Agostinis *et al.*, 2011; Avirah *et al.*, 2012). Na figura 1.8, encontra-se representada a estrutura química da porfirina (A), hematoporfirina (B) e do Photofrin® na forma de éter (C).

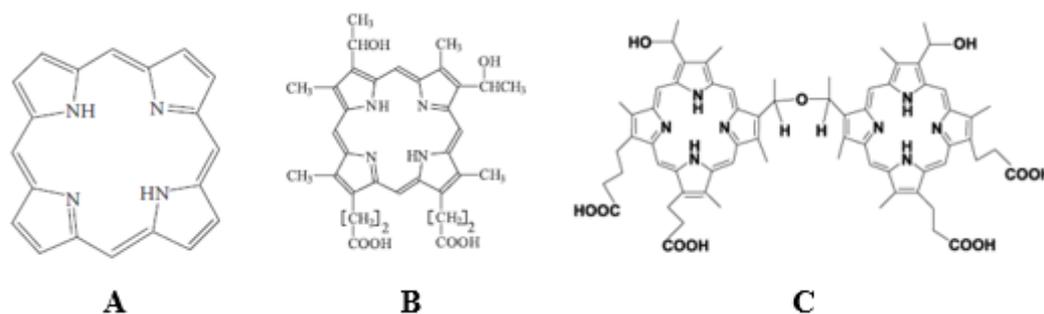


Figura 1.8 - Representação da estrutura química da porfirina (A) hematoporfirina (B) e Photofrin® na forma de éter (C) (adaptada de Machado, 2000; Perussi, 2007; Josefsen & Boyle, 2008).

Apesar do sucesso destes FSs, nomeadamente, do Photofrin® (o FS mais utilizado na prática clínica), estes apresentam muitos inconvenientes, particularmente, porque possuem um baixo coeficiente de extinção que implica a administração de grandes quantidades de composto para obter uma resposta fototerapêutica eficiente; baixa penetração pela luz nos tecidos, devido ao seu máx. de absorção não ultrapassar dos 630 nm e baixa velocidade de eliminação, o que causa fotossensibilidade prolongada na pele após o tratamento (Hendrickx, 2006; Josefsen & Boyle, 2008). Estes inconvenientes levaram ao desenvolvimento de novos FSs, nomeadamente os da segunda geração, que inclui vários HpD; ftalocianinas; naftalocianinas; clorinas; bacterioclorinas (Hendrickx, 2006; O'Connor, *et al.*, 2009), dos quais algumas estruturas estão representadas na figura 1.9, compostos esquarílicos (Devi *et al.*, 2008); cianinas esquarílicas, (estas ainda se encontram em estudo quanto à avaliação do seu potencial na PDT); entre outros (Santos *et al.*, 2003).



Figura 1.9 - Representação da estrutura química de alguns fotossensibilizadores da segunda geração utilizados em PDT (adaptada de Josefsen & Boyle, 2008).

Estes FSs são compostos com propriedades farmacocinéticas e físico-químicas melhoradas, tendo uma maior eficiência na produção de ROS. Possuem uma banda de absorção com c.d.o. mais longos (650 a 800 nm), na região entre o visível e próximo do

infravermelho (IV) e provocam uma menor fotossensibilidade prolongada na pele (Hendrickx, 2006; Perussi, *et al.*, 2007; O'Connor, *et al.*, 2009; Avirah *et al.*, 2012). A grande maioria destes compostos são hidrofóbicos, levando a uma maior captação pelos tumores em relação aos tecidos normais. No entanto, e como já referido anteriormente, até ao momento, o mecanismo para essa seletividade ainda não está bem esclarecido. No entanto, sabe-se que, ao menos em parte, esta seletividade resulta da associação do FS a lipoproteínas do plasma, que assim o transportam preferencialmente para as células anormais. Isso ocorre devido ao facto destas células possuírem um número exageradamente alto de recetores de lipoproteínas de baixa densidade (Machado, 2000).

Compostos com características hidrofóbicas podem apresentar problemas de solubilidade e conseqüentemente surge a terceira geração devido à fraca solubilidade de muitos dos FSs (Josefsen & Boyle, 2008).

Recentemente, vários trabalhos têm-se focado no desenvolvimento de sistemas que transportam os FSs até ao tecido alvo, com o intuito de melhorar a sua seletividade, especificidade e aumentar a captação tumoral. Alguns transportadores de FSs desenvolvidos apresentam grande capacidade, tais como, as emulsões de lipossomas e nanopartículas. No entanto, embora estes sistemas de entrega possam aumentar o efeito fototerapêutico observado, podem, de forma inadvertida, diminuir o rendimento quântico de $^1\text{O}_2$. Este quando formado tem que se difundir para fora do sistema e, como o seu raio de ação é curto devido ao seu pequeno tempo de semivida, pode não conseguir alcançar o alvo e não realizar o efeito desejado. Uma alternativa possível para este problema é ligar diretamente os FSs a moléculas biologicamente ativas, tais como anticorpos (Josefsen & Boyle, 2008).

1.5.1 Fotossensibilizadores utilizados na prática clínica

Grandes avanços têm sido alcançado nas últimas décadas para a definição do papel da PDT no tratamento de diferentes tipos de cancros (Gupta *et al.*, 2013). Existem muitos FSs que apresentam bons resultados no tratamento oncológico, contudo, só alguns estão disponíveis comercialmente, enquanto outros ainda se encontram em ensaios clínicos (Allison & Sibata, 2010).

Na tabela 1.2, apresenta-se os FSs que têm sido aprovados para o uso clínico na PDT, para o tratamento do cancro, e alguns que se apresentam como promissores mas que ainda se encontram sob investigação (Agostinis *et al.*, 2011).

Tabela 1.2 - Fotossensibilizadores aprovados clinicamente e promissores para utilização na PDT para o tratamento do cancro (adaptada de Agostinis *et al.*, 2011).

Fotossensibilizador	Estrutura básica	c.d.o. (máx.)	Aprovado	Em estudo	Tipos de cancro
Photofrin® (HpD)	Porfirina	630	Mundial		Pulmão, esófago, ducto biliar, bexiga, cérebro, ovários
Levulan® (ALA)	Ácido aminolevulínico	635	Mundial		Pele, bexiga, cérebro, esófago
Metvix® (éster de ALA)	Ácido aminolevulínico	635	Europa		Pele, bexiga
Foscan®	Clorina	652	Europa	Estados Unidos	Cabeça e pescoço, pulmão, cérebro, pele, ducto biliar
Verteporfin®	Clorina	690	Mundial (DMRI)	Reino Unido	Oftálmico, pancreático, pele
Photochlor®	Clorina	665		Estados Unidos	Cabeça e pescoço, esófago, pulmão
Purlytin®	Clorina	660		Estados Unidos	Pele, mama
Talaporfin®	Clorina	660		Estados Unidos	Fígado, cólon, cérebro
Radachlorin®	Clorina	660		Bielorrússia, Rússia	Nasofaringe, sarcoma, cérebro
Ftalocianina de silício	Ftalocianina	675		Estados Unidos	Linfoma cutâneo de células T
Tookad®	Bacterioclorina	762		Estados Unidos	Próstata
Lutex®	Texafirina	732		Estados Unidos	Mama

1.5.2 Parâmetros de um Fotossensibilizador ideal para utilização na PDT

Os FSs são determinantes para a PDT e até agora, para a grande maioria das aplicações médicas da PDT tem sido usado como FS, uma mistura de HpD que, como descrito anteriormente, apresentam propriedades indesejáveis. Consequentemente, nos últimos anos, uma grande quantidade de trabalhos de investigação tem sido feita no sentido de desenvolver novos FSs com melhores propriedades para o tratamento fotodinâmico do cancro e outras doenças (Nawalanya *et al.*, 2012).

O sucesso de qualquer FS para PDT depende de propriedades fotofísicas e fotoquímicas muito específicas (Santos *et al.*, 2003). Assim, um FS ideal deve apresentar as seguintes características: 1) pureza, estabilidade química e composição conhecida (Nyman & Hynninen, 2004; Pervaiz & Olivo, 2006; Robertson *et al.*, 2009; Agostinis *et al.*, 2011; Yano *et al.*, 2011); 2) apresentar uma forte absorção de radiação na zona de c.d.o. (s) mais longos, que apresentem um elevado coeficiente de extinção ($> 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Santos *et al.*, 2003; Yano *et al.*, 2011), de preferência no espectro eletromagnético próximo da região do vermelho/infravermelho (600 a 850 nm) (Pervaiz & Olivo, 2006; Agostinis *et al.*, 2011; Yano *et al.*, 2011), designada por “janela fototerapêutica”, em que

a dispersão da luz nos tecidos é reduzida e a profundidade de penetração é aumentada (Santos *et al.*, 2003). Por outro lado, acima de 800 nm ocorre absorção de radiação pela água o que restringe o c.d.o. nesse limite superior e também porque a absorção de fótons não fornece energia suficiente para excitar o O₂ para o seu estado excitado singuleto e consequentemente não ocorre formação de um rendimento substancial de ROS (Nyman & Hynninen, 2004; Agostinis *et al.*, 2011); 3) ter uma elevada retenção nos tecidos-alvo face aos restantes tecidos para maximizar a seletividade da terapia (Nyman & Hynninen, 2004; Ribeiro *et al.*, 2005; Pervaiz & Olivo, 2006; Josefsen & Boyle, 2008; Robertson *et al.*, 2009; Allison & Sibata, 2010). Deve acumular-se preferencialmente em organelos estratégicos como a mitocôndria, retículo endoplasmático, lisossomas e complexo de golgi. A produção de ROS, por parte de um FS excitado, nesses organelos, (principalmente na mitocôndria) pode induzir a morte de células tumorais por apoptose (Ribeiro *et al.*, 2005); 4) possuir características fotofísicas apropriadas, como, elevado rendimento quântico tripleto, elevado rendimento quântico de oxigénio singuleto (Santos *et al.*, 2003; Pervaiz & Olivo, 2006) e apresentar um estado tripleto com um τ_T elevado ($\tau_T \geq 500$ ns) para que ocorra a transferência de energia e/ou eletrões do FS para o ³O₂ (Machado, 2000; Ribeiro *et al.*, 2005); 5) deve apresentar uma mínima atividade citotóxica no escuro, desenvolvendo apenas atividade na presença de luz (Nyman & Hynninen, 2004; Ribeiro *et al.*, 2005; Pervaiz & Olivo, 2006; Agostinis *et al.*, 2011; Yano *et al.*, 2011; Avirah *et al.*, 2012); 6) ser rapidamente excretado a partir do organismo (Nyman & Hynninen, 2004; Pervaiz & Olivo, 2006; Robertson *et al.* 2009; Agostinis *et al.*, 2011; Yano *et al.*, 2011; Avirah *et al.*, 2012); 7) deve possuir uma estrutura anfifílica, ou seja, solúvel em água mas contendo um grupo hidrofóbico para facilitar a passagem através das membranas celulares (Josefsen & Boyle, 2008; Allison & Sibata, 2010) e 8) não deve provocar efeitos mutagénicos ou carcinogénicos (Hendrickx, 2006; O'Connor *et al.*, 2009).

Outros autores acrescentam que compostos que se destinam a aplicações nesta área devem, também, ser compostos de síntese fácil (Castano *et al.*, 2004; (Nyman & Hynninen, 2004), elevada reprodutibilidade e bons rendimentos (Silva *et al.*, 2000).

Estas características definem teoricamente um FS ideal, no entanto, é necessário ter em conta, para além das propriedades biológicas, físicas e químicas, as condições que respondam às necessidades do doente. Deste modo, o clínico tem que optar pelo FS que lhe parece ser o mais apropriado face às necessidades e com as melhores características clínicas (Hendrickx, 2006; Plaetzer *et al.*, 2009).

1.6 Aplicações da PDT

A aplicação mais importante da PDT é no tratamento de diferentes tipos de cancro, (Nyman & Hynninen, 2004; Pervaiz & Olivo, 2006; Konopla & Goslinski, 2007; Agostinis *et al.*, 2011; Yano *et al.*, 2011; Wan & Lin, 2014) tais como, no cancro do esófago, gástrico; intestino; colon-retal; mama; bexiga; pulmão; pele (Yano *et al.*, 2011); colangiocarcinoma irresecável (CC) (Agostinis *et al.*, 2011); cancros resistentes a outros tratamentos (Nyman & Hynninen, 2004) e lesões pré-cancerosas (Pervaiz & Olivo, 2006).

À medida que a aplicação da PDT evoluiu ao longo dos anos, têm aparecido algumas terminologias na literatura, tais como fotomedicina, que envolve o uso de luz na preparação de formas farmacêuticas e na prevenção e tratamento de doenças; fototerapia e fotoquimioterapia (a primeira envolve o tratamento diretamente com luz, enquanto a segunda envolve uma combinação de agentes quimioterapêuticos com a luz) (Pervaiz & Olivo, 2006). As técnicas de PDT, em que, após irradiação de células cancerígenas com luz de c.d.o. específico gerando uma excitação, têm sido utilizadas como método de diagnóstico de cancro (Yano *et al.*, 2011). Machado (2000), escreve que o cancro da bexiga é, normalmente, de difícil diagnóstico, contudo, devido à retenção preferencial dos FSs no tecido doente, estes casos têm sido detetados com sucesso através da medição da fluorescência, após irradiação do tecido lesado.

Agostinis e colaboradores (2011), descrevem que na PDT, a taxa de penetração da luz através dos tecidos é limitada, todavia esta característica pode ser explorada favoravelmente para o tratamento de doenças superficiais, tais como, condições pré-cancerosas (e.g. displasias mucosas, queratose actínica), carcinoma *in situ* (CIS) ou tumores superficiais (e.g. mesotelioma maligno pleural, carcinomatose intraperitoneal disseminada).

A PDT também pode ser combinada com a cirurgia (Nyman & Hynninen, 2004; Agostinis *et al.*, 2011), e.g., para remoção de um tumor até um tamanho tratável pela PDT, como também pode ser aplicada para remover possíveis restos microscópicos do tumor após cirurgia; com a quimio; radio e hipertermia. Pode ser também usada para tratamento paliativo, com o objetivo de reduzir o tamanho do tumor e, assim, aliviar os sintomas e aumentar a expectativa de vida de um paciente terminal (Nyman & Hynninen, 2004). Robertson e colaboradores (2009) descreveram que pacientes com cancro terminal, após aplicação da PDT dirigida para o alívio da dor, sobreviveram por muito mais tempo do que o esperado.

A PDT pode ainda fornecer ajuda em casos de obstrução das vias aéreas por um tumor ou de um tumor inoperável no cérebro (Machado 2000; Nyman & Hynninen, 2004). Além disso, pode representar um tratamento para casos não oncológicos tais como, a aterosclerose; (uma das principais causas de morte nos países desenvolvidos); hiperplasia prostática benigna (HPB); artrite reumatóide (AR); psoríase; acne; (Dougherty *et al.*, 1998; Nyman & Hynninen, 2004) degeneração macular relacionada com idade (DMRI); entre outros (Nyman & Hynninen, 2004; Pervaiz & Olivo, 2006; Gupta *et al.*, 2013). Vários estudos têm ainda demonstrado que a PDT também apresenta propriedades antimicrobianas (Konopla & Goslinski, 2007).

Atualmente, a PDT é um método terapêutico que tem vindo a ser usado cada vez com frequência em dermatologia, na tentativa do tratamento do sarcoma de Kaposi, da doença de Paget extramamária, e do Linfoma cutâneo de células B (Wan & Lin, 2014)e

Noutras doenças proliferativas, tais como, malformações vasculares, observaram-se resultados impressionantes, provavelmente devido aos efeitos anti-angiogénicos da PDT (Wan & Lin, 2014).

1.7 Estudos da terapia fotodinâmica *in vitro* e *In vivo*

Em 2002, Hajri e colaboradores avaliaram a eficácia da PDT, *in vitro*, utilizando uma cultura de células tumorais do colón humano, HT29, a partir da avaliação da citotoxicidade provocada por concentrações crescentes de dois FSs, Photofrin® (100 ng a 100 mg/mL) e a Feoforbida *a* (Ph *a*, uma bacterioclorina), 6 ng a 6 mg/mL. As células foram expostas a uma irradiação de 640 nm para Photofrin® e 670 nm para a Ph *a*, emitida por uma lâmpada de halogénio. Os resultados demonstraram que a aplicação da PDT inibiu o crescimento das células HT29. A fotolesão celular ocorreu quando o valor das concentrações de Ph *a* e Photofrin® atingiram os 0,3 mg/mL e 10 mg/mL, respetivamente (Hajri *et al.*, 2002).

Os mesmos autores, também investigaram a eficácia da PDT, *in vivo*, utilizando os mesmos FSs e tipo de cancro em ratinhos atímicos, nos quais foi injetado por via subcutânea $1,7 \times 10^7$ células HT29 para indução do tumor. As investigações foram realizadas quando os tumores atingiram 8 a 10 mm de diâmetro (isto é, 0,25 a 0,50 cm³ de volume). Os ratinhos portadores do tumor HT29 foram injetados intraperitonealmente com Photofrin® ou com Ph *a* (30 mg/kg). A inibição do crescimento do tumor após uma única sessão de PDT, com luz de intensidade 100 J/cm², foi medida pelas alterações de

volume e por análise histológica de necrose tumoral. A luz foi gerada por um laser sintonizável para 635 nm para Photofrin® e 665 nm para Ph *a*. A luz do laser foi desfocada na ponta de uma fibra de quartzo de 400 µm de diâmetro através de microlentes e ajustada para circular em 2 cm² no tecido tumoral. Nestas condições experimentais, as irradiações foram de 200 mW/cm² a 635 nm e 150 mW/cm² a 665 nm (Hajri *et al.*, 2002).

Concluíram, através dos resultados obtidos, que a PDT apresenta capacidade de destruir células de tumor do cólon humano, *in vivo* (tumor induzido nos ratinhos), pois observaram um atraso no crescimento do tumor. O estudo também sugere a utilização preferencial de Photofrin® na PDT no tratamento do cancro do cólon, sugerindo que este deve ser mais eficaz *in vivo* relativamente ao Ph *a*, uma vez que verificaram uma melhor absorção do Photofrin® pelo tumor (Hajri *et al.*, 2002).

Yan e colaboradores (2010) avaliaram o efeito anti-tumoral do FS Chlorin-H (figura 1.10) para a PDT, *in vivo*.

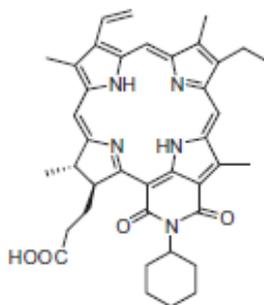


Figura 1.10 - Representação da estrutura química da Chlorin-H (adaptada de Yan *et al.*, 2010).

Para determinar os efeitos de Chlorin-H, utilizaram um grupo de ratinhos, aos quais foram injetados subcutaneamente células de cancro do pulmão (células A549) na zona dos flancos. Quando os tumores atingiram 1 cm, foi administrado uma concentração de 8 µM desse composto e o tratamento iniciado. Após 24 h, os ratinhos foram expostos a irradiação por laser (c.d.o.= 698 nm) com 130 mW/cm², com uma intensidade de 78 J/cm², durante 10 minutos (Yan *et al.*, 2010).

Os resultados mostram que os tumores tratados com PDT começaram a diminuir de tamanho dentro de 5 dias e formaram uma crosta ao fim de 20 dias. Em contraste os tumores, no grupo de ratos só com FS e não irradiados e no grupo de controlo, continuou a crescer e apresentavam-se significativamente maiores do que no grupo tratado com a PDT, após 10 dias de tratamento. Em geral, consideram que o Chlorin-H é um FS anti-

tumoral eficaz *in vivo* e é merecedor de estudos adicionais como um novo candidato a fármaco para a PDT (Yan *et al.*, 2010).

Outro estudo, onde se avaliou o efeito *in vitro* da PDT mediada pelo FS alumínio-cloro-ftalocianina (AlClFt) em formulação lipossomal (TFD-AlClFt), em culturas celulares primárias derivadas de carcinoma mamário de cadelas. Pela citotoxicidade provocada pelo AlClFt à concentração de 2,5 μM , no escuro e sob irradiação, utilizando o LED como fonte de luz (intensidade= 10 J/cm^2 e c.d.o. = 660 nm) e avaliando a citotoxicidade apenas mediada pela irradiação (Rocha, 2010).

Os resultados demonstraram claramente (perante um controlo) a eficácia da PDT mediada pelo AlClFt em formulação lipossomal na destruição de células tumorais em culturas *in vitro* e verificou que o LED e o AlClFt em formulação lipossomal, ambos de forma isolada, não causaram citotoxicidade no modelo experimental proposto (Rocha, 2010).

Berlanda e colaboradores (2010) avaliaram, *in vitro*, as propriedades de seis FSs (Foscan®, Fospeg®, hipericina, alumínio (III) cloreto de ftalocianina tetrasulfonato (AlPcS₄), ácido 5-aminolevulínico (ALA) e o Photofrin®) em termos de citotoxicidade (sem irradiação); fototoxicidade (com irradiação), utilizando o LED como sistema de irradiação (610 nm para a hipericina, 630 nm para Photofrin® e ALA, 660 nm para Foscan®, Fospeg® e AlPcS₄), em células de carcinoma epidermoide humano (A431). A fototoxicidade foi avaliada utilizado 0,4 μM de Foscan® e Fospeg®, 1 μM de hipericina, 2 μM de Photofrin®, 40 μM de AlPcS₄ e 1 mM de ALA. Observaram que Foscan® é um FS muito eficaz pois induziu elevada fototoxicidade a concentrações muito baixas, 0,4 μM , quando irradiado com intensidade de 0,07 J cm^{-2} . Idêntico padrão foi observado *in vitro* para Fospeg®. ALA não produziu efeitos citotóxicos no escuro até uma concentração de 3,3 mM, seguindo-se uma rápida diminuição da viabilidade a concentrações mais elevadas. Entre todos os FSs, o Photofrin® apresentou maiores aprovações clínicas e serve como padrão (Berlanda *et al.*, 2010).

A PDT tem demonstrado resultados de sucesso (Avirah *et al.*, 2012), razão pela qual se tem realizado imensos estudos para que seja implantada (Perussi, 2007). No entanto, o verdadeiro desafio consiste na destruição de tumores mais profundos e outra preocupação ainda mais grave, deve-se ao microambiente celular de hipoxia criado nos tumores, o que pode comprometer severamente a eficácia da PDT, uma vez que a presença de oxigénio molecular endógeno é essencial para que forme a espécies

citotóxicas. Assim, a investigação nesta área devem prosseguir no sentido de superar estes desafios, para que a PDT possa evoluir ainda mais como uma terapêutica eficaz no tratamento do cancro (Avirah *et al.*, 2012).

Atualmente a síntese de corantes esquarílicos eficazes, também é uma área ativa de investigação fotobiológica. Vários resultados relacionados com a utilização desses corantes sugerem que os compostos esquarílicos apresentam um elevado potencial para ser utilizados em ensaios clínicos num futuro previsível (Avirah *et al.*, 2012).

1.8 Corantes

O primeiro corante orgânico sintético, Mauveína (figura 1.11), foi descoberto pelo químico britânico William Henry Perkin em 1856, quando fez reagir anilina com solução ácida de dicromato de potássio, numa tentativa de preparar uma droga anti-malária. Ele não só descobriu o primeiro maior corante sintético como também fundou a indústria química moderna (Broadbent, 2001) e consequentemente, em poucos anos, os corantes sintéticos substituíram quase todos os antigos corantes naturais (Christie, 2001).

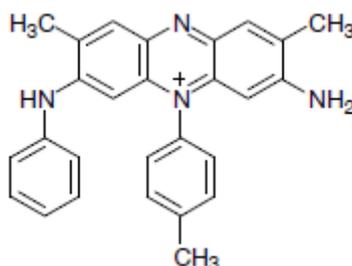


Figura 1.11 - Estrutura química de Mauveína (adaptada de Broadbent, 2001).

A estrutura molecular dos corantes é complexa quando comparada com a maioria dos compostos orgânicos comuns. Apesar da complexidade, as estruturas dos corantes apresentam características comuns, tais como a presença de um determinado número de anéis aromáticos como o benzeno ou naftaleno, ligados em um sistema completamente conjugado. Este fato leva à existência de uma longa sequência de ligações simples e duplas alternadas entre os átomos, maioritariamente entre átomos de carbono, que formam grande parte da estrutura, sendo esta unidade formada designada por cromóforo ou unidade responsável pela coloração. Contudo, para que um composto apresente coloração, são necessárias cinco ou seis ligações duplas conjugadas na sua estrutura

molecular (Broadbent, 2001). Os cromóforos mais importantes são grupos azo (-N=N-), carbonilo (C=O), metino (-CH=) e nitro (NO₂) (Christie, 2001).

Os corantes são substâncias com grande capacidade de absorção de luz no espectro visível e pelo facto de absorverem luz com elevada eficiência, são capazes de induzir ou participar em reações fotoquímicas (Machado, 2000). Na PDT os corantes são denominados por FSs, devem ser compostos não-tóxicos na ausência de luz e são divididos nos seguintes grupos: azino-catiónicos, fenotiazínicos, cianinas, macrocíclicos, ftalocianinas, psorales, porfirinas, perilenequinonóides e combinações de corantes (Bouillaguet *et al.*, 2008).

Os corantes que absorvem ou emitem em c.d.o. longos (> 650 nm) têm ganho uma atenção crescente nos últimos anos, devido às suas potenciais aplicações na optoelectrónica e na biomédica. Várias tentativas têm sido feitas para o desenvolvimento de compostos que absorvem na região do IV próximo, sendo uma das hipóteses, aumentar a extensão da conjugação π . Os corantes de cianina têm recebido uma especial atenção devido às suas propriedades notáveis de absorção e emissão na região IV próximo (NIR -do inglês near-infrared). No entanto, a sua fotodegradação e baixa estabilidade química levou ao desenvolvimento de corantes que apresentam absorção alternada na região do IV próximo e IV (IR – do inglês infrared), tais como os corantes esquarílicos (Avirah *et al.*, 2008).

1.9 Cianinas

A estrutura das cianinas é caracterizada pela presença de dois grupos heterocíclicos de azoto, em que um deles está carregado positivamente, ligados por uma cadeia polimetínica (formada por um número ímpar de grupos de metino, ligados de forma alternada por ligações simples e duplas (-CH=)) (Figura 1.12).

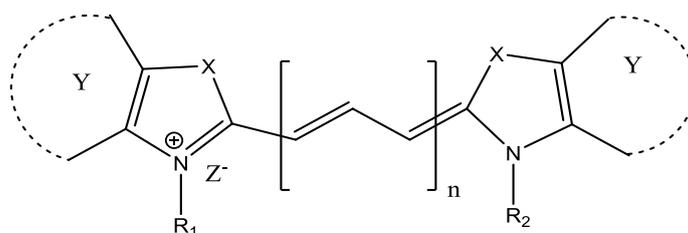


Figura 1.12 - Estrutura e classificação geral das cianinas, sendo $n=0$ (cianina); $n=1$ (carbocianina); $n=2$ (dicarbocianina) e $n=3$ (tricarbo-cianina); $X= S, Se, O, N, C(CH_3)_2, \dots$; $Y=$ grupos heterocíclicos terminais; R_1 e $R_2= CH_3, C_2H_5, C_3H_7, C_6H_{13}, C_{10}H_{21}, \dots$ e $Z= Cl, I, \dots$ (Adaptado de Fagundes, 2013).

São moléculas que podem ser obtidas por métodos de síntese simples, e numa larga variedade estrutural podendo exibir uma ampla diversidade de cores dependendo do meio em que se encontram (Mishra *et al.*, 2000) e estão associadas à interação de ressonância entre os átomos de azoto, presentes nos extremos da cadeia conjugada anéis heterocíclicos terminais, envolvendo a deslocalização da carga positiva (Armitage, 2008), originado assim, os cromóforos (Delay *et al.*, 2000).

Dependendo da sua estrutura, as cianinas apresentam um espectro eletromagnético com bandas de absorção que vão desde a região do IV ao UV incluindo a região do visível (Vis) (Mishra *et al.*, 2000) e normalmente apresentam elevados coeficientes de absorvidade molar (Delay *et al.*, 2000). A maioria destes corantes são catiónicos, em contraste com os FSs aniônicos mais utilizados, tais como a hematoporfirina, clorinas e as flatocianinas. Os corantes catiónicos podem ser utilizados como FSs de tumor de células específica e induzem reduzida fototoxicidade da pele (Delay *et al.*, 2000).

As características fotoquímicas e fotofísicas destes corantes tais como, elevados coeficientes de absorvidade molar numa ampla zona do espectro (Delay *et al.*, 2000; Avirah *et al.*, 2012); bom rendimento quântico; capacidade de geração do T₁ (Tatikolov, 2012) tem sido muito úteis para muitas aplicações biológicas, como por exemplo para a PDT (Avirah *et al.*, 2012).

1.9.1 Cianinas escurilicas

A maioria dos FSs aprovados têm vias metabólicas degradativas lentas e, infelizmente, são ativados pela luz de c.d.o. abaixo de 600 nm, conseqüentemente não podem penetrar mais do que alguns milímetros na pele. Devido a esta razão, recentemente, tem havido um grande interesse no desenvolvimento de corantes que possuem absorção na região do IV próximo. Nesta perspectiva, os corantes escurilicos tem atraído grande interesse nos últimos anos para o desenvolvimento de FSs que mostrem propriedades melhoradas de absorção, um melhor rendimento quântico do estado excitado tripleto e conseqüentemente uma maior formação de ¹O₂ (Avirah *et al.*, 2012).

As primeiras sínteses das cianinas escurilicas foram há mais de 40 anos (Reis *et al.*, 2009). São estruturas polimetínicas, 1,3-zwiteriônicas, com um aceitador central de quatro membros, o anel escurilico e com doadores aromáticos ou anéis heterocíclicos laterais (Avirah *et al.*, 2012), como apresentado na figura 1.13. A síntese de muitos destes

corantes envolve a condensação de um anel aromático rico em elétrons, com o ácido esquárico (Levine, 2012).

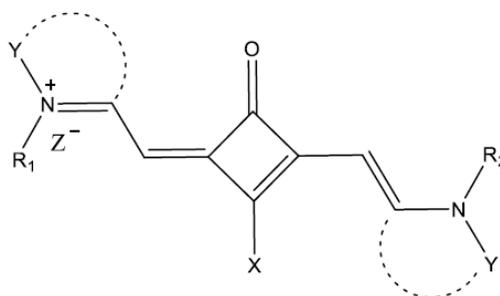


Figura 1.13 - Representação da estrutura geral dos corantes esquarílicos, sendo R₁ e R₂= grupo alquilo...; X = O⁻, OCH₃, NH₂, NHCH₃...; Z⁻ = I⁻, Cl⁻, CF₃SO₃⁻...; Y = grupo aromático (Adaptado de Torres, 2010).

Estes compostos possuem bandas de absorção estreitas e intensas ($\epsilon = 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), que se estendem desde a região do IV próximo até ao IV, a designada por “janela fototerapêutica”. A absorção intensa nesta região (600-850 nm) leva a que as cianinas esquarílicas apresentem elevado potencial como novos agentes FSs na PDT. Este facto deve-se ao carácter intramolecular, fundamentalmente pela existência de uma grande quantidade de ligações π presentes nestes compostos (Avirah *et al.*, 2012). As propriedades fotoquímicas e fotofísicas exibidas por estes corantes permitem que sejam altamente apropriados para um vasto número de aplicações biológicas, tais como, sensores de iões metálicos; marcadores fluorescentes (Santos *et al.*, 2003) (Avirah *et al.*, 2012); e detetores de grupos tiol (Avirah *et al.*, 2012).

Apesar das várias vantagens dos corantes esquarílicos tais como absorção na “janela fototerapêutica”, elevada estabilidade devido à rigidez imposta pela inclusão do anel de quatro membros na cadeia polimetínica, as aplicações biológicas destes corantes, especialmente como potenciais sensibilizadores em PDT, não foram exploradas até recentemente. Isto deve-se possivelmente ao facto de que estes corantes mostram baixa eficiência no ISC, tornando-os menos eficientes na geração de espécies reativas necessárias para induzir danos celulares (Avirah *et al.*, 2012).

Quando comparados com as cianinas, os corantes esquarílicos apresentam algumas propriedades que limitam o seu potencial como FSs, tal como, a propensão para formarem agregados em solução aquosa que, para além de reduzir a fotoestabilidade, levam à diminuição dos $\Phi\Delta$ de formação de $^1\text{O}_2$ e do tempo de vida do estado tripleto e sofrerem degradação química por parte do ataque de agentes nucleófilos biológicos

(proteínas, cisteínas) ao anel esquarílico (Arun *et al.*, 2011, Avirah *et al.*, 2012). Contudo, vários estudos já demonstraram que quando substituídos adequadamente, os corantes esquarílicos exibem propriedades fotofísicas bastante favoráveis que lhes conferem potencial como sensibilizadores em PDT (Avirah *et al.*, 2012).

Fagundes (2013) realizou a síntese e caracterização de corantes cianínicos esquarílicos simétricos e assimétricos, figura 1.14, e avaliou a sua citotoxicidade, *in vitro*, no escuro e sob irradiação nas linhagens celulares HepG2 e Caco-2, com a finalidade de estudar o seu potencial como agentes fotossensibilizadores para a PDT. Utilizou concentrações crescentes de 0,1; 1,0; 5,0 e 10,0 μM para a aplicação de cada um dos compostos nas culturas celulares e a fonte de luz utilizada para irradiação foi o LED, com uma banda de emissão centrada a 660 nm (c.d.o. utilizado segundo os valores de c.d.o. máx. obtido nos estudos Vis dos corantes) e uma potência de 3,6 mW.

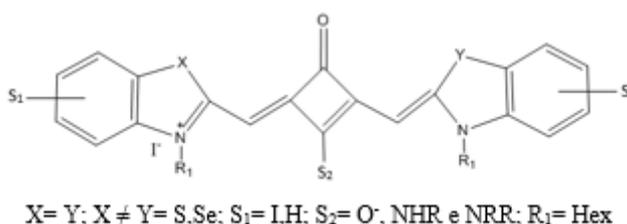


Figura 1.14 - Fórmula geral dos corantes cianínicos esquarílicos sintetizados (adaptado de Fagundes, 2013).

Os resultados obtidos demonstraram que o composto zwitteriônico (X= Se, Y= S, S₁= I, S₂= O⁻) e o composto aminoesquarílico que possui o grupo NH₂ (X= Se, Y= S, S₁= I, S₂= NH₂) podem ser considerados como potenciais FSs para PDT do cancro (Fagundes, 2013).

Mais recentemente, Friães (2015) também sintetizou corantes esquarílicos assimétricos (figura 1.15) e avaliou a sua citotoxicidade, *in vitro*, no escuro e após irradiação (durante 7 ou 14 minutos), nas linhas celulares Caco-2 e HepG2, com o objetivo de estudar o potencial destes corantes como agentes FSs para aplicação em PDT do cancro.

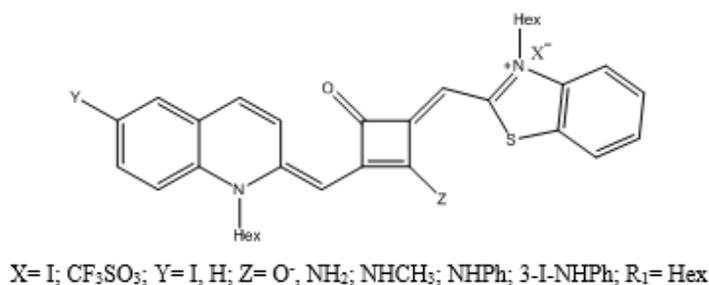


Figura 1.15 - Fórmula geral dos corantes cianínicos esquarílicos sintetizados (adaptado de Friães, 2015).

Utilizou concentrações crescentes de 0,1; 1,0; 5,0 e 10,0 μM para a aplicação de cada um dos compostos nas culturas celulares e para irradiação utilizou LEDs centrados a 630 ou 660 nm. Os resultados obtidos demonstraram que o corante zwitteriônico (Z= O⁻; Y= I) pode ser considerado como um potencial FS para PDT do cancro.

1.10 Avaliação da citotoxicidade em culturas de células - Indicador de viabilidade celular (Alamar Blue)

O Alamar Blue © (A.B.) é um corante solúvel em água que tem sido muito utilizado para a quantificação da viabilidade, *in vitro*, de vários tipos de células. Devido ao fato de que é extremamente estável e mais importante, apresentar ausência de citotoxicidade para as células, é possível a monitorização contínua das culturas ao longo do tempo. Principalmente por esta razão, este teste foi considerado superior a testes clássicos para a viabilidade celular, tais como o ensaio MTT. O ensaio MTT baseia-se na capacidade de células viáveis produzirem formazano a partir da clivagem do sal de tetrazólio por mitocôndrias funcionais (Al-Nasiry *et al.*, 2007) (através de enzimas como a desidrogenase e outros agentes redutores (Stockert *et al.*, 2012)). No entanto, o teste de MTT necessita de matar as células para quantificar a viabilidade celular, pois o formazano precipita no meio intracelular e é necessário extraí-lo com solventes orgânicos, tornando-se impossível o contínuo acompanhamento da cultura celular (Al-Nasiry *et al.*, 2007).

O A.B. é constituído por um indicador redox, a resazurina, e quando adicionado a culturas de células viáveis, a forma sua forma oxidada (resazurina) entra no citosol e é convertido para a sua forma reduzida (resorufina), figura 1.16, pela atividade enzimática mitocondrial, por aceitar eletrões de NADPH, FADH₂, NADH, bem como a partir dos citocromos (Al-Nasiry *et al.*, 2007).

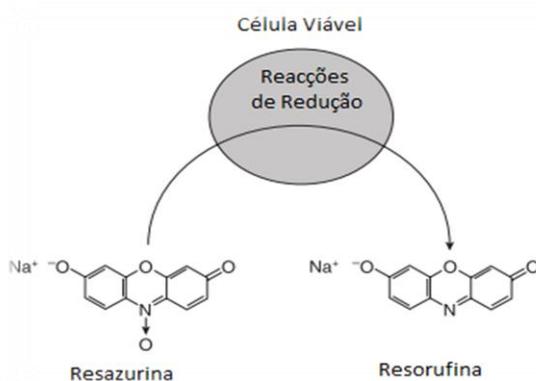


Figura 1.16 - Representação da reação de redução da resazurina, em células viáveis (adaptado de Riss *et al.*, 2013).

Esta reação redox é acompanhada por uma mudança de cor do meio de cultura de azul intenso para rosa fluorescente, que pode ser facilmente medida pelo método colorimétrico (Al-Nasiry *et al.*, 2007), espectrofotometria, uma vez que a resazurina absorve a 600 nm e a resorufina a 570 nm (Al-Nasiry *et al.*, 2007; Borra *et al.*, 2009), permitindo uma avaliação da atividade celular metabólica (Al-Nasiry *et al.*, 2007), uma vez que a quantidade de fluorescência absorvida (taxa de redução) é diretamente proporcional ao número de células viáveis (O'Brien *et al.*, 2000).

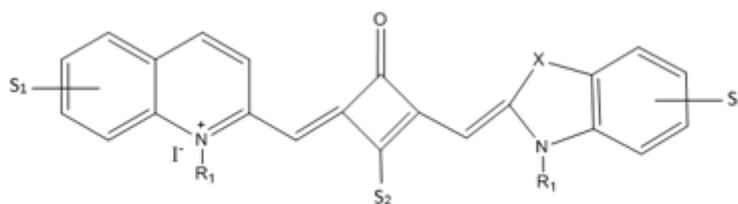
A avaliação da viabilidade celular com o A.B. é um método muito popular devido à sua rapidez, sensibilidade, eficácia e baixo custo (O'Brien *et al.*, 2000; Riss *et al.*, 2013).

1.11 Objetivos do trabalho

O principal objetivo deste trabalho consistiu na síntese de novos corantes cianínicos esquarílicos assimétricos derivados da quinaldina, a sua caracterização espectroscópica e a avaliação como potenciais FSs para PDT do cancro da mama, usando as linhas celulares tumorais MCF-7 e BT-474.

Objetivos específicos:

- Preparação de vários precursores/heterocíclicos, a partir de compostos disponíveis comercialmente, derivados da quinaldina e do benzoselenazole, utilizando métodos previamente descritos na literatura ou adaptados a partir deles.
- Síntese, purificação e caracterização (confirmação estrutural) dos corantes esquarílicos assimétricos, figura 1.17, através do p.f.; técnicas de espectroscopia no IV, no VIS, espectroscopia de massa de alta resolução (EMAR) e ressonância magnética nuclear de protão (^1H -RMN) e de carbono (^{13}C -RMN).



X = Se; S₁ = H; S₂ = O⁻; OCH₃; NHCH₃; NH₂; NPh e 3-I-NPh; R₁ = Hex

Figura 1.17 - Fórmula geral dos corantes cianínicos esquarílicos sintetizados neste trabalho.

- 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 IV próximo.

- Avaliação da citotoxicidade dos corantes esquarílicos (figura 1.17, $S_2 = O^-$; OCH_3 ; $NHCH_3$; NH_2 ; $NHPh$ e $3-I-NHPh$) em comparação com o corante zwitteriônico (figura 1.17, $S_2 = O^-$), *in vitro*, utilizando células em cultura das linhas celulares MCF-7 e BT-474, no escuro e sob irradiação, de forma a comprovar a eficiência dos novos corantes. A fonte de luz utilizada foram os LEDs com um c.d.o específico ao espectro de absorção dos FSs sintetizados.

Capítulo 2

PARTE EXPERIMENTAL

2.1 Reagentes e Equipamentos

Os solventes utilizados e, na qual a sua síntese não se encontra descrita foram adquiridos comercialmente e apresentam elevado grau de pureza. O diclorometano (CH_2Cl_2) utilizado nas reações de síntese foi pré-seco com cloreto de cálcio (CaCl_2) e posteriormente seco sob hidreto de cálcio (CaH_2) por métodos padronizados (Perrin *et al.*, 1980).

O progresso das reações foi seguido por cromatografia em camada fina (c.c.f), usando placas de sílica-gel Merck, 60 F₂₅₄ com 0,25 mm de espessura, sendo o eluente utilizado apenas CH_2Cl_2 ou uma mistura de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (2, 5 e 10 %). Após a eluição, as placas cromatográficas foram observadas à luz UV nos c.d.o. 254 e/ou 365 nm. No entanto, as placas correspondentes a compostos que apresentam na sua estrutura molecular átomos de azotos básicos (sais quaternários de amônio e aminas) foram ainda reveladas, adquirindo uma coloração alaranjada aquando da pulverização com a solução de Dragendorff (mistura 1/1 (v/v) de nitrato de bismuto 2 % em solução aquosa de ácido acético 20 % e iodeto de potássio 40 % em água).

Os pontos de fusão foram determinados num Microscópio Binocular URA com placa aquecida e não foram corrigidos.

Os espectros no VIS foram obtidos e registados num espectrofotómetro Spectrophotometer Perkin-Elmer Lambda 25 entre os comprimentos de onda 500 e 800/900 nm. Os diferentes corantes utilizados para a determinação dos respetivos espectros foram dissolvidos em DMSO (dimetilsulfóxido) e em meio de cultura sem soro (DMEM) e seguidamente colocados numa célula de quartzo de 1 cm de percurso ótico, para se efetuar a leitura. Na descrição de cada espectro é apresentado o valor do c.d.o. correspondente ao máximo de absorção ($\lambda_{\text{máx}}$, em nm) e o logaritmo do valor do coeficiente de extinção molar correspondente a essa banda (ϵ em $\text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

Os espectros no IV foram realizados num espectrofotómetro UNICAM Research Series FTIR. Na descrição dos diferentes espectros, os dados conseguidos são indicados 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), larga (l), média (m), fraca (fr), e larga (frl)] e atribuição dessa banda a uma ligação entre átomos da molécula.

Os espectros de ^1H -RMN e de ^{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 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 sendo utilizado como referencia ($\delta = 0,00$ ppm), nos espectros em que o solvente utilizado foi o CDCl_3 e o sinal do próprio solvente 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, respetivamente.

A obtenção dos espectros de massa foi conseguida num espectrómetro microTOF (focus) Brücker Daltonics nos serviços de Espectrometria de massa no C.A.C.T.I. da Universidade de Vigo. No registo dos diferentes espectros obtidos, os dados estão indicados pela seguinte ordem: razão massa carga do ião molecular (*m/z*); fórmula molecular e massa exata determinada para o ião molecular correspondente.

O $\Phi\Delta$ de formação de $^1\text{O}_2$ 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 fotodiodo 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/Visível normal (cerca de 200 a 800 nm). Para avaliação da eficácia dos corantes escurílicos, na produção de $^1\text{O}_2$, os $\Phi\Delta$ na formação de $^1\text{O}_2$ foram medidos, em clorofórmio a 337 nm, com densidade ótica de 0,6, utilizando a fenazina como padrão.

Na cultura de células *in vitro* todo o material utilizado para aplicação dos compostos escurílicos nas diferentes linhas celulares encontrava-se esterilizado e após a sua utilização foi devidamente descartado, os frascos ventilados com filtro (Costar) e todo o trabalho experimental foi realizado numa câmara de fluxo laminar classe II, com o objetivo de evitar possíveis contaminações.

A cultura de células foi realizada em placas de cultura de 96 poços (Costar) sendo estas mantidas numa incubadora de CO₂ (Binder CB150), à temperatura de 37 °C com controlo de humidade e CO₂/ar (5:95).

O meio base de cultura utilizado foi o DMEM (Ref. 21969 GIBCO), armazenado no frigorífico a 4 °C, com 4,5 g/L de glicose e 0,11 g/L de piruvato de sódio (sem L-glutamina devido ao facto do composto sofrer degradação ao longo do tempo).

A avaliação das placas de cultura de células foi realizada num Microscópio Invertido de Epifluorescência Olympus e a leitura das absorvâncias num espectrofotómetro de microplacas Labsystems Multiskan Ex.

As pipetagens foram realizadas com pipetas de Pasteur, pipetas graduadas, micropipetas (Gilson) e micropipeta multi-canal.

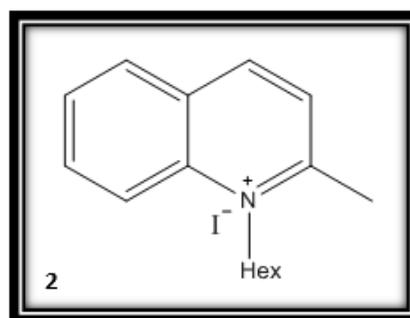
Os sistemas LEDs para irradiação das células foi idealizado e desenvolvido em conjunto com o Professor José Ramiro Fernandes do Departamento de Física, Escola de Ciências e Tecnologia da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro.

2.2 Síntese dos corantes esquarílicos assimétricos derivados da quinaldina e do benzoselenazole

2.2.1 Síntese prévia

2.2.1.1 Síntese do iodeto de 1-hexil-2-metilquinolínio (2)

A síntese do sal quaternário de amónio **2** foi adaptada da literatura (Pardal *et al.*, 2002). Fez-se reagir a quinaldina (**1**) (4,73 mL, 34,96 mmol) e 1-iodo-hexano (I-Hex) (15,47 mL, 104,88 mmol), em acetonitrilo (125 mL), a refluxo e sob agitação. A evolução da reação foi seguida c.c.f. (sílica, CH₂Cl₂/MeOH 2 %).

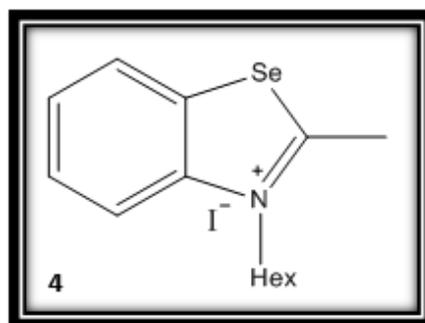


Após cinco dias de reação, a mistura reacional foi removida do aquecimento e arrefecida em banho de gelo, tendo-se adicionado éter etílico para promover a precipitação total do produto desejado. O precipitado formado foi recolhido por filtração a pressão reduzida e lavado com éter etílico gelado e os cristais obtidos secos a pressão reduzida. As fases orgânicas resultantes das lavagens foram recolhidas e concentradas por

evaporação do solvente a pressão reduzida. À mistura resultante foi adicionado mais um equivalente molar (7,74 mL) de I-Hex e colocada novamente a refluxo durante cinco dias no sentido de aumentar o rendimento da reação. Este procedimento foi realizado por mais duas vezes. Deste modo, obteve-se então **iodeto de 1-hexil-2-metilquinolínio (2)** com um rendimento de 88 %, na forma de cristais amarelos apresentando: p.f. 161,7-162,9 °C (lit. 129-130 °C, Pardal *et al.*, 2002), IV $\nu_{\text{máx}}$ (KBr): 3069 (fr, ArC-H), 3009 (fr, ArC-H), 2948 (f, CH-alif.), 2914 (f, CH-alif.), 1618 (m), 1603 (f), 1580 (m), 1463 (m), 1428 (m), 1370 (m), 1359 (f), 1240 (fr), 1220 (fr), 1180 (fr), 1133 (fr), 1066 (fr), 1039 (fr), 834 (m), 826 (f), 788 (m), 779 (m), 754 (fr), 729 (fr), 597 (fr) cm^{-1} .

2.2.1.2 Síntese do iodeto de 3-hexil-2-metilbenzoselenazólio (4)

A síntese do sal quaternário de amônio **4** foi adaptada da literatura (Pardal *et al.*, 2002). Fez-se reagir 2-metilbenzoselenazole (**3**) (5,0 g, 25 mmol) e I-Hex (11,07 mL, 75 mmol) em acetonitrilo (50 mL), com agitação e a refluxo. O progresso da reação foi seguido por c.c.f. (sílica, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 2 %).

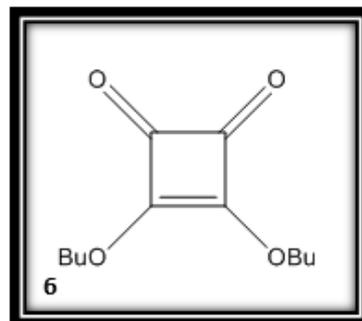


Após cinco dias de reação, a mistura reacional retirou-se do refluxo e deixou-se a arrefecer à temperatura ambiente (≈ 25 °C) por alguns minutos. Posteriormente a mistura foi colocada em banho de gelo tendo-se adicionado éter etílico para promover a precipitação total do produto desejado. O precipitado formado foi recolhido por filtração a pressão reduzida e seguidamente os cristais obtidos foram lavado com éter etílico gelado e secos a pressão reduzida. As fases orgânicas resultantes das lavagens foram recolhidas e concentradas por evaporação do solvente a pressão reduzida. À mistura resultante foi adicionado um equivalente molar (5,53 mL) de I-Hex e colocada novamente a refluxo por mais cinco dias. O mesmo procedimento foi realizado por mais duas vezes com o objetivo de aumentar o rendimento da reação. No entanto, nesta última recolha não se verificou precipitação de composto após a adição do éter etílico, tendo-se rejeitado a mistura reacional. Assim, obteve-se o **iodeto de 3-hexil-2-metilbenzoselenazólio (4)** com um rendimento de 83 %, na forma de cristais beges, apresentando: p.f. 131-133 °C, (lit. 132-133 °C, Pardal *et al.*, 2002), IV $\nu_{\text{máx}}$ (KBr): 3048 (fr, Ar-CH), 2923 (f, CH-alif.), 1576 (fr); 1518 (m); 1454 (m), 1439 (f), 1322 (m), 1187 (m), 1002 (fr), 760 (f), 716 (m) cm^{-1} .

2.2.1.3 Síntese do 3,4-dibutoxi-3-ciclobuten-1,2-diona (6)

A síntese do **3,4-dibutoxi-3-ciclobuten-1,2-diona (6)** foi adaptada da síntese descrita na literatura (Graça *et al.*, 2014).

Uma mistura de ácido esquárico (**5**) (2 g, 17,5 mmol) e *n*-butanol (50 mL) foi colocada a refluxo e sob agitação durante 3 h. Após este período a mistura reacional foi



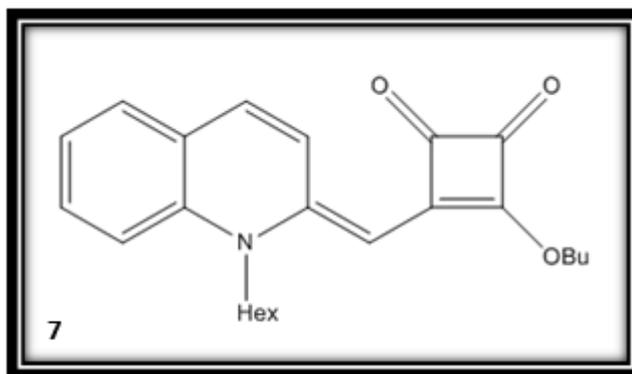
retirada do refluxo e deixou-se a arrefecer à temperatura ambiente. Para obtenção do composto orgânico desejado, a mistura reacional foi colocada numa ampola de decantação à qual foi adicionado 75 mL de éter etílico e 100 mL de água gelada para efetuar a lavagem da fase orgânica. Recolheu-se a fase aquosa e precedeu-se à segunda lavagem da fase orgânica com 100 mL de uma solução aquosa saturada de NaHCO₃ gelada. Recolheu-se a fase aquosa e lavou-se novamente a fase orgânica com água gelada (100 mL). Seguidamente recolheu-se a fase orgânica e as fases aquosas resultantes das lavagens rejeitaram-se. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro (Na₂SO₄) e após a sua filtração, o solvente foi removido a pressão reduzida tendo-se obtido um óleo acastanhado, que foi seco a pressão reduzida. Por fim, levou-se à secura sob vácuo para retirar o restante solvente ainda presente. Deste modo, foi obtido um óleo acastanhado, cromatograficamente puro, com um rendimento de 63 %.

2.2.1.4 Síntese do 3-butoxi-4-[(1-hexilquinolin-2(1H)-ilideno)metil]-3-ciclobuteno-1,2-diona (7)

2.2.1.4.1 Método A

O **3-butoxi-4-[(1-hexilquinolin-2(1H)-ilideno)metil]-3-ciclobuteno-1,2-diona (7)** foi sintetizado de acordo com o método descrito na literatura (Jyothish *et al.*, 2004). Fez-se reagir o composto 1-hexil-2-metilquinolínio (**2**) (1,0 g, 2,82 mmol) com o ácido esquárico (**5**) (0,321 g, 2,82 mmol) em 300 mL de uma mistura de *n*-butanol/benzeno

(1:1) e quinolina (23,33 mL, 198,81 mmol) com agitação e a refluxo com destilação azeotrópica em Dean-stark. O progresso da reação foi seguido por c.c.f. (sílica, CH₂Cl₂/MeOH 2 %) até se verificar o total consumo do material de



partida (24 h). A mistura reacional foi arrefecida em banho de gelo, seguidamente foi colocada numa ampola de decantação à qual foi adicionado CH₂Cl₂ e a seguir lavada com água gelada (este processo foi repetido por mais 3 vezes). Após a separação da fase orgânica esta foi seca com NaSO₄ anidro e o solvente removido a pressão reduzida. No entanto, por c.c.f. (sílica, CH₂Cl₂/MeOH 2 %) verificou-se que a mistura obtida era muito complexa e como não se conseguiu obter o produto na forma sólida, abandonou-se a mistura.

2.2.1.4.2 Método B

O segundo método foi adaptado da síntese descrita na literatura (Graça *et al.* 2014). Fez-se reagir uma mistura de 3,4-dibutoxi-3-ciclobuten-1,2-diona (**6**) (2,0 g, 8, 85 mmol) com o iodeto de 1-hexil-2-metilquinolínio (**2**) (3,14 g, 8.85 mmol), com trietilamina (Et₃N) (1,36 mL, 9,73 mmol) e 100 mL de etanol. A mistura reacional foi colocada a refluxo, sob agitação, e o progresso da reação foi seguida por c.c.f. (sílica, CH₂Cl₂/MeOH 2 %) até se verificar o total consumo do material de partida ao fim de 4 h de reação. Terminada a reação, a mistura reacional foi arrefecida à temperatura ambiente e obteve-se, um precipitado castanho-escuro. O sólido foi recolhido por filtração a pressão reduzida, lavado com etanol gelado e seco a pressão reduzida. Após realização de uma c.c.f. verificou-se que o composto obtido correspondia ao composto esperado mas encontrava-se impuro.

As águas-mães resultantes das lavagens também continham produto impuro, pelo que foram concentradas por evaporação do solvente a pressão reduzida. Tentou-se então uma purificação do sólido recolhido por filtração (1,921 g), através de cromatografia em coluna (sílica) (c.c), utilizando como eluente CH₂Cl₂. Recolhidas as frações realizou-se uma c.c.f. para verificar qual delas continha o composto pretendido puro. As frações puras do composto alaranjado foram recolhidas para um balão e o

solvente foi removido a pressão reduzida. As frações que apresentavam o composto impuro foram também recolhidas para um balão, o solvente removido a pressão reduzida e tentou-se novamente a purificação através de c.c., utilizando o mesmo eluente. Realizou-se uma terceira c.c., utilizando o mesmo eluente para tentar purificar o composto resultante das águas-mães. No final, realizou-se uma c.c.f. que confirmou que os produtos obtidos das três c.c. referidas anteriormente eram iguais. Obteve-se então o produto **3-butoxi-4-[(1-hexilquinolin-2(1H)-ilideno)metil]-3-ciclobuteno-1,2-diona (7)**, com um rendimento de 54 %, cromatograficamente puro, na forma de cristais alaranjados, 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), 5,25 (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 (150,90 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.

2.2.1.4.3 Método C

Fez-se reagir uma mistura de 3,4-dibutoxi-3-ciclobuten-1,2-diona (**6**) (2,485 g, 11,0 mmol) com o iodeto de 1-hexil-2-metilquinolínio (**2**) (3,905 g, 11,0 mmol), com Et_3N (1,68 mL, 12,09 mmol) e 125 mL etanol. A mistura reacional foi colocada a refluxo e sob agitação. O progresso da reação foi seguida por c.c.f. (sílica, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 2 %) até se verificar o total consumo do material de partida (4 h). Terminada a reação, a mistura reacional foi arrefecida à temperatura ambiente e posteriormente colocada no banho de gelo até de formar um precipitado castanho-escuro. O sólido foi recolhido por filtração a pressão reduzida e lavados inicialmente com etanol gelado, mas como se verificou que dissolvia o produto, lavou-se então várias vezes com uma mistura de éter dietílico e etanol

(1:1) gelado, sendo então seco a pressão reduzida. Após realização de uma c.c.f. verificou-se que os cristais se apresentavam quase puros.

As águas-mães resultantes das lavagens também continham produto impuro, pelo que foram concentradas por evaporação do solvente a pressão reduzida. Procedeu-se então à sua purificação (4,537 g) por c.c. utilizando-se inicialmente como eluente o CH_2Cl_2 e posteriormente uma mistura de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 2 %. Como resultado, conseguiu-se extrair 26 frações, duas das quais continham composto puro, outras duas continham o composto quase puro e treze frações continham o composto impuro. As restantes frações (9 frações) rejeitaram-se pois não continham composto. O solvente das frações foi removido e posteriormente o composto puro e o quase puro obtido das frações juntou-se ao composto obtido inicialmente por filtração e o composto impuro foi colocado num frasco devidamente identificado, para uma futura purificação por c.c.. Deste modo, foi obtido o **3-butoxi-4-[(1-hexilquinolin-2(1H)-ilideno)metil]-3-ciclobuteno-1,2-diona (7)** com um rendimento de 62 %, praticamente puro.

2.2.1.4.4 Método D

Fez-se reagir uma mistura de 3,4-dibutoxi-3-ciclobuten-1,2-diona (**6**) (3,610 g, 16,0 mmol) com o iodeto de 1-hexil-2-metilquinolínio (**2**) (5,68 g, 16,0 mmol), com Et_3N (2,45 mL, 17,59 mmol) e 180 mL de etanol. A mistura reacional foi colocada a refluxo e sob agitação. O progresso da reação foi seguida por c.c.f. (sílica, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 2 %) até se verificar o total consumo do material (4 h e 30 min.). Terminada a reação, a mistura reacional foi arrefecida à temperatura ambiente e posteriormente colocada no frigorífico até ao dia seguinte, para promover a precipitação do produto pretendido. O sólido formado (castanho-escuro) foi recolhido por filtração a pressão reduzida, lavado com éter de petróleo e seco a pressão reduzida. No entanto, as águas resultantes desta lavagem foram recolhidas num balão diferente do balão onde foram recolhidas as águas-mães.

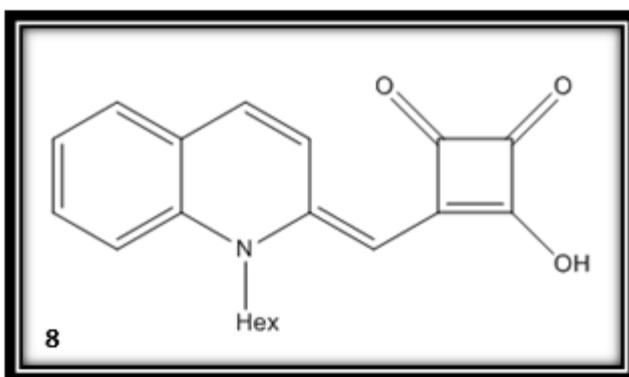
As águas-mães juntaram-se às águas de lavagem pois ambas apresentavam produto e por isso procedeu-se à remoção do solvente a pressão reduzida. Posteriormente, o balão foi colocado no banho de gelo aproximadamente 15 min. e o precipitado foi recolhido por filtração a pressão reduzida, lavado várias vezes com uma mistura de éter de petróleo, éter dietílico e etanol gelado (1:1:1) e seco a pressão reduzida. Após a junção do precipitado e do sólido obtido inicialmente foi obtido o composto **3-butoxi-4-[(1-**

hexilquinolin-2(1H)-ilideno)metil]-3-ciclobuteno-1,2-diona (7), com um rendimento de 63 %.

2.2.1.5 Síntese de 3-[(1-hexilquinolin-2(1H)-ilideno)metil]-4-hidroxi-3-ciclobuteno-1,2-diona (8)

2.2.1.5.1 Método A

A síntese do composto **8** foi adaptada do método descrito na literatura (Graça *et al.*, 2014). Fez-se reagir uma mistura de 3-butoxi-4-[(1-hexilquinolin-2(1H)-ilideno)metil]-3-ciclobuteno-1,2-



diona (**7**) (0,650 g; 1,72 mmol) com etanol (30 mL) e colocou-se a refluxo e sob agitação. Quando a mistura iniciou o refluxo foi adicionado, nesta altura, 0,2 mL de uma solução aquosa de NaOH 40 % e deixou-se a mistura a reagir durante 15 min.. A evolução da reação foi seguida por c.c.f. (sílica, CH₂Cl₂/MeOH 2 %) e decorridos 15 min., verificou-se que a reação encontrava-se incompleta. Posto isto, foi adicionado mais 0,2 mL da solução aquosa de NaOH 40% e deixou-se a mistura a reagir por mais 15 min.. Após estes últimos 15 min. verificou-se que a reação estava completa. Terminada a reação, retirou-se a mistura reacional do refluxo e deixou-se arrefecer à temperatura ambiente. Posteriormente a mistura foi colocada num banho de gelo tendo-se adicionado 2,49 mL de uma solução aquosa de HCl 2M. Neutralizada a reação, a mistura foi colocada numa ampola de decantação, adicionou-se CH₂Cl₂ e lavou-se a fase orgânica várias vezes com água destilada gelada. Após recolher a fase orgânica, esta foi seca com NaSO₄ anidro e após filtração, o solvente foi removido por evaporação a pressão reduzida.

Ao sólido obtido adicionou-se éter dietílico gelado e seguidamente foi recolhido por filtração a pressão reduzida. Os cristais resultantes foram lavados várias vezes com éter dietílico gelado e verificou-se por c.c.f. (sílica, CH₂Cl₂/MeOH 2%) que os cristais estavam mais puros. Obteve-se então o composto **3-[(1-hexilquinolin-2(1H)-ilideno)metil]-4-hidroxi-3-ciclobuteno-1,2-diona (8)**, com um rendimento de 43 %, em forma de cristais avermelhados apresentando um: p.f. 190-195 °C (dec.); IV $\nu_{\text{máx}}$ (KBr):

2928 (fr, CH-alif.), 1765 (m, C=O), 1647 (fr, C=O), 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- d_6) 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*, NCH₂(CH₂)₄CH₃), 1,73-1,65 (2H, *quint*, NCH₂CH₂(CH₂)₃CH₃), 1,54-1,47 (2H, *quint*, N(CH₂)₂CH₂(CH₂)₂CH₃), 1,41-1,49 (4H, *m*, N(CH₂)₃(CH₂)₂CH₃), 0,90 (3H, *t*, $J= 6,0$ Hz, N(CH₂)₅CH₃) ppm.

Como o composto é insolúvel nos solventes deuterados usuais (DMSO- d_6 , CDCl_3 , CD_3OD) não foi possível a obtenção dos espectros de $^1\text{H-RMN}$ e $^{13}\text{C-RMN}$.

2.2.1.5.2 Método B

Neste método, dissolveu-se o 3-butoxi-4-[(1-hexilquinolin-2(1H)-ilideno)metil]-3-ciclobuteno-1,2-diona (**7**) (1,0 g, 2,64 mmol) com etanol (60 mL) e colocando a mistura sob agitação e aquecimento de forma regulada, ou seja, o aumento da temperatura foi feito progressivamente com o objetivo de observar a que temperatura o composto solubilizava e a que temperatura se iniciava refluxo. Observou-se que aos 80 °C o composto começou a dissolver e verificou-se a dissolução completa aos 100 °C. Após a solução iniciar o refluxo (102 °C), foi adicionado 0,6 mL (2x0.3 mL) de uma solução aquosa de NaOH 40% e deixou-se a mistura a reagir durante 15 min..

A evolução da reação foi seguida por c.c.f. (sílica, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 2%) e decorridos os 15 min., verificou-se que a reação encontrava-se completa. Terminada a reação, retirou-se a mistura reacional do refluxo e deixou-se arrefecer à temperatura ambiente. Posteriormente, a mistura foi colocada num banho de gelo tendo-se adicionado lentamente e uma solução aquosa de HCl 2M para neutralizar a mistura reacional. Neutralizada a reação, a mistura foi colocada numa ampola de decantação, adicionou-se CH_2Cl_2 e lavou-se a fase orgânica várias vezes com água destilada gelada. Após recolher a fase orgânica, esta foi seca com NaSO_4 anidro e após filtração, o solvente foi removido a pressão reduzida, tendo-se obtido um sólido vermelho-arroxeadado. Após lavagem deste sólido com éter dietílico, seguido de uma mistura de éter dietílico e éter de petróleo (1:1) foram obtidos cristais avermelhados cromatograficamente puros.

Posteriormente, os cristais foram recolhido por filtração a pressão reduzida, lavados várias vezes com a mistura de éter dietílico/éter de petróleo gelado (1:1) e secos a pressão reduzida. Obteve-se então o composto **3-[(1-hexilquinolin-2(1H)-ilideno)metil]-4-**

hidroxi-3-ciclobuteno-1,2-diona (8), com um rendimento de 59 %, em forma de cristais avermelhados.

2.2.1.5.3 Método C

Na tentativa de evitar a degradação do composto de 3-butoxi-4-[(1-hexilquinolin-2(1*H*)-ilideno)metil]-3-ciclobuteno-1,2-diona (**7**), dissolveu-se **3-butoxi-4-[(1-hexilquinolin-2(1*H*)-ilideno)metil]-3-ciclobuteno-1,2-diona (7)** (0,922 g, 2,43 mmol) com etanol (60 mL) e colocou-se a mistura aquecer, sob agitação, até aos 90 °C, temperatura à qual se verificou a dissolução completa do composto. Nesta altura, foi adicionado à mistura reacional 0,56 mL de uma solução aquosa de NaOH 40% e deixou-se a reagir durante 15 min. à temperatura de 90 °C (sem entrar em refluxo). A evolução da reação foi seguida por c.c.f. (sílica, CH₂Cl₂/MeOH 2%). Terminada a reação (após os 15 min.) a mistura reacional foi deixada arrefecer à temperatura ambiente e posteriormente, foi colocada num banho de gelo e neutralizada (controlo do pH) com 3,0 mL de uma solução aquosa de HCl 2M.

Neutralizada a reação, a mistura foi colocada numa ampola de decantação, adicionou-se CH₂Cl₂ e lavou-se a fase orgânica várias vezes com água destilada gelada. Após recolher a fase orgânica, esta foi seca com NaSO₄ anidro e após filtração, o solvente foi removido por evaporação a pressão reduzida.

Com o objetivo de retirar as impurezas (precipitado roxo), o produto obtido foi lavado com éter dietílico gelado e seguidamente com uma mistura de éter dietílico/éter de petróleo gelada (1:1) e colocou-se no banho de gelo para uma melhor precipitação dos cristais avermelhados. Posteriormente, os cristais foram recolhidos por filtração a pressão reduzida, lavados várias vezes com a mistura de éter dietílico/éter de petróleo gelado (1:1) e secos a pressão reduzida. Após a realização de uma c.c.f. (sílica, CH₂Cl₂/MeOH 2 %) verificou-se que os cristais continuavam impuros. Obteve-se então o composto **3-[(1-hexilquinolin-2(1*H*)-ilideno)metil]-4-hidroxi-3-ciclobuteno-1,2-diona (8)**, com um rendimento de 29 %, em forma de cristais avermelhados, ligeiramente impuros.

2.2.1.5.4 Método D

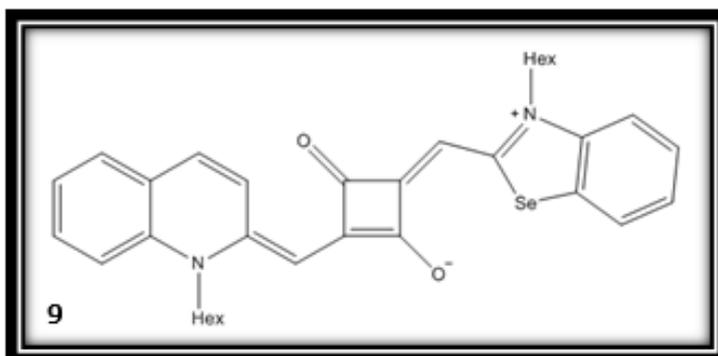
Neste método, com o objetivo de melhorar o rendimento, colocou-se o **3-butoxi-4-[(1-hexilquinolin-2(1*H*)-ilideno)metil]-3-ciclobuteno-1,2-diona (7)**, (1,24 g, 3,30 mmol) com etanol (65 mL) e colocou-se a mistura aquecer, sob agitação, até aos 90 °C (temperatura à qual se verificou a dissolução completa do composto). Nesta altura, foi adicionado à solução 0,8 mL de uma solução aquosa de NaOH 40% e deixou-se a reagir durante o período de 15 min. à temperatura de 80 °C sem entrar em refluxo. A evolução da reação foi seguida por c.c.f. (sílica, CH₂Cl₂/MeOH 2%). Terminada a reação (após os 15 min.) a mistura reacional foi colocada arrefecer à temperatura ambiente. Posteriormente, a mistura foi colocada num banho de gelo e neutralizada (controlo do pH) com 4,0 mL uma solução aquosa de HCl 2M. Neutralizada a reação, a mistura foi colocada numa ampola de decantação, adicionou-se CH₂Cl₂ e lavou-se a fase orgânica várias vezes com água destilada gelada. Após recolher a fase orgânica, esta foi seca com NaSO₄ anidro e após filtração, o solvente foi removido por evaporação a pressão reduzida.

Após procedimento igual ao referido no método C do ponto anterior, foi obtido o **3-[(1-hexilquinolin-2(1*H*)-ilideno)metil]-4-hidroxi-3-ciclobuteno-1,2-diona (8)**, na forma de cristais avermelhados ligeiramente impuros, com um rendimento de 73 %, tendo-se usado estes cristais na reação seguinte sem posterior purificação.

2.2.1.6 Síntese do 2-[(3-hexilbenzoselenazole-2(3*H*)-ilideno)metil]-4-[(1-hexilquinolin-1-*io*-2-il)metileno]-3-oxociclobut-1-en-1-olato (9)

2.2.1.6.1 Método A

A síntese do composto **2-[(3-hexilbenzoselenazole-2(3*H*)-ilideno)metil]-4-[(1-hexilquinolin-1-*io*-2-il)metileno]-3-oxociclobut-1-en-1-olato (9)** foi adaptada da síntese descrita na



literatura (Graça *et al.*, 2014). Ao composto **8** anteriormente obtido (0,375 g, 1,20 mmol) adicionou-se o sal de iodeto de 3-hexil-2-metilbenzoselenazólio (**4**) (0,490 g, 1,20 mmol)

e 25 mL de uma mistura de *n*-BuOH/piridina (9:1). A mistura reacional foi colocada a refluxo, sob agitação durante 21 h e a evolução da reação foi seguida por c.c.f. (sílica, CH₂Cl₂/MeOH 2 %). Após o término da reação (4 h) a mistura reacional foi colocada a arrefecer à temperatura ambiente e posteriormente, vertida para uma ampola de decantação, tendo-se adicionado éter dietílico gelado. Lavou-se a fase orgânica várias vezes com água destilada gelada até a fase aquosa recolhida não apresentar uma coloração alaranjada. Após recolher a fase orgânica, esta foi seca com NaSO₄ anidro e após filtração, o solvente foi removido por evaporação a pressão reduzida.

Ao produto bruto obtido, foi adicionado uma mistura de éter dietílico/éter de petróleo gelado (1:1) e colocou-se a precipitar em banho de gelo. Os cristais foram recolhidos por filtração a pressão reduzida e lavados várias vezes com a mistura de éter dietílico/éter de petróleo gelado (1:1). Após a realização de uma c.c.f. (sílica, CH₂Cl₂/MeOH 2 %) verificou-se que os cristais se encontravam impuros. Na tentativa de recrystalizar o composto adicionou-se uma mistura de MeOH/éter dietílico (1:1) e levou-se por alguns minutos ao banho quente. Seguidamente, colocou-se a precipitar em gelo. Os cristais foram recolhido por filtração a pressão reduzida e lavados várias vezes com MeOH gelado. Após a realização de uma c.c.f. (sílica, eluente: CH₂Cl₂/MeOH 2 %) verificou-se que os cristais continuavam impuros. A mistura foi concentrada com MeOH gelado e com uma mistura de éter dietílico/éter petróleo gelado (1:1). Os cristais foram recolhido por filtração a pressão reduzida e lavados várias vezes com uma mistura de éter dietílico/éter petróleo gelado (1:1). Após a realização de uma c.c.f. (sílica, CH₂Cl₂/MeOH 2 %) verificou-se que os cristais estavam quase puros e as águas-mães apresentavam bastantes impurezas. Como este segundo método de recrystalização estava a resultar, realizou-se uma terceira recrystalização utilizando este mesmo método. Após a realização de uma c.c.f. (sílica, CH₂Cl₂/MeOH 2 %) verificou-se que os cristais estavam puros. Obteve-se então o composto **2-[(3-hexilbenzoselenazole-2(3*H*)-ilideno)metil]-4-[(1-hexilquinolin-1-*io*-2-il)metileno]-3-oxociclobut-1-en-1-olato (9)** com um rendimento de 15 %, cromatograficamente puro, em forma de cristais acastanhados, apresentando: p.f. 280- 281 °C (dec.); VIS $\lambda_{\text{máx}}$ (DMSO): 721 nm; log ϵ = 5,15; IV $\nu_{\text{máx}}$ (KBr): 3059 (fr, CH-alif.), 2926 (fr, CH-alif.), 1618 (m, C=O), 1588 (f, ArC=C), 1449 (f, ArC=C), 1426 (f), 1336 (f), 1289 (f), 1239 (f), 1165 (f), 1080 (f), 974 (m), 813 (fr), 746 (m) cm⁻¹; ¹H-RMN (600 MHz, CDCl₃) δ : 9,28 (1H, *d*, *J*= 9,6 Hz, Ar-H), 7,55-7,49 (4H, *m*, Ar-H), 7,36 (1H, *d*, *J*= 9,0 Hz, Ar-H), 7,32 (1H, *t*, *J*= 7,8 Hz, Ar-H), 7,27 (1H, *d*, *J*= 9,6 Hz, Ar-H), 7,09 (1H, *t*, *J*= 7,2 Hz, Ar-H), 7,03 (1H, *d*, *J*= 8,4 Hz, Ar-H), 6,00 (1H, *s*, C=CH), 5,77

(1H, *s*, C=CH), 4,18 (2H, *t*, *J*= 6,0 Hz, NCH₂(CH₂)₄CH₃), 4,01 (2H, *t*, *J*= 6,0 Hz, NCH₂(CH₂)₄CH₃), 1,86 (2H, *sl*, NCH₂CH₂(CH₂)₃CH₃), 1,78 (2H, *sl*, NCH₂CH₂(CH₂)₃CH₃), 1,54 (2H, *sl*, N(CH₂)₂CH₂(CH₂)₂CH₃), 1,45-1,35 (10H, *m*, N(CH₂)₃(CH₂)₂CH₃) + N(CH₂)₂(CH₂)₃CH₃), 0,95-0,91 (6H, *m*, N(CH₂)₅CH₃) ppm; ¹³C-RMN (150,90 MHz, CDCl₃) δ: 181,01, 177,08, 173,28, 151,05, 142,79, 139,42 (Ar-CH), 133,61 (Ar-CH), 131,39 (Ar-CH), 128,96 (Ar-CH), 126,96 (Ar-CH), 126,75 (Ar-CH), 124,21 (Ar-CH), 123,54 (Ar-CH), 114,66 (Ar-CH), 112,65 (Ar-CH), 93,01 (C=CH), 89,07 (C=CH), 48,37 (NCH₂(CH₂)₄CH₃), 46,71 (NCH₂(CH₂)₄CH₃), 31,64 (CH₂), 31,60 (CH₂), 27,14 (CH₂), 26,91 (CH₂), 26,74 (CH₂), 26,67 (CH₂), 22,81 (CH₂), 22,71 (CH₂), 14,16 (CH₃), 14,15 (CH₃) ppm; EMAR-ESI-TOF *m/z*: 586,20943[M]⁺ (C₃₄H₃₈N₂O₂Se⁺, calc. 586.20953).

2.2.1.6.2 Método B

Neste método fez-se reagir uma mistura **3-[(1-hexilquinolin-2(1H)-ilideno)metil]-4-hidroxi-3-ciclobuteno-1,2-diona (8)** (1,111 g, 3,44 mmol) com o sal de iodeto de 3-hexil-2-metilbenzoselenazólio (**4**) (1,403 g, 3,44 mmol) e uma mistura de *n*-BuOH/ piridina (9:1) (72 mL). A mistura reacional foi colocada a refluxo (temperatura 120-130 °C), sob agitação e a evolução da reação foi seguida por c.c.f. (sílica, CH₂Cl₂/MeOH 2 %). Terminada a reação (4 h) a mistura reacional foi colocada arrefecer à temperatura ambiente e posteriormente colocada no congelador durante o fim-de-semana. Quando a mistura foi retirada do congelador para tratamento, observou-se a presença de cristais no balão, então, ao produto bruto obtido foi adicionado éter dietílico gelado e colocou-se a precipitar no gelo. O precipitado foi recolhido por filtração a pressão reduzida e lavado várias vezes com éter dietílico gelado, seguidamente com água destilada gelada e por fim, com éter dietílico gelado. Após a realização de uma c.c.f. (sílica, CH₂Cl₂/MeOH 2 %) verificou-se que os cristais apresentavam-se impuros. O resíduo obtido foi recristalizado com MeOH/éter dietílico (1:1).

Os cristais resultantes foram recolhidos por filtração a pressão reduzida e lavados várias vezes com MeOH gelado. Após a realização de uma c.c.f. (sílica, CH₂Cl₂/MeOH 2 %) verificou-se que os cristais estavam menos impuros. Realizou-se uma segunda recristalização utilizando uma pequena quantidade de MeOH/éter dietílico e gotas de CH₂Cl₂ e realizou-se o mesmo procedimento descrito anteriormente. Os cristais foram então recolhido por filtração a pressão reduzida e lavados várias vezes com a mistura de

éter dietílico/éter petróleo gelado (1:1). Após a realização de uma c.c.f. (sílica, CH₂Cl₂/MeOH 2 %) verificou-se que os cristais encontravam-se quase puros. Realizou-se uma terceira recristalização. Os cristais resultantes foram lavados com uma mistura de éter dietílico/éter petróleo gelado (1:1) e com gotas de MeOH. Após a realização de uma c.c.f. (sílica, CH₂Cl₂/MeOH 2 %) verificou-se que os cristais encontravam-se praticamente puros para seguir para a próxima reação.

Obteve-se então o **2-[(3-hexilbenzoselenazole-2(3H)-ilideno)metil]-4-[(1-hexilquinolin-1-io-2-il)metileno]-3-oxociclobut-1-en-1-olato (9)** com um rendimento de 9 %, em forma de cristais acastanhados.

2.2.1.6.3 Método C

Neste método fez-se reagir uma mistura de **3-[(1-hexilquinolin-2(1H)-ilideno)metil]-4-hidroxi-3-ciclobuteno-1,2-diona (8)** (1,333 g, 4,13 mmol) com o sal de iodeto de 3-hexil-2-metilbenzoselenazólio (**4**) (1,685 g, 4,13 mmol) e 86 mL de uma mistura de *n*-BuOH/piridina (9:1) e realizou-se o mesmo procedimento descrito anteriormente para a síntese do composto. Neste método, ao produto bruto obtido foi adicionado éter dietílico e uma maior quantidade de éter de petróleo gelado e colocou-se a precipitar no gelo. O precipitado foi recolhido por filtração a pressão reduzida e lavado várias vezes com éter de petróleo gelado, seguidamente com água destilada gelada e por fim com éter de petróleo gelado. Após a realização de uma c.c.f. (sílica, CH₂Cl₂/MeOH 2 %) verificou-se que os cristais apresentavam-se impuros e as águas-mães foram rejeitadas.

O sólido resultante foi recristalizado com uma mistura de MeOH/éter dietílico (1:1). Os cristais foram recolhido por filtração a pressão reduzida e lavados várias vezes com éter de petróleo gelado. Após a realização de uma c.c.f. (sílica, CH₂Cl₂/MeOH 2 %) verificou-se que os cristais estavam suficientemente puros para seguir para a próxima reação.

Obteve-se então o **2-[(3-hexilbenzoselenazole-2(3H)-ilideno)metil]-4-[(1-hexilquinolin-1-io-2-il)metileno]-3-oxociclobut-1-en-1-olato (9)** com um rendimento de 3 %, em forma de cristais acastanhados. Este procedimento e o descrito anteriormente para o tratamento da mistura reacional foi abandonado, uma vez que eram obtidos rendimentos muito baixos.

2.2.1.6.4 Método D

Neste método fez-se reagir uma mistura de **3-[(1-hexilquinolin-2(1H)-ilideno)metil]-4-hidroxi-3-ciclobuteno-1,2-diona (8)** (2,406 g, 7,45 mmol) com o sal de iodeto de 3-hexil-2-metilbenzoselenazólio (**4**) (3,04 g, 7,45 mmol) e uma mistura de *n*-BuOH/ piridina (9:1) (157 mL) e realizou-se o mesmo procedimento descrito no método B no ponto 2.2.1.6.1. Para o tratamento da mistura reacional utilizou-se o mesmo procedimento descrito no método A do ponto 2.2.1.6.1. O produto bruto obtido apresentava uma coloração azul-escura. Na tentativa de recrystalizar o composto obtido, adicionou-se uma pequena quantidade de MeOH e éter dietílico e levou-se por alguns minutos ao banho quente. Seguidamente, colocaram-se os cristais a precipitar em gelo. Os cristais foram então recolhidos por filtração a pressão reduzida e lavados várias vezes com MeOH gelado. Após a realização de uma c.c.f. (sílica, CH₂Cl₂/MeOH 2 %) verificou-se que os cristais estavam impuros. Realizou-se uma segunda recrystalização éter dietílico/CH₂Cl₂ (1:1) e realizou-se o mesmo procedimento descrito anteriormente. Os cristais foram recolhido por filtração a pressão reduzida e lavados várias vezes com uma mistura de éter dietílico/éter petróleo gelado (1:1). Após a realização de uma c.c.f. (sílica, CH₂Cl₂/MeOH 2 %) verificou-se que os cristais apresentavam menos impurezas. Como este segundo método de recrystalização estava a resultar, realizou-se uma terceira recrystalização mas utilizando desta vez uma menor quantidade de CH₂Cl₂. Após a realização de uma c.c.f. (sílica, CH₂Cl₂/MeOH 2 %) verificou-se que os cristais ainda estavam impuros. Realizou-se então uma lavagem dos cristais, diretamente no funil, com MeOH gelado e posteriormente pré aquecido mas após realização de uma c.c.f. (sílica, CH₂Cl₂/MeOH 2 %) verificou-se que os cristais ainda estavam impuros. Seguidamente, lavaram-se com acetonitrilo e após realização de uma c.c.f. (sílica, eluente: CH₂Cl₂/MeOH 2 %) verificou-se que as águas-mães apresentavam apenas impurezas, então, realizou-se uma lavagem dos cristais com acetonitrilo pré aquecido e após realização de uma c.c.f. (sílica, CH₂Cl₂/MeOH 2 %) verificou-se que as águas-mães apresentavam bastante impurezas e que o acetonitrilo não dissolvia o composto pretendido. Após várias lavagens com acetonitrilo pré-aquecido, confirmou-se por c.c.f. (sílica, CH₂Cl₂/MeOH 2 %) que os cristais estavam puros.

Obteve-se então o composto **2-[(3-hexilbenzoselenazole-2(3H)-ilideno)metil]-4-[(1-hexilquinolin-1-io-2-il)metileno]-3-oxociclobut-1-en-1-olato (9)** com um

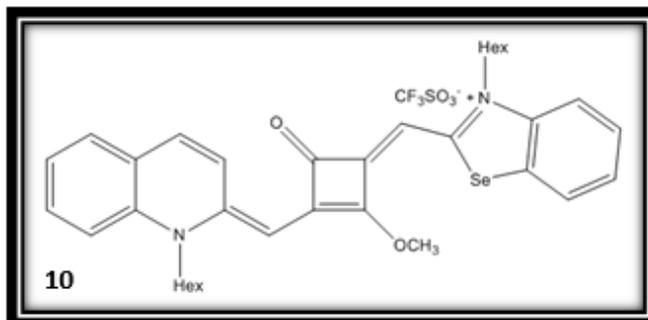
rendimento de 33 %, cromatograficamente puro, apresentando p.f. e espectro no IV coincidentes com o composto obtido no método A, descrito no ponto 2.2.1.6.1.

2.2.1.7 Síntese do trifluorometanossulfonato de 3-hexil-2-[(3-[(1-hexil-6-quinolin-2(1H)-ilideno)metil]-2-metoxi-4-oxociclobut-2-en-1-ilideno)metil]benzoselenazole-3-io (10)

2.2.1.7.1 Método A

O trifluorometanossulfonato de 3-hexil-2-[(3-[(1-hexil-6-quinolin-2(1H)-ilideno)metil]-2-metoxi-4-oxociclobut-2-en-1-ilideno)metil]benzoselenazole-3-io

(10) foi sintetizado segundo a reação de metilação descrita na literatura (Reis *et al.*, 2009). Fez-se reagir o 2-[(3-hexilbenzoselenazole-2(3H)-ilideno)metil]-4-[(1-hexilquinolin-



1-io-2-il)metileno]-3-oxociclobut-1-en-1-olato (9) (0,731 g, 1,25 mmol), com o trifluorometanossulfonato de metilo ($\text{CF}_3\text{SO}_3\text{CH}_3$) (0,424 mL, 3,75 mmol) em CH_2Cl_2 seco. A mistura reacional foi deixada à temperatura ambiente, em atmosfera de azoto, sob agitação e a evolução da reação foi seguida por c.c.f. (sílica, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 5 %). Após 4 h de reação verificou-se que esta ainda não estava completa, tendo-se então, adicionado mais 1,5 mL de $\text{CF}_3\text{SO}_3\text{CH}_3$.

Terminada a reação (7 h), a mistura reacional foi colocada numa ampola de decantação e lavou-se duas vezes com 50 mL de uma solução aquosa de NaHCO_3 (5 %). Separada a fase aquosa, lavou-se a fase orgânica com água destilada gelada. Após recolher a fase orgânica, esta foi seca com NaSO_4 anidro e após filtração, o solvente foi removido por evaporação a pressão reduzida.

O sólido obtido apresentava uma coloração esverdeada com reflexos dourados brilhantes. O composto foi guardado à temperatura ambiente para no dia seguinte se proceder a uma recristalização. No entanto, verificou-se que o composto estava sob a forma de pasta e apesar das várias tentativas, não se conseguiu obter o produto na forma de cristais e consequentemente não se conseguiu purificar.

2.2.1.7.2 Método B

Fez-se reagir 2-[(3-hexilbenzoselenazole-2(3*H*)-ilideno)metil]-4-[(1-hexilquinolin-1-*io*-2-*il*)metileno]-3-oxociclobut-1-en-1-olato (**9**) (0,718 g, 1,23 mmol), com CF₃SO₃CH₃ (0,417 mL, 3,69 mmol) em CH₂Cl₂ seco. A mistura reacional foi colocada à temperatura ambiente, em atmosfera de azoto, sob agitação e a evolução da reação foi seguida por c.c.f. (sílica, CH₂Cl₂/MeOH 5 %). Terminada a reação (4 h), a mistura reacional foi tratada igual ao procedimento descrito no método anterior. O produto bruto obtido apresentava uma coloração esverdeado dourado brilhante. Após realização de uma c.c.f. (sílica, CH₂Cl₂/MeOH 2 %) verificou-se que os cristais se apresentavam suficientemente puros para seguirem, tendo sido previamente secos a pressão reduzida.

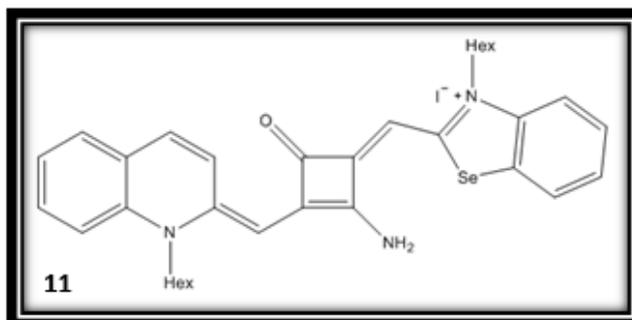
Obteve-se então o composto **trifluorometanossulfonato de 3-hexil-2-[(3-[(1-hexil-6-quinolin-2(1*H*)-ilideno)metil]-2-metoxi-4-oxociclobut-2-en-1-ilideno)metil]benzoselenazole-3-*io* (10)** com um rendimento de 88 %, na forma de cristais esverdeados com reflexos dourados brilhantes, suficientemente puros, para utilizar na reação seguinte, apresentando: p.f. 195-200 °C (dec.), IV $\nu_{\text{máx}}$ (KBr): 3064 (fr, Ar-CH), 2929 (fr, CH-alif.), 1619 (fr, C=O), 1565 (fr, ArC=C), 1505 (m, ArC=C), 1446 (f), 1414 (f), 1348 (f), 1315 (m), 1257 (f), 1214 (m), 1181 (m), 1148 (f), 1111 (f), 1051 (m), 1030 (m), 978 (fr), 752 (fr), 637 (fr) cm⁻¹; ¹H-RMN (600 MHz, CDCl₃) δ : 8,74 (1H, *sl*, Ar-H), 7,90 (1H, *dl*, Ar-H), 7,73 (1H, *t*, *J* = 7,2 Hz, Ar-H), 7,68 (1H, *d*, *J* = 9,0 Hz, Ar-H), 7,65 (1H, *d*, *J* = 7,8 Hz, Ar-H), 7,46 (1H, *t*, *J* = 7,8 Hz, Ar-H), 7,42 (1H, *t*, *J* = 7,2 Hz, Ar-H), 7,25-7,22 (3H, *m*, Ar-H), 6,16 (1H, *s*, C=CH), 5,74 (1H, *s*, C=CH), 4,61 (3H, *s*, OCH₃), 4,43 (2H, *sl*, NCH₂(CH₂)₄CH₃), 4,27 (2H, *t*, *J* = 7,2 Hz, NCH₂(CH₂)₄CH₃), 1,90-1,85 (2H, *quint*, NCH₂CH₂(CH₂)₃CH₃), 1,82-1,77 (2H, *quint*, NCH₂CH₂(CH₂)₃CH₃), (2H, *quint*, N(CH₂)₂CH₂(CH₂)₂CH₃), 1,46-1,36 (6H, *m*, N(CH₂)₂(CH₂)₃CH₃), 1,32-1,30 (4H, *m*, N(CH₂)₃(CH₂)₂CH₃), 0,93 (3H, *t*, *J* = 6,6 Hz, N(CH₂)₅CH₃), 0,88 (3H, *t*, *J* = 7,2 Hz, N(CH₂)₅CH₃) ppm; ¹³C-RMN (150,90 MHz, CDCl₃) δ : 163,99, 159,54, 156,82, 152,31, 142,34, 139,02, 137,60 (Ar-CH), 133,26 (Ar-CH), 129,66 (Ar-CH), 129,74 (Ar-CH), 128,52, 127,89 (Ar-CH), 126,29 (Ar-CH), 125,75, 125,27 (Ar-CH), 125,15 (Ar-CH), 124,50, 122,09, 119,91, 116,24 (Ar-CH), 114,46 (Ar-CH), 92,76 (C=CH), 89,55 (C=CH), 61,40 (OCH₃), 49,51 (NCH₂(CH₂)₄CH₃), 47,71 (NCH₂(CH₂)₄CH₃), 31,66 (CH₂), 31,51 (CH₂), 27,66 (CH₂), 27,61 (CH₂), 26,55 (CH₂), 26,44 (CH₂), 22,66 (CH₂), 22,60 (CH₂), 15,42 (CH₃), 14, 02 (CH₃) ppm.

2.2.2 Síntese dos corantes cianínicos aminoescuarílicos assimétricos

2.2.2.1 Síntese do iodeto de 2-[(2-amino-3-[(1-hexilquinolin-2(1*H*)-ilideno)metil]-4-oxociclobuten-2-en-1-ilideno)metil]-3-hexilbenzoselenazole-3-io (11)

2.2.2.1.1 Método A

Fez-se reagir o composto trifluorometanossulfonato de 3-hexil-2-[(3-[(1-hexil-6-quinolin-2(1*H*)-ilideno)metil]-2-metoxi-4-oxociclobut-2-en-1-ilideno)metil]benzoselenazole-3-io



(**10**) (0,200 g, 0,267 mmol), com 3 eq. de amónia 2M em MeOH (0,4005 mL, 0,801 mmol) em CH₂Cl₂ seco. A mistura reacional foi deixada à temperatura ambiente, em atmosfera de azoto e com agitação. A evolução da reação foi seguida por c.c.f. (sílica, CH₂Cl₂/MeOH 5 %) até consumo completo do material de partida. Terminada a reação (4 h), a mistura reacional foi colocada numa ampola de decantação, adicionou-se CH₂Cl₂ gelado e lavou-se a fase orgânica várias vezes com água destilada gelada. Após recolher a fase orgânica, esta foi seca com NaSO₄ anidro e após filtração, o solvente foi removido por evaporação a pressão reduzida.

Os cristais resultantes de coloração esverdeada foram dissolvidos em 10 mL de MeOH e tendo-se adicionado 10 mL de uma solução aquosa de KI a 14 %. A mistura foi deixada sob agitação forte, à temperatura ambiente durante 2 h. Após filtração a pressão reduzida dos cristais obtidos, foram lavados várias vezes com água destilada gelada e seguidamente várias vezes com éter dietílico gelado. Após realização de uma c.c.f. (sílica, CH₂Cl₂/MeOH 5 %) verificou-se que os cristais apresentavam uma mancha azul que correspondia ao composto **9**, não sendo possível a obtenção do produto reacional pretendido puro, apesar de terem sido realizadas várias lavagens e recristalizações com solventes diferentes.

2.2.2.1.2 Método B

Neste método, fez-se reagir o composto trifluorometanossulfonato de 3-hexil-2-[(3-[(1-hexil-6-quinolin-2(1*H*)-ilideno)metil]-2-metoxi-4-oxociclobut-2-en-1-ilideno)metil]benzoselenazole-3-io (**10**) (0,200 g, 0,267 mmol) com 10 eq. de amónia 2M em MeOH (1,335 mL, 2,67 mmol) em CH₂Cl₂ seco. A mistura reacional foi deixada temperatura ambiente, em atmosfera de azoto e com agitação. A evolução da reação foi seguida por c.c.f. (sílica, CH₂Cl₂/MeOH 5%). Terminada a reação (5 h), a mistura reacional foi colocada numa ampola de decantação, adicionou-se CH₂Cl₂ gelado e lavou-se a fase orgânica várias vezes com água destilada gelada. Após recolher a fase orgânica, esta foi seca com NaSO₄ anidro e após filtração, o solvente foi removido por evaporação a pressão reduzida.

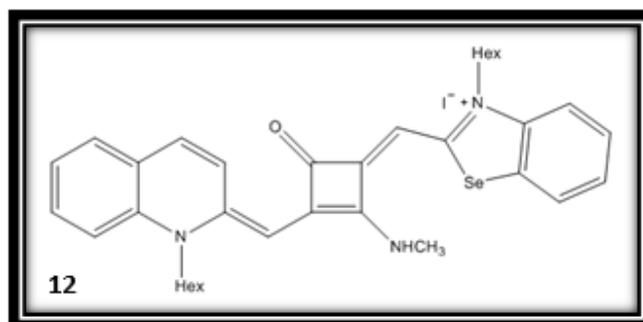
Os cristais resultantes de coloração esverdeada foram dissolvidos em 10 mL de MeOH e tendo-se adicionado 10 mL de uma solução aquosa de KI a 14%. A mistura foi deixada em agitação forte, à temperatura ambiente durante 2 h. Após filtração a pressão reduzida dos cristais obtidos, estes foram lavados várias vezes com água destilada gelada e seguidamente lavados várias vezes com éter dietílico gelado. Após realização de uma c.c.f. (sílica, CH₂Cl₂/MeOH 5 %) verificou-se que os cristais estavam impuros.

Na tentativa de purificar os cristais, adicionou-se uma mistura de éter dietílico/CH₂Cl₂ e gotas de MeOH, colocaram-se a precipitar em banho de gelo. Os cristais foram recolhido por filtração a pressão reduzida e após realização de uma c.c.f. (sílica, CH₂Cl₂/MeOH 10 %) verificou-se que os cristais se encontravam menos impuros. Realizou-se uma segunda recristalização utilizando o procedimento anterior. Os cristais foram recolhidos por filtração a pressão reduzida e após realização de uma c.c.f. (sílica, CH₂Cl₂/MeOH 10 %) verificou-se que os cristais estavam quase puros. Realizou-se uma terceira recristalização, uma vez que este procedimento estava a resultar, utilizando a mesma metodologia. Após realização de uma c.c.f. (sílica, CH₂Cl₂/MeOH 10 %) verificou-se que os cristais estavam puros. Obteve-se então o **2-[(2-amino-3-[(1-hexilquinolin-2(1*H*)-ilideno)metil]-4-oxociclobuten-2-en-1-ilideno)metil]-3-hexilbenzoselenazole-3-io** (**11**) com um rendimento de 54 %, cromatograficamente puro, na forma de cristais acastanhados, apresentando: p.f. 242-246 °C (dec.), VIS $\lambda_{\text{máx}}$ (DMSO): 700 nm; log ϵ = 5,27; IV $\nu_{\text{máx}}$ (KBr): 3210 (fr, N-H), 3102 (fr, Ar-CH), 2929 (fr, CH-alif.), 1623 (fr, C=O), 1565 (fr, ArC=C), 1518 (fr, ArC=C), 1457 (f, ArC=C), 1354 (m), 1274 (m), 1251 (m), 1158 (f), 1088 (fr), 1070 (fr), 980 (fr) cm⁻¹, ¹H-RMN (600 MHz, DMSO-*d*₆ + CD₃OD + CDCl₃) δ :

8,96 (1H, *d*, $J= 9,0$ Hz, Ar-H), 8.79 (1H, *sl*, NH₂), 8,68 (1H, *sl*, NH₂), 8,01 (1H, *d*, $J= 9,6$ Hz, Ar-H), 7,92 (1H, *d*, $J= 7,80$ Hz, Ar-H), 7, 83-7,79 (2H, *m*, Ar-H), 7,76 (1H, *t*, $J= 7,80$ Hz, Ar-H), 7,48-7,43 (3H, *m*, Ar-H), 7,21 (1H, *t*, $J= 7,2$ Hz, Ar-H), 6,17 (1H, *s*, C=CH), 5,94 (1H, *s*, C=CH), 4,37 (2H, *sl*, NCH₂(CH₂)₄CH₃), 4,15 (2H, *t*, $J= 7,2$ Hz, NCH₂(CH₂)₄CH₃), 1,76-1,68 (4H, *m*, NCH₂CH₂(CH₂)₃CH₃), 1,56-1,54 (4H, *quint*, N(CH₂)₂CH₂(CH₂)₂CH₃), 1,36-1,32 (8H, *m*, N(CH₂)₃(CH₂)₂CH₃), 0,93 (6H, *m*, N(CH₂)₅CH₃) ppm; ¹³C-RMN (150,90 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 175,06, 167,53, 162,43, 158,25, 154,81, 151,28, 142,32, 138,66, 136,10 (Ar-CH), 132,63 (Ar-CH), 129,16 (Ar-CH), 127,89, 127,44, (Ar-CH), 125, 85 (Ar-CH), 125,38 (Ar-CH), 124,97, 124,25 (Ar-CH), 124,14 (Ar-CH), 116,27 (Ar-CH), 114,14 (Ar-CH), 93,89 (C=CH), 89,15 (C=CH), 48,17 (NCH₂(CH₂)₄CH₃), 46,53 (NCH₂(CH₂)₄CH₃), 31,05 (CH₂), 30,97 (CH₂), 26,93 (CH₂), 26,89 (CH₂), 26,88 (CH₂), 25,77 (CH₂), 22,16 (CH₂), 22,08 (CH₂), 13,88 (CH₃) ppm; EMAR-ESI-TOF *m/z*: 586,23254 [M-I]⁺ (C₃₄H₄₀N₃OSe⁺, calc.586,2334).

2.2.2.2 Síntese do iodeto de 3-hexil-2-[(3-[(1-hexilquinolin-2(1*H*)-ilideno)metil]-2-metilamino-4-oxociclobut-2-en-1-ilideno)metil]benzoselenazole-3-io (12)

Fez-se reagir o trifluorometanossulfonato de 3-hexil-2-[(3-[(1-hexil-6-quinolin-2(1*H*)-ilideno)metil]-2-metoxi-4-oxociclobut-2-en-1-ilideno)metil]benzoselenazole-3-io



(10) (0,200 g, 0,267 mmol) com metilamina (NH₂CH₃) 2M, em tetra-furano (THF) (0,401 mL, 0,801 mmol), em CH₂Cl₂ seco. A mistura reacional foi colocada à temperatura ambiente, em atmosfera de azoto com agitação. A evolução da reação foi seguida por c.c.f. (sílica, CH₂Cl₂/MeOH 5 %). Terminada a reação (1h 15 min.), a mistura reacional foi colocada numa ampola de decantação, adicionou-se CH₂Cl₂ gelado e lavou-se a fase orgânica várias vezes com água destilada gelada. Após recolher a fase orgânica, esta foi seca com NaSO₄ anidro e após filtração, o solvente foi removido por evaporação a pressão reduzida.

Os cristais resultantes de coloração escura foram dissolvidos em 10 mL de MeOH e tendo-se adicionado 10 mL de uma solução aquosa de KI a 14%. A mistura foi deixada

reagir com agitação forte, à temperatura ambiente durante 2 h. Após filtração a pressão reduzida dos cristais obtidos, estes foram lavados várias vezes com água destilada gelada e seguidamente várias vezes com éter dietílico gelado. Após realização de uma c.c.f. (sílica, CH₂Cl₂/MeOH 2 %) verificou-se que os cristais apresentavam-se praticamente puros. Os cristais foram recristalizados com uma mistura de MeOH/éter dietílico e CH₂Cl₂ e posteriormente recolhidos por filtração a pressão reduzida e lavados várias vezes com éter dietílico/éter de petróleo gelado (1:1). Após realização de uma c.c.f. (sílica, CH₂Cl₂/MeOH 2 %) verificou-se que os cristais estavam puros.

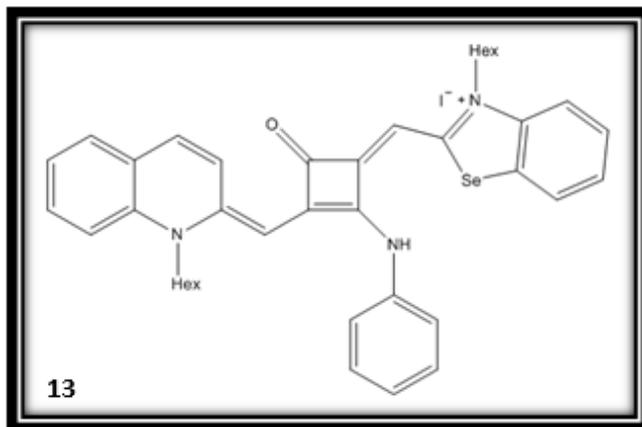
Obteve-se então o composto **iodeto de 3-hexil-2-[(3-[(1-hexilquinolin-2(1H)-ilideno)metil]-2-metilamino-4-oxociclobut-2-en-1-ilidenometil]benzoselenazole-3-iodido) (12)** com um rendimento de 98 %, cromatograficamente puro, na forma de cristais verde escuro, apresentando: p.f. 212 - 215 °C (dec.); VIS $\lambda_{\text{máx}}$ (DMSO): 711 nm ; log $\epsilon = 5,12$; IV $\nu_{\text{máx}}$ (KBr): 3235 (fr, N-H), 3065 (fr, CH-alif.), 2929 (m, CH-alif.), 1624 (f, C=O), 1565 (f, ArC=C), 1454 (f, ArC=C), 1433 (f), 1344 (f), 1255 (f), 1160 (f), 1112 (f), 1056 (m), 1029 (f), 988 (m), 748 (m), 637 (fr) cm⁻¹; ¹H-RMN (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 8,96 (1H, *d*, *J*= 9,6 Hz, Ar-H), 8,89-8,86 (2H, *m*, Ar-H), 8,79 (1H, *dl*, Ar-H), 8,08 (1H, *d*, *J*= 9,6 Hz, Ar-H), 7,96-7,93 (2H, *m*, Ar-H), 7,90-7,82 (4H, *m*, Ar-H), 7,77 (2H, *t*, *J*= 7,20 Hz, Ar-H), 7,70 (1H, *t*, *J*= 7,8 Hz, Ar-H), 7,51-7,40 (4H, *m*, Ar-H), 7,23 (1H; *t*, *J*= 7,2 Hz, Ar-H), 7,18 (1H; *t*, *J*= 7,2 Hz, Ar-H), 6,14 (1H, *s*, C=CH), 6,06 (1H, *s*, C=CH), 5,93 (1H, *s*, C=CH), 5,84 (1H, *s*, C=CH), 4,34 (4H, *sl*, NCH₂(CH₂)₄CH₃), 4,21 (2H, *t*, *J*= 6,0 Hz, NCH₂(CH₂)₄CH₃), 4,13 (2H, *t*, *J*= 6 Hz NCH₂(CH₂)₄CH₃), 3,29 (3H, *s*, NHCH₃) 3,28 (3H, *s*, NHCH₃) 1,72 (4H, *sl*, NCH₂CH₂(CH₂)₃CH₃), 1,67-1,65 (4H, *quint*, NCH₂CH₂(CH₂)₃CH₃), 1,39-1,24 (4H, *m*, N(CH₂)₂CH₂(CH₂)₂CH₃), 1,39-1,24 (20H, *m*, N(CH₂)₂CH₂(CH₂)₂CH₃ + N(CH₂)₃(CH₂)₂CH₃), 0,89-0,83 (12H, *m*, N(CH₂)₅CH₃) ppm; ¹³C-RMN (150,90 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 174,63, 165,86, 163,71, 161,20, 157,83, 157,49, 154,94, 153,65, 151,60, 150,70, 142,57, 142,38, 139,10, 138,83, 136,38 (Ar-CH), 135,52 (Ar-CH), 133,03 (Ar-CH), 132,67 (Ar-CH), 129,45 (Ar-CH), 129,19 (Ar-CH), 128,43 (Ar-CH), 127,57 (Ar-CH), 126,17 (Ar-CH), 125,90 (Ar-CH), 125,39 (Ar-CH), 124,93 (Ar-CH), 124,62 (Ar-CH), 124,35 (Ar-CH), 124,13 (Ar-CH), 121,93 (Ar-CH), 116,73 (Ar-CH), 116,38 (Ar-CH), 114,61 (Ar-CH), 114,19 (Ar-CH), 94,60 (C=CH), 94,19 (C=CH), 90,06 (C=CH), 89,50 (C=CH), 48,56 (NCH₂(CH₂)₄CH₃), 48,43 (NCH₂(CH₂)₄CH₃), 46,89 (CH₂), 46,27 (CH₂) 30,42 (NHCH₃), 30,23 (NHCH₃), 31,19 (CH₂), 31,12 (CH₂), 31,03 (CH₂), 30,95 (CH₂), 27,22 (CH₂), 27,12 (CH₂), 26,74 (CH₂), 25,90 (CH₂), 25,84 (CH₂), 25,74 (CH₂), 22,31 (CH₂), 22,23 (CH₂), 22,15 (CH₂), 14,04

($\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 13,99 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 13,97 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 13,95 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3$) ppm; EMAR-ESI-TOF m/z: 600,24826 [M-I]⁺ (C₃₅H₄₂N₃OSe⁺, calc. 600,24900).

2.2.2.3 Síntese do iodeto de 3-hexil-[(3-(1-hexilquinolin-2(1H)-ilideno)metil]-4-oxo-2-[(fenilamino)ciclobut-2-en-1-ilideno)metil]benzoselenazole-3-io (13)

2.2.2.3.1 Método A

Fez-se reagir o trifluorometanossulfonato de 3-hexil-2-[(3-[(1-hexil-6-quinolin-2(1H)-ilideno)metil]-2-metoxi-4-oxociclobut-2-en-1-ilideno)metil]benzoselenazole-3-io (10) (0,200 g, 0,267 mmol), com 5 eq. de anilina (NH₂Ph) (0,122 mL; 1,34 mmol); 0,5 eq. de Et₃N (0,019 mL, 0,134 mmol) e 0,5 eq. de 4-DMAP (0,0164 g, 0,134 mmol) em CH₂Cl₂ seco. A mistura reacional foi deixada à temperatura ambiente, em atmosfera de azoto e com agitação.



A evolução da reação foi seguida por c.c.f. (sílica, CH₂Cl₂/MeOH 5 %) tendo-se verificado que a reação não estava a evoluir após 48 h. Posto isto, ao 3º e 4º dia de reação foi adicionado mais 0,02 mL de Et₃N e ao 7º foi adicionado mais 0,04 mL. Terminada a reação (11 dias), a mistura reacional foi colocada numa ampola de decantação, adicionou-se CH₂Cl₂ gelado e lavou-se a fase orgânica várias vezes com água destilada gelada. Após recolher a fase orgânica, esta foi seca com NaSO₄ anidro e após filtração, o solvente foi removido por evaporação a pressão reduzida.

Os cristais resultantes foram dissolvidos em 10 mL de MeOH e tendo-se adicionado 10 mL de uma solução aquosa de KI a 14 %. A mistura foi deixada em agitação forte, à temperatura ambiente durante 2 h. Após filtração a pressão reduzida dos cristais obtidos, estes foram lavados várias vezes com água destilada gelada e seguidamente várias vezes com éter dietílico gelado. Após realização de uma c.c.f. (sílica, CH₂Cl₂/MeOH 10 %) verificou-se que os cristais se encontravam quase puros.

Os cristais foram então recristalizados com CH₂Cl₂/MeOH, e recolhidos por filtração a pressão reduzida e após realização de uma c.c.f. (sílica, CH₂Cl₂/MeOH 10 %)

verificou-se que se encontravam menos impuros e o solvente das águas-mães como continham composto, foi removido a pressão reduzida e posteriormente tentou-se purificar os cristais. Os cristais resultantes das águas-mães juntaram-se aos cristais obtidos na primeira recristalização. Realizou-se uma segunda recristalização utilizando o mesmo procedimento. Após realização de uma c.c.f. (sílica, CH₂Cl₂/MeOH 10 %) verificou-se que os cristais estavam quase puros. Realizaram-se então mais duas recristalizações, utilizando sempre a mesma metodologia e após realização de uma c.c.f. (sílica, CH₂Cl₂/MeOH 10 %) verificou-se que os cristais estavam puros.

Obteve-se então o **iodeto de 3-hexil-[(3-(1-hexilquinolin-2(1*H*)-ilideno)metil]-4-oxo-2-[(fenilamino)ciclobut-2-en-1-ilideno)metil]benzoselenazole-3-io (13)**, com um rendimento de 50 %, cromatograficamente puro, na forma de cristais acastanhados, apresentando: p.f. 223-226 °C (dec.); VIS $\lambda_{\text{máx}}$ (DMSO): 698 nm; log ϵ = 5,22; IV $\nu_{\text{máx}}$ (KBr): 3097 (fr, Ar-CH), 2926 (fr, CH-alif.), 1623 (fr, C=O), 1538 (fr, ArC=C), 1455 (m, ArC=C), 1345 (m), 1259 (m), 1158 (m), 985 (fr) cm⁻¹; EMAR-ESI-TOF m/z: 662,26372 [M-I]⁺ (C₄₀H₄₄N₃OSe⁺, calc. 662,26473). Como o composto é insolúvel nos solventes deuterados usuais (DMSO-*d*₆, CDCl₃, CD₃OD) não foi possível a obtenção dos espectros de ¹H-RMN e ¹³C-RMN.

2.2.2.3.2 Método B

Neste método, fez-se reagir o trifluorometanossulfonato de 3-hexil-2-[(3-[(1-hexil-6-quinolin-2(1*H*)-ilideno)metil]-2-metoxi-4-oxociclobut-2-en-1-ilideno)metil]benzoselenazole-3-io (**10**) (0,200 g, 0,267 mmol), com 5 eq. de anilina (0,122 mL, 1,34 mmol); 1,5 eq. Et₃N (0,06 mL; 0.401 mmol) e 0,5 eq. de 4-DMAP (0,02 g, 0.134 mmol) em CH₂Cl₂ seco. A mistura reacional foi deixada à temperatura ambiente, em atmosfera de azoto e com agitação. A evolução da reação foi seguida por c.c.f. (sílica, CH₂Cl₂/MeOH 5 %). Neste método, o término da reação verificou-se após 6 dias, o tratamento da mistura reacional e dos cristais obtidos foi realizado de acordo com procedimento descrito no método anterior. A purificação dos cristais foi conseguida após a realização de duas recristalizações, utilizando o mesmo procedimento do método anterior.

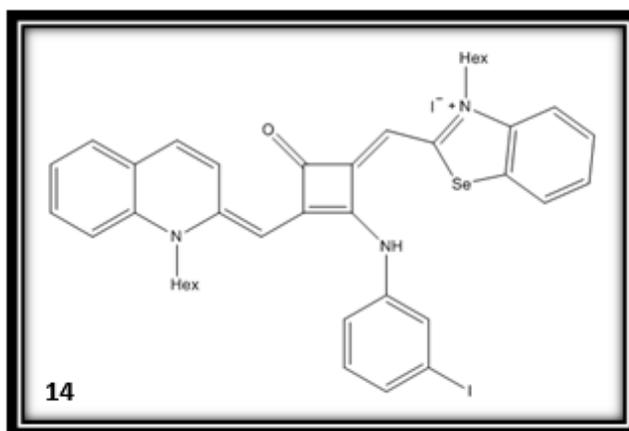
Obteve-se então o **iodeto de 3-hexil-[(3-(1-hexilquinolin-2(1*H*)-ilideno)metil]-4-oxo-2-[(fenilamino)ciclobut-2-en-1-ilideno)metil]benzoselenazole-3-io (13)** com

um rendimento de 42 %, cromatograficamente puro, na forma de cristais acastanhados. O p.f. e o espectro no IV coincide com os do composto **13** descrito no método A.

2.2.2.4 Síntese do iodeto de iodeto de 3-hexil-2-[3-(1-hexilquinolin-2(1*H*)-ilideno)metil]-2-[(3-iodofenil)amino]-4-oxociclobut-2-en-1-ilideno)metil]benzoselenazole-3-io (**14**)

2.2.2.4.1 Método A

Fez-se reagir o composto trifluorometanossulfonato de 3-hexil-2-[3-[(1-hexil-6-quinolin-2(1*H*)-ilideno)metil]-2-metoxi-4-oxociclobut-2-en-1-ilideno)metil]benzoselenazole-3-io (**10**) (0,200 g, 0,267 mmol), com 5 eq. de 3-iodoanilina (NH₂-3-I-Ph)



(0,161 mL; 1,34 mmol); 0,5 eq. Et₃N (0,019 mL, 0,134 mmol) e 0,5 eq. de 4-DMAP (0,0164 g, 0,134 mmol) em CH₂Cl₂ seco. A mistura reacional foi deixada à temperatura ambiente, em atmosfera de azoto e com agitação. A evolução da reação foi seguida por c.c.f. (sílica, CH₂Cl₂/MeOH 5 %) e tendo-se verificado que a reação não estava a evoluir ao fim de 48 h. Então no 3º e 7º dia de reação foi adicionado mais 0,02 mL de Et₃N. Terminada a reação (19 dias), a mistura reacional foi vertida para uma ampola de decantação, adicionou-se CH₂Cl₂ gelado e lavou-se a fase orgânica várias vezes com água destilada gelada. Após recolher a fase orgânica, esta foi seca com NaSO₄ anidro e após filtração, o solvente foi removido por evaporação a pressão reduzida.

Os cristais resultantes foram dissolvidos em 10 mL de MeOH e tendo-se adicionado 10 mL de uma solução aquosa de KI a 14%. A mistura foi deixada em agitação forte, à temperatura ambiente durante 2 h. Após filtração a pressão reduzida dos cristais obtidos, estes foram lavados várias vezes com água destilada gelada e seguidamente várias vezes com éter dietílico gelado. Após realização de uma c.c.f. (sílica, CH₂Cl₂/MeOH 10 %) verificou-se que os cristais encontravam-se quase puros.

Os cristais foram então recristalizados com uma mistura de CH₂Cl₂ e éter dietílico, e posteriormente recolhidos por filtração a pressão reduzida e após realização de uma

c.c.f. (sílica, CH₂Cl₂/MeOH 10 %) verificou-se que os cristais ainda apresentavam impurezas. Realizou-se uma lavagem dos cristais com acetonitrilo diretamente no funil e após realização de uma c.c.f. (sílica, CH₂Cl₂/MeOH 10 %) verificou-se que os cristais que ficaram retidos no funil estavam puros. Obteve-se então o **iodeto de iodeto de 3-hexil-2-[3-(1-hexilquinolin-2(1*H*)-ilideno)metil]-2-[(3-iodofenil)amino]-4-oxociclobut-2-en-1-ilideno)metil]benzoselenazole-3-io (14)** com um rendimento de 13 %, cromatograficamente puro, na forma de cristais acastanhados, apresentando: p.f. 260-264°C (dec.); VIS λ_{máx} (DMSO): 696,33 nm; log ε= 5,06; IV υ_{máx} (KBr): 3068 (fr, Ar-CH), 2928 (fr, CH-alif.), 1623 (fr, C=O), 1564 (fr, ArC=C), 1533 (fr, ArC=C), 1453 (f, ArC=C), 1432 (m), 1344 (m), 1316 (fr), 1258 (m), 1157 (m), 1134 (m) cm⁻¹; EMAR-ESI-TOF m/z: 788,15896 [M-I]⁺ (C₄₀H₄₃IN₃OSe⁺, calc. 788,16137). Como o composto é insolúvel nos solventes deuterados usuais (DMSO-*d*₆, CDCl₃, CD₃OD) não foi possível a obtenção dos espectros de ¹H-RMN e ¹³C-RMN.

2.2.2.4.2 Método B

Fez-se reagir o composto trifluorometanossulfonato de 3-hexil-2-[3-[(1-hexil-6-quinolin-2(1*H*)-ilideno)metil]-2-metoxi-4-oxociclobut-2-en-1-ilideno)metil]benzoselenazole-3-io (**10**) (0,200 g, 0,267 mmol), com 5 eq. de 3-iodoanilina (0,161 mL, 1,34 mmol); 1,5 eq. Et₃N (0,06 mL, 0,401 mmol) e 0,5 eq. de 4-DMAP (0,0164 g, 0,134 mmol) em CH₂Cl₂ seco. A mistura reacional foi deixada à temperatura ambiente, em atmosfera de azoto e com agitação. A evolução da reação foi seguida por c.c.f. (sílica, CH₂Cl₂/MeOH 5 %) até consumo do material de partida (18 dias). O tratamento da mistura reacional e dos cristais resultantes foi realizado de acordo com a metodologia descrita no método anterior. Após realização de uma c.c.f. (sílica, CH₂Cl₂/MeOH 10%) verificou-se que os cristais apresentavam algumas impurezas, tendo sido por isso recristalizados com uma mistura de éter dietílico/CH₂Cl₂/gotas de MeOH. Os cristais foram recolhido por filtração a pressão reduzida e após realização de uma c.c.f. (sílica, CH₂Cl₂/MeOH 10%) verificou-se que os cristais continham poucas impurezas, tendo sido sujeitos a uma nova recristalização. Após realização de uma c.c.f. (sílica, CH₂Cl₂/MeOH 10 %) verificou-se que os cristais estavam praticamente puros. Após a realização de mais duas recristalizações utilizando sempre a mesma metodologia, verificou-se por c.c.f. (sílica, CH₂Cl₂/MeOH 10 %) que os cristais apresentavam-se puros. Obteve-se então o composto **iodeto de iodeto de 3-hexil-2-[3-(1-hexilquinolin-**

2(1*H*ilideno)metil]-2-[(3-iodofenil)amino]-4-oxociclobut-2-en-1-ilideno)metil]benzoselenazole-3-io (14) com um rendimento de 25 %, cromatograficamente puro, na forma de cristais acastanhados, apresentando p.f. e espectro no IV coincidentes com o composto obtido no método A.

2.3 Aplicação dos corantes esquarílicos nas linhagens celulares

2.3.1 Preparação de meio de cultura

O meio de cultura utilizado foi o DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium; Gibco, Invitrogen, Portugal) que consiste numa preparação que contém 4,5 g/L de glicose, 0,11 g/L de piruvato de sódio e vermelho de fenol (um indicador de pH). Com o objetivo de obter um meio completo suplementou-se o DMEM com soro fetal bovino (FBS, 10 % v/v), Gibco), antibiótico (200 U/mL de penicilina e 200 µg/mL de streptomina, Gibco) e 1 mM de L-Glutamina (Gibco).

2.3.2 Cultura de células

2.3.2.1 Linha celular MCF-7 e BT-474 e sua manutenção

Neste trabalho para aplicação dos compostos, *in vitro*, utilizaram-se as seguintes linhas celulares: células MCF-7 (ATCC, HTB-22TM, linha celular derivada de adenocarcinoma de mama humano) e as células BT-474 (CLS Germany, linha celular derivada de um carcinoma ductal da glândula mamária humano). As linhas celulares foram mantidas em meio de cultura completo, em frascos de cultura ventilados, numa incubadora COM 5% de CO₂, à temperatura de 37 °C e humidade controlada.

Ambas as linhas celulares apresentam crescimento, *in vitro*, aderente às caixas ou frascos de cultura, no entanto, as MCF-7 crescem em monocamada e as BT-474 formam agregados, tal como se pode observar na figura 2.1.

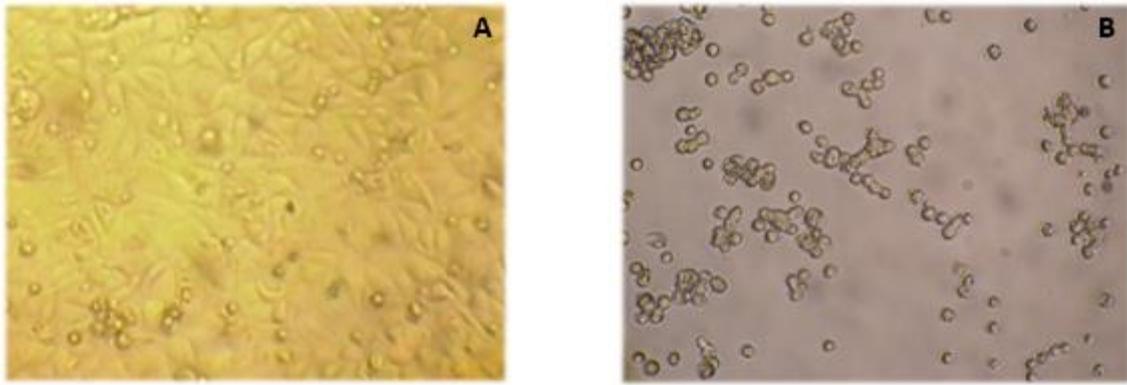


Figura 2.1 - Fotografia das células MCF-7 (A) e BT-474 (B) cedidas pela Prof. Doutora Amélia Silva (ampliação de 100x).

2.3.2.2 Subcultura e tripsinização

Quando as culturas apresentavam um crescimento em estado de 80-90 % de confluência foram tratadas para subcultura ou para ensaio. O meio de cultura onde se encontravam as células (meio velho) foi removido com auxílio de uma pipeta de Pasteur estéril e descartou-se para um frasco com lixívia. Seguidamente, para lavar as células, adicionou-se a cada frasco de cultura 1 mL de HBSS (*“Hank’s Balanced Salt Solution”*, Gibco) de forma a remover o Ca^{2+} e todo o meio completo ainda existente. Após a lavagem, removeu-se o HBSS e adicionou-se 1 mL de Tripsina-EDTA 0,05 % (Gibco) a cada frasco, de modo a romper as ligações e desagregar as células das “paredes” do frasco, e deixou-se atuar durante 5 a 8 minutos na incubadora a 37 °C com 5 % de CO_2 . Posteriormente, os frascos foram retirados da incubadora (controlou-se a desagregação celular ao microscópio invertido) e acrescentou-se 1,5 mL de meio completo para inibir a ação da tripsina, Com a ajuda de uma pipeta de Pasteur promoveu-se a desagregação das células ainda aderentes ao frasco, com aspirações suaves separaram-se os grumos em suspensão. Removeram-se 2 mL da suspensão para um tubo de falcon e às células que ficaram no frasco de cultura adicionou-se 5 mL de meio completo e voltaram-se então, a colocar na incubadora a 37 °C com 5 % de CO_2 , para voltarem a crescer e dividir-se (subcultura).

2.3.3 Contagem de células

Após a tripsinização das células para ensaio, procedeu-se à sua contagem com ajuda de um hemocitómetro convencional (câmara de Neubauer) (figura 2.2 A). O

hemocitômetro é caracterizado por apresentar nove quadrados de um milímetro divididos em quadrados menores, onde um dos nove quadrados de 1 mm representa um volume de 0,1 mm ou 10^{-4} mL. A contagem das células é realizada através da utilização do microscópio.

Alternativamente, também se realizou a contagem das células utilizando um contador automático (TC10 Automated Cell Counter 145-0001 BIO-RAD) (figura 2.2 **B**), que consiste em colocar na câmara de uma lâmina descartável, com auxílio de uma micropipeta, suspensão celular até encher a câmara da lâmina. A lâmina é colocada na ranhura do contador automático e o número de células é automaticamente determinado, dado em células/mL.

Após a contagem, procedeu-se à diluição das células para a densidade final de $5,0 \times 10^4$ células por mL.

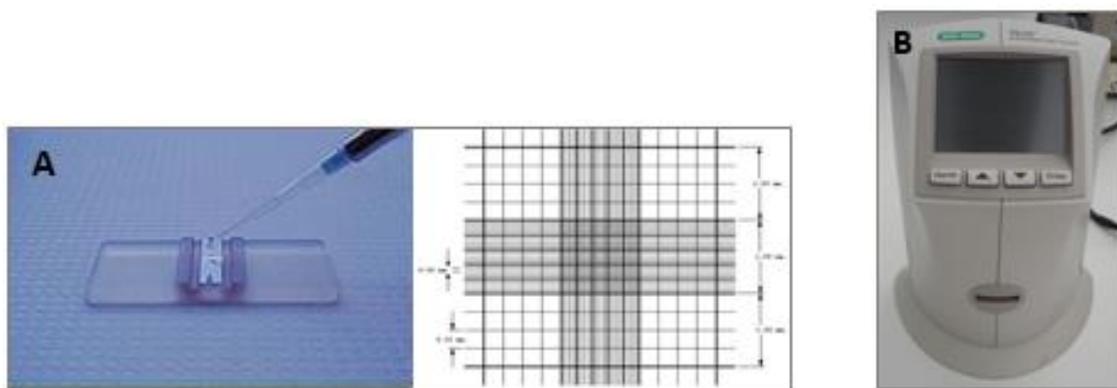


Figura 2.2 - Processo de contagem das células: no hemocitômetro (câmara de Neubauer) (**A**) ou no contador automático (**B**).

2.3.4 “Plantação” das células em placas de cultura e aplicação dos corantes esquarílicos assimétricos derivados da quinaldina e benzoselenazole

A suspensão celular referida anteriormente (densidade celular de $5,0 \times 10^4$ células/mL) foi utilizada para plantação das células em placas de cultura de 96 poços, adicionando-se 100 μ L por poço, exceto nos poços da coluna 1 e 7 (na tabela 2.1 está representado um esquema da respectiva placa). Após aplicação das células, as placas foram colocadas na incubadora a 37 °C com 5 % de CO₂, onde permaneceram durante 24 h, para ocorrer a adesão das células às placas.

Tabela 2.1 - Esquema representativo da aplicação das células nas placas de cultura de 96 poços (\emptyset : poços sem células (o branco); C: poços com células; **Ctrl**: poços com células (controlo)). Cada placa utilizada apresentava apenas a “plantação” de uma linha celular.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												
	\emptyset	C	C	C	C	Ctrl	\emptyset	C	C	C	C	Ctrl

2.3.4.1 Preparação das soluções dos corantes a serem aplicados nas células

Preparou-se, inicialmente, uma solução mãe de cada corante a testar, num balão volumétrico de 10 mL, com uma concentração final conhecida na ordem dos 10^{-4} M, utilizando como solvente o DMSO. A partir destas, foram feitas diluições utilizando-se o meio DMEM (meio de cultura sem soro) para obtenção de soluções com concentrações de 0,1; 1,0; 5,0 e 10,0 μ M para cada um dos corantes, tendo sempre o cuidado de o volume da solução de corante (em DMSO) nunca ultrapassar 5 % (v/v) da solução final.

2.3.4.2 Aplicação dos corantes nas células

Passadas as 24 h de adesão das células, as placas foram retiradas da incubadora e o meio de cultura completo foi removido com ajuda de uma micropipeta multicanal. Seguidamente, procedeu-se à adição das soluções referidas anteriormente (100 μ L/poço), nas concentrações desejadas, para cada um dos cinco corantes a testar (**9, 11, 12, 13 e 14**), tal como representado no esquema da tabela 2.2. As placas foram colocadas novamente na incubadora por mais 24 h, para incubação dos corantes.

Tabela 2.2 - Representativo da aplicação dos compostos nas placas de cultura de 96 poços (**Ø**: poços sem células/corante (o branco); **0,1; 1,0; 5,0 e 10,0**: as concentrações dos diferentes corantes (em μM); **Ctrl**: poços com células mas sem corante (controle). A verde está representado a aplicação de um corante e a azul está representado a aplicação de um outro corante.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												
	Ø	0,1	1,0	5,0	10,0	Ctrl	Ø	0,1	1,0	5,0	10,0	Ctrl

2.3.5 Irradiação das células

O sistema de LEDs foi preparado pelo professor José Ramiro Fernandes (DF, ECT, UTAD), com o c.d.o. adequado para cada um dos compostos. Para os corantes **9**, **11**, **12** e **13** usou-se LEDs com uma banda de emissão centrada a 630 nm e para o corante **14** irradiado com LEDs com uma banda de emissão centrada a 660 nm (c.d.o. segundo os valores determinados a partir dos estudos noVis dos corantes).

Após 24 h de incubação das placas com os respetivos corantes, procedeu-se à irradiação com o sistema de LEDs, utilizando-se 3 condições de irradiação para cada um dos corantes: i) uma placa não irradiada, colocada à temperatura ambiente na ausência de luz, durante 14 minutos, servindo assim, de controlo não irradiado; ii) uma placa irradiada durante 7 minutos e iii) uma placa irradiada durante 14 minutos, tendo sempre o cuidado de evitar a exposição ao ar e conseqüente contaminação.

2.3.6 Determinação da viabilidade celular

A viabilidade celular foi avaliada pela utilização de um indicador de viabilidade celular conhecido comercialmente por Alamar Blue© (resazurina). Este composto é um indicador de oxidação-redução cuja forma oxidada (resazurina) apresenta coloração azul e não é fluorescente, que é reduzido intracelularmente por células metabolicamente ativas (resorufina), conferindo a coloração rosa intenso e fluorescente (figura 2.3). As formas redox deste indicador conferem diferentes características colorimétricas em resposta ao metabolismo de células vivas, sendo a viabilidade celular seguida por alteração da

absorvância medida a 570 (forma reduzida) e 620 nm (forma oxidada). Assim, a análise da alteração por espectrometria do A.B. é um método rápido, sensível e não-tóxico para analisar a viabilidade celular, tal como descrito no capítulo 1, no ponto 1.10.

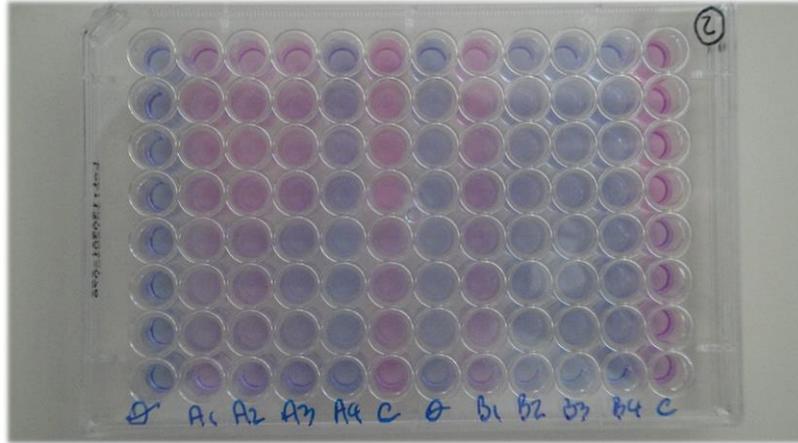


Figura 2.3 - Exemplo de uma placa de cultura após 24 h da adição do Alamar Blue.

A percentagem de redução do A.B. foi calculada pela seguinte equação (figura 2.4), de acordo com as indicações descritas na literatura (Al-Nasiry *et al.*, 2007):

$$\% \text{ de redução de Alamar Blue} = \frac{(\epsilon_{ox}\lambda_2)(A\lambda_1) - (\epsilon_{ox}\lambda_1)(A\lambda_2)}{(\epsilon_{red}\lambda_1)(A'\lambda_2) - (\epsilon_{red}\lambda_2)(A'\lambda_1)} \times 100$$

Figura 2.4 - Equação de percentagem de redução do Alamar Blue (ϵ_{ox} : coeficiente de extinção molar do AB oxidado; ϵ_{red} : coeficiente de extinção molar do AB reduzido; A: absorvância dos poços a testar; A': absorvância dos poços brancos; λ_1 : 570 nm e λ_2 : 620 nm).

2.3.6.1 Aplicação do indicador de viabilidade: Alamar Blue

Após a realização das condições de irradiação para cada um dos corantes, procedeu-se à lavagem das placas em 2 fases: as filas A, B, C e D foram lavadas 1 h após a irradiação e as filas E, F, G e H foram lavadas 24 h após a irradiação. Contudo, em ambas as condições o procedimento da lavagem realizou-se da seguinte forma: procedeu-se à remoção do meio com o corante, com o auxílio de uma micropipeta multicanal (protegendo as restantes filas da ausência de luz). Seguidamente, adicionou-se 100 μ L/poço de PBS (procedimento realizado 2 vezes) e logo após a adição procedeu-se à sua remoção. Após retirar a última vez, adicionou-se 100 μ L/poço de solução de A.B. a 10 % (v/v) em meio de cultura DMEM sem soro e colocaram-se novamente as placas na incubadora 37 °C; 5 % de CO₂.

A quantificação da viabilidade celular foi feita através das leituras das absorvâncias medidas a dois c.d.o. distintos (570 e 620 nm), a partir da utilização de um espectrofotômetro de leitura de placas de 96 poços (figura 2.5). As leituras foram realizadas após 4 e 24 h após a adição do A.B..



Figura 2.5 - Espectrofotômetro de leitura de placas de 96 poços.

2.3.7 Análise e apresentação dos resultados

Os valores de viabilidade celular são apresentados como o valor médio de um número de experiências ($n=4$) \pm desvio do erro médio (SD). Os valores foram calculados por rotinas dos programas Microsoft Excel. Os gráficos foram elaborados no GraphPad.

A análise estatística realizou-se no programa Origin através da análise de variância com o teste ANOVA com um nível de significância de 0,05 onde o $p < 0,05$.

Capítulo 3

RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Preâmbulo

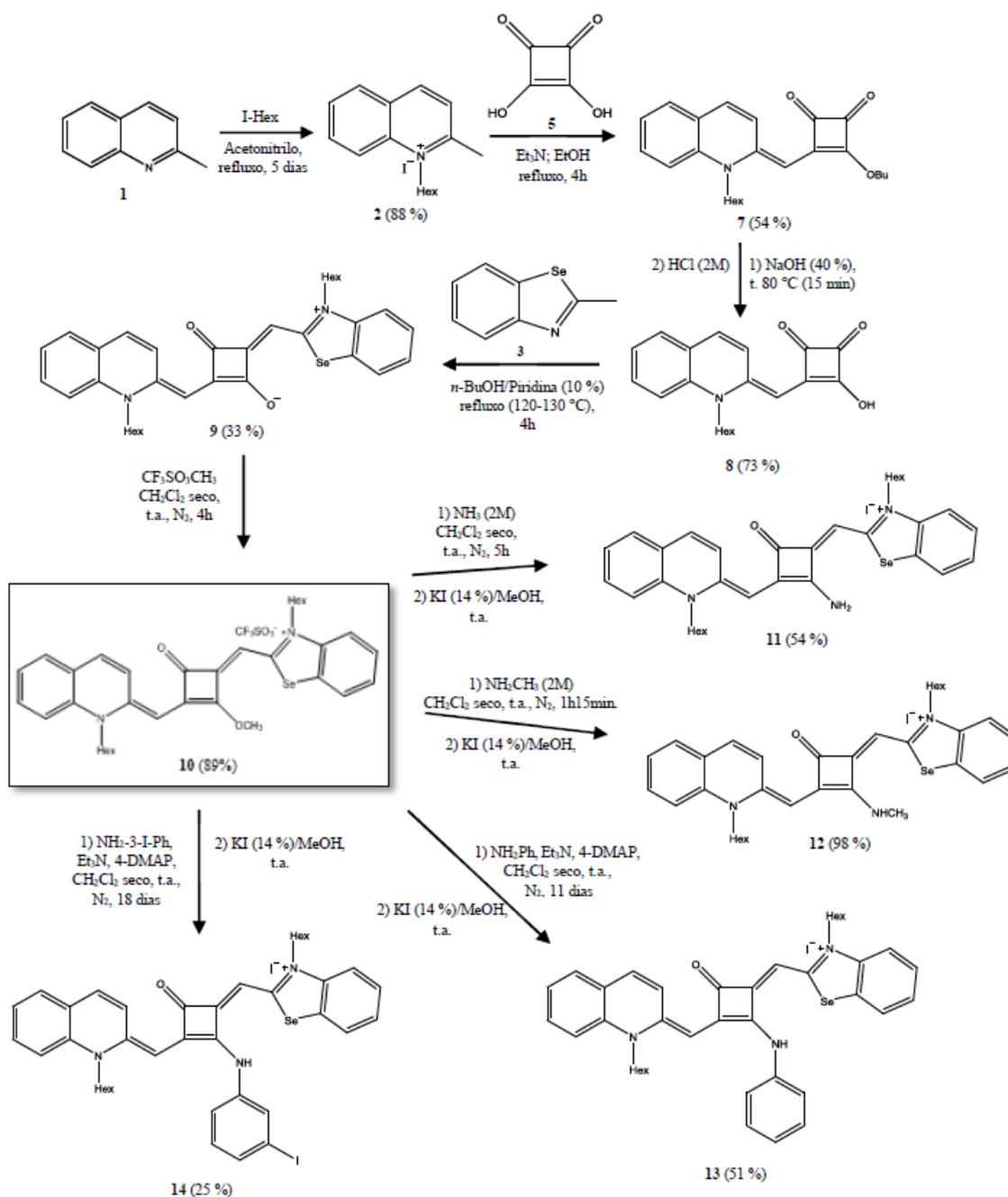
Neste capítulo está apresentada a discussão dos resultados experimentais obtidos neste trabalho, que se encontra dividida em duas partes. Na primeira parte é apresentada a descrição e discussão dos métodos de síntese e respetiva caracterização espectroscópica, dos sais quaternários de amónio **2** e **4**, dos corantes semi-esquarílicos **7** e **8** e dos corantes esquarílicos assimétricos **9-14**. Para a caracterização estrutural de cada composto sintetizado foram utilizadas as seguintes técnicas: determinação do p.f., espectros no Vis, no IV, análise de ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C e por fim, espectros de massa de alta resolução (EMAR-ESI-TOF).

Na segunda parte é apresentada a discussão dos resultados experimentais obtidos relativamente à avaliação da proliferação e viabilidade celular, *in vitro*, das linhas celulares MCF-7 e BT-474, na presença dos corantes cianínicos esquarílicos, **9**, **11**, **12**, **13** e **14**. São avaliados os efeitos destes compostos na proliferação/viabilidade celular, quando sujeitos a irradiação ou ausência da mesma durante 7 e 14 minutos, utilizando LEDs de c.d.o. adequados a cada corante. A análise referente à viabilidade celular é realizada segundo a utilização do indicador A.B. que se pode traduzir numa quantificação do metabolismo celular.

Por fim, são apresentadas algumas conclusões relativas ao potencial destes corantes como agentes fotossensibilizadores na PDT do cancro.

3.2 Síntese dos corantes cianínicos esquarílicos assimétricos derivados da quinaldina e do benzoselenazole

A síntese dos corantes cianínicos esquarílicos assimétricos foi feita de acordo com métodos adaptados da literatura (Fagundes, 2013) e que está resumida no esquema 3.1.



Esquema 3.1 - Síntese dos vários corantes cianínicos esquarílicos assimétricos.

Após alquilação da quinaldina (**1**) com 1-iodohexano, obteve-se o sal quaternário **2**. A condensação deste com o 3,4-dibutoxi-3-ciclobuten-1,2-diona (**6**) originou o produto 3-butoxi-4-[(1-hexilquinolin-2(1*H*)-ilideno)metil]-3-ciclobuteno-1,2-diona (**7**). Através de uma reação de hidrólise, a partir deste composto, obteve-se o composto 3-[(1-hexilquinolin-2(1*H*)-ilideno)metil]-4-hidroxi-3-ciclobuteno-1,2-diona (**8**) que após a condensação com o sal quaternário **4** originou o corante esquarílico zwitteriônico **9**, que por metilação com o agente metilante $\text{CF}_3\text{SO}_3\text{CH}_3$ permitiu a obtenção do derivado *O*-

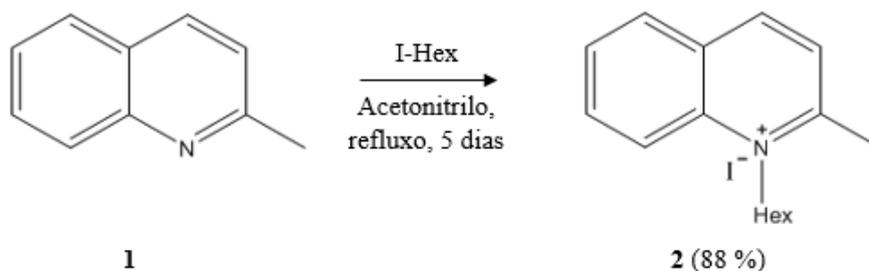
metilado **10**. Este derivado através de uma reação de substituição nucleófila com aminas apropriadas levou à obtenção dos corantes aminoescarílicos pretendidos (**11-14**), com rendimentos de 25-98 %.

As condições reacionais para obtenção do corante **10**, bem como dos corantes aminoescarílicos (**11-14**) foram muito similares, ou seja, todas as reações ocorreram à temperatura ambiente, na presença de atmosfera de azoto, com excesso de agente metilante/amina e utilização de CH_2Cl_2 seco. No entanto, para obtenção dos corantes **13** e **14** houve a necessidade de adicionar trietilamina e 4-DMAP que funcionaram como catalisadores da reação uma vez que as respectivas aminas aromáticas são menos nucleófilas do que as aminas alifáticas. Seguidamente é apresentada uma discussão mais detalhada dos métodos de síntese e respetiva caracterização espectroscópica.

3.2.1 Síntese prévia

3.2.1.1 Síntese do iodeto de 1-hexil-2-metilquinolínio (2)

O sal quaternário de amónio **2** foi sintetizado, fazendo-se reagir a quinaldina (**1**) com um excesso de I-Hex (1:3), em acetonitrilo a refluxo e sob agitação, tal como se ilustra no esquema 3.2.



Esquema 3.2 - Síntese do composto 2.

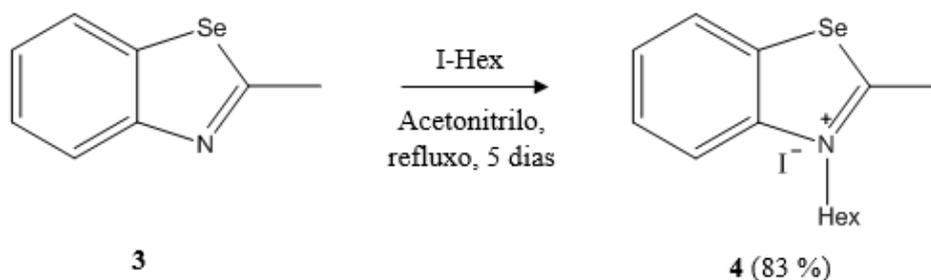
Após cinco dias de reação, a precipitação do sal foi conseguida através da adição de éter dietílico à mistura reacional. Posteriormente, o precipitado obtido foi recolhido por filtração a pressão reduzida e os cristais foram lavados várias vezes com éter dietílico, tendo-se obtido cristais amarelados, cromatograficamente puros. A alquilação das águas-mães foi repetida por mais três vezes, adicionando-se mais 1 eq. molar de I-Hex, deixando-se recorrer a reação por mais 5 dias, de forma a obter um melhor rendimento.

Relativamente ao rendimento da reação ($\eta = 88\%$), podemos afirmar que se apresenta muito superior ao descrito na literatura (46% , Pardal *et al.*, 2002). Este facto pode dever-se à repetição da alquilação das primeiras águas-mães, como descrito anteriormente.

O p.f. do sal encontra-se no intervalo $161,7-162,9\text{ }^\circ\text{C}$, e apesar do intervalo ser estreito, não está de acordo com o da literatura, apresentando-se muito superior (lit. $129-130\text{ }^\circ\text{C}$, Pardal *et al.*, 2002). Como a síntese e caracterização deste composto já está descrita na literatura (Pardal *et al.*, 2002) apenas foi traçado o seu espectro no IV, que se encontra de acordo com o descrito na literatura referida. Salientam-se as bandas de absorção relativas às vibrações das ligações ArC-H (fraca) a 3069 e a 3009 cm^{-1} e as bandas relativas às vibrações das ligações C-H alifáticas (forte) a 2948 e a 2914 cm^{-1} .

3.2.1.2 Síntese do iodeto de 3-hexil-2-metilbenzoselenazólio (4)

O sal quaternário de amónio (4) foi sintetizado, fazendo-se reagir o 2-metilbenzoselenazole (3) com um excesso de I-Hex (1:3), em acetonitrilo, a refluxo e sob agitação, tal como se ilustra no esquema 3.3.



Esquema 3.3 - Síntese do composto 4.

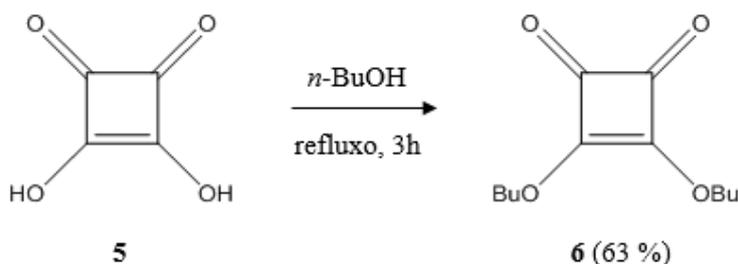
Após cinco dias de reação, a precipitação do sal foi conseguida do mesmo modo que referido para o composto 2, através da adição de éter dietílico à mistura reacional. Posteriormente, o precipitado obtido foi recolhido por filtração a pressão reduzida e os cristais foram lavados várias vezes com éter dietílico, tendo-se obtido cristais beges, cromatograficamente puros. A alquilação das águas-mães foi repetida por mais duas vezes, adicionando-se mais 1 eq. molar de I-Hex, deixando-se recorrer a reação por mais 5 dias, de forma a obter um melhor rendimento. O rendimento conseguido foi muito bom, 83% , valor que se encontra bastante acima do referido na literatura ($\eta = 40\%$, Pardal *et*

al., 2002). Fagundes (2013), também sintetizou este sal quaternário e obteve um rendimento superior de 97 %.

O p.f. do sal é 131-133 °C, que está de acordo com o da literatura (lit. 132-133 °C, Pardal *et al.*, 2002). No entanto, Fagundes (2013) obteve para este composto um p.f de 121-123 °C, apesar de ser um intervalo estreito não está de acordo com o publicado na literatura. Como a síntese e caracterização deste composto já está descrita na referida literatura, apenas foi traçado o seu espectro no IV, que também se encontra de acordo com o publicado. Salientam-se apenas a banda de absorção relativa às vibrações das ligações ArC-H a 3048 cm⁻¹ (fraca) e, a 2923 cm⁻¹ (forte) a banda relativa às vibrações das ligações C-H alifáticas.

3.2.1.3 Síntese do 3,4-dibutoxi-3-ciclobuten-1,2-diona (6)

O 3,4-dibutoxi-3-ciclobuten-1,2-diona (**6**) foi obtido por reação do ácido esquárico (**5**) com *n*-BuOH, a refluxo e sob agitação, durante 3 h, tal como ilustrado no esquema 3.4.



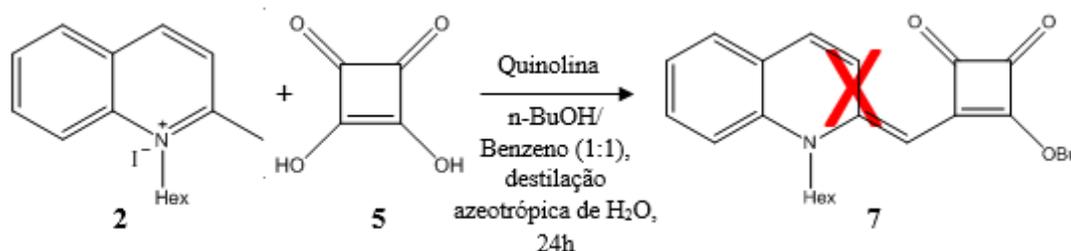
Esquema 3.4 - Síntese do composto **6**.

Após tratamento da mistura reacional, tal como descrito no capítulo 2, no ponto 2.2.1.3, foi obtido o composto **6** na forma de um óleo acastanhado, com um rendimento de 63 %, cromatograficamente puro, tendo sido usado na reação seguinte sem qualquer purificação ou caracterização posterior.

3.2.1.4 Síntese do 3-butoxi-4-[(1-hexilquinolin-2(1H)-ilideno)metil]-3-ciclobuteno-1,2-diona (7)

➤ Método A

Tentou-se a síntese do composto 3-butoxi-4-[(1-hexilquinolin-2(1H)-ilideno)metil]-3-ciclobuteno-1,2-diona (7) de acordo com o método descrito na literatura Jyothish *et al.*, 2004, através da reação do composto 1-hexil-2-metilquinolínio (2), com o ácido esquárico (5) numa mistura de *n*-BuOH/benzeno (1:1) e quinolina, com agitação e a refluxo com destilação azeotrópica da água em Dean-Stark, durante 24 h, tal como se ilustra no esquema 3.5.

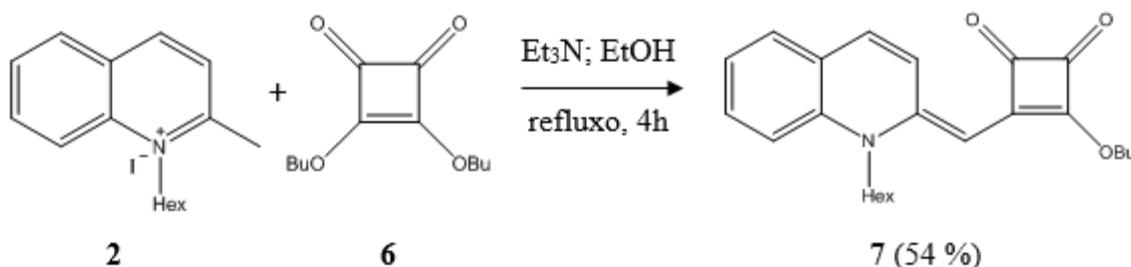


Esquema 3.5 - Síntese do composto 7.

Após o tratamento da mistura reacional, verificou-se que a mistura obtida era muito complexa e como não se conseguiu obter o produto na forma sólida, abandonou-se este método de síntese.

➤ Método B

Devido ao insucesso do método A, o 3-butoxi-4-[(1-hexilquinolin-2(1H)-ilideno)metil]-3-ciclobuteno-1,2-diona (7) foi então sintetizado fazendo-se reagir uma mistura de 3,4-dibutoxi-3-ciclobuten-1,2-diona (6) com o iodeto de 1-hexil-2-metilquinolínio (2), com Et₃N e etanol, a refluxo e sob agitação, durante 4 h (esquema 3.6), adaptado do método descrito na literatura Graça *et al.*, 2014.



Esquema 3.6 - Síntese do composto 7.

Este composto foi obtido, após purificação por c.c. utilizando como eluente o CH_2Cl_2 , na forma de cristais alaranjados, cromatograficamente puros, com um rendimento de 54 %. Fagundes, em 2013, sintetizou um composto derivado do benzoselenazole, análogo ao composto 7, o qual foi também foi purificado por c.c., no entanto, utilizou como eluente uma mistura de éter de petróleo/éter diétilico (1:1), tendo obtido um rendimento de 58 %, o qual se encontra mais próximo do obtido neste trabalho. Posto isto, um melhor rendimento poderá ser conseguido utilizando outro eluente na separação cromatográfica.

O p.f. deste composto é de 158-159 °C, o que indica que o composto foi obtido com elevada pureza, uma vez que apresenta uma diferença de apenas 1 °C. No entanto, como se trata de um composto novo, não existe dados na literatura para comparação.

No espectro no IV salientam-se as bandas características das vibrações das ligações CH -alif. (fraca) a 2955 e 2930 cm^{-1} , das vibrações das ligações $\text{C}=\text{O}$ a 1758 cm^{-1} (fraca) e a 1691 cm^{-1} (média) e por fim, das vibrações das ligações, $\text{ArC}=\text{C}$ (forte) a 1526 cm^{-1} .

Em relação ao espectro de ^1H -RMN relativo a este composto apresenta todos os sinais esperados para a totalidade dos prótons presentes na molécula. Na zona aromática do espectro surge um sinal na forma de um singuleto largo de um próton, ao desvio químico de 8,5 ppm. Os restantes prótons aromáticos surgem ao desvio químico de 7,52-7,22 ppm sob a forma de dupletos e tripletos de um próton de acordo com o previsto teoricamente. O sinal do próton do grupo $\text{C}=\text{CH}$ da cadeia polimetínica surge tal como esperado sob a forma de singuleto de um próton ao desvio químico de 5,25 ppm. Os sinais que surgem no espectro aos desvios químicos 4,81 e 4,06 ppm, na forma de tripleto e singuleto largo de dois prótons cada, foram atribuídos aos prótons dos grupos CH_2 , ligados diretamente aos átomos de oxigénio e azoto das cadeias alquílicas, respetivamente. Salientam-se os sinais dos grupos metilo da cadeia *O*-alquílica e *N*-alquílica que surgem no espectro aos desvios químicos 1,00 e 0,95 ppm, na forma de dois tripletos de três prótons cada, respetivamente.

O espectro de ^{13}C -RMN deste composto apresenta seis sinais correspondentes a carbonos de ligações duplas ligados a átomos de hidrogénio, aos desvios químicos de 133,06, 131,13, 128,74, 124,28, 123,34 e 114,04, os quais foram atribuídos aos CH dos anéis aromáticos (Ar-CH). O sinal correspondente ao carbono do grupo C=CH da cadeia polimetínica encontra-se ao desvio químico de 85,84 ppm. Observa-se a presença de oito sinais correspondentes aos oito grupos CH_2 das cadeias alquílicas aos desvios químicos entre 18,54-73,48 ppm, sendo os que se apresentam a campo mais baixo 73,48 e 47,84, os carbonos que estão diretamente ligados aos átomos de oxigénio e azoto, respetivamente. Por fim, os dois sinais correspondentes aos grupos metilo das cadeias alquílicas, encontram-se aos desvios químicos 13,98 e 13,76 ppm.

➤ Método C

Neste método, sintetizou-se o composto **7**, pelo mesmo método descrito anteriormente, uma vez que a síntese foi conseguida com sucesso. No entanto, realizaram-se otimizações no método de tratamento da mistura reacional e purificação do composto, de modo a obter um melhor rendimento. Neste caso, terminada a reação a mistura reacional foi arrefecida à temperatura ambiente e posteriormente colocada no banho de gelo para ajudar na precipitação. O sólido após ter sido recolhido por filtração a pressão reduzida, inicialmente foi lavado com etanol gelado, tal como no método B, no entanto, verificou que dissolvia o produto e lavou-se então várias vezes com uma mistura de éter dietílico e etanol (1:1) gelado. O composto foi purificação por c.c. utilizando-se inicialmente como eluente o CH_2Cl_2 e posteriormente uma mistura de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 2 %, para melhorar a separação cromatográfica. No final, foi conseguido cristais praticamente puros com um rendimento de 62 %, muito próximo do rendimento conseguido a partir do método B.

➤ Método D

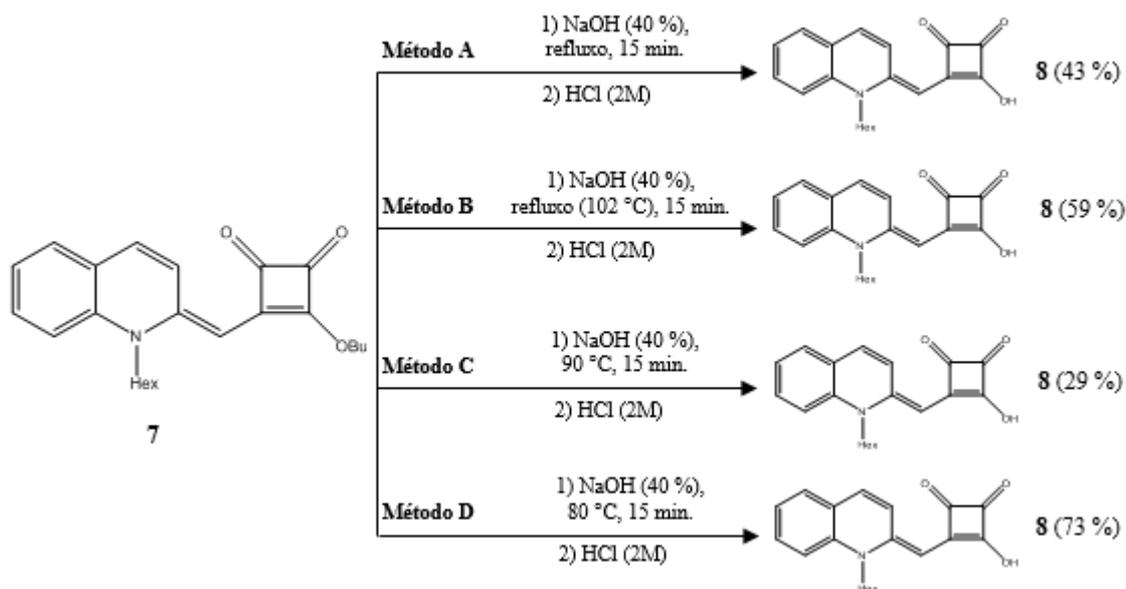
Neste método realizou-se a síntese do 3-butoxi-4-[(1-hexilquinolin-2(1*H*)-ilideno)metil]-3-ciclobuteno-1,2-diona (**7**), pelo mesmo procedimento descrito no método B e C, utilizando-se 3,610 g do composto **6**. Com o objetivo de melhor o rendimento também foram realizadas otimizações no tratamento da mistura reacional e na purificação do composto **7**. Após término da reação a mistura reacional foi arrefecida

à temperatura ambiente e posteriormente colocada no frigorífico até ao dia seguinte, para promover uma melhor precipitação do produto pretendido. O sólido formado, recolhido por filtração a pressão reduzida, foi lavado com éter de petróleo e obtido suficientemente puro para ser usado na reação seguinte sem “sofrer” purificação por c.c. Assim, obteve-se o composto 3-butoxi-4-[(1-hexilquinolin-2(1*H*)-ilideno)metil]-3-ciclobuteno-1,2-diona (**7**), com um rendimento de 63 %, isto indica que, apesar de usar uma maior massa do composto **6** (relativamente à utilizada no método B e C) e de o composto **7** não sofrer purificação por c.c (para serem evitadas perdas), não foi conseguido um bom rendimento quando comparado com os rendimento obtido no método A e B.

3.2.1.5 Síntese do 3-[(1-hexilquinolin-2(1*H*)-ilideno)metil]-4-hidroxi-3-ciclobuteno-1,2-diona (**8**)

➤ Método A

O composto **8** foi sintetizado através da reação de hidrólise adaptada da literatura (Graça *et al.* 2014) em que se fez reagir uma mistura de 3-butoxi-4-[(1-hexilquinolin-2(1*H*)-ilideno)metil]-3-ciclobuteno-1,2-diona (**7**) com NaOH 40 %, em etanol a refluxo, tal como está ilustrado no esquema 3.7-método A.



Esquema 3.7 - Síntese do composto **8**.

O composto **8** foi obtido com um rendimento de 59 %, em forma de cristais avermelhados. O p.f. é 190-195 °C (dec.), com uma diferença de 5 °C, o que indica que o composto obtido encontrava-se impuro. Como se trata de um composto novo, não existe dados na literatura para comparação.

Fagundes, em 2013, sintetizou um composto análogo ao composto **8**, derivado do benzoselenazole, tendo obtido um rendimento de 96 %, utilizando uma metodologia diferente da utilizada neste trabalho, descrita na literatura Kim *et al.*, 2010. Embora este valor seja bastante superior ao obtido neste trabalho, o composto análogo, referido no trabalho de Fagundes (2013), não foi sujeito a qualquer purificação, o que também pode justificar a diferença de valores nos rendimentos obtidos.

No espectro no IV salientam-se as bandas características das vibrações das ligações CH-alif. (fraca) a 2928 cm⁻¹, das vibrações das ligações C=O a 1765 cm⁻¹ (média) e a 1647 cm⁻¹ (fraca) e por fim, das vibrações das ligações, ArC=C (forte) a 1479 cm⁻¹.

Em relação ao espectro de ¹H-RMN relativo a este composto apresenta todos os sinais esperados para a totalidade dos prótons presentes na molécula. Na zona aromática do espectro observa-se um sinal na forma de duplete de um próton, ao desvio químico de 8,45 ppm, um sinal na forma de multiplete de quatro prótons que surge ao desvio químico de 7,57-7,52 ppm e um último sinal que surge na forma de triplete de um próton ao desvio químico 7,23 ppm. O sinal do grupo C=CH da cadeia polimetínica surge tal como esperado sob a forma de singuleto de um próton ao desvio químico de 5,37 ppm. O sinal que surge no espectro ao desvio químico 4,06 ppm, na forma de singuleto largo de dois prótons, foi atribuído aos prótons do grupo CH₂, ligado diretamente ao átomo de azoto da cadeia alquílica. O sinal do grupo metilo da cadeia *N*-alquílica surgem ao desvio químico 0,90 ppm, na forma de um triplete de três prótons, tal como esperado teoricamente.

Devido à fraca solubilidade do composto **8** nos solventes deuterados usuais (DMSO-*d*₆, CDCl₃, CD₃OD), não foi possível a sua caracterização pelos espectros de ¹H-RMN e ¹³C-RMN.

➤ Método B

Neste método, foram realizadas otimizações no processo de síntese para obtenção do composto **8** (esquema 3.7-método B). O aquecimento da mistura foi regulada com o objetivo de observar a que temperatura o composto solubilizava e a que temperatura se iniciava refluxo. Observou-se que aos 80 °C o composto começou a dissolver e verificou-

se a dissolução completa aos 100 °C e deixou-se a mistura a reagir à temperatura 102 °C, temperatura à qual se verificou início de refluxo, evitando assim, o aumento da temperatura para evitar uma possível degradação do composto. A adição da solução aquosa de HCl 2M foi realizada lentamente, com o objetivo de a neutralização não ser violenta. Obteve-se então, o composto **8**, com um rendimento superior ($\eta = 59 \%$), ao obtido no método A.

➤ Método C

Na tentativa de evitar a degradação do composto de 3-butoxi-4-[(1-hexilquinolin-2(1*H*)-ilideno)metil]-3-ciclobuteno-1,2-diona (**7**), realizou-se a síntese do composto **8** de acordo com o esquema 3.7-método C. A mistura foi colocada a aquecer, até aos 90 °C, temperatura à qual se verificou a dissolução completa do composto e nesta altura, foi adicionado à mistura reacional a solução aquosa de NaOH 40% e deixou-se a reagir à temperatura de 90 °C, sem entrar em refluxo. Neste caso, a adição da solução aquosa de HCl 2M foi controlada, evitando-se assim, adição de HCl em excesso. Os cristais obtidos por este método encontravam-se muito impuros e apesar das tentativas, não foi possível purificá-los. Obteve-se então o composto **8** impuro, com um rendimento muito inferior ($\eta = 29 \%$), ao obtido nos métodos discutidos anteriormente.

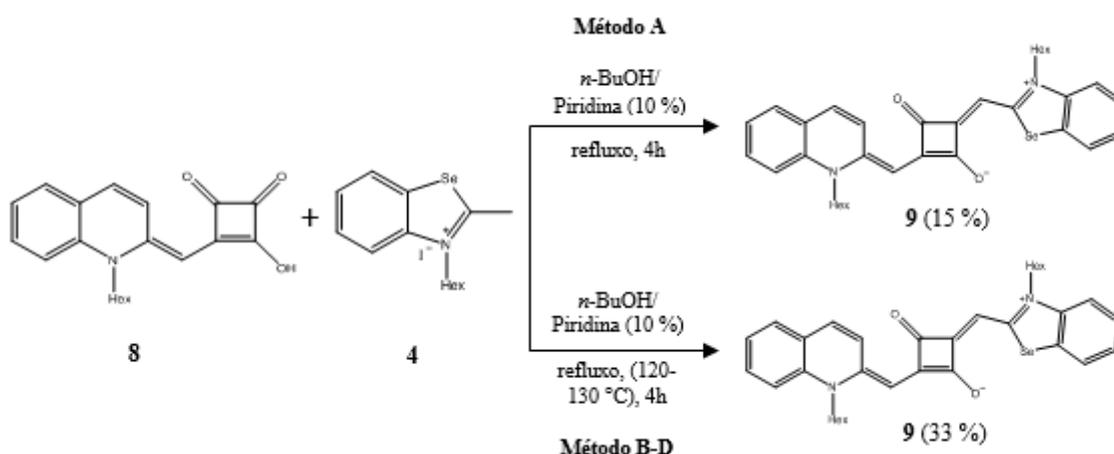
➤ Método D

Neste método, com o objetivo de melhorar o rendimento, sintetizou-se o composto **8**, de acordo com o esquema 3.7-método D. Colocou-se a mistura a aquecer até aos 90 °C, temperatura à qual, se verificou a dissolução completa do composto no método C e nesta altura, foi adicionado a solução aquosa de NaOH 40% e deixou-se a mistura a reagir à temperatura de 80 °C sem entrar em refluxo. Para tratamento da reação e purificação do composto pretendido realizou-se o mesmo procedimento referido no capítulo 2, método C (2.2.1.5.3), e como resultado, obteve-se o composto **8** na forma de cristais avermelhados ligeiramente impuros, com um rendimento muito superior ao obtido nos métodos referidos anteriormente ($\eta = 73 \%$). Isto indica que, após otimizações dos métodos de síntese é possível a obtenção de melhores rendimentos.

3.2.1.6 Síntese do 2-[(3-hexilbenzoselenazole-2(3*H*)-ilideno)metil]-4-[(1-hexilquinolin-1-ilo-2-il)metileno]-3-oxociclobut-1-en-1-olato (**9**)

➤ Método A

A síntese do corante zwitteriônico **9** foi adaptada do método descrito na literatura (Graça *et al.*, 2014), fazendo reagir o composto **8** com o sal quaternário **4** numa mistura de *n*-BuOH/piridina (1:9), a refluxo e sob agitação durante 4 h, tal como está ilustrado no esquema 3.8-método A.



Esquema 3.8 - Síntese do corante esquarílico **9**.

Este foi obtido, após a realização de várias lavagens com éter dietílico/éter de petróleo gelado e algumas recristalizações, como está descrito no capítulo 2, no ponto 2.2.1.6.1, sob a forma de cristais acastanhados, com um rendimento de 15 % e cromatograficamente puro.

Apresenta p.f. 280-281 °C (dec.), com a diferença de 1 °C, o que indica que o composto apresenta elevado grau de pureza, no entanto, este valor não pode ser comparado, uma vez o composto sintetizado é novo logo não existe valores de referência na literatura.

No espectro no IV salientam-se as bandas características das vibrações das ligações Ar-CH (fraca) a 3059 cm⁻¹ e das vibrações das ligações CH-alif. (fraca) a 2926 cm⁻¹, das vibrações das ligações C=O a 1618 cm⁻¹ (média) e por fim, das vibrações das ligações, ArC=C (forte) a 1588 e a 1449 cm⁻¹.

O espectro de ^1H -RMN do composto **9** (figura 3.1) apresenta sinais esperados para a totalidade dos prótons presentes na molécula referida. Na zona aromática do espectro observa-se um sinal na forma de duplete de um próton, ao desvio químico de 9,28 ppm, um sinal na forma de multiplete de quatro prótons que surge ao desvio químico de 7,55-7,49 ppm. Nesta mesma zona observam-se, aos desvios químicos 7,36, 7,27 e 7,03 ppm, três sinais na forma de duplete de um próton cada e dois sinais na forma de triplete de um próton cada que surgem ao desvio químico 7,32 e 7,09 ppm, sendo estes atribuídos aos restantes prótons aromáticos.

Uma vez que o composto é assimétrico, os sinais do grupo $\text{C}=\text{CH}$ da cadeia polimetínica surgem tal como esperado sob a forma de singuleto de um próton a desvio químico diferentes, 6,00 e 5,77 ppm. Os sinais que surgem no espectro aos desvios químicos 4,18 e 4,01 ppm, na forma de triplete de dois prótons cada, foram atribuídos aos prótons dos grupos CH_2 , ligados diretamente aos átomos de azoto das cadeias alquílicas. Os prótons dos dois grupos metilo das cadeias alquílicas de seis carbonos, surgem ao desvio químico 0,95-0,91 ppm, sob a forma de um multiplete de seis prótons.

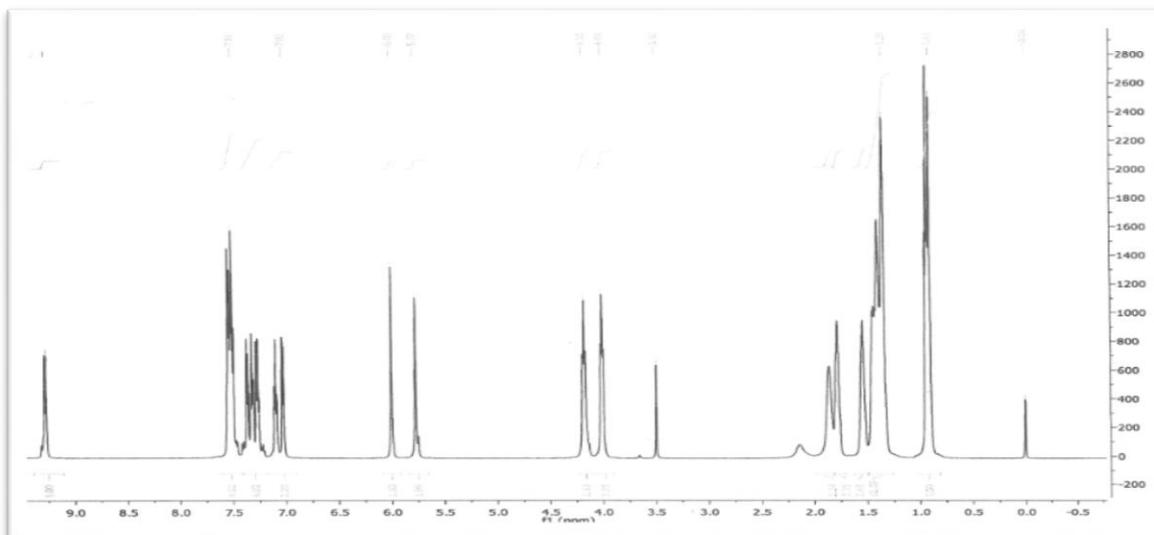


Figura 3.1 - Espectro de ^1H -RMN do composto **9**.

Relativamente ao espectro de ^{13}C -RMN (figura 3.2) este composto apresenta dez sinais correspondentes aos dez carbonos de ligações duplas ligados aos átomos de hidrogénio dos anéis aromáticos, aos desvios químicos de 139,42, 133,61, 131,39, 128,96, 126,96, 126,75, 124,21, 123,54, 114,66 e 112,65 ppm, os quais foram atribuídos aos CH dos anéis aromáticos ($\text{Ar}-\text{CH}$). Os sinais correspondentes aos carbonos da ligação $\text{C}=\text{CH}$ da cadeia polimetínica encontra-se ao desvio químico de 93,01 e 89,07 ppm. Observa-se

a presença de dez sinais correspondentes aos dez grupos CH₂ das cadeias alquílicas aos desvios químicos entre 48,37-22,71 ppm, sendo os que se apresentam a campo mais baixo 48,37 e 46,71 ppm, os carbonos que estão diretamente ligados aos átomos de azoto. Por fim, os dois sinais correspondentes aos grupos metilo das cadeias alquílicas, encontram-se aos desvios químicos 14,16 e 13,15 ppm.

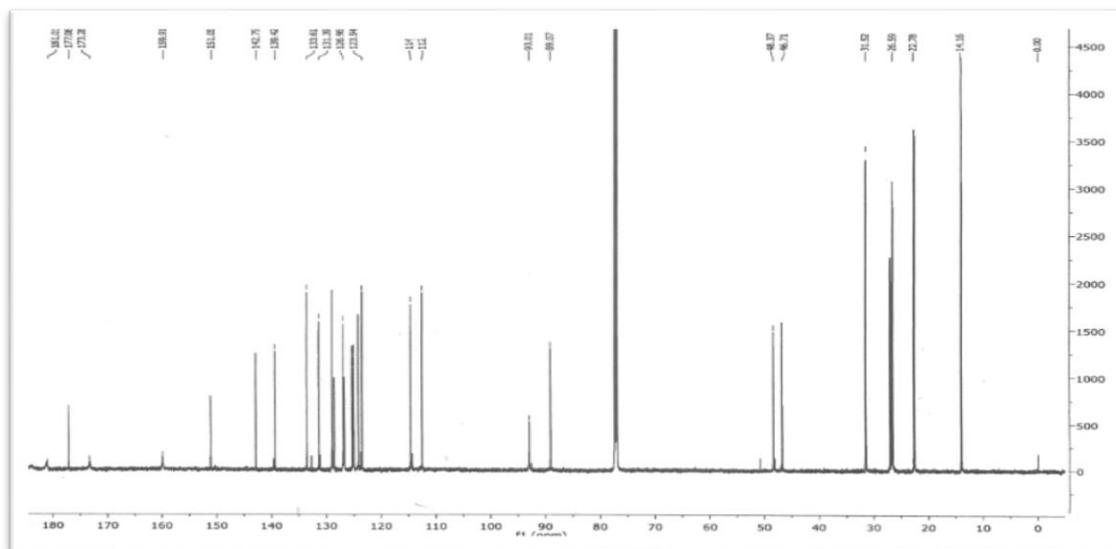


Figura 3.2 - Espectro de ¹³C-RMN do composto **9**.

No que diz respeito ao espectro de EMAR-ESI-TOF, a massa exata encontrada para o composto **9** está de acordo com a estrutura proposta m/z : 586,20943[M]⁺, (C₃₄H₃₈N₂O₂Se⁺, calc. 586.20953).

➤ Método B-D

Nestes métodos, o composto **9**, foi sintetizado pelo método descrito esquema 3.8- método B-D, nos quais a mistura reacional foi colocada a refluxo entre 120-130 °C. No entanto, foram realizadas otimizações no tratamento da mistura reacional e no tratamento do composto bruto obtido, tal como descrito no capítulo 2, nos pontos 2.2.1.6.2, 2.2.1.6.3 e 2.2.1.6.4. Estas otimizações tiveram como objetivo encontrar o melhor método de purificação do composto e para obtenção de melhores rendimentos. No método D, a purificação do composto **9**, foi bastante complexa, no entanto, obteve-se composto cromatograficamente puro, com um rendimento superior ($\eta = 33\%$) aos obtidos nos restantes métodos.

3.2.1.7 Síntese do trifluorometanossulfonato de 3-hexil-2-[(3-[(1-hexil-6-quinolin-2(1*H*)-ilideno)metil]-2-metoxi-4-oxociclobut-2-en-1-ilideno)metil]benzoselenazole-3-io (10)

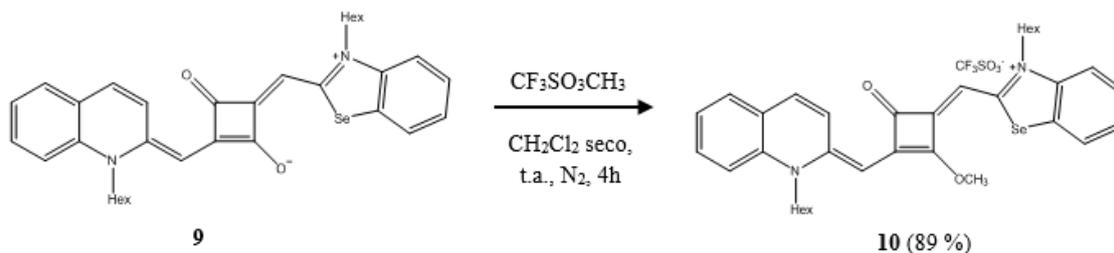
➤ Método A

O derivado *O*-metilado **10**, foi sintetizado segundo a reação de metilação descrita na literatura Reis *et al.*, 2009, fazendo reagir o composto **9** com excesso do agente metilante o $\text{CF}_3\text{SO}_3\text{CH}_3$, (1:3), em CH_2Cl_2 seco, à temperatura ambiente, sob agitação, em atmosfera de azoto (esquema 3.9-metodo B).

Após 4 h de reação verificou-se que esta ainda não estava completa, tendo-se então, adicionado mais 1,5 mL de $\text{CF}_3\text{SO}_3\text{CH}_3$. Após obtenção do composto pretendido este foi guardado à temperatura ambiente e mais tarde verificou-se que o composto estava sob a forma de pasta. Este facto pode ser explicado, devido ao agente metilante ($\text{CF}_3\text{SO}_3\text{CH}_3$) deteriorar na presença de água, pois o átomo de oxigénio da água funcionada como nucleófilo e “ataca” o carbono do grupo CH_3 do agente metilante por uma reação $\text{S}_\text{N}2$ (reação de substituição nucleófila). Como foi adicionado mais 1,5 mL à mistura reacional, este poderia não ter sido bem removido durante o tratamento da mistura reacional e ainda estar presente no composto sólido e acabou por reagir com moléculas de água (da humidade do ar ou pelo facto da fase orgânica não ter sido suficientemente seca com o NaSO_3 anidro) e daí resultar o composto sob a forma de pasta.

➤ Método B

Neste método, realizou-se a síntese do derivado *O*-metilado **10** utilizando o mesmo procedimento de síntese descrito no método anterior, que está representado no esquema 3.9.



Esquema 3.9 - Síntese do corante esquarílico **10**.

Após o tratamento da reação, obtiveram-se cristais de coloração esverdeado com reflexos dourados brilhantes, com um bom rendimento de 89 % e cromatograficamente verificou-se que apresentavam-se suficientemente puros para serem utilizados na etapa seguinte. Este composto é o intermediário crucial para a síntese dos corantes cianícos aminoquarilícos **11**, **12**, **13** e **14**.

O p.f. é 195-200 °C (dec.), com a diferença de 5 °C, que indica que o composto não estava totalmente puro tal como se verificou cromatograficamente. Uma vez o composto sintetizado é novo logo não existe valores de referência na literatura.

No espectro no IV salientam-se as bandas características das vibrações das ligações Ar-CH (fraca) a 3064 cm^{-1} , das vibrações das ligações CH-alif. (fraca) a 2929 cm^{-1} , das vibrações das ligações C=O a 1619 cm^{-1} (fraca) e por fim, das vibrações das ligações, ArC=C (fraca) a 1565 e a 1505 (média) cm^{-1} .

No espectro de ^1H -RMN do composto **10** observam-se sinais correspondentes aos 38 prótons existentes na molécula. É se salientar que este espectro é semelhante ao espectro do seu precursor **9**, sendo a maior diferença observada pela presença do sinal do grupo metilo do grupo OCH_3 , que surge tal como esperado, sob a forma de singuleto de três prótons ao desvio químico de 4,61 ppm. Na zona aromática entre os desvios químicos 8,74 e 7,22 ppm, surgem os sinais correspondentes aos dez prótons aromáticos do composto. Os sinais dos grupos C=CH da cadeia polimetínica surgem sob a forma de dois singuletos de um próton cada, aos desvios químicos de 6,16 e 5,74 ppm.

Os sinais que surge no espectro aos desvios químicos 4,43 e 4,27 ppm, sob forma de um singuleto largo e um tripleto, respetivamente, de dois prótons cada, foram atribuídos aos prótons dos grupos CH_2 , ligados diretamente ao átomo de azoto das cadeias alquílicas. Os restantes prótons dos grupos CH_2 das cadeias referidas anteriormente surgem no espectro sob a forma de quintetos e multipletos entre os desvios químicos de 1,90 e 1,30 ppm. Por fim, os sinais referentes aos prótons metílicos terminais das cadeias alquílicas surgem no espectro sob a forma de dois tripletos de três prótons cada aos desvios químicos 0,93 e 0,88 ppm.

No espectro de ^{13}C -RMN do composto **10**, tal como no espectro do seu precursor **9**, observa-se a presença de dez sinais correspondentes aos CH dos anéis aromáticos (Ar-CH), entre os desvios químicos de 137,60 e 114,46 ppm. Os sinais correspondentes aos carbonos da ligação C=CH da cadeia polimetínica encontra-se ao desvio químico de 92,76 e 89,55 ppm e o sinal do carbono do grupo metoxilo (OCH_3) aparece ao desvio químico de 61,40 ppm. Aos desvios químicos de 49,51 e 47,71 ppm, observa-se os sinais dos

carbonos dos grupos CH₂ que estão diretamente ligados ao átomo de azoto das cadeias alquílicas. Entre os desvios químicos 31,66 e 22,60 ppm surgem os oito sinais referentes aos carbonos dos restantes grupos CH₂ das cadeias referidas anteriormente. Por fim, os dois sinais correspondentes aos grupos metilo das cadeias alquílicas, encontram-se no espectro ao desvio químico de 15,42 e 14,02 ppm.

3.2.2 Síntese dos corantes cianínicos aminoescarílicos assimétricos

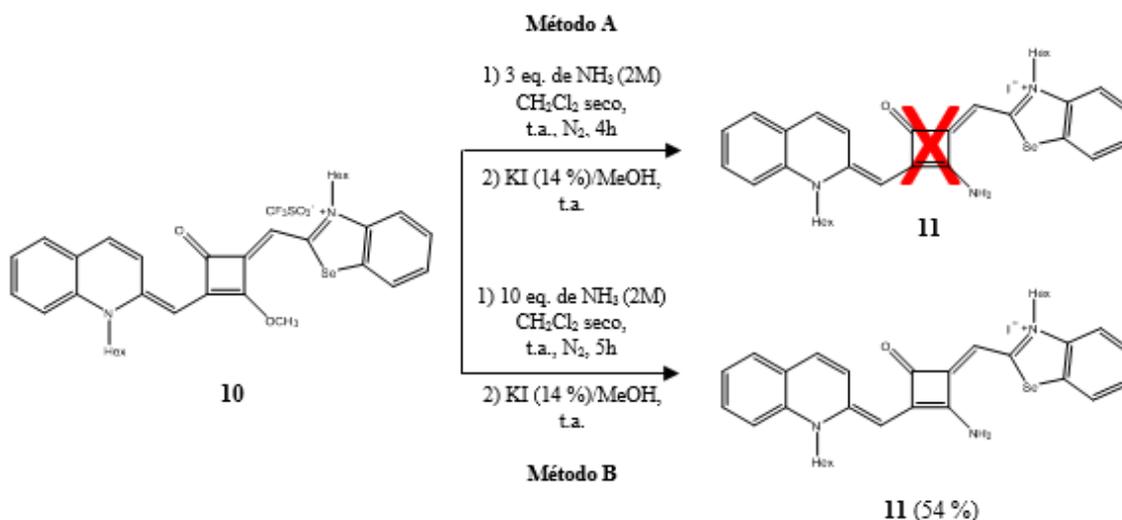
Tal como já foi referido anteriormente, os corantes cianínicos aminoescarílicos assimétricos foram obtidos por reação do derivado *O*-metilado **10** com aminas apropriadas. Estas funcionam como nucleófilos e conseqüentemente o grupo O-CH₃ é substituído pela correspondente amina.

3.2.2.1 Síntese do iodeto de 2-[(2-amino-3-[(1-hexilquinolin-2(1*H*)-ilideno)metil]-4-oxociclobuten-2-en-1-ilideno)metil]-3-hexilbenzoselenazole-3-io (**11**)

➤ Método A

O corante cianínico aminoescarílico **11** foi obtido por reação do corante cianínico escarílico *O*-metilado **10** com uma solução de amónia 2M em MeOH, em CH₂Cl₂ seco. No sentido de aumentar a produção de ¹O₂ o contra-íão CF₃SO₃⁻ dos corantes aminoescarílicos **11-14** foi trocado pelo íão iodeto dissolvendo o produto bruto em MeOH e adicionando igual volume de uma solução aquosa de KI a 14 % (esquema 3.10-método A).

Após tratamento da mistura reacional e obtenção do produto, verificou-se por c.c.f. que os cristais apresentavam uma mancha azul que correspondia ao composto **9**. Embora tenha sido observado por c.c.f. o consumo do material de partida, após o tratamento da mistura reacional, observou-se a formação deste produto que pode estar relacionado com o facto de a reação ainda não estar completa e conseqüentemente ainda existir o derivado *O*-metilado (**10**) no composto obtido e como os cristais foram lavados várias vezes com água, pode ter ocorrido uma reação SN₂.

Esquema 3.10 - Síntese do corante aminosquarílico **11**.

➤ Método B

Neste método, corante cianínico aminosquarílico **11** foi sintetizado utilizando o método de síntese apresentado no esquema 3.10-método B. O processo de síntese foi otimizado, ou seja, no método A foram utilizados 3 eq. de NH₃ e neste procedimento de síntese utilizou-se 10 eq. de NH₃.

Obteve-se então o corante **11** na forma de cristais acastanhados com um rendimento de 54 %, cromatograficamente puro, apresentando p.f. 242-246 °C (dec.). Uma vez que o composto sintetizado é novo não existem valores de referência na literatura.

No espectro no IV deste composto, salientam-se as bandas características das vibrações das ligações N-H do grupo amina (NH₂), fraca a 3210 cm⁻¹ (fr, N-H), das vibrações das ligações Ar-CH (fraca) a 3102 cm⁻¹, das vibrações das ligações CH-alif. (fraca) a 2929 cm⁻¹, das vibrações das ligações C=O (fraca) a 1623 cm⁻¹ e por fim, das vibrações das ligações, ArC=C (fraca) a 1565, 1518 cm⁻¹ e a 1457 (forte) cm⁻¹.

No espectro de ¹H-RMN do composto **11** observam-se sinais correspondentes aos 37 prótons existentes na molécula. Na zona aromática surge um sinal sob a forma de duplete de um próton ao desvio químico 8,96 ppm e os sinais referentes aos restantes prótons aromáticos surgem entre os desvios químicos 8,01 e 7,21 ppm, sob a forma de dupletos e tripletos de um próton cada e dois multipletos de dois e três prótons cada. Os sinais dos dois prótons do grupo amina surgem a desvios químicos diferentes, a 8,79 e 8,68 ppm, sob a forma de singuletos largos. Os sinais do grupo C=CH da cadeia

polimetínica surgem sob a forma de dois singuletos de um próton cada aos desvios químicos de 6,17 e 5,94 ppm.

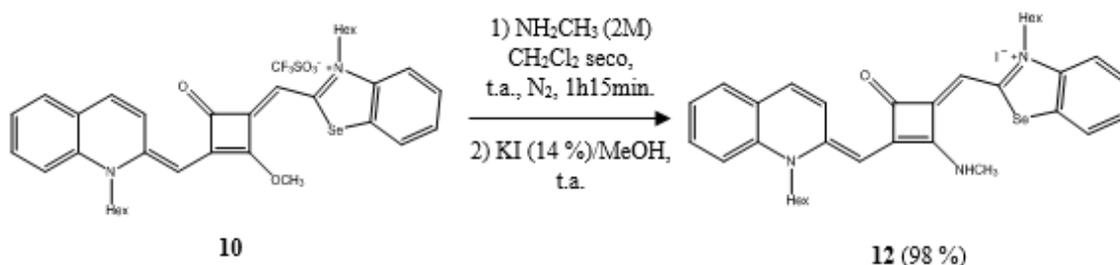
Os sinais referentes aos prótons dos grupos CH₂, ligados diretamente ao átomo de azoto das cadeias alquílicas, surgem no espectro sob forma de um singuleto largo e um tripleto de dois prótons cada, tal como se verificou no espectro do seu derivado *O*-metilado **10**, que neste caso surgem aos desvios químicos 4,37 e 4,15 ppm. Os restantes prótons dos grupos CH₂ das cadeias referidas anteriormente surgem no espectro sob a forma de multipletos e quintetos entre os desvios químicos de 1,76 e 1,32 ppm. Por fim, observa-se o sinal referente aos prótons metílicos terminais das cadeias alquílicas que surgem no espectro sob a forma de um multipletos de seis prótons, ao desvio químico de 0,93 ppm.

No espectro de carbono ¹³C-RMN do composto **10** observa-se a apresenta de dez sinais correspondentes aos CH dos anéis aromáticos (Ar-CH), entre os desvios químicos de 136,10 e 114,14 ppm. Os sinais correspondentes aos carbonos da ligação C=CH da cadeia polimetínica encontra-se ao desvio químico de 93,89 e 89,15 ppm.

Aos desvios químicos de 48,17 e 46,53 ppm, observam-se os sinais dos carbonos dos grupos CH₂ que estão diretamente ligados ao átomo de azoto das cadeias alquílicas. Entre os desvios químicos 31,05 e 22,08 ppm surgem os oito sinais referentes aos carbonos dos restantes grupos CH₂ das cadeias referidas anteriormente. Por fim, o sinal referente aos carbonos dos grupos metilo das cadeias alquílicas surgem ao mesmo desvio químico (13,88 ppm). No que diz respeito ao espectro de EMAR-ESI-TOF, a massa exata encontrada para o composto **11** está de acordo com a estrutura proposta sendo m/z: 586,23254 [M-I]⁺, (C₃₄H₄₀N₃OSe⁺; calc. 586,2334).

3.2.2.2 Síntese do iodeto de 3-hexil-2-[(3-[(1-hexilquinolin-2(1*H*)-ilideno)metil]-2-metilamino-4-oxociclobut-2-en-1-ilidenometil]benzoselenazole-3-io (12)

O corante cianínico aminoescuarílico **12** foi obtido por reação do corante cianínico escuarílico *O*-metilado **10** e uma solução de NH₂CH₃ (2M em THF) (1:3) em CH₂Cl₂ seco. Posteriormente fez-se reagir o produto bruto obtido dissolvido em MeOH e com KI (solução aquosa a 14 %), e deixou-se a reagir nas condições que estão representadas no esquema 3.11.



Esquema 3.11 - Síntese do corante aminoescuarílico **12**.

Obteve-se então o corante **12** na forma de cristais verde-escuro com um rendimento de 98 %, cromatograficamente puro, apresentando p.f. no intervalo 212-215 °C, com uma diferença de 3 °C, o que sugere que o composto está praticamente puro. Uma vez o composto sintetizado é novo não existem valores de referência na literatura.

No espectro no IV deste composto, salientam-se as bandas características das vibrações das ligações N-H do grupo amino, fraca a 3235 cm^{-1} (fr, N-H), das vibrações das ligações Ar-CH (fraca) a 3065 cm^{-1} , das vibrações CH-alif. (fraca) a 2929 (média) cm^{-1} , das vibrações das ligações C=O (forte) a 1624 cm^{-1} e por fim, das vibrações das ligações ArC=C (forte) a 1565 e a 1454 cm^{-1} .

O espectro de $^1\text{H-RMN}$ do composto **12** é muito diferente do seu análogo **11**, verificando-se o dobro do número de sinais, o que indica que neste caso, há restrição da rotação do grupo NHCH_3 devido ao carácter parcial da ligação dupla entre o átomo de azoto e o átomo de carbono do anel central de quatro membros, o que provoca assimetria molecular, podendo-se verificar sinais correspondentes a duas conformações do composto, o que não se verificou nos espectros do análogos **9-11**. Este facto também foi observado por Santos *et al.*, 2010 em corantes cianínicos aminoescuarílicos simétricos com o grupo NHCH_3 e, por Fagundes, 2013 em corantes cianínicos aminoescuarílicos assimétricos. No espectro do composto **12** observam-se todos os sinais dos 42 prótons presentes no composto, mas em duplicado, uma vez que a molécula para além de sofrer impedimento de rotação da ligação C-N, também apresenta assimetria. Na zona aromática do espectro entre os desvios químicos 8,96 e 7,18 ppm surgem os sinais correspondentes aos vinte prótons (dez prótons de cada conformação adquirida pela molécula), sob a forma de dupletos de um próton cada ao desvio químico de 8,96 e 8,08 ppm; duplete largo de um próton ao desvio químico de 8,79 ppm; multipletos de dois prótons aos desvios químicos de 8,89-8,86 e 7,96-7,93; de quatro prótons aos desvios químicos de 7,90-7,82 e 7,51-7,40 ppm e sob a forma de tripletos de dois prótons ao desvio químico de 7,77 e de um próton aos desvios químicos 7,70, 7,23 e 7,18 ppm. Contrariamente ao que se

observa nos espectros dos análogos **9-11**, verifica-se no espectro de ^1H -RMN deste composto a presença de quatro sinais que surgem sob a forma de singuletos de um próton cada, aos desvios químicos de 6,14, 6,06, 5,93 e 5,84 ppm, sendo atribuídos aos prótons $\text{C}=\text{CH}$ da cadeia polimetínica, corroborando a hipótese da existência das duas conformações possíveis da molécula. O mesmo não se verificou nos análogos **9-11**, onde apenas surgem dois sinais sob a forma de singuletos de um próton cada.

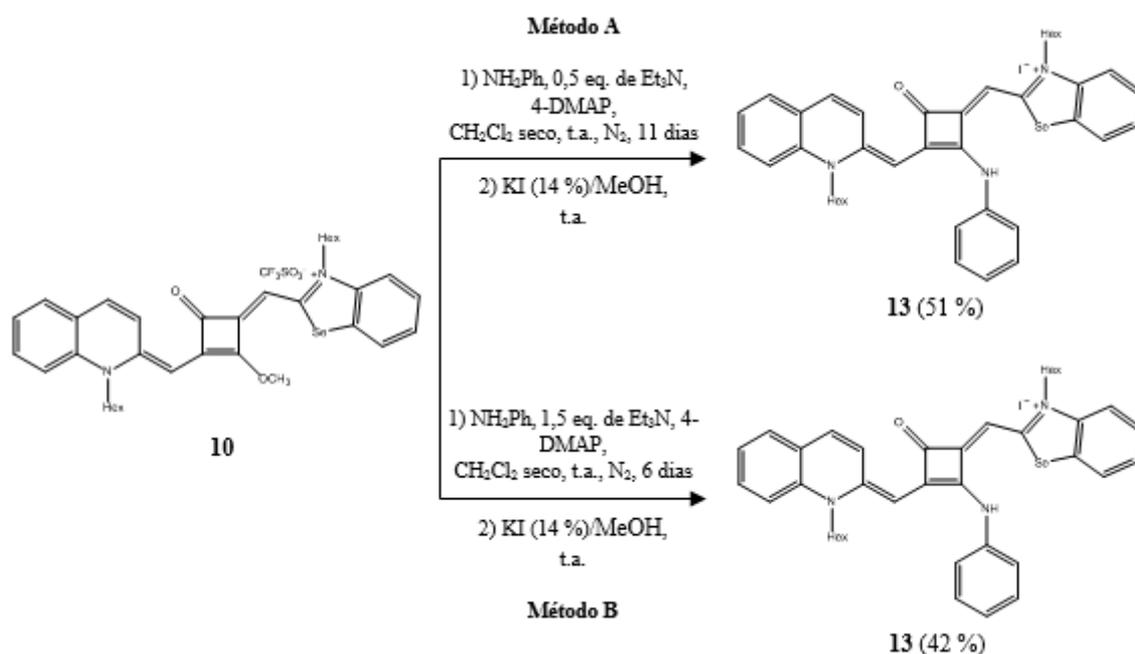
Os quatro sinais referentes aos prótons dos grupos CH_2 , ligados diretamente ao átomo de azoto das cadeias alquílicas, surgem no espectro sob forma de um singuleto largo de quatro prótons, ao desvio químico de 4,34 ppm e sob a forma de tripletos de dois prótons cada, aos desvios químicos de 4,21 e 4,13 ppm. Ao desvio químico de 3,29 ppm surge um sinal sob a forma de um singuleto de três prótons correspondentes aos prótons do grupo NHCH_3 de uma conformação e ao desvio químico de 3,28 ppm surge outro sinal também ele sob a forma de singuleto de três prótons, que corresponde aos prótons do grupo NHCH_3 da outra conformação. O sinal referente aos prótons metílicos terminais das cadeias alquílicas surgem no espectro sob a forma de um multipletto de doze prótons (seis de cada conformação), ao desvio químico de 0,89-0,83 ppm.

No espectro de carbono ^{13}C -RMN do composto **12** observa-se os vinte sinais correspondentes aos CH dos anéis aromáticos (Ar-CH), entre os desvios químicos de 136,38 e 114,19 (Ar-CH) ppm, referente à hipótese de existência de duas conformações. Os sinais correspondentes aos carbonos da ligação $\text{CH}=\text{C}$ da cadeia polimetínica encontram-se ao desvio químico de 94,60, 94,19, 90,06 e 89,50 ppm. O aparecimento destes sinais em duplicado corrobora mais uma vez a hipótese da existência de duas conformações da molécula. Aos desvios químicos de 48,56 e 48,43, observa-se os sinais dos carbonos dos grupos CH_2 que estão diretamente ligados ao átomo de azoto das cadeias alquílicas. Os sinais correspondentes aos carbonos dos grupos NHCH_3 surgem aos desvios químicos 30,42 e 30,23 ppm. Entre os desvios químicos 46,89 e 22,08 ppm surgem quinze sinais referentes aos carbonos dos restantes grupos CH_2 das cadeias alquílicas. Por fim, os sinais referente aos carbonos dos grupos metilo das cadeias alquílicas surgem também em duplicado (dois grupos CH_3 de cada conformação), aos desvios químicos 14,04, 13,99, 13,97 e 13,95 ppm. No que diz respeito ao espectro de EMAR-ESI-TOF, a massa exata encontrada para o composto **12** está de acordo com a estrutura proposta sendo m/z : 600,24826 $[\text{M-I}]^+$, ($\text{C}_{35}\text{H}_{42}\text{N}_3\text{OSe}^+$, calc. 600,24900).

3.2.2.3 Síntese do iodeto de 3-hexil-[(3-(1-hexilquinolin-2(1H)-ilideno)metil]-4-oxo-2-[(fenilamino)ciclobut-2-en-1-ilideno)metil]benzoselenazole-3-io (13)

➤ Método A

O corante cianínico aminoesquarílico **13** foi sintetizado fazendo reagir o corante cianínico esquarílico *O*-metilado **10** com 5 eq. de NH₂Ph, 0,5 eq. de Et₃N e 0,5 eq. de 4-DMAP em CH₂Cl₂ seco. Tal como os análogos aminoesquarílicos **11** e **12**, o produto bruto obtido foi dissolvido em MeOH tendo-se adicionado igual volume de uma solução aquosa de KI a 14%, para que ocorresse a troca do contra-íon CF₃SO₃⁻ por I⁻ (esquema 3.12- método A).



Esquema 3.12 - Síntese do corante aminoesquarílico **13**.

O corante **13** foi então obtido após a realização de algumas recristalizações (descritas no capítulo 2, no ponto 2.2.2.3.1), na forma de cristais acastanhados com um rendimento de 50 %, cromatograficamente puro, apresentando p.f. 223-226 °C (dec.). Uma vez o composto sintetizado é novo não existe valores de referência na literatura.

No espectro no IV deste composto, salientam-se as bandas características das vibrações das ligações Ar-CH (fraca) a 3097 cm⁻¹, das vibrações das ligações CH-alif. (fraca) a 2926 cm⁻¹, das vibrações das ligações C=O (fraca) a 1623 cm⁻¹ e por fim, das

vibrações das ligações, ArC=C (fraca) 1538 e a 1455 (média) cm^{-1} . Devido à fraca solubilidade do composto **13** nos solventes deuterados usuais (DMSO- d_6 , CDCl_3 , CD_3OD) não foi possível a obtenção dos espectros de ^1H -RMN e ^{13}C -RMN.

No que diz respeito ao espectro de EMAR-ESI-TOF, a massa exata encontrada para o composto **13** e está de acordo com a estrutura proposta sendo m/z : 662,26372 $[\text{M-I}]^+$, ($\text{C}_{40}\text{H}_{44}\text{N}_3\text{OSe}^+$, calc. 662,26473).

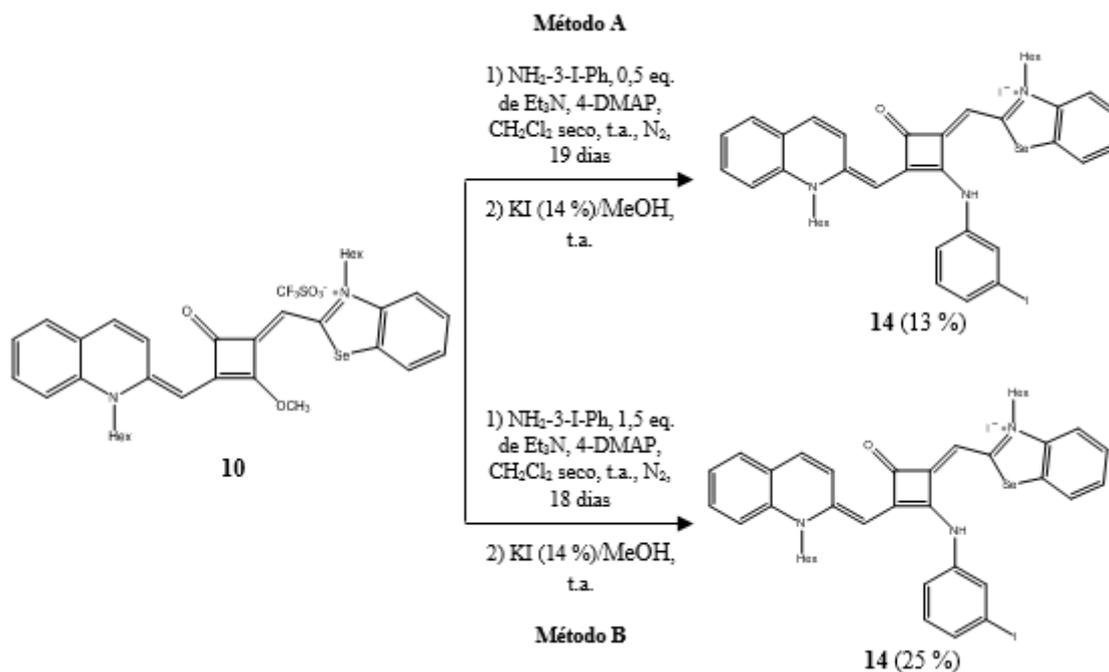
➤ Método B

Neste método, o composto **13** foi sintetizado de acordo com o esquema 3.12-método B, na qual foram utilizados 1,5 eq. de Et_3N no processo de síntese. Nestas condições verificou-se o término da reação após 6 dias de reação e para a purificação dos cristais foi apenas necessário a realização de duas recristalizações, utilizando o mesmo procedimento descrito no método A do capítulo 2, no ponto 2.2.2.3.1. Contudo o rendimento obtido nestas condições foi ligeiramente mais baixo ($\eta = 42\%$), relativamente ao obtido no método A.

3.2.2.4 Síntese do iodeto de iodeto de 3-hexil-2-[3-(1-hexilquinolin-2(1H)ilideno)metil]-2-[(3-iodofenil)amino]-4-oxociclobut-2-en-1-ilideno)metil]benzoselenazole-3-io (**14**)

➤ Método A

O corante cianínico aminoescuarílico **14** foi obtido fazendo-se reagir o corante cianínico escuarílico *O*-metilado **10**, com NH_2 -3-I-Ph, Et_3N e 4-DMAP em CH_2Cl_2 seco. O produto bruto obtido foi dissolvido em MeOH tendo-se adicionado igual volume de uma solução aquosa de KI a 14 %, e a fim de trocar o contra-íon CF_3SO_3^- por I^- (esquema 3.13-método A).

Esquema 3.13 - Síntese do corante aminoescarfilico **14**.

O corante **14** foi então obtido após a realização de uma recristalização e lavagem com acetonitrilo, tal como descrito no capítulo 2, no ponto 2.2.2.4.1), na forma de cristais acastanhados com um rendimento de 13 %, cromatograficamente puro, apresentando p.f. 260-264 °C (dec.). Uma vez que o composto sintetizado é novo não existe valores de referência na literatura.

No espectro no IV deste composto, salientam-se as bandas características das vibrações das ligações Ar-CH (fraca) a 3068 cm^{-1} , das vibrações das ligações CH-alif. (fraca) a 2928 cm^{-1} , das vibrações das ligações C=O (fraca) a 1623 cm^{-1} e por fim, das vibrações das ligações, ArC=C (fraca) 1564 e a 1453 cm^{-1} . Há semelhança do seu análogo **13**, também não foi possível a caracterização do composto **14** pelos espectros de ^1H -RMN e de ^{13}C -RMN devido à fraca solubilidade do composto **14** nos solventes deuterados usuais ($\text{DMSO-}d_6$, CDCl_3 , CD_3OD). No que diz respeito ao espectro de EMAR-ESI-TOF, a massa exata encontrada para o composto **14** está de acordo com a estrutura proposta sendo m/z : 788,15896 $[\text{M-I}]^+$, ($\text{C}_{40}\text{H}_{43}\text{IN}_3\text{OSe}^+$, calc. 788,16137).

➤ Método B

Neste método, o composto **14** foi sintetizado de acordo com o esquema 3.13- método B, na qual foram utilizados 1,5 eq. de Et_3N no processo de síntese. Nestas

condições verificou-se o término da reação após 18 dias de reação e apesar dos cristais terem sido sujeitos a quatro recristalizações, tal como descrito no método B do capítulo 2, no ponto 2.2.2.4.2, foi obtido um melhor rendimento ($\eta = 25\%$), relativamente ao obtido no método A.

3.3 Espectros no VIS dos corantes cianínicos esquarílicos assimétricos derivados da quinaldina e do benzoselenazole

Para a obtenção dos espectros de absorção no Vis quantitativos (figura 3.3), prepararam-se soluções com os corantes cianínicos esquarílicos **9-14** sintetizados, à concentração de $0,5 \times 10^{-6} \mu\text{M}$, exceto para o composto **10** que é qualitativo, utilizando como solvente o DMSO.

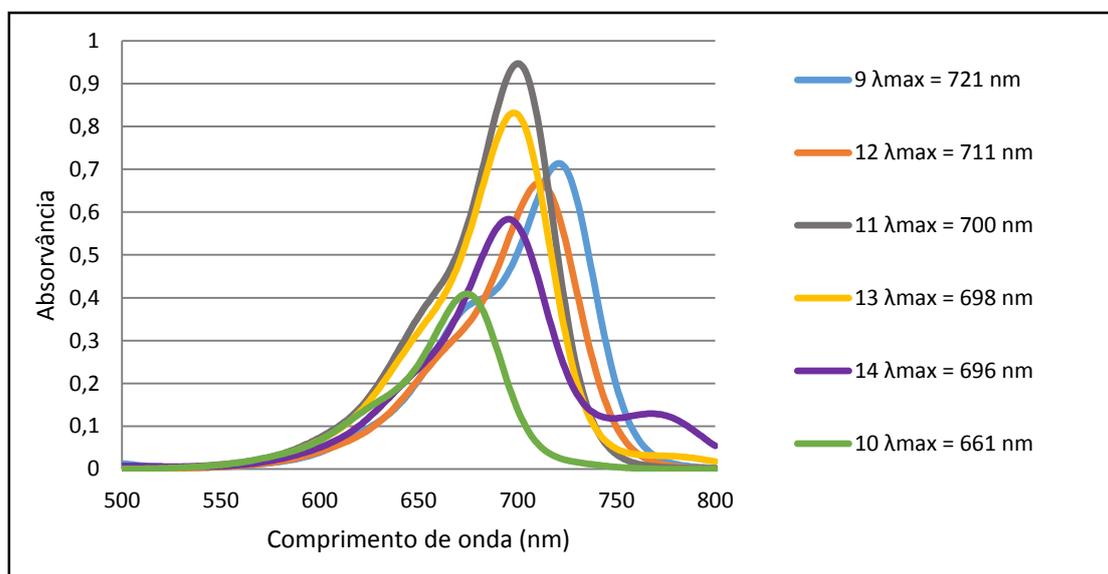


Figura 3.3 - Espectros de absorção no Vis dos corantes **9-14** em DMSO à concentração de $0,5 \times 10^{-6} \mu\text{M}$, exceto o corante **10** (qualitativo).

A realização destes espectros tem como objetivo verificar se estes compostos absorvem ou não na chamada “janela fototerapêutica”, situada entre os 600 a 850 nm (Pervaiz & Olivo, 2006; Agostinis *et al.*, 2011; Yano *et al.*, 2011). Tal como se pode observar na figura 3.3, os espectros apresentam bandas estreitas e intensas, e neste solvente, os corantes apresentam valores para o c.d.o. máx. de absorção, que variam entre 661 e 721 nm, o que indica, que estes corantes apresentam um dos requisitos mais importantes para que possam ser potenciais FSs a utilizar na PDT no capítulo 1- Introdução, tal como descrito na literatura (capítulo 1). Da análise da figura 3.3, verifica-se que em relação ao composto zwitteriônico **9**, todos os compostos apresentam um desvio

hipsocrómico, sendo este mais acentuado para o *O*-metilado **10**. Os compostos **11**, **13** e **14** apresentam c.d.o. máx. de absorção muito próximos.

Realizaram-se, ainda, soluções dos corantes cianínicos esquarílicos **9**, **11-14** em meio de cultura (DMEM). Os espectros Vis qualitativos (figura 3.4), obtidos nestas condições fornecem o c.d.o. máx. a que os compostos absorvem quando em contacto com o meio de cultura, de modo a que seja possível a determinação do c.d.o. ao qual os compostos vão absorver radiação emitida por LEDs.

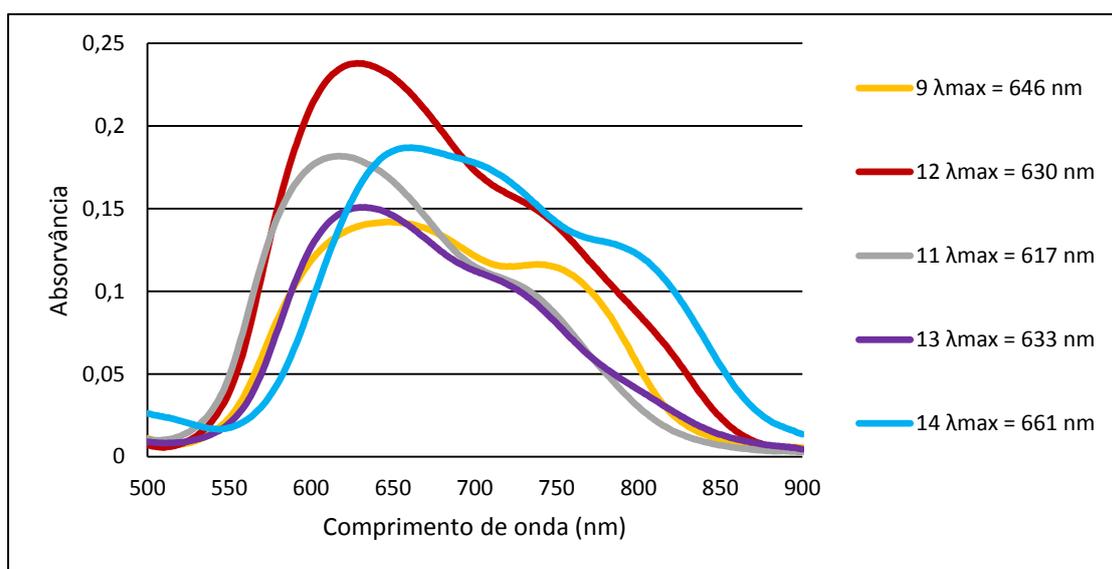


Figura 3.4 - Espectros de absorção no Vis dos corantes **9**, **11-14** em meio de cultura (DMEM).

Pela análise da figura 3.4, verifica-se que estes compostos, quando dissolvidos em meio DMEM, possuem um comportamento muito diferente, relativamente ao que se observa quando dissolvidos em DMSO, como se pode verificar na figura 3.3. Neste caso, as bandas de absorção são mais largas e apresentam dois picos de $\lambda_{\text{máx}}$. e os valores de $\lambda_{\text{máx}}$. dos compostos **9**, **11-14**, apresentam-se mais baixos relativamente aos valores de $\lambda_{\text{máx}}$ observados na figura 3.3. Este facto pode ser justificado devido à elevada propensão à formação de agregados, num solvente mais polar Halkiotis e colaboradores (1997) observou a partir da introdução de ftalocianinas tetrassulfonadas em PBS, a formação de dois picos de $\lambda_{\text{máx}}$. e também verificou a descida dos valores de absorvância para cerca de metade quando dissolvidos em metanol. Também podemos observar que os compostos **11-14** apresentam um efeito batocrómico em relação ao composto zwitteriónico **9**, sendo este efeito mais acentuado para o composto **12**.

Com base nos valores obtidos e apresentados na figura 3.4, determinou-se que o c.d.o. dos LEDs a utilizar para irradiação das células seriam de 630 para os compostos **9**, **11-13** e 660 nm para o composto **14**. Deste modo procedeu-se à construção do sistema de LEDs apropriados para este trabalho experimental.

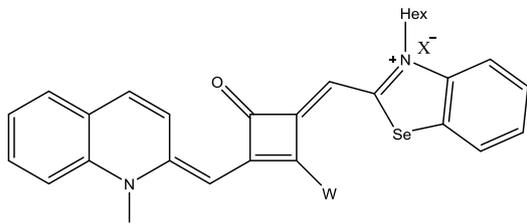
3.4 Avaliação da capacidade de formação de oxigénio singuleto (1O_2) por parte dos corantes cianínicos esquarílicos assimétricos sintetizados

Como já referido no capítulo 1 (4.2), considera-se que, na PDT, a formação de 1O_2 , após ativação de um corante (conhecido como FS), por uma luz visível de c.d.o. específico do espectro de absorção do FS (Maisch, 2007) é considerado a principal espécie citotóxica formada durante o processo fotodinâmico (Konan, 2002; Santos *et al.*, 2003; Yano *et al.*, 2011) responsável pela morte celular (Agostinis *et al.*, 2011; Yano *et al.*, 2011; Nawalanya *et al.*, 2012; Wan & Lin, 2014).

Deste modo, procedeu-se à avaliação da capacidade de formação de 1O_2 por parte do corante esquarílico zwitteriónicos **9** e dos corantes aminoesquarílicos **11-14** sintetizados, de forma a tentar perceber qual o seu potencial para aplicação em PDT.

Na tabela 3.1, estão representados os valores do rendimento quântico ($\Phi\Delta$) na formação de 1O_2 de cada um dos corantes cianínicos esquarílicos assimétricos sintetizados.

Tabela 3.1 – Rendimentos quânticos de formação de oxigénio singuleto por parte dos compostos cianínicos esquarílicos assimétricos sintetizados.

<i>Estrutura do Composto</i>	<i>Nº do composto</i>	<i>X⁻</i>	<i>W</i>	<i>$\Phi\Delta$</i>
	9	-	O ⁻	0,03
	11	I	NH ₂	0,04
	12	I	NHMe	0,05
	13	I	NHPh	0,06
	14	I	3-I-NHPh	0,09

Tal como previsto, o corante **9** apresenta um menor $\Phi\Delta$ de formação de 1O_2 , uma vez que não apresenta na sua estrutura nenhum átomo de iodo. A introdução de grupos amino no anel esquarílico de quatro membros aumentou ligeiramente o $\Phi\Delta$ de formação

de $^1\text{O}_2$, no entanto, o valor mais elevado registado, verifica-se para o corante **14** ($\Phi\Delta=0.09$), o qual apresenta um átomo de iodo no anel de benzeno. Este facto era espectável, pois de todos os corantes sintetizados, o composto **14** 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 $^1\text{O}_2$ (Avirah *et al.*, 2012). Contudo, os valores obtidos são francamente mais baixos do que os previstos uma vez que estes corantes possuem na sua estrutura átomos de selénio e, devido ao efeito do átomo pesado, estes compostos deveriam apresentar um $\Phi\Delta$ de formação de $^1\text{O}_2$ maior. Friães, em 2015, determinou o $\Phi\Delta$ na formação de $^1\text{O}_2$ para corantes esquarílicos assimétricos derivados de benzotiazole e quinaldina na gama dos 0,03-0,11, compostos análogos aos sintetizados neste trabalho. Para o composto zwitteriónico obteve um valor $\Phi\Delta$ de 0,03, valor este, que é igual ao registado para o composto **9** sintetizado neste trabalho. Para o corante cianínico aminoesquarílico $\text{W}=\text{NH}_2$ obteve um valor de $\Phi\Delta$ de 0.05, valor ligeiramente superior ao determinado para o composto **11**, no entanto, para o composto $\text{W}=\text{NHMe}$ obteve um valor de $\Phi\Delta$ ligeiramente mais baixo ($\Phi\Delta=0,04$) comparativamente ao composto **12**. Para os compostos $\text{W}=\text{NHPh}$ e 3-I-NHPH obteve valores superiores de $\Phi\Delta$ de formação de $^1\text{O}_2$, (0,06 e 0,11, respetivamente) relativamente aos compostos **13** e **14**. A diferença de resultados poderá ser explicada pela diferença do átomo presente no anel de cinco membros. Resultados semelhantes, mas com valores mais elevados de $\Phi\Delta$ de formação de $^1\text{O}_2$ foram encontrados na literatura. Em 2013, Fagundes determinou o $\Phi\Delta$ de formação de $^1\text{O}_2$, para corantes esquarílicos assimétricos derivados de benzoselenazole e 6-iodobenzotiazole, rendimentos que variam entre 0,14-0,26 e para um corante esquarílico assimétrico derivado do benzolenazole e benzotialole ($\Phi\Delta=0,02$). Tal como se verifica neste estudo os compostos zwitteriónicos apresentam os valores mais baixos de $\Phi\Delta$ de formação de $^1\text{O}_2$ (0,14 e 0,02). A introdução de grupos amino no anel central de quatro membros aumenta ligeiramente $\Phi\Delta$ sendo o valor mais acentuado quando se introduziu a amina primária, contrariamente ao que se observa para o composto **11** e **12**. O composto $\text{W}=\text{3-I-NHPH}$, tal como o composto **14**, apresenta o valor de $\Phi\Delta$ de formação de $^1\text{O}_2$ mais elevado relativamente aos restantes compostos. Como todos os compostos sintetizados por Fagundes (2013) apresentam um átomo de selénio e um átomo de enxofre um em cada anel de cinco membros e apresentam um átomo de iodo na sua estrutura, resultaram $\Phi\Delta$ superiores o que confirma mais uma vez que a introdução de

átomos pesados resulta num ISC mais eficiente e consequentemente melhores valores de $\Phi\Delta$ de formação de 1O_2 (Avirah *et al.*, 2012).

3.5 Avaliação do potencial fototerapêutico dos corantes cianínicos esquarílicos e aminoesquarílicos assimétricos em células MCF-7 e BT-474

3.5.1 Efeito do tempo de irradiação e do tempo de exposição dos compostos após irradiação nas células MCF-7

A adição das soluções suplementadas com os corantes foi realizada de acordo com ao descrito e representado na tabela 2.2 do capítulo 2 (2.3.4.2). Após 24 h de incubação das células com os compostos, estas foram submetidas a irradiação com LEDs centrados a 630 nm (para os compostos **9**, **11**, **12** e **13**) e centrados a 660 nm (para o composto **14**), durante 7 e 14 minutos, mantendo uma caixa sem irradiação (controlo). As filas de A a D (n= 4 poços por condição) foram lavadas, 1 h após irradiação, com PBS (2 vezes) e depois adicionou-se meio de cultura sem soro contendo A.B. (10 % v/v). As linhas E a H (n= 4 poços por condição) foram lavadas 24 h após irradiação (PBS 2x, adição de A.B. (10 % v/v) após última lavagem). Este procedimento foi realizado com o objetivo de avaliar o efeito do tempo de exposição ao composto irradiado, depois de ser excitado por luz a um determinado c.d.o., na viabilidade celular (% de controlo). Assim, a análise dos gráficos foi feita comparando os resultados para as células lavadas 1 h após a irradiação (1h) e lavadas 24 h após a irradiação (24h) e pela comparação dos tempos de irradiação (7 e 14 minutos) com o controlo não irradiado (0 minutos). As células não irradiadas foram manipuladas da mesma maneira, para minimizar algum efeito de alteração de temperatura ou pH (pelo facto da sua retirada da incubadora de CO₂) estas foram mantidas no escuro, fora da incubadora, durante 14 minutos.

3.5.1.1 Efeito do corante cianínico esquarílico 9

Para que um corante seja um bom FS, para aplicação em PDT do cancro, deve apresentar uma toxicidade mínima no escuro e apenas desenvolver atividade citotóxica quando ativado por luz, a um c.d.o. apropriado (Nyman & Hynninen, 2004; Ribeiro *et al.*, 2005; Pervaiz & Olivo, 2006; Agostinis *et al.*, 2011; Yano *et al.*, 2011; Avirah *et al.*, 2012).

De acordo com a figura 3.5, nas células MCF-7 não irradiadas (figura 3.5 A), podemos observar que o composto **9** à concentração de 10,0 μM induz uma elevada diminuição da viabilidade celular para 1 e 24 h de exposição ao composto. Assim, o composto **9** induz elevada toxicidade a 10,0 μM , no escuro e nas células irradiadas a 7 (figura 3.5 B) e 14 minutos (figura 3.5 C). O corante **9** apesar de reduzir ligeiramente a viabilidade celular às concentrações de 0,1, 1,0 e 5,0 μM , não é considerado citotóxico no escuro, uma vez que a toxicidade induzida varia entre 10 e 20 % da viabilidade celular do controlo, e segundo as normas GRAS Status (Generally Recognized as Safe) está dentro dos limites aceitáveis para que um composto se considere seguro (International Organization for Standardization, 2009).

Nas células irradiadas durante 7 minutos (figura 3.5 B), para a concentração de 5,0 μM , verifica-se uma redução da viabilidade celular idêntica à dos resultados no escuro (figura 3.5 A), para a mesma concentração. Contudo, a redução da viabilidade é mais notória nas células irradiadas durante 14 minutos (figura 3.5 C). Ainda na figura 3.5 B podemos observar que, para a concentração de 0,1 e 1,0 μM , a irradiação durante 7 minutos não foi eficaz em incrementar a toxicidade celular como seria de esperar.

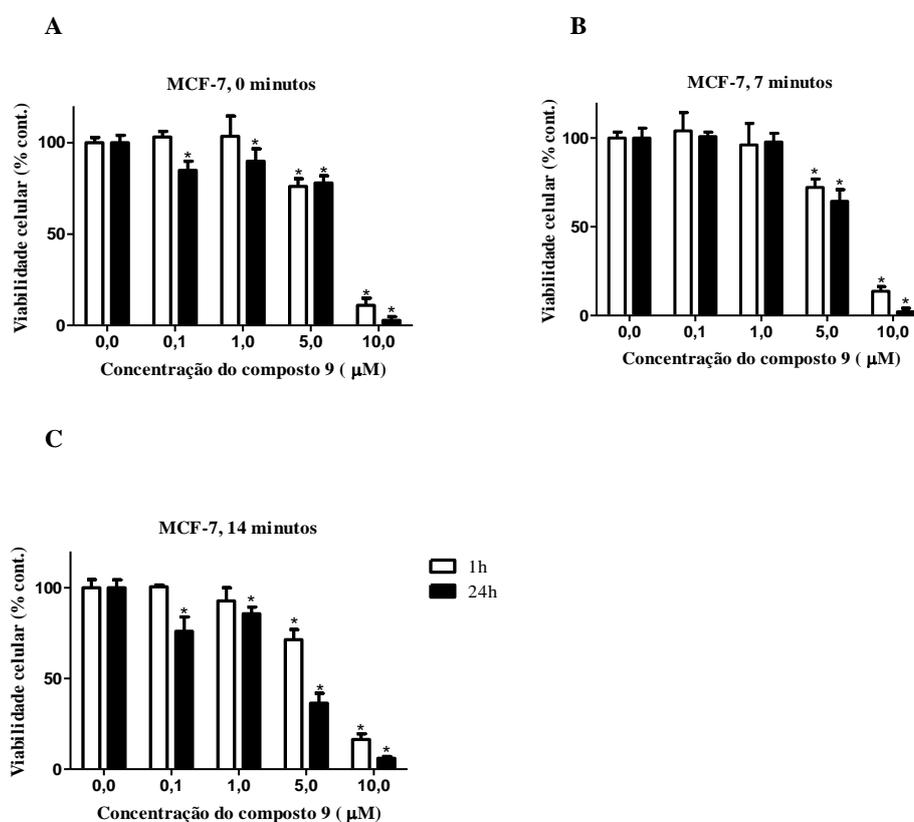


Figura 3.5 - Viabilidade celular (% de controlo) em função da concentração do corante **9**, registada em células MCF-7 sem irradiação (A), com irradiação por 7 minutos (B) e 14 minutos (C). Leituras efetuadas 1 h e 24 h após irradiação das células pré-incubadas com o corante. Valores referem-se à média \pm SD (n= 4). (* diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) comparadas relativamente ao controlo, do mesmo ensaio).

Assim, podemos constatar que o composto **9** não preenche um dos requisitos mais importantes para a escolha de um bom FS. Apesar de o composto **9** não ser considerado citotóxico no escuro às concentrações de 0,1; 1,0 e 5,0 μM , este não é um bom FS, porque na gama em que não é citotóxico no escuro a irradiação não aumentou a toxicidade deste.

3.5.1.2 Efeito do corante cianínico aminoescarilico **11**

Para o composto **11**, nas células MCF-7 não irradiadas (figura 3.6 **A**), verificou-se toxicidade quase total para a concentração de 5,0 μM e total para 10,0 μM . Com 5,0 μM de composto e 1 h de contacto após irradiação, reduziu significativamente ($p < 0,05$) a viabilidade para aproximadamente 20 % do controlo (redução de 80 %), o que indica elevada toxicidade no escuro para estas concentrações, pois segundo as normas GRAS Status, o corante é considerado tóxico a esta concentração, uma vez que reduz a viabilidade celular em mais de 30 % (International Organization for Standardization, 2009). Para as concentrações de 0,1 e 1,0 μM , observa-se um decréscimo significativo ($p < 0,05$) da viabilidade celular em relação ao controlo para o ensaio de 24 h de exposição ao composto, no valor de cerca 10 % de viabilidade para 0,1 μM e de cerca 30 % para 1,0 μM .

Na figura 3.6 **B** e **C**, células irradiadas durante 7 e 14 minutos, respetivamente, para 0,1 e 1,0 μM verifica-se uma redução da viabilidade celular relativamente aos resultados no ensaio no escuro (figura 3.6 **A**). Esta redução de viabilidade é mais notória, nas células irradiadas durante 14 minutos (figura 3.6 **C**), para a concentração de 0,1 e 1,0 μM , observando-se à concentração de 1,0 μM uma viabilidade de 5 % do controlo (95 % de redução), para os ensaios de 1 h e 24 h de exposição das células ao composto após irradiação.

Para a concentração de 0,1 μM observa-se uma redução de viabilidade menor relativamente à concentração de 1,0 μM , cerca de 60 % do controlo (40 % de redução) para o ensaio de 1 h de exposição ao composto e cerca de 40 % do controlo (60 % de redução) para 24 h.

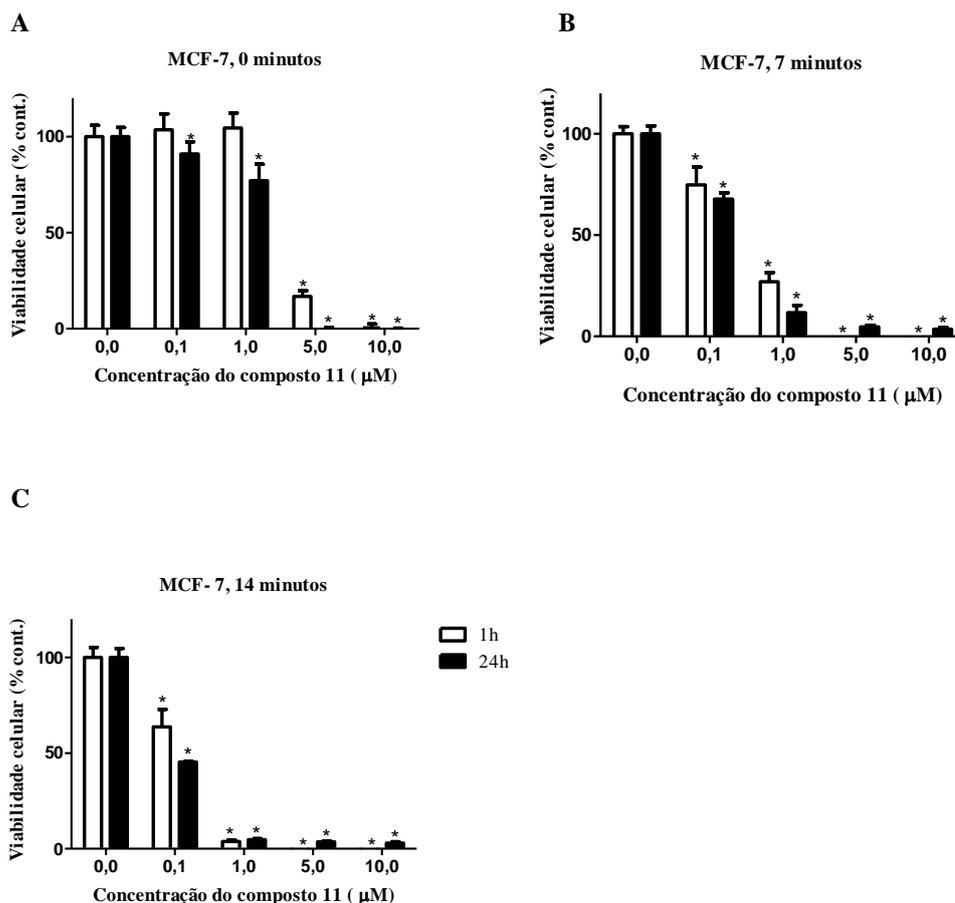


Figura 3.6 - Viabilidade celular (% de controlo) em função da concentração do corante **11**, registada em células MCF-7 sem irradiação (**A**), com irradiação por 7 minutos (**B**) e 14 minutos (**C**). Leituras efetuadas 1 h e 24 h após irradiação das células pré-incubadas com o corante. Valores referem-se à média \pm SD (n= 4). (* diferenças estatisticamente significativas (p<0,05) comparadas relativamente ao controlo, do mesmo ensaio).

Após a análise, pode concluir-se que a toxicidade do composto **11** depende do tempo de irradiação (sendo mais eficaz aos 14 minutos), do tempo de exposição das células MCF-7 ao composto após irradiação e da concentração do composto. Assim, este composto tem um elevado potencial para ser usado como FS em PDT do cancro, nas seguintes condições: usar a concentração de 1,0 μ M; o tempo de exposição do composto **11** após irradiação deve ser 1 h, uma vez que pela análise do gráfico, à concentração de 1,0 μ M, não apresenta toxicidade no escuro no ensaio de 1 h de exposição do composto após irradiação e por fim, o tempo de radiação a que o composto será eficaz aos 14 minutos pois apresenta um elevado poder de toxicidade (redução da viabilidade cerca de 5 % do controlo (95 % de redução)).

3.5.1.3 Efeito do corante cianínico aminoesquarílico 12

Para exposição ao composto **12**, as células MCF-7 não irradiadas (figura 3.7 **A**) apresentam para as concentrações mais elevadas (5,0 e 10,0 μM) perda total da viabilidade celular. Na concentração de 1,0 μM , para o ensaio de 1 h de exposição das células ao composto (1 h após retirada da caixa da incubadora a 25 h após aplicação do composto nas células), observa-se redução significativamente ($p < 0,05$) da viabilidade para aproximadamente 60 % do controlo (redução de 40 %) e para 24 h (48 h de exposição do composto) verificou-se uma maior diminuição da viabilidade, para cerca de 11 % do controlo (89 % de redução). À concentração de 0,1 μM , para 1 h de exposição ao composto, verifica-se ligeira diminuição da viabilidade celular quando comparada com o controlo não sendo significativa ($p < 0,05$) e um decréscimo significativo ($p < 0,05$) de aproximadamente 35 % de redução da viabilidade no ensaio de 24 h de exposição do composto.

Na figura 3.7 **B**, células irradiadas durante 7 minutos, observa-se na concentração de 0,1 μM um decréscimo significativo ($p < 0,05$) da viabilidade em relação ao controlo e à condição de 0 minutos de irradiação (figura 3.7 **A**), sendo este decréscimo da viabilidade mais notória para o ensaio de 24 h de exposição ao composto em ambos os casos. No entanto, verifica-se uma perda quase total da viabilidade para 1,0 μM , nos ensaios de 1 e 24 h, e relativamente aos resultados obtidos para as células não irradiadas (controlo), na mesma concentração. O mesmo se observa para as células irradiadas durante 14 minutos (figura 3.7 **C**) para ambas as concentrações.

Após a análise da figura 3.7, pode concluir-se que o efeito citotóxico do composto **12** é dependente da concentração, do tempo de irradiação e do tempo de exposição das células ao composto após irradiação. No entanto, o composto **12** apresenta toxicidade no escuro a todas as concentrações, exceto para a concentração de 0,1 μM no ensaio de 1 h de exposição do composto. Contudo, a esta concentração e neste ensaio (1 h), nas células irradiadas durante 7 e 14 minutos, verifica-se apenas um decréscimo de 30 % e 40 % da viabilidade, respetivamente. Conclui-se então, segundo os motivos atrás mencionados que o composto **12** não reúne as condições necessárias para ser utilizado como FS em PDT.

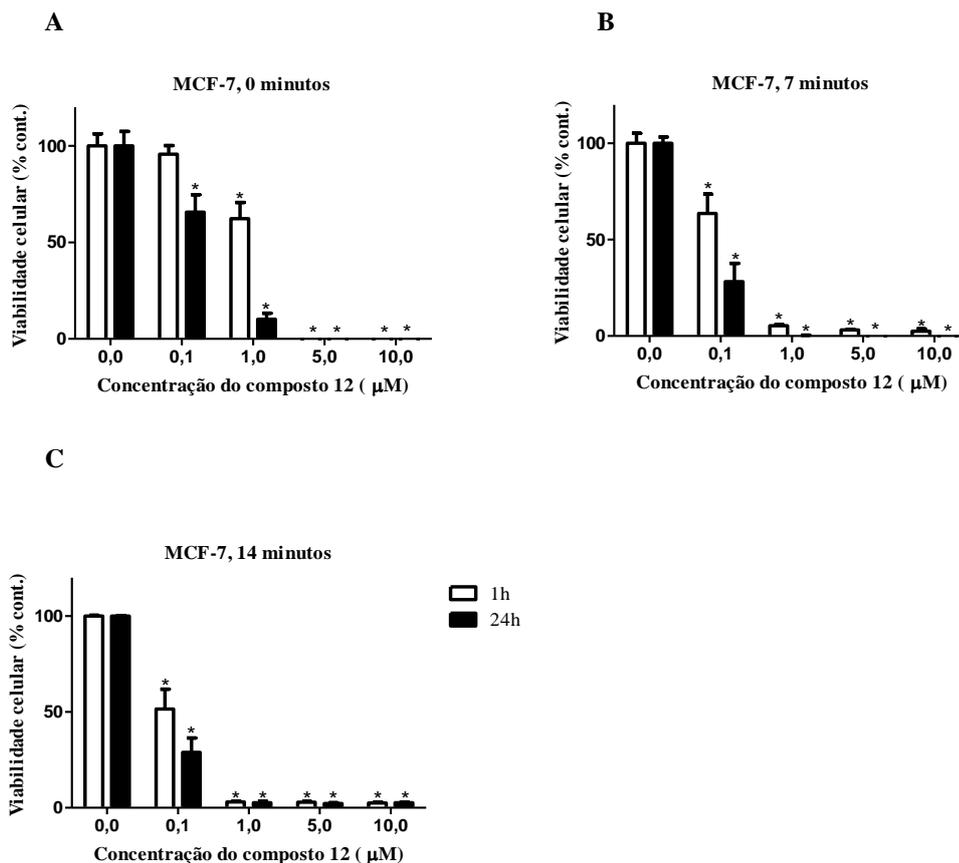


Figura 3.7 - Viabilidade celular (% de controlo) em função da concentração do corante **12**, registada em células MCF-7 sem irradiação (A), com irradiação por 7 minutos (B) e 14 minutos (C). Leituras efetuadas 1 h e 24 h após irradiação das células pré-incubadas com o corante. Valores referem-se à média \pm SD (n= 4). (* diferenças estatisticamente significativas (p<0,05) comparadas relativamente ao controlo, do mesmo ensaio).

3.5.1.4 Efeito do corante cianínico aminoquarílico **13**

Os resultados obtidos para o corante **13** encontram-se ilustrados na figura 3.8. As células MCF-7 não irradiadas (figura 3.8 A) mostram que a exposição ao corante **13** induz uma elevada toxicidade no escuro nas concentrações mais altas (5,0 e 10,0 µM). No entanto, para 0,1 µM observa-se um ligeiro decréscimo mas significativo (p<0,05) na viabilidade celular, cerca de 10 % do controlo para o ensaio de 1 h de exposição, logo não é considerado citotóxico no escuro segundo as normas (GRAS Status International Organization for Standardization, 2009) e para o ensaio de 24 h de exposição do composto, para a mesma concentração, não se observou qualquer alteração significativa (p>0,05) na viabilidade celular. Para 1,0 µM, verifica-se um maior efeito de toxicidade por parte do composto, relativamente à concentração mais baixa (redução da viabilidade cerca de 20 % para ambos os ensaios (1 e 24 h)).

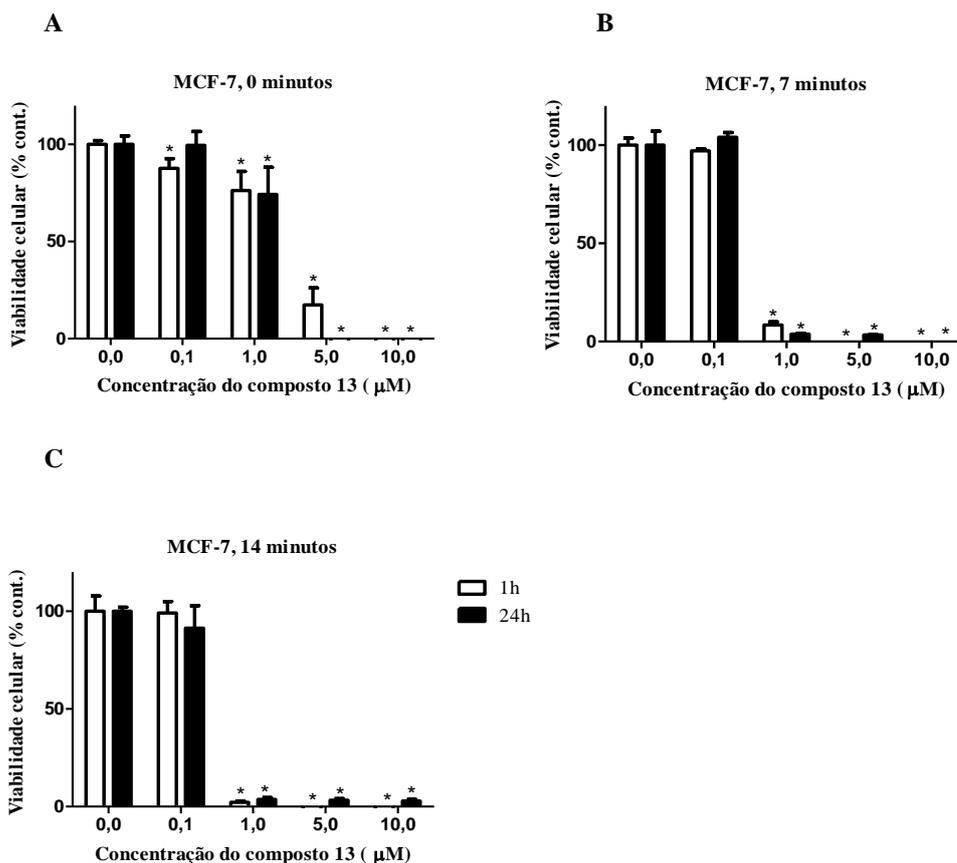


Figura 3.8 - Viabilidade celular (% de controlo) em função da concentração do corante **13**, registada em células MCF-7 sem irradiação (A), com irradiação por 7 minutos (B) e 14 minutos (C). Leituras efetuadas 1 h e 24 h após irradiação das células pré-incubadas com o corante. Valores referem-se à média \pm SD (n= 4). (* diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) comparadas relativamente ao controlo, do mesmo ensaio).

A ação da radiação durante 7 e 14 minutos (figura 3.8 B e C), nas células expostas ao corante **13**, na concentração de 0,1 μM não alterou significativamente ($p > 0,05$) o perfil de toxicidade relativamente ao controlo e às células não irradiadas (figura 3.8 A). No entanto, para ambos os tempos de irradiação, observa-se que a concentração de 1,0 μM provocou redução significativa ($p < 0,05$) da viabilidade de quase 100 % em relação ao controlo e em relação aos resultados representados no ensaio no escuro. Aqui, verifica-se que quanto maior o tempo de irradiação maior foi o efeito tóxico do composto **13**.

Os resultados indicam que o composto **13**, a 0,1 μM , não apresenta toxicidade significativa no escuro no ensaio de 24 h, o que seria desejável para um bom FS, no entanto, verifica-se ausência de incremento na toxicidade por ação da radiação. Para a concentração de 1,0 μM , verifica-se que a irradiação aumenta significativamente ($p < 0,05$) o efeito de toxicidade do composto e como não é considerado citotóxico no escuro

(redução da viabilidade cerca de 20 % do controlo), pode ser considerado um bom FS para ser utilizado em PDT, a esta concentração.

3.5.1.5 Efeito do corante cianínico aminoesquarílico 14

Para o corante **14** observa-se na figura 3.9 **A**, em células não sujeitas a irradiação, que existe uma redução da viabilidade celular com o aumento da concentração do composto, quando exposto durante 1 h. Na concentração de 0,1 e 1,0 μM , não se verificou redução significativa ($p>0,05$) da viabilidade celular, exceto a 1,0 μM no ensaio de 1 h. Quando expostas ao composto durante mais 24 h, apenas à concentração de 10,0 μM se observou uma redução significativa ($p<0,05$) da viabilidade celular, em relação ao controlo.

Quando irradiadas durante 7 minutos (figura 3.9 **B**), à concentração de 0,1 e 1,0 μM , no ensaio de 1 h, verifica-se ausência de toxicidade por parte do composto, no entanto, no ensaio de 24 h verifica-se redução significativa ($p<0,05$) na viabilidade celular. Às concentrações de 5,0 e 10,0 μM verifica-se uma redução significativa ($p<0,05$) da viabilidade, em ambos os ensaios (1 e 24 h). No entanto, comparando os resultados das células irradiadas durante 7 minutos, à concentração de 0,1; 1,0 e 5,0 μM no ensaio de 24 h de exposição do composto, com os resultados das células não irradiadas, observa-se um decréscimo na viabilidade celular.

Nas células irradiadas durante 14 minutos verifica-se apenas um decréscimo significativo ($p<0,05$) na viabilidade celular para a maior concentração (10,0 μM) e para as restantes concentrações, verifica-se ausência de toxicidade celular.

Para o corante **14** eram espectáveis bons resultados na redução da viabilidade celular quando irradiado, uma vez que o composto apresenta um átomo pesado de iodo no anel aromático, que deveria induzir uma maior produção de $^1\text{O}_2$ e por este motivo ter um efeito citotóxico mais elevado.

Pela análise dos resultados da figura 3.9, pode concluir-se que o composto **14** não preenche os requisitos para ser utilizado como FS em PDT, uma vez que, apesar de não ser considerado citotóxico no escuro à concentração de 0,1 e 1,0 μM , verifica-se um ligeiro incremento na toxicidade após 7 minutos de irradiação e sendo ausente após 14 minutos de irradiação. À concentração de 10 μM , após 7 e 14 minutos de irradiação, o composto **14** apresenta elevado poder citotóxico o que seria desejável para ser um bom FS, no entanto, o mesmo é observado para as células não irradiadas.

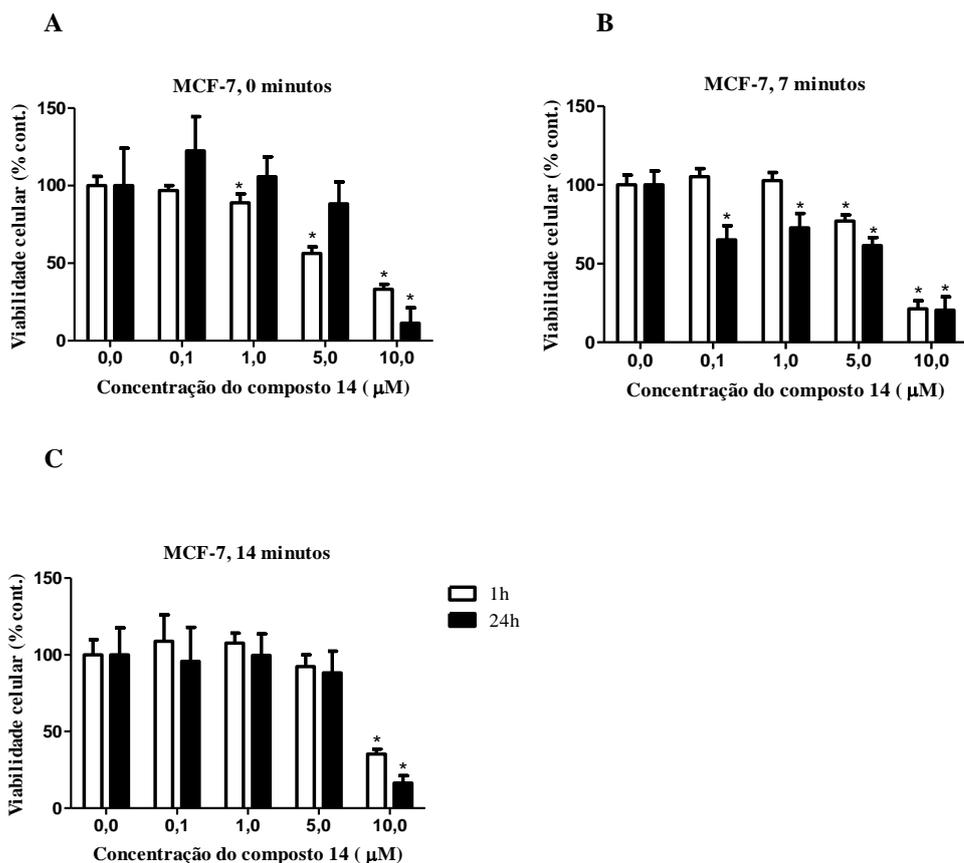


Figura 3.9 - Viabilidade celular (% de controlo) em função da concentração do corante **14**, registada em células MCF-7 sem irradiação (**A**), com irradiação por 7 minutos (**B**) e 14 minutos (**C**). Leituras efetuadas 1 h e 24 h após irradiação das células pré-incubadas com o corante. Valores referem-se à média \pm SD (n= 4). (* diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) comparadas relativamente ao controlo, do mesmo ensaio).

3.5.2 Efeito do tempo de irradiação e do tempo de exposição dos compostos após irradiação nas células BT-474

3.5.2.1 Efeito do corante cianínico esquarílico **9**

Nas células não irradiadas (figura 3.10 **A**) mas que permanecem 14 minutos à temperatura ambiente ao abrigo da luz, podemos verificar que o composto **9** induz uma redução significativa ($p < 0,05$) da viabilidade celular com o aumento da concentração do composto, sendo o efeito citotóxico maior quando exposto durante 1 h (1 hora após retirada da caixa da incubadora a 25 h após aplicação do composto nas células), exceto à concentração de 10,0 μM.

Quando irradiadas durante 7 minutos (figura 3.10 **B**), verifica-se um decréscimo significativo ($p < 0,05$) na viabilidade celular a todas as concentrações, sendo a diminuição

mais notória à maior concentração. No entanto, comparando os resultados das células irradiadas durante 7 minutos com os resultados das células não irradiadas, não se verifica grande diferença na percentagem de diminuição da viabilidade celular, exceto à concentração de 5,0 μM que contrariamente aos resultados no escuro, no ensaio de 1 h de exposição ao composto, observa-se um menor efeito citotóxico do composto e no ensaio de 24 h de exposição das células ao composto após irradiação, verifica-se um maior efeito citotóxico.

Nas células irradiadas durante 14 minutos verifica-se também um decréscimo significativo ($p < 0,05$) da viabilidade celular para todas as concentrações (exceto a 0,1 e 1,0 μM , no ensaio de 24 e 1 h respetivamente) sendo dependente da concentração, o mesmo se verifica nos resultados das células mantidas no escuro e irradiadas após 7 minutos.

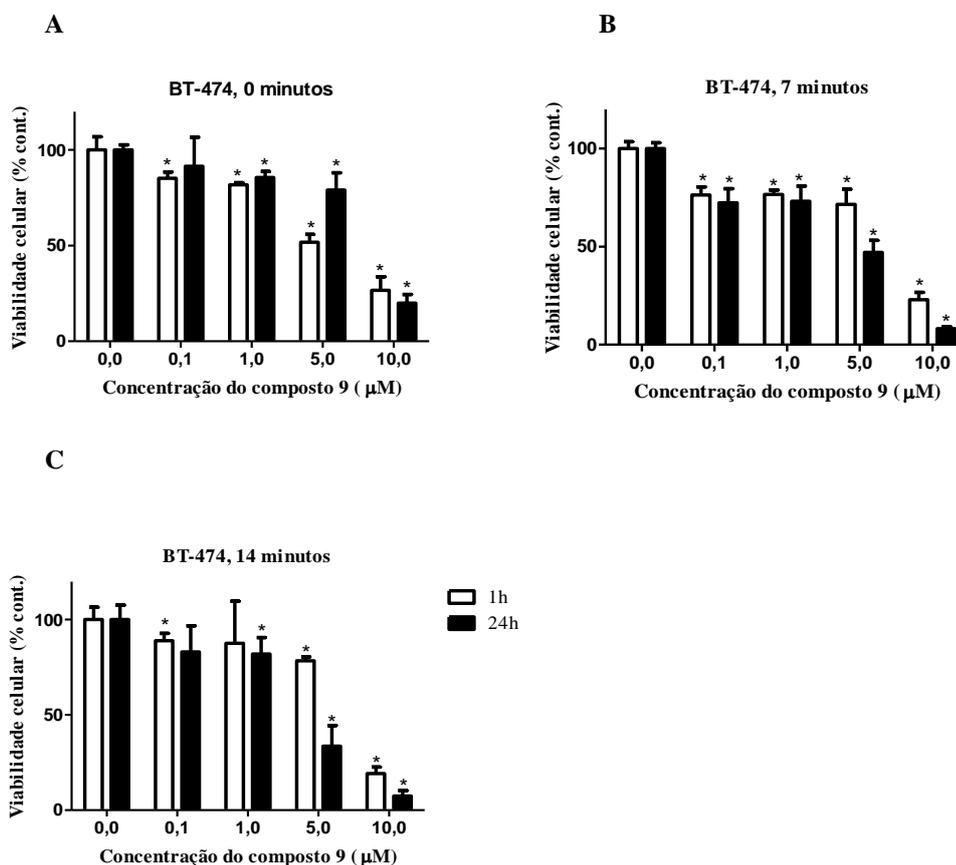


Figura 3.10 - Viabilidade celular (% de controlo) em função da concentração do corante **9**, registada em células BT-474 sem irradiação (**A**), com irradiação por 7 minutos (**B**) e 14 minutos (**C**). Leituras efetuadas 1 h e 24 h após irradiação das células pré-incubadas com o corante. Valores referem-se à média \pm SD ($n = 4$). (* diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) comparadas relativamente ao controlo, no mesmo ensaio).

Assim, podemos concluir que o composto **9** não preenche os requisitos para ser utilizado como FS em PDT pois, apesar de não ser considerado citotóxico no escuro à

concentração de 0,1 e 1,0 μM segundo as normas GRAS Status (International Organization for Standardization, 2009), apresentando cerca de 90 e 85 % da viabilidade do controlo, verifica-se um ligeiro incremento na toxicidade após 7 e 14 minutos de irradiação a estas concentrações. À concentração de 5,0 e 10,0 μM o composto apresenta um efeito citotóxico na viabilidade celular nas três condições (A, B e C).

3.5.2.2 Efeito do corante cianínico esquarílico 11

Para o composto 11, as células BT-474 não irradiadas (figura 3.11 A), apresentam para as concentrações mais elevadas (5,0 e 10,0 μM) perda total da viabilidade celular, exceto para a concentração 5,0 μM no ensaio de 1 h de exposição ao composto aplicado (1 hora após retirada da caixa da incubadora a 25 h após aplicação com composto). À concentração de 1,0 μM , no ensaio de 1 h de exposição das células ao composto, reduziu significativamente ($p < 0,05$) a viabilidade celular para aproximadamente 75 % do controlo e no ensaio de 24 h de exposição para 40 % do controlo (60 % de redução). À concentração de 0,1 μM , quando o composto foi exposto durante 1 h (1 hora após retirada da caixa da incubadora a 25 h após aplicação com composto) verifica-se um aumento significativo ($p < 0,05$) da viabilidade celular. Tal facto pode ter resultado de um possível erro experimental que permitiu a multiplicação celular, por exemplo: erro na pipetagem do volume da solução suplementada com o corante a ser adicionado em cada poço da placa de cultura ou erro na preparação da dosagem da solução suplementada com o corante consequentemente erro na concentração pretendida. Pode também estar relacionado com possíveis contaminações que possam ter ficado incorporadas nas membranas das células e que absorvem a c.d.o. diferentes mas que interfiram com os c.d.o. do A.B. e, por outro lado, também pode ter ocorrido uma adaptação celular, podendo as células ter utilizado mecanismos de defesa, tal como a metabolização do composto em subprodutos não tóxicos e deste modo desencadear a proliferação celular (Wilkening *et al.* 2003).

Na figura 3.11 B, células irradiadas durante 7 minutos, verifica-se uma redução significativa ($p < 0,05$) da viabilidade celular em todas as concentrações, que é dependente do tempo de exposição do composto após irradiação e da concentração. Para 0,1 μM e 1 h de exposição do composto, observa-se um decréscimo da viabilidade de aproximadamente 35 % do controlo. Comparando estes resultados com os obtidos nas células não irradiadas, observa-se um maior poder de toxicidade do composto após

irradiação e o mesmo é confirmado para as células irradiadas durante 14 minutos. Para as concentrações de 1,0, 5,0 e 10,0 μM , verifica-se uma elevada redução da viabilidade celular.

Na figura 3.11 C, nas células irradiadas durante 14 minutos verifica-se um decréscimo significativo ($p < 0,05$) da viabilidade celular a todas as concentrações, sendo dependente do tempo de exposição do composto após irradiação e da concentração. Às restantes concentrações (1,0, 5,0, e 10 μM) os resultados são muito semelhantes aos obtidos nas células irradiadas durante 7 minutos, no entanto, nos ensaios de 24 h de exposição do composto verifica-se perda total da viabilidade celular.

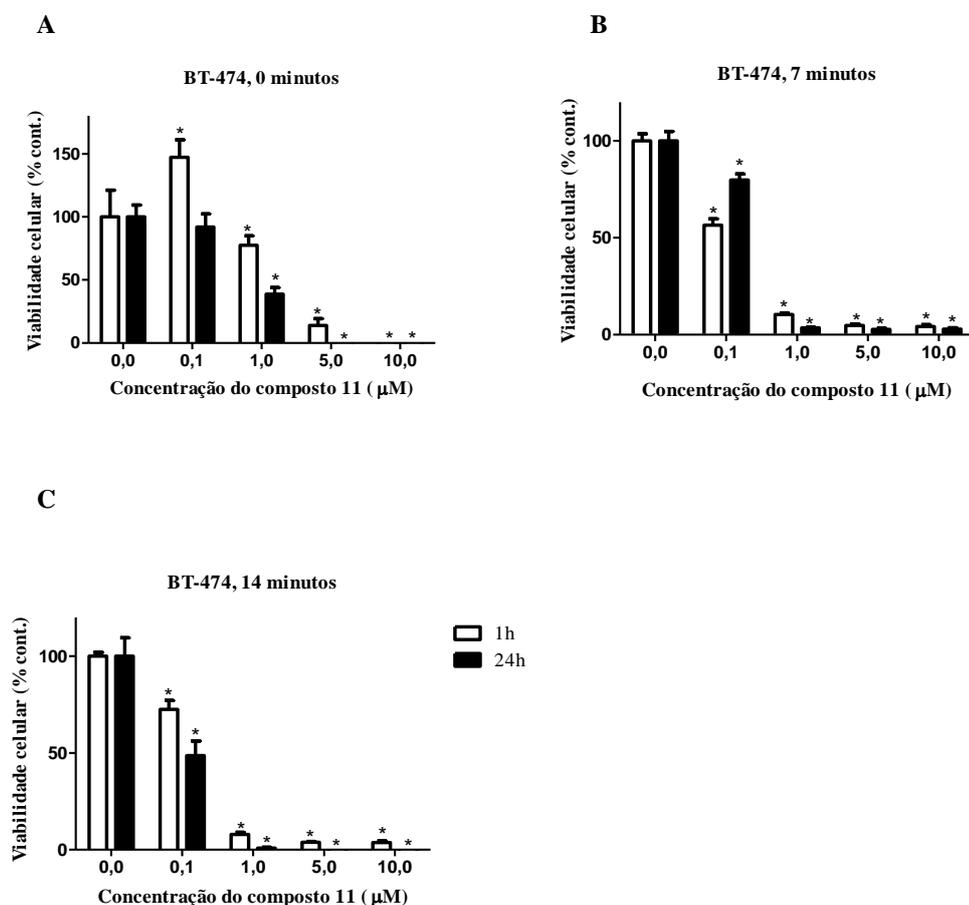


Figura 3.11 - Viabilidade celular (% de controlo) em função da concentração do corante **11**, registada em células BT-474 sem irradiação (**A**), com irradiação por 7 minutos (**B**) e 14 minutos (**C**). Leituras efetuadas 1 h e 24 h após irradiação das células pré-incubadas com o corante. Valores referem-se à média \pm SD ($n = 4$). (* diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) comparadas relativamente ao controlo, do mesmo ensaio).

Após a análise pode concluir-se que o efeito citotóxico do composto **11** nas células BT-474 é dependente da concentração, pois nas concentrações mais elevadas (1,0, 5,0 e 10,0 μM) verifica-se um elevado efeito citotóxico nas células nas três condições (**A**, **B** e **C**); da radiação pois à concentração de 0,1 e 1,0 μM verificou-se que a irradiação

aumentou o efeito citotóxico do composto (redução da viabilidade celular) relativamente aos resultados observados nas células não irradiadas e do tempo de exposição das células ao composto após irradiação. No entanto, os resultados indicam que o composto **11** não reúne os requisitos necessários para ser considerado um bom FS para ser utilizado na PDT do cancro, pois apesar de apresentar elevada toxicidade às concentrações mais altas (1,0, 5,0 e 10,0 μM), também apresenta toxicidade no escuro. À concentração de 0,1 μM , no ensaio de 1 h de exposição não apresenta toxicidade no escuro, no entanto, após irradiação não apresenta elevado poder citotóxico.

3.5.2.3 Efeito do corante cianínico aminoesquarílico 12

Nas células BT-474 não irradiadas (figura 3.12 **A**), observa-se um decréscimo significativo ($p < 0,05$) da viabilidade celular dependente da concentração do composto **12**. Para 10,0 μM , observa-se uma perda total da viabilidade celular, e a 5,0 μM no ensaio de 1 h de exposição, observa-se um decréscimo significativo ($p < 0,05$) da viabilidade celular de aproximadamente 80 % do controlo. À concentração de 0,1 μM verifica-se um decréscimo significativo ($p < 0,05$) da viabilidade celular, sendo mais notória no ensaio de 1 h de exposição ao composto, mas como a redução da viabilidade é cerca de 15 a 20 % do controlo, o composto não é considerado citotóxico a esta concentração segundo as normas GRAS Status (International Organization for Standardization, 2009). A 1,0 μM observa-se um maior decréscimo na viabilidade celular relativamente à menor concentração, sendo mais notória no ensaio de 24 h de exposição (24 h após retirada da caixa da incubadora a 48 h após aplicação do composto).

Na figura 3.12 **B**, células irradiadas durante 7 minutos, verifica-se um decréscimo significativo ($p < 0,05$) da viabilidade celular quando comparado com o grupo controlo, também dependente da concentração (quanto maior a concentração maior é a percentagem de redução da viabilidade celular), sendo esta diminuição mais notória às concentrações mais elevadas (1,0, 5,0 e 10,0 μM). Com o efeito da radiação, à concentração de 1,0 μM , verifica-se um maior incremento de toxicidade do composto **12** relativamente ao resultado apresentado para a mesma concentração nas células não irradiadas, sendo mais notória no ensaio de 24 h de exposição do composto após irradiação (90 % de redução).

Na figura 3.12 **C**, células irradiadas durante 14 minutos, tal como nos resultados apresentados para as células não irradiadas e nas irradiadas 7 minutos, verifica-se uma

diminuição da viabilidade celular dependente da concentração. Comparando estes resultados com os obtidos nas células irradiadas 7 minutos, verifica-se que à concentração de 0,1 μM , observa-se um maior decréscimo da viabilidade celular no ensaio de 24 h de exposição do composto, e o mesmo se verifica para as maiores concentrações (1,0, 5,0 e 10,0 μM).

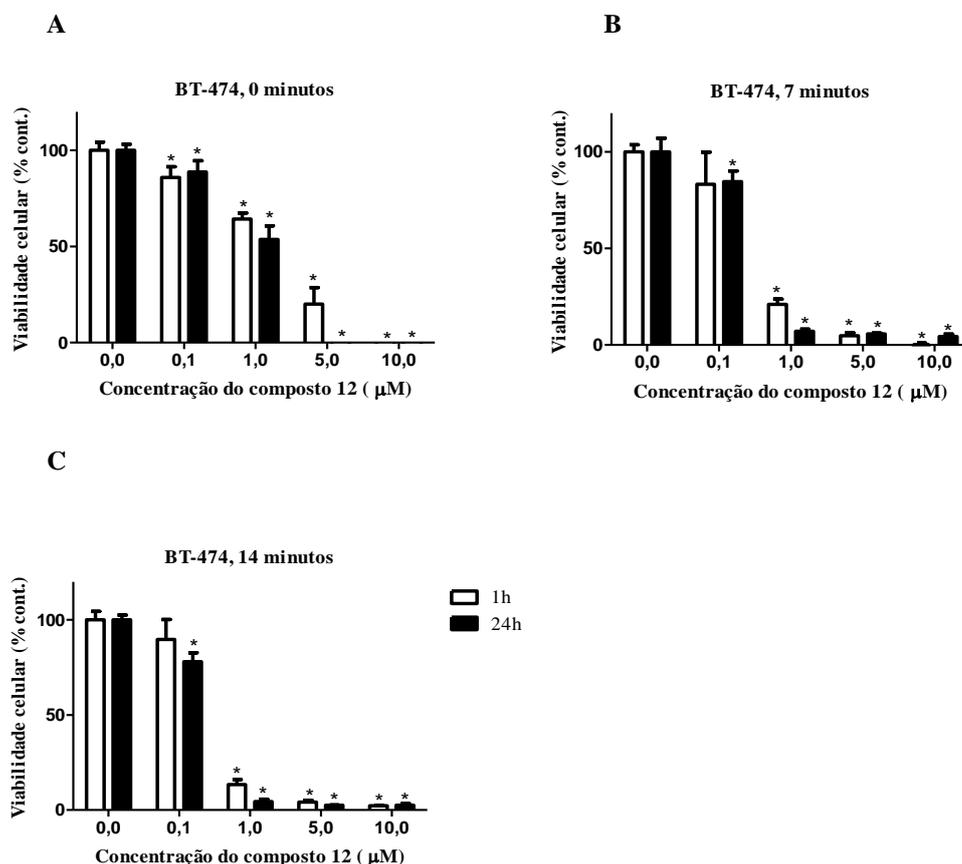


Figura 3.12 - Viabilidade celular (% de controlo) em função da concentração do corante **12**, registada em células BT-474 sem irradiação (**A**), com irradiação por 7 minutos (**B**) e 14 minutos (**C**). Leituras efetuadas 1 h e 24 h após irradiação das células pré-incubadas com o corante. Valores referem-se à média \pm SD (n= 4). (* diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) comparadas relativamente ao controlo, do mesmo ensaio).

Após a análise da figura 3.12, pode concluir-se que o efeito citotóxico do composto **12** é dependente da concentração, do tempo de irradiação e do tempo de exposição das células ao composto após irradiação. Este produz toxicidade no escuro a todas as concentrações, salvo à concentração de 0,1 μM . Contudo, a esta concentração, após irradiação, não induz diferenças significativas na redução da viabilidade celular. Há concentração de 1,0 μM , verifica-se um incremento de toxicidade do composto **12** após irradiação (90 e 95 % de redução da viabilidade), no entanto, este composto também provoca toxicidade nas células mantidas no escuro quando expostas à mesma

concentração. Conclui-se então, segundo os motivos atrás mencionados, que o composto **12** não reúne as condições necessárias para ser utilizado como FS em PDT do cancro.

3.5.2.4 Efeito do corante cianínico aminoescuarílico **13**

Na figura 3.13 **A**, células BT-474 não irradiadas, observa-se nas concentrações de 1,0, 5,0 e 10,0 μM que o composto **13** produz citotoxicidade no escuro, sendo a diminuição da viabilidade celular dependente da concentração e do tempo de exposição. À concentração de 0,1 μM o aumento de viabilidade celular observado não é significativo ($p > 0,05$).

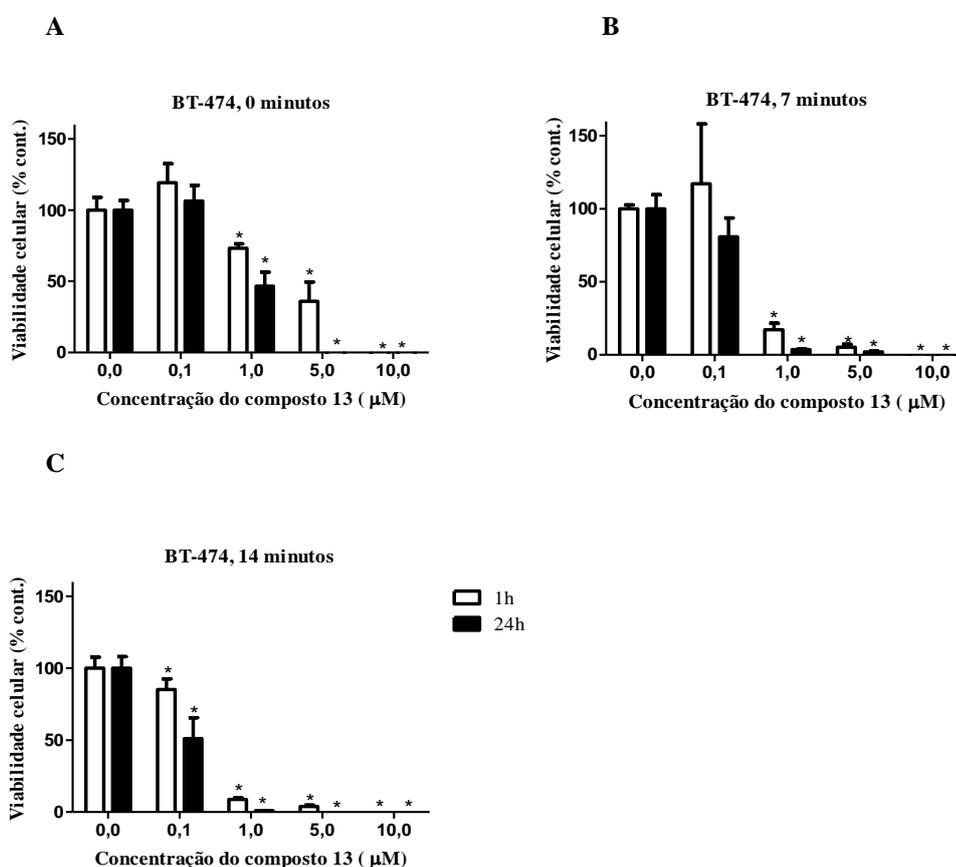


Figura 3.13 - Viabilidade celular (% de controlo) em função da concentração do corante **13**, registada em células BT-474 sem irradiação (**A**), com irradiação por 7 minutos (**B**) e 14 minutos (**C**). Leituras efetuadas 1 h e 24 h após irradiação das células pré-incubadas com o corante. Valores referem-se à média \pm SD ($n = 4$). (* diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) comparadas relativamente ao controlo, do mesmo ensaio).

Na figura 3.13 **B**, células irradiadas durante 7 minutos, verifica-se para 1,0, 5,0 e 10,0 μM um decréscimo significativo ($p < 0,05$) da viabilidade celular quando comparado com o grupo controlo, dependente da concentração e do tempo de exposição do composto

após irradiação, tal como observado nos resultados das células não irradiadas. Para 1,0 e 5,0 μM o composto **13** induz incremento de toxicidade, relativamente aos resultados apresentados nas células não irradiadas e a 10,0 μM observa-se efeito citotóxico total do composto, tal como nas células mantidas no escuro.

Na figura 3.13 **C**, células irradiadas durante 14 minutos, tal como no controlo não irradiado e irradiadas 7 minutos, verifica-se uma diminuição significativa ($p < 0,05$) da viabilidade celular relativamente ao grupo controlo, dependente da concentração e dependente do tempo de exposição do composto após irradiação. Comparando estes resultados com os obtidos nas células não irradiadas e irradiadas 7 minutos, a diferença está na concentração de 0,1 μM (ensaio de 24 h de exposição ao composto irradiado) onde se verifica um decréscimo significativo ($p < 0,05$) da viabilidade celular para 50 % do controlo não irradiado.

Após a análise da figura 3.13, pode concluir-se que o efeito citotóxico do composto **13** é dependente da concentração, do tempo de irradiação e do tempo de exposição das células ao composto após irradiação. Os resultados indicam que o composto **13** apresenta toxicidade no escuro às concentrações de 1,0, 5,0 e 10,0 μM , no entanto, à concentração de 0,1 μM não apresenta toxicidade. Posto isto, o composto **13** poderá ser um bom FS em PDT do cancro em situações de tratamento faseado, nas seguintes condições: usando a concentração de 0,1 μM , o ensaio de 24 h de exposição ao composto após irradiação e irradiação durante 14 minutos, pois não mostrou citotoxicidade no escuro e, apesar de não reduzir totalmente a viabilidade celular, apresentou uma boa resposta após a irradiação. Por outro lado, poderia ser realizado um estudo da toxicidade numa gama de concentrações entre 0,1 e 1,0 μM , uma vez que poderá haver uma boa resposta fototerapêutica.

3.5.2.5 Efeito do corante cianínico aminoesquarílico 14

Para o corante **14** observa-se (figura 3.14 **A**), em células não sujeitas a irradiação, que existe uma redução significativa ($p < 0,05$) da viabilidade celular relativamente ao controlo, dependente da concentração (exceto à concentração de 0,1 μM) e do tempo de exposição.

Na figura 3.14 **B**, células irradiadas durante 7 minutos, verifica-se um decréscimo significativo ($p < 0,05$) da viabilidade celular quando comparado com o grupo controlo, também dependente da concentração e do tempo de exposição. A radiação não foi eficaz

em incrementar a toxicidade celular à concentração de 0,1 μM , mas à concentração de 5,0 μM , observa-se redução da viabilidade para aproximadamente 10 % do controlo (redução de 90 %) e à concentração de 10,0 μM observa-se quase total perda de viabilidade, indicando elevada toxicidade após 7 minutos de irradiação para estas concentrações. Comparando estes resultados relativamente aos obtidos no controlo não irradiado, verifica-se um maior poder citotóxico por parte do composto após irradiação.

Nas células irradiadas durante 14 minutos (figura 3.14 C) verifica-se um ligeiro decréscimo da viabilidade celular relativamente aos resultados obtidos com 7 minutos de irradiação.

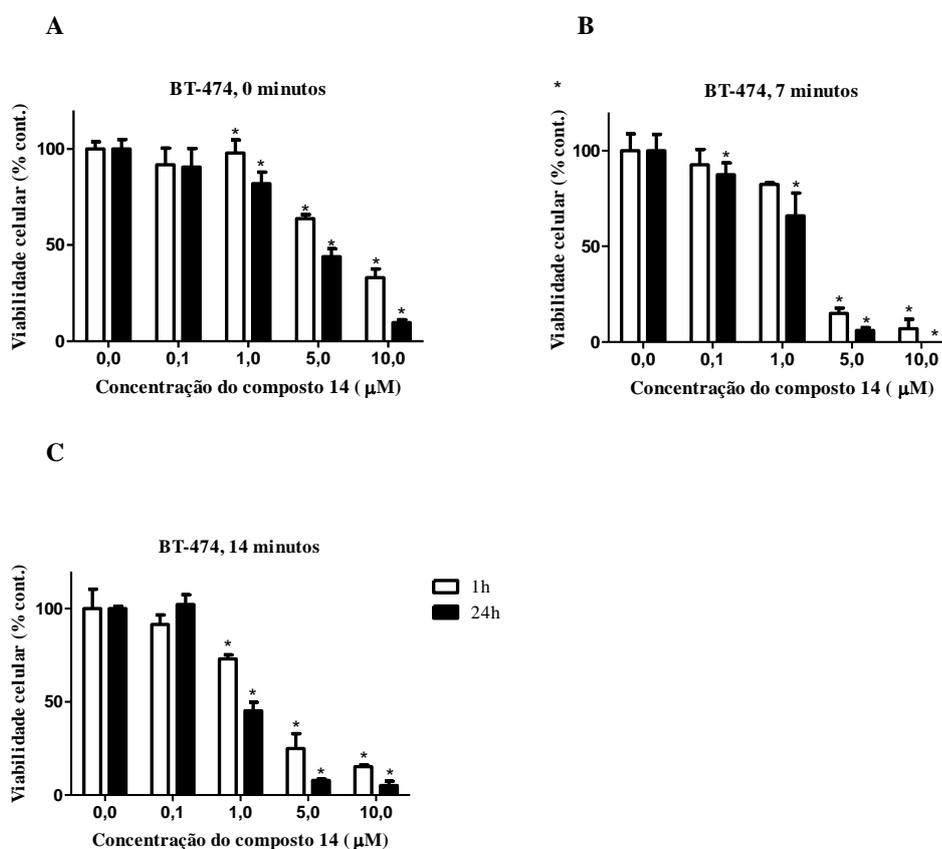


Figura 3.14 - Viabilidade celular (% de controlo) em função da concentração do corante **14**, registada em células BT-474 sem irradiação (A), com irradiação por 7 minutos (B) e 14 minutos (C). Leituras efetuadas 1 h e 24 h após irradiação das células pré-incubadas com o corante. Valores referem-se à média \pm SD (n= 4). (* diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) comparadas relativamente ao controlo, do mesmo ensaio).

Para o composto **14** eram espectáveis bons resultados na redução da viabilidade celular quando irradiado, pelos motivos descritos na discussão dos resultados da aplicação deste composto nas células MCF-7 (3.5.1.5) e isso é observado essencialmente para a concentração de 5,0 μM , após 7 minutos de irradiação, no entanto, apresenta toxicidade no escuro. À concentração de 0,1 μM não apresenta toxicidade significativa e a 1,0 μM

o composto não é considerado citotóxico no escuro pelas normas GRAS Status (International Organization for Standardization, 2009), no entanto, não é observado elevado incremento da toxicidade após irradiação. Assim, pelos motivos mencionados pode concluir-se que o composto **14** não preenche os requisitos para ser utilizado como FS na PDT do cancro.

3.5.3 Avaliação do potencial fototerapêutico dos corantes cianínicos esquarílicos e aminoesquarílicos assimétricos em células MCF-7 e BT-474 – comparação de resultados

Após exposição das células MCF-7 e BT-474 aos corantes **9** a **14** observa-se que, todos os compostos derivados do benzoselenazole e da quinaldina produzem citotoxicidade no escuro, às concentrações mais altas (5,0 e 10,0 μM). Contudo, os corantes não induzem uma perda total de viabilidade celular, mas pelas normas GRAS Status estes corantes são considerados tóxicos, para esta concentração, pois reduzem a viabilidade celular em mais de 30 % (International Organization for Standardization, 2009).

Comparando os resultados de ambas as linhas celulares pode observar-se que ambas foram afetadas de forma semelhante pelos corantes esquarílicos assimétricos derivados do benzoselenazole e da quinaldina, no entanto, de uma forma geral obtiveram-se melhores resultados nas células MCF-7. Nas células MCF-7 e BT-474, o corante que apresentou o melhor perfil de toxicidade no escuro foi o composto **9** e **14**, seguido do composto **11**, apenas nas células MCF-7, que não apresenta toxicidade no ensaio de 1 h e não é considerado tóxico no ensaio de 24 h a 0,1 μM e a 1,0 μM , no ensaio de 1 h, não apresenta citotoxicidade e por último o composto **13**, à concentração de 0,1 μM em ambas as linhas celulares. Contudo, os corantes, que apresentam o comportamento ideal no escuro, só poderão ser considerados potenciais FS em PDT do cancro, se às concentrações a que não são tóxicos no escuro apresentarem citotoxicidade após serem ativados por luz, a c.d.o. adequado. Assim, no conjunto de corantes utilizados poderão vir a ser potenciais candidatos a FS para aplicação em PDT do cancro, o composto **11**, uma vez que na concentração de 1,0 μM não apresentam toxicidade no escuro nas células MCF-7 no ensaio de 1 h de exposição do composto e apresenta elevado poder de toxicidade após 14 minutos de irradiação e o composto **13**, uma vez que a 1,0 μM apresenta efeito citotóxico nas células MCF-7 após irradiação e não é considerado citotóxico no escuro e nas células

BT-474, a 0,1 μM não apresenta toxicidade no escuro e após 14 minutos de irradiação, no ensaio de 24 h, induz uma redução da viabilidade celular para 50 % do controlo não irradiado. Para o corante **14** era esperada uma resposta fototerapêutica mais eficiente, uma vez que, como já foi referido, apresenta um átomo de iodo no anel aromático e consequentemente apresentou melhor $\Phi\Delta$ de formação de $^1\text{O}_2$ ($\Phi\Delta= 0,09$). Contudo, o mesmo não se verificou em ambas as linhas celulares. Ainda assim, o facto de o corante **14** não ter apresentado o perfil fototerapêutico esperado pode ser explicado pela ocorrência de uma incompatibilidade entre a estrutura do composto e a membrana celular, impedindo a sua passagem para o interior das células. Segundo os autores Josefsen & Boyle (2008) e Allison & Sibata (2010) os compostos devem possuir uma estrutura anfifílica, ou seja, solúvel em água mas contendo um grupo hidrofóbico para facilitar a passagem através das membranas celulares.

O corante **9** induziu uma fraca resposta fototerapêutica em ambas as linhas celulares após irradiação, o mesmo seria de espera pois apresentou um $\Phi\Delta$ de formação de $^1\text{O}_2$ próximo de zero ($\Phi\Delta= 0,03$). Resultados semelhantes foram obtidos por Friães (2015) que aplicou corantes esquarílicos assimétricos sintetizados derivados do benzotiazole e da quinaldina em células Caco-2 e HepG2. O corante zwitteriónico, análogo ao composto **9**, não produziu citotoxicidade no escuro para as células Caco-2 e apenas à concentração de 10,0 μM se verificou redução de viabilidade de aproximadamente 50 % do controlo, para 1 h de exposição ao corante, após irradiação. No que diz respeito à aplicação do corante nas células HepG2 observou, que este não apresenta citotoxicidade no escuro até à concentração de 5,0 μM e após o ensaio de irradiação não se verificaram grandes alterações de viabilidade celular para ambos os tempos de irradiação (LED centrado a 630 nm). Fagundes (2013) obteve uma melhor resposta fototerapêutica pela aplicação de um corante esquarílico assimétrico zwitteriónico sintetizado, derivado do benzoselenazole e do 6-iodobenzotiazole, em células Caco-2 e HepG2. O corante apresentou de uma forma geral, ausência de citotoxicidade no escuro e induziu uma elevada redução na viabilidade celular após 7 e 14 minutos de irradiação (LED centrado a 660 nm), exceto à menor concentração (0,1 μM).

Para o corante **11** sintetizado neste trabalho, também era esperada uma menor resposta fototerapêutica uma vez que o seu valor de $\Phi\Delta$ na formação de $^1\text{O}_2$ é de 0,04. Contrariamente a este resultado, o corante **11** apresentou uma boa resposta fototerapêutica na linha celular MCF-7, isto indica que pode ter atuado, não através da reação do tipo II,

mas sim através da indução da reação do tipo I (formação de ROS). Friães (2015), também obteve resultados semelhantes com o corante análogo sintetizado derivado do benzotiazole e da quinaldina, aplicado em células Caco-2 e HepG2. Tal como nos resultados obtidos para a linha MCF-7 o corante análogo induziu toxicidade no escuro a partir de 5,0 μM , nas células Caco-2 e após irradiação (LEDs centrados a 630 nm) verificou-se redução da viabilidade celular, à concentração de 1,0 μM , sendo mais acentuada para 14 minutos de irradiação. Relativamente à aplicação do corante análogo sintetizado por Friães (2015), nas células HepG2, este mostrou-se mais citotóxico no escuro, à concentração de 1,0 μM , no entanto, apresentou uma boa resposta após a irradiação, apesar de não reduzir a totalmente a viabilidade celular.

Fagundes (2013), também obteve bons resultados com o corante esquarílico assimétrico sintetizado derivado do benzoselenazole e 6-iodobenzotiazole, que tem como substituinte no anel de quatro membros uma amina primária ($\text{W} = \text{NH}_2$). Este apresentou uma boa resposta fototerapêutica (LEDs centrados a 660 nm) e baixa toxicidade no escuro para as células Caco-2 e HepG2.

O corante **13**, que tem como substituinte no anel central de quatro membros uma anilina ($\text{W} = \text{NHPh}$), e que apresentou um $\Phi\Delta$ de formação de $^1\text{O}_2$ razoável ($\Phi\Delta = 0,06$), induziu uma boa resposta fototerapêutica em ambas as linhas celulares. Friães, em 2015, obteve resultados diferentes aos resultados obtidos para o corante **13**, usando um análogo. O corante sintetizado por Friães, (2015) derivado do benzotiazole e da quinaldina, que tem como substituinte no anel de quatro membros uma anilina, não provocou toxicidade às células Caco-2, à concentração de 1,0 μM , mas após a irradiação (LEDs centrados a 630 nm) verificou-se que esta não teve grande influência na citotoxicidade. Nas células HepG2 o corante mostrou ser citotóxico no escuro. Fagundes, em 2013 obteve bons resultados para o corante análogo ao composto **13**, derivado do benzoselenazole e 6-iodobenzotiazole, à concentração de 1,0 μM , para as células HepG2. Contrariamente, nas células Caco-2 o corante análogo mostrou ser citotóxico no escuro.

3.6 Conclusões

Relativamente à descrição e discussão dos métodos de síntese pode concluir-se que os sais quaternários de amónio **2** e **4** foram facilmente obtidos, com elevado grau de pureza e rendimentos bastante satisfatórios.

A obtenção do intermediário **7** pelo método A (2.2.1.4.1) não foi conseguida, no entanto, a sua síntese pelo método B (2.2.1.4.2), foi conseguida com sucesso e após as otimizações efetuadas no método de tratamento da mistura reacional e purificação do composto (método C), foi conseguido a obtenção de um melhor rendimento e composto suficientemente puro para ser utilizado na etapa seguinte, evitando assim a purificação por c.c.

O composto **8** foi obtido com sucesso, nos quatro métodos de síntese, no entanto, foi obtido um melhor rendimento (73 %) após otimização da temperatura à qual decorreu a reação.

O composto zwitteriônico **9**, assim como o seu derivado *O*-metilado **10**, foram sintetizados de forma fácil, sendo este último obtido com um bom rendimento ($\eta = 88\%$). Contudo, a síntese do composto **9** necessita de ser otimizada em várias etapas, de modo a conseguir obter os compostos com melhor rendimento, como por exemplo, no método de purificação do composto pois demonstrou ser bastante complexa tendo sido necessário efetuar várias recristalizações para obtenção do composto puro, tendo-se realizado otimizações a este nível nos vários métodos de síntese.

A utilização do método de síntese dos corantes aminoescuarílicos assimétricos *via* intermediário *O*-metilado mostrou-se simples e eficaz na obtenção dos compostos, assim como a troca do contra-íon CF_3SO_3^- por I^- , permitindo a obtenção dos corantes pretendidos, com rendimentos bastante satisfatórios, tendo-se conseguido o rendimento mais elevado para o composto **12** ($\eta = 98\%$) e para o para o composto **14** rendimentos mais baixos ($\eta = 13$ e 25%). Relativamente à caracterização física e espectroscópica dos compostos sintetizados 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. Pode-se também concluir que todos os corantes escuarílicos e aminoescuarílicos sintetizados cumprem um dos principais requisitos de FS para aplicação em PDT, visto que todos apresentam os picos de absorção máxima a c.d.o. próximos de 700 nm, quando dissolvidos em DMSO e quando dissolvidos em DMEM, apresentam picos de absorção máxima próximos de 630 ou 660 nm, que se encontram dentro da chamada “janela fototerapêutica” (600 a 850 nm).

No que diz respeito ao $\Phi\Delta$ de formação de $^1\text{O}_2$ pode-se concluir que os valores obtidos são francamente mais baixos do que os previstos uma vez que estes corantes possuem na sua estrutura átomos de selénio e, devido ao efeito do átomo pesado, estes compostos deveriam apresentar um $\Phi\Delta$ de formação de $^1\text{O}_2$ maior. No entanto, o

composto **14** (W= 3-I-NHPH) apresenta o valor mais elevado ($\Phi\Delta= 0.09$). Este facto era espectável, pois de todos os corantes sintetizados, o composto **14** 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 .

Após análise dos ensaios de viabilidade celular pode concluir-se que ambas as linhagens foram afetadas de forma semelhante pelos corantes esquarílicos assimétricos derivados do benzoselenazole e quinaldina, no entanto, de uma forma geral, obtiveram-se melhores resultados nas células MCF-7. Tendo em conta o conjunto de corantes aplicados, pode concluir-se que o composto **13** (W= NHPH) reúne as melhores condições necessárias para ser utilizado como FS em PDT do cancro, uma vez que apresentou uma boa resposta fototerapêutica em ambas as linhas celulares tumorais, assim como o composto **11** (W= NH₂), pois induziu uma boa resposta fototerapêutica na linha celular MCF-7. Em ambos os casos conclui-se que o efeito citotóxico é dependente da concentração, do tempo de exposição das células ao composto após irradiação e do tempo de irradiação. Também foi possível concluir que o composto **11** atua nas células por outra via que não a reação do tipo II, uma vez que o seu valor de $\Phi\Delta$ na formação de 1O_2 é baixo ($\Phi\Delta= 0,04$). Pela análise dos ensaios de viabilidade celular do composto **14** conclui-se que apesar de apresentar um átomo pesado no anel aromático e o melhor $\Phi\Delta$ na formação de 1O_2 ($\Phi\Delta= 0,09$), não induziu uma boa resposta fototerapêutica em nenhuma das linhas celulares.

Relativamente às concentrações de corantes usadas nestes ensaios e à análise da citotoxicidade induzida em ambas as linhas celulares, conclui-se, de uma maneira geral, que os compostos, às concentrações mais elevadas (5,0 e 10,0 μ M), induzem elevada citotoxicidade, tendo-se verificado para alguns casos perda total de viabilidade celular.

Capítulo 4

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Referências Bibliográficas

- Aboussekhra A.** (2011). Role of cancer-associated fibroblasts in breast cancer development and prognosis. *International Journal of Developmental Biology*, 55: 841-849.
- Agostinis P., Berg K., Cengel K.A., Foster T.H., Girotti A.W., Gollnick S.O., Hahn S.M., Hamblin M.R., Juzeniene A., Kessel D., Korbelik M., Moan J., Mroz P., Nowis D., Piette J., Wilson B.C. & Golab J.** (2011). Photodynamic Therapy of Cancer: An Update. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 61: 250-281.
- Allison R.R. & Sibata C.H.** (2010). Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: a clinical review. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 7: 61-75.
- Al-Nasiry S., Geusens N., Hanssens M., Luyten C. & Pijnenborg, R.** (2007). The use of Alamar Blue assay for quantitative analysis of viability, migration and invasion of choriocarcinoma cells. *Human Reproduction*, 22: 1304-1309.
- Apolinário C.L.S.** (2012). Farmacoterapia no cancro da mama. Dissertação de mestrado integrado em Ciências Farmacêuticas: Universidade do Algarve, Faro, Portugal, 133 páginas e referências aí citadas.
- 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 24 de Agosto de 2015, de <http://www.doc88.com/p-075309319155.html>.
- Arun K. T., Jayaram D.T., Avirah R.R. & Ramaiah D.** (2011). B-cyclodextrin as a photosensitizer carrier: effect on photophysical properties and chemical reactivity of aquaraine dyes. *The Journal of Physical Chemistry B*, 115: 7122-7128.
- ATCC.** (2014a). *MCF-7 [MCF-7] (ATCC® HTB-22™) - Product Sheet*.
- ATCC.** (2014b). *BT-474 [BT-474] (ATCC® HTB-20™) - Product Sheet*.
- Avirah R., Jayaram D., Adarsh N. & Ramaiah D.** (2012). Squaraine dyes in PDT: from basic design to *in vivo* demonstration. *Organic and Biomolecular Chemistry*, 10: 911-920.
- Avirah R., Jyothish K. & Ramaiah D.** (2008). Infrared Absorbing Croconaine Dyes: Synthesis and Metal Ion Binding Properties. *Journal of Organic Chemistry*, 73: 274-279.
- Berlanda J., Kiesslich T., Engelhardt V., Krammer B. & Plaetzer K.** (2010). Comparative *in vitro* study on the characteristics of different photosensitizers employed in PDT. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 100: 173-180.
- Borra R.C., Lotufo M.A., Gaglioti S.M., Barros F.M. & Andrade P. M.** (2009). A simple method to measure cell viability in proliferation and cytotoxicity assays. *Brazilian Oral Research*, 23: 255-262.
- Bouillaguet S., Owen B., Wataha J., Campo M., Lange N. e Schrenzel J.** (2008). Intracellular reactive oxygen species in monocytes generated by photosensitive chromophores activated with blue light. *Dent Mater Aug*, 24: 1070-6.
- Broadbent A.D.** (2001). Basic Principles of Textile Coloration Society of Dyers and Colourists. Canadá. Université de Sherbrooke. *Society of Dyers and Colourists*, ISBN: 0 901956 76 7, 579 páginas.
- Carlson R.W. & Stockdale F.E.** (1988). The clinical biology of breast cancer. *Annual Reviews Medicine*, 39: 453-464.
- Castano A., Demidova T. & Hamblin M.** (2004). Mechanisms in photodynamic therapy: part one - photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 1: 279-293.

- Christie R.M.** (2001). Colour Chemistry. Heriot-Watt University, Scottish Borders Campus, Galashiels, United Kingdom. *The Royal Society of Chemistry*, ISBN: 0-85404-573-2, 205 páginas.
- Cló E., Snyder J.W., Ogilby P.R. & Gothelf K.V.** (2007). Control and selectivity of photosensitized singlet oxygen production: challenges in complex biological systems. *ChemBioChem*, 8: 475-81.
- Corazza A.V.** (2005). Fotobiomodulação comparativa entre o laser e LED de baixa intensidade na angiogénese de feridas cutâneas em ratos. Dissertação de Mestrado em Bioengenharia: Escola de Engenharia de São Carlos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, Brasil, 89 páginas e referência aí citada.
- Costa Á.L.J.** (2001). O desenvolvimento da Psico-oncologia: implicações para a pesquisa e intervenção profissional em saúde. *Psicologia: Ciência e Profissão*, 21: 36-43.
- Delay E., Van L.F., Vos D., Kamuhabwa A., Jacobs P. & Witte P.** (2000). A comparative study of the photosensitizing characteristics of some cyanine dyes. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 55: 27-36.
- Devi D., Cibin T., Ramaiah D. & 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.
- Dolmans D.E., Fukumura D. & Jain R.K.** (2003). Photodynamic therapy for cancer. *Nature Review Cancer*, 3: 380-387.
- Dougherty T.J., Gomer C.J., Henderson B.W., Jori G., Kessel D., Korbek M., Moan J. & Peng Q.** (1998). Photodynamic Therapy. *Journal of the National Cancer Institute*, 90: 889-905.
- Dougherty T.J., Kaufman J.E., Goldfarb A., Weishaupt K.R., Boyle D. & Mittleman A.** (1978). Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors. *Cancer Research*, 38: 2628-35
- Ellsworth R.E., Decewicz D.J., Shriver C.D. & Ellsworth D.L.** (2010) Breast cancer in the personal genomics Era. *Current Genomics*, 11: 146-61.
- Fagundes S.I.G.** (2013). Corantes esquarterícos com potencial utilização em terapia fotodinâmica do cancro. Dissertação de Mestrado em Bioquímica: Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, Portugal, 137 páginas.
- Fernandes S.M.R.** (2009). Preditores psicossociais do ajustamento à doença e tratamento em mulheres com cancro na mama: o papel do estado emocional, das representações de doença, do otimismo e dos benefícios percebidos. Tese de Doutoramento: Universidade do Minho, Instituto de Educação e Psicologia, Braga, Portugal, 476 páginas e referências aí citadas.
- Friães S.M.P.** (2015). Síntese, caracterização espetroscópica de novos corantes esquarterícos assimétricos e sua avaliação como potenciais fotossensibilizadores em Terapia Fotodinâmica. Dissertação de Mestrado em Bioquímica: Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, Portugal, 150 páginas.
- Globocan** (2012). Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012. *International agency for research on cancer*. Disponível em: http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx (Acedido a julho de 2014).
- Graça V.S., Silva M.S., Reis L.V., Sousa F., Almeida P., Queiroz J.A., & Santos P.F.** (2014). Ethylenediamine-Derived Chromatographic Ligand to Separate BSA, Lysozyme, and RNase A. *Chromatographia*, 77: 1529-1537.
- Gupta A., Avci P., Sadasivam M., Chandran R., Parizotto N., Vecchio D., Melo W.C.M.A., Dai T., Chiang L.Y. & Hamblin M.R.** (2013). Shining light on nanotechnology to help repair and regeneration. *Biotechnology Advances*, 31: 607-631.
- Hajri A., Wack S., Meyer C., Smith M.K., Leberquier C., Keding M. & Aprahamian M.** (2002). *In vitro* and *in vivo* efficacy of PhotofrinT and Pheophorbide a, a Bacteriochlorin, in photodynamic therapy of colonic cancer cells. *Photochemistry and Photobiology*, 75: 140-148.

- Halkiotis K.N., Uzunoglu N.K., Loukas S., Portelias G.E., Tortalis D. & Yova D.** (1997). Influence of drug and light dose in determining PDT efficacy in human pancreatic cancer cells, treated with zinc tetrassulfonated phthalocyanines (ZnTSPc). *Photocemotherapy: Photodynamic therapy and other modalities III*, 3191:243-251.
- Hamblin M.R. & Mróz P.** (2008). Advances in photodynamic therapy: basic, translational and clinical. *Artech House*, ISBN: 10: 1-59693-277-5, 279 páginas.
- Henderson B.W. & Dougherty T.J.** (1992). How does photodynamic work? *Photochemistry and Photobiology*, 55: 145-157.
- Hendrickx N.** (2006). Mechanism and role of cyclooxygenase-2 up-regulation by photodynamic therapy. *Leuven University Press*, ISBN 10 9058675289, 139 páginas.
- Hill M.J.** (2001). Changes and developments in cancer prevention. *Journal of the Royal Society for the Promotion of Health*, 121: 94-97.
- Holm K., Hegardt C., Staaf J., Vallon-Christersson J., Jonsson G., Olsson H., Borg A. & Ringér M.** (2010). Molecular subtypes of breast cancer are associated with characteristic DNA methylation patterns. *Breast Cancer Research*, 12(3): R36.
- International Organization for Standardization.** (2009). Biological Evaluation of Medical Devices Part 5: Tests for in Vitro Cytotoxicity. ISO 10993-5:2009.
- Issa M.C.A. & Manela-Azulay M.** (2010). Terapia fotodinâmica: revisão da literatura e documentação iconográfica. *Brazilian Annals of Dermatology*, 85: 501-11.
- Josefsen L.B. & Boyle R.W.** (2008). Photodynamic therapy and the development of metal-based photosensitizers. *Metal Based Drugs*, 7: 1-24.
- Jyothish K., Arun K.T. & Ramaiah D.** (2004). Synthesis of novel quinaldine-based squaraine dyes: effect of substituents and role of electronic factors. *Organic Letters*, 6: 3965-3968.
- Kim S., Mor G.K., Paulose M., Varghese, O.K., Baik C. & Grimes, C.A.** (2010). Molecular Design of Near-IR Harvesting Unsymmetrical Squaraine Dyes. *Langmuir*, 26: 13486-13492.
- Konan Y.N., Chevallier J., Gurny R. & Allémann E.** (2002). State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 66: 89-106.
- Konopla K. & Goslinski T.** (2007). Photodynamic Therapy in Dentistry. *Journal of Dental Research*, 86: 694-707.
- Kubler A.C.** (2005). Photodynamic therapy. *Medical Laser Application*, 20: 37-45.
- Levine P.** (2012). Synthesis of a Near-Infrared Emitting Squaraine Dye in an Undergraduate Organic Laboratory Department of Chemistry, University of Rhode Island, Kingston, Rhode Island 02881, United States. *Journal of Chemical Education*, 89: 1186-1189.
- Lipson R.L., Aldes E. & Olsen, A.** (1961). The use of a derivative of hematoporphyrin in tumor detection. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1: 1-11.
- Lipson R.L., Gray M.J. & BaldoS E.J.** (1966). Hematoporphyrin derivative for detection and management of cancer. *Proceedings of the 9th International Cancer Congress*, Tokyo, Japan, 393 páginas.
- Machado A.E.H.** (2000). Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. *Química Nova*, 23: 237-243.
- Maisch T.** (2007). Anti-microbial photodynamic therapy: useful in the future? *Lasers in Medical Science*, 22: 83-91.
- Mishra A., Behera R.K., Behera P.K., Mishra B.K. & Behera, G.B.** (2000). Cyanines during the 1990s: A Review. *Chemical Reviews*, 100: 1973-2012.

- Mroz P., Yaroslavsky A., Kharkwal G.B. & Hamblin M.R.** (2011). Cell death pathways in photodynamic therapy of cancer. *Cancers*, 3: 2516-2539.
- Nawalanya K., Rusinc A., Kepczynskia, M., Filipczak P., Kumoreka M., Kozika B., Weitmand H., Ehrenbergd B., Krawczyk Z., & Nowakowska M.** (2012). Novel nanostructural photosensitizers for photodynamic therapy: *In vitro* studies. *International Journal of Pharmaceutics*, 430: 129-140.
- Nowis D., Makowski M., Stoklosa T., Legat M., Issat T. & Golab J.** (2005). Direct tumor damage mechanisms of photodynamic therapy. *Acta Biochimica Polonica*, 52: 339-352.
- Nyman E. & Hynninen P.H.** (2004). Research advances in the use of tetrapyrrolic photosensitizers for photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 73: 1-28.
- O'Brien J., Wilson I., Orton T. & Pognan, F.** (2000). Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *European Journal of Biochemistry*, 267: 5421-5426.
- O'Connor A.E., Gallagher W.M. & Byrne A.T.** (2009). Porphyrin and nonporphyrin photosensitizers in oncology: preclinical and clinical advances in photodynamic therapy. *Photochemistry and photobiology*, 85: 1053-74.
- Ortel B., Shea C.R. & Calzavara-Pinton P.** (2009). Molecular mechanisms of photodynamic therapy. *Frontiers in Bioscience*, 14: 4157-4172.
- Pardal A.C., Ramos S.S., Santos P., Reis L.V. & Almeida P.** (2002). Synthesis and spectroscopic characterisation of N-alkyl quaternary ammonium salts typical precursors of cyanines. *Molecules*, 7: 320-330.
- Perrin D.D. & Armarego W.L.F.** (1988). Purification of laboratory chemicals. *Pergamon Press*, Oxford, 391, ISBN 0080347142.
- Perussi J. R.** (2007). *Química Nova*, 30: 988-994.
- Pervaiz S.** (2001). Reactive oxygen-dependent production of novel photochemo-therapeutic agents. *The FASEB Journal*, 15: 612-617.
- Pervaiz S. & Olivo M.** (2006). Frontiers in research review: cutting-edge molecular approaches to therapeutics. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 33: 551-556.
- Plaetzer K., Krammer B., Berlanda J., Berr F. & Kiesslich T.** (2009). Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: fundamental aspects. *Lasers in medical science*, 24: 259-68.
- Policard A.** (1924). A study on the available aspects of experimental tumours examined by Wood's light. *Comptes Rendus Des Seances De La Societe De Biologie Et De Ses Filiales*, 91: 1423-1424.
- Raab O.** (1900). Uber die Wirkung fluoreszierender Stoffe auf Infusorien. *Zeitung Biology*, 39: 524-526.
- Reis L. V., Serrano J. P., Almeid P. & Santos P. F.** (2009). The synthesis and characterization of novel, aza-substituted squarylium cyanine dyes. *Dyes and Pigments*, 81: 197-202.
- Ribeiro J.N., Flores A.V., Mesquita R.C., Nicola J.H. & Nicola E.M.D.** (2005). Terapia Fotodinâmica: uma luz na luta contra o câncer. *Physicae*, 5: 5-14.
- Ribeiro J.N., Silva A. & Jorge R.** (2004). Involvement of mitochondria in apoptosis of cancer cells induced by photodynamic therapy. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, 40: 383-390.
- Riss T.L., Moravec R.A., Niles A.L., Benink H.A., Worzella T.J. & 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., Evans D.H. & Abrahamse H.** (2009). Photodynamic therapy (PDT): a short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT. *Journal of photochemistry and photobiology B: Biology*, 96: 1-8.
- Rocha M.S.T.** (2010). Terapia fotodinâmica sobre carcinoma mamário de cadela cultivado *in vitro*. Dissertação de Mestrado em Saúde animal: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, 85 páginas e referências aí citadas.
- Ruddon R.W.** (2007) *Cancer Biology*. Oxford University Press: New York, ISBN-13: 978-0-19-517543-1, 545 páginas.
- Santos P.F., Reis L., Almeida P., Oliveira A.S. & Ferreira L.F.V.** (2003). Singlet oxygen generation ability of squarylium cyanine dyes. *Journal of Photochemistry and photobiology A: Chemistry*, 160: 159-161.
- Schwartz S., Absolon K. & Vermund, H.** (1955). Some relationships of porphyrins, x-rays, and tumors. *University of Minnesota Medical Bulletin*, 7: 7-13.
- Silva A.M.G., Tomé A.C., Neves M.G.P.S. & Cavaleiro J.A.S.** (2000). Novel barrelene-fused chlorins by Diels-Alder reactions. *Tetrahedron Lett*, 41: 3065-3068.
- Solana C.A.** (2005). Aspectos psicológicos en el pacientes superviviente. *Oncologia*, 28: 151-163.
- Stockert J.C., Blázquez-Castro A., Canete M., Horobin, R.W. & Villanueva Á.** (2012). MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. *Acta Histochemica*, 114: 785-796.
- Tatikolov, A.S.** (2012). Polymethine dyes as spectral-fluorescent probes for biomacromolecules. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*, 13: 55-90.
- Torres, E.** (2010). Fotoquímica e caracterização espectroscópica de novos corantes cianínicos. Dissertação de Mestrado em Análises laboratoriais: Universidade de Trás-os-Montes e AltoDouro, Vila Real, Portugal, 133 páginas.
- Von Tappeiner H.H. & Jesionek A.** (1903). Therapeutische versuche mit fluorescierenden stoffen. *Munch Med Wochenschr*, 47: 2042-2044.
- Wan M.T. & Lin J.Y.** (2014). Current evidence and applications of photodynamic therapy in dermatology. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*, 7: 145-16.
- Weishaupt K.R., Gomer C.J. E Dougherty T.J.** (1976). Identification of singlet oxygen as cytotoxic agent in photo-inactivation of a murine tumor. *Cancer Research*, 36: 2326-2329.
- 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: 1035-1042.
- Yan Y., Zheng M., Chen Z., Yu X., Yang X., Ding Z. & Xu L.** (2010). Studies on preparation and photodynamic mechanism of chlorin P6-13, 15-N (cyclohexyl) cycloimide (Chlorin-H) and its antitumor effect for photodynamic therapy in vitro and in vivo. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 18: 6282-6291.
- Yano S., Hiroharab S., Obatac M., Hagiya Y., Ogurad S., Ikedab A., Kataokae H., Tanakae M. & Johe T.** (2011). Current states and future views in photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*, 12: 46-67.