



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR

Ciências

# **Síntese de carbocianinas 6-substituídas e estudo da sua possível aplicação no cancro da mama**

**João Pedro Fonseca Marques**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em

**Bioquímica**

(2º ciclo de estudos)

Orientador: Prof. Doutor Renato Emanuel Félix Boto

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Doutora Luiza Augusta Tereza Gil Breitenfeld Granadeiro

**Covilhã, outubro de 2016**

*O conteúdo da presente Dissertação é da exclusiva responsabilidade do autor*

---

(João Pedro Fonseca Marques)

**“Work hard in silence,  
Let your success be your noise”  
Frank Ocean**

# Agradecimentos

Em primeiro lugar, quero agradecer ao meu orientador, Professor Doutor Renato Boto, pelo voto de confiança, ao me permitir iniciar o meu percurso na síntese em química orgânica há dois anos atrás. O meu sincero obrigado por todo o incentivo, disponibilidade, paciência, apoio científico, transmissão incansável de conhecimentos e, acima de tudo, um enorme obrigado pela sua amizade.

À minha co-orientadora, Professora Doutora Luiza Granadeiro, pela sua constante disponibilidade, incansável ajuda, pela vasta transmissão de conhecimento e pelas suas palavras de ânimo, o meu muito obrigado.

Ao Professor Doutor Paulo Almeida, pela sua disponibilidade, ajuda e amizade.

À Professora Doutora Elisa Cairrão por toda a disponibilidade e entreaajuda.

À Doutora Catarina Ferreira, por todo o auxílio prestado na Microscopia Confocal.

À Doutora Susana Ramos que muito me ajudou a dar os primeiros passos no laboratório de síntese, pela sua boa disposição contagiante, por todos os conhecimentos transmitidos e pela distante, mas contínua amizade.

A todos os meus colegas de laboratório destes últimos anos, pelo companheirismo, partilha e por todos os bons momentos.

Aos meus amigos por todas as palavras de incentivo e apoio incondicional.

Ao meu irmão, pela amizade, palavras de força e por todos os conselhos.

Aos meus pais, por todo o apoio, paciência, compreensão, educação, conselhos, pelos imensos esforços e por todo o amor. Obrigado por acreditarem sempre em mim.

## Resumo

As cianinas, sintetizadas pela primeira vez em 1856 por Greville Williams, são uma classe de compostos catiónicos pertencentes à família dos corantes polimetínicos. A sua estrutura consiste em duas subunidades heterocíclicas azotadas, ligadas por uma cadeia mono- ou polimetínica. Embora estes compostos tenham começado a ser utilizados no mundo da fotografia, nos últimos anos têm sido estudados na deteção e sequenciação de ADN, em citometria de fluxo e em microscopia de fluorescência. As cianinas têm também sido estudadas na doença de Alzheimer; na terapia fotodinâmica como fotossensibilizadores, ou ainda como possíveis agentes anticancerígenos para o cancro do cólon, leucemia e melanoma.

O cancro da mama é uma das neoplasias mundialmente mais comuns no sexo feminino, apresentando-se como a segunda principal causa de morte na mulher. Existem diversos fenótipos e perfis morfológicos associados a esta neoplasia. No entanto, o cancro hormono-dependente representa cerca de 85% de todos os cancros da mama. Atualmente, a terapia hormonal utilizada baseia-se principalmente na utilização de anti-estrogénios ou inibidores da aromatase. No entanto, os diversos efeitos secundários associados a estas terapias, bem como a sua baixa seletividade para as células do cancro da mama e o desenvolvimento de resistência, levam à investigação de novos compostos com possível ação anticancerígena, eficientes no combate a esta doença.

Este trabalho tem como objetivos principais a síntese de novas carbocianinas, variando a sua base heterocíclica, o tamanho da cadeia alquílica e a introdução de alguns grupos substituintes na posição 6; o estudo do efeito destes compostos na proliferação e viabilidade celular em células epiteliais com carcinoma da mama (MCF-7) e em fibroblastos da derme humana, recorrendo ao ensaio de MTT e ao ensaio do ácido bicinconínico (BCA); e ainda o estudo da localização intracelular das carbocianinas através da microscopia confocal de varredura a laser.

Os resultados obtidos no estudo relativo à proliferação e viabilidade dos compostos sintetizados, sugerem que alguns dos compostos estudados estão associados a um processo de apoptose e que o tamanho da cadeia *N*-alquílica se apresenta como um fator importante na toxicidade destes compostos. No entanto, a importância da restante estrutura não pode ser desprezada.

## Palavras-chave

Carbocianinas, cancro da mama, MCF-7, citotoxicidade

# Abstract

Cyanines, first synthesized in 1856 by Greville Williams, are a class of cationic compounds that belong to the polymethine dye family. They consist in two nitrogen heterocyclic subunits connected by one mono- or polymethine bond. Although these compounds were first used in the field of photography, in the last years cyanines have been studied in DNA detection and sequencing, in flow cytometry and in fluorescence microscopy. Cyanines have also been widely used in Alzheimer's disease; as photosensibilizers in photodynamic therapy, or in colon cancer, in leukaemia and melanoma as anticarcinogens.

Breast cancer is one of the world's most common cancer in women, presenting itself as the second leading cause of death in women. There are several phenotypes and morphological profiles associated with the type of cancer. However, the hormone dependent cancer is about 85% of all breast cancer cases. Nowadays, the hormone therapy used is mainly based on the use of anti-estrogens and aromatase inhibitors. Nevertheless, the several secondary effects associated to this therapies, as well as its low selectivity for the breast cancer cells and the development of resistance, lead to the new compounds' research with potential anti-cancer properties, effective to fight against this disease.

The mainly aims of this work are the synthesis of new carbocyanines, varying the heterocyclic base, alkyl chain's size, and the introduction of some substituent groups in 6 position; the study of their effect on cell proliferation and viability in epithelial breast carcinoma cells (MCF-7) and normal human dermal fibroblasts (NHDF), using the MTT assay and the bicinchoninic acid assay (BCA); and also the study of the carbocyanines' intracellular localization by confocal laser scanning microscopy.

The results obtained in the cell proliferation and viability studies, suggest that some of the used compounds are associated with apoptosis and that the size of the *N*-alkyl chain presents itself as an important factor in the toxicity of these compounds. However, the importance of the remaining structure can't be underestimated.

## Keywords

Carbocyanines, breast cancer, MCF-7, cytotoxicity.

# Índice

Resumo .....	v
Abstract .....	vi
Lista de Figuras.....	xi
Lista de Esquemas .....	xii
Lista de Tabelas .....	xiii
Lista de Acrónimos e Abreviaturas.....	xiv
I. Introdução .....	1
1.1. Cianinas .....	2
1.1.1. Caraterísticas das cianinas .....	3
1.1.2. Síntese de sais de amónio quaternário .....	3
1.1.3. Síntese de cianinas .....	6
1.1.4. Aplicações das cianinas .....	9
1.2. Cianinas e o Cancro .....	9
1.3. Cancro.....	10
1.3.1. Cancro da Mama .....	11
1.3.1.1. Fármacos utilizados na terapia do cancro da mama hormono-dependente. 12	
1.3.1.2. Desenvolvimento de novas terapias.....	16
II. Objetivos .....	18
III. Materiais e Métodos .....	20
3.1. Preâmbulo.....	21
3.2. Reagentes e Equipamentos.....	21
3.3. Síntese de Carbocianinas .....	22
3.3.1. Síntese de precursores de sais de amónio quaternário.....	22
3.3.1.1. Síntese do 2-metil-6-nitrobenzotiazole (1) .....	22
3.3.1.2. Síntese do 6-amino-2-metilbenzotiazole (2).....	23
3.3.1.3. Síntese do tert-butil-(2-metilbenzo[d]tiazol-6-il)carbamato (3).....	23
3.3.1.4. Síntese do 6-iodo-2-metilbenzotiazole (4) .....	24
3.3.1.5. Síntese da N-(2-metilbenzotiazol-6-il)acetamida (5) .....	24

<b>3.3.2.</b>	<b>Síntese de sais de amónio quaternário precursores das carbocianinas</b> .....	25
3.3.2.1.	Síntese do iodeto de 6-((tert-butoxicarbonil)amino)-2-metil-3-pentilbenzo[ <i>d</i> ]tiazol-3-io (9a) .....	25
3.3.2.2.	Síntese do iodeto de 6-((tert-butoxicarbonil)amino)-2-metil-3-undecilbenzo[ <i>d</i> ]tiazol-3-io (9b) .....	25
3.3.2.3.	Síntese do iodeto de 6-iodo-2-metil-3-pentilbenzo[ <i>d</i> ]tiazol-3-io (10a).....	26
3.3.2.4.	Síntese do iodeto de 6-iodo-2-metil-3-undecilbenzo[ <i>d</i> ]tiazol-3-io (10b).....	26
3.3.2.5.	Síntese do iodeto de 6-acetamida-2-metil-3-pentilbenzotiazol-3-io (11a).....	26
3.3.2.6.	Síntese do iodeto de 6-acetamida-3-undecil-2-metilbenzotiazol-3-io (11b)....	27
3.3.2.7.	Síntese do iodeto de 6-metoxi-2-metil-3-pentilbenzotiazol-3-io (12a) .....	27
3.3.2.8.	Síntese do iodeto de 6-metoxi-2-metil-3-undecilbenzotiazol-3-io (12b) .....	28
3.3.2.9.	Síntese do iodeto de 2,3,3-trimetil-1-pentil-3H-indol-1-io (13a) .....	28
3.3.2.10.	Síntese do iodeto de 2,3,3-trimetil-1-undecil-3H-indol-1-io (13b) .....	29
3.3.2.11.	Síntese do iodeto de 1,1,2-trimetil-3-pentil-1H-benzo[ <i>e</i> ]indol-3-io (14a) .....	29
3.3.2.12.	Síntese do iodeto 1,1,2-trimetil-3-undecil-1H-benzo[ <i>e</i> ]indol-3-io (14b) .....	30
<b>3.3.3.</b>	<b>Síntese de carbocianinas</b> .....	31
3.3.3.1.	Síntese do iodeto de 6-iodo-2-((1E,3E)-3-(6-iodo-3-pentilbenzo[ <i>d</i> ]tiazole-2(3H)-ilideno)prop-1-en-1-il)-3-pentilbenzo[ <i>d</i> ]tiazol-3-io (16a) .....	31
3.3.3.2.	Síntese do iodeto de 6-acetamida-2-((1E,3E)-3-(6-acetamida-3-pentilbenzo[ <i>d</i> ]tiazole-2(3H)-ilideno)prop-1-en-1-il)-3-pentilbenzo[ <i>d</i> ]tiazol-3-io (17a).....	31
3.3.3.3.	Síntese do iodeto de 6-acetamida-2-((1E,3E)-3-(6-acetamida-3-undecilbenzo[ <i>d</i> ]tiazole-2(3H)-ilideno)prop-1-en-1-il)-3-undecilbenzo[ <i>d</i> ] tiazol-3-io (17b) ....	32
3.3.3.4.	Síntese do iodeto de 6-metoxi-2-((1E,3E)-3-(6-metoxi-3-pentilbenzo[ <i>d</i> ]tiazol-2(3H)-ilideno)prop-1-en-1-il)-3-pentilbenzo[ <i>d</i> ]tiazol-3-io (18a).....	33
3.3.3.5.	Síntese do iodeto de 6-metoxi-2-((1E,3E)-3-(6-metoxi-3-undecilbenzo[ <i>d</i> ]tiazole-2(3H)-ilideno)prop-1-en-1-il)-undecilbenzo[ <i>d</i> ]tiazol-3-io (18b) .....	33
3.3.3.6.	Síntese do iodeto de 2-((E)-3-((Z)-3,3-dimetil-1-pentilindolin-2-ilidene)prop-1-en-1-il)-3,3-dimetil-1-pentil-3H-indol-1-io (19a).....	34
3.3.3.7.	Síntese do iodeto de 2-((E)-3-((Z)-3,3-dimetil-1-undecilindolin-2-ilidene)prop-1-en-1-il)-3,3-dimetil-1-undecil-3H-indol-1-io (19b).....	34
3.3.3.8.	Síntese do iodeto de 2-((1E,3Z)-3-(1,1-dimetil-3-pentil-1,3-dihidro-2H-benzo[ <i>e</i> ]indol-2-ilideno)prop-1-en-1-il)-1,1-dimetil-3-pentil-1H-benzo[ <i>e</i> ]indol-3-io (20a) ....	35
3.3.3.9.	Síntese do iodeto de 2-((1E,3Z)-3-(1,1-dimetil-3-undecil-1,3-dihidro-2H-benzo[ <i>e</i> ]indol-2-ilideno)prop-1-en-1-il)-1,1-dimetil-3-undecil-1H-benzo[ <i>e</i> ]indol-3-io (20b)...	35

3.3.3.10.	Síntese do iodeto de 6-amino-2-((1E,3E)-3-(6-amino-3-pentilbenzo[d]tiazole-2(3H)-ilideno)prop-1-en-1-il)-3-pentilbenzo[d]tiazol-3-io (21a).....	36
3.3.3.11.	Síntese do iodeto de 6-amino-2-((1E,3E)-3-(6-amino-3-undecilbenzo[d]tiazol-2(3H)-ilideno)prop-1-en-1-il)-3-undecilbenzo[d]tiazol-3-io (21b).....	36
3.4.	<b>Cultura de células</b> .....	37
3.4.1.	<b>Passagem de Células</b> .....	38
3.4.2.	<b>Contagem de células</b> .....	38
3.4.3.	<b>Armazenamento de células</b> .....	38
3.4.4.	<b>Ensaio de Citotoxicidade</b> .....	39
3.4.4.1.	Ensaio de viabilidade pelo método MTT .....	39
3.4.4.2.	Doseamento de proteínas pelo método BCA .....	39
3.5.	<b>Microscopia confocal de varrimento a laser (CLSM)</b> .....	40
3.6.	<b>Análise estatística</b> .....	41
IV.	<b>Resultados e Discussão</b> .....	42
4.1.	<b>Preâmbulo</b> .....	43
4.2.	<b>Síntese das carbocianinas</b> .....	43
4.2.1.	<b>Síntese dos precursores de sais de amónio quaternário</b> .....	43
4.2.1.1.	Síntese do 2-metil-6-nitrobenzotiazole (1) .....	43
4.2.1.2.	Síntese do 6-amino-2-metilbenzotiazole (2).....	44
4.2.1.3.	Síntese do tert-butil-(2-metilbenzo[d]tiazol-6-il)carbamato (3).....	45
4.2.1.4.	Síntese do 6-iodo-2-metilbenzotiazole (4) .....	47
4.2.1.5.	Síntese da N-(2-metilbenzotiazol-6-il)acetamida (5) .....	48
4.2.2.	<b>Síntese de sais de amónio quaternário</b> .....	49
4.2.3.	<b>Síntese de Carbocianinas</b> .....	61
4.2.3.1.	Síntese de tiocarbocianinas.....	61
4.2.3.2.	Síntese de Indocarbocianinas.....	70
4.3.	<b>Curva de crescimento celular através do doseamento de proteínas</b> .....	79
4.4.	<b>Estudos de citotoxicidade</b> .....	80
4.4.1.	<b>Otimização das condições experimentais</b> .....	80
4.4.2.	<b>Doseamento de proteínas pelo método BCA</b> .....	80
4.4.3.	<b>Ensaio de viabilidade pelo método MTT</b> .....	85
4.5.	<b>Identificação da internalização dos compostos por CLSM</b> .....	86

V.	Conclusão e Perspetivas Futuras .....	88
VI.	Referências Bibliográficas .....	90

# Lista de Figuras

<b>Figura 1</b> Esquema geral da estrutura das cianinas .....	2
<b>Figura 2</b> Bases heterocíclicas precursoras de sais de amónio quaternário .....	4
<b>Figura 3</b> Estrutura química dos corantes cianínicos esquarílicos. ....	4
<b>Figura 4</b> Doseamento de proteínas pelo método BCA às 48h e 96 horas após cultura das células MCF-7. ....	79
<b>Figura 5</b> Efeito citotóxico das carbocianinas na linha celular MCF-7 após 48h de incubação. Resultados obtidos pelo método BCA. ....	81
<b>Figura 6</b> Resultados obtidos na linha celular MCF-7 para os compostos com cadeia N-alquílica de (A) cinco carbonos e (B) de onze carbonos. Resultados obtidos pelo método BCA. ....	83
<b>Figura 7</b> Resultados obtidos para o doseamento de proteínas nas células NHDF na presença de 20 µg/mL dos compostos <b>17a</b> (A) e <b>17b</b> (B). ....	84
<b>Figura 8</b> Comparação dos resultados obtidos para o doseamento de proteínas nas células MCF-7 e NHDF na presença de 20 µg/mL dos compostos <b>17a</b> e <b>17b</b> . ....	84
<b>Figura 9</b> Resultados obtidos através dos dois métodos: BCA (B) e MTT (M) para a concentração de 2 µg/mL, na linha celular MCF-7. ....	85
<b>Figura 10</b> Imagem CLSM de células MCF-7 após a incubação com (A) <b>17b</b> durante 1 hora (B) <b>17b</b> durante 12 horas (C) <b>18a</b> durante 1 hora (D) <b>18a</b> durante 12 horas (E) <b>20b</b> durante 1 hora (F) <b>20b</b> durante 12 horas (G) <b>22b</b> durante 1 hora (H) <b>22b</b> durante 12 horas. ....	87

# Lista de Esquemas

Esquema 1 Síntese geral de sais de amónio quaternário.....	3
Esquema 2 Resumo esquemático das reações de substituição da posição 6 da base heterocíclica.....	5
Esquema 3 Método de síntese das monometinocianinas (método do tioalquilo). ....	6
Esquema 4 Método de síntese das trimetinocianinas simétricas (método do ortoéster). ....	6
Esquema 5 Método de síntese das trimetinocianinas simétricas e assimétricas (método da difenilformamidina). . ....	7
Esquema 6 Método de síntese das pentametinocianinas (método da N'-(3-(fenilimino)propenil)anilina). ....	8
Esquema 7 Vias metabólicas diferentemente inibidas pelos vários IAs. ....	14
Esquema 8 Na mulher pré-menopáusia, os ovários são os principais produtores de estrogénio, e a sua biossíntese é regulada pelo hipotálamo e pela pituitária através da hormona libertadora de gonadotrofinas (GnRH) e pela hormona folículo-estimulante (FSH)..	15
Esquema 9 Esquema representativo de diferentes mecanismos de resistência ao Tam.....	17
Esquema 10 Síntese do 2-metil-6-nitrobenzotiazole.....	43
Esquema 11 Síntese do 6-amino-2-metilbenzotiazole .....	45
Esquema 12 Síntese do tert-butil-(2-metilben[d]zotiazol-6-il)carbamato .....	46
Esquema 13 Síntese do 6-iodo-2-metilbenzotiazole .....	47
Esquema 14 Síntese da N-(2-metilbenzotiazol-6-il)acetamida.....	48
Esquema 15 Sais de amónio quaternário sintetizados .....	50
Esquema 16 Procedimento geral da síntese de carbocianinas .....	61
Esquema 17 Síntese geral das aminocarbocianinas .....	76

## Lista de Tabelas

Tabela 1	Estrutura das carbocianinas previamente sintetizadas e utilizadas nos ensaios.....	40
Tabela 2	Dados físicos e espectroscópicos e $\eta$ do composto 1 .....	44
Tabela 3	Dados físicos e espectroscópicos e $\eta$ do composto 2 .....	45
Tabela 4	Dados físicos e espectroscópicos e $\eta$ do composto 3 .....	46
Tabela 5	Dados físicos e espectroscópicos e $\eta$ do composto 4 .....	48
Tabela 6	Dados físicos e espectroscópicos e $\eta$ do composto 5 .....	49
Tabela 7	Dados físicos, espectroscópicos e $\eta$ do composto 10a. ....	52
Tabela 8	Dados físicos, espectroscópicos e $\eta$ dos compostos 11a e 11b. ....	54
Tabela 9	Dados físicos, espectroscópicos e $\eta$ dos compostos 12a e 12b. ....	56
Tabela 10	Dados físicos, espectroscópicos e $\eta$ dos compostos 13a e 13b. ....	58
Tabela 11	Dados físicos, espectroscópicos e $\eta$ dos compostos 14a e 14b. ....	60
Tabela 12	Dados físicos, espectroscópicos e $\eta$ do composto 16a.....	63
Tabela 13	Dados físicos, espectroscópicos e $\eta$ dos compostos 17a e 17b. ....	66
Tabela 14	Dados físicos, espectroscópicos e $\eta$ dos compostos 18a e 18b. ....	69
Tabela 15	Dados físicos, espectroscópicos e $\eta$ dos compostos 19a e 19b. ....	72
Tabela 16	Dados físicos, espectroscópicos e $\eta$ dos compostos 20a e 20b. ....	75
Tabela 17	Dados físicos, espectroscópicos e $\eta$ do composto 21b.....	78

## Lista de Acrónimos e Abreviaturas

$\eta$	Rendimento
$\nu_{\text{máx}}$	Frequência máxima da banda de absorção
)))	Ultrassons
$\Delta$	Aquecimento
Ac	Acetil
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
alq.	Cadeia alquílica
arom.	aromático
ATP	Adenosina trifosfato
BCA	Ácido bicinconínico
BOC	Dicarbonato de di-tert-butilo
c.c.f.	Cromatografia em camada fina
CLSM	Microscopia confocal de varrimento a laser (do inglês <i>Confocal laser scanning microscopy</i> )
d	Dupleto
dd	duplo dupleto
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ER	Recetor de Estrogénio (do inglês <i>Estrogen Receptor</i> )
EREs	Elementos de resposta ao estrogénio (do inglês <i>Estrogen Response Element</i> )
ER $\alpha$	Recetor de estrogénio alfa
ER $\beta$	Recetor de estrogénio beta
ESR 1	Recetor de estrogénio 1 (do inglês <i>Estrogen Receptor 1</i> )
FTIR	Espetroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (do inglês <i>Fourier transform infrared spectroscopy</i> )
HEPES	Ácido (4-(2-hidroxiethyl)-1-piperazina-etanosulfónico
HER2	Recetor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano (do inglês <i>human epidermal growth factor receptor 2</i> )
IA	Inibidores da aromatase
IV	Infravermelho

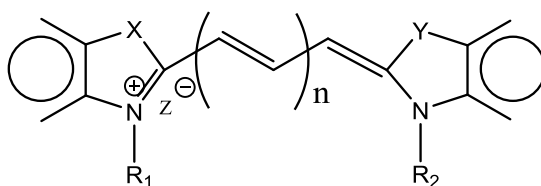
J	Constante de acoplamento
lit.	literatura
m	multipleteo
MCF-7	linha celular de adenocarcinoma humano (do inglês <i>Michigan Cancer Foundation-7</i> )
MetOH	Metanol
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
NHDF	Fibroblastos da derme humana ( <i>Normal Human Dermal Fibroblasts</i> )
p.f.	Ponto de fusão
PBS	Tampão de fosfato salino (do inglês <i>Phosphate Buffered Saline</i> )
PR	Recetor de Progesterona (do inglês <i>Progesterone Receptor</i> )
q	quarteto
quint.	quinteto
RMN <sup>13</sup> C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono
RMN <sup>1</sup> H	Ressonância Magnética Nuclear de Protão
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
s	singuleto
SD	Desvio padrão (do inglês <i>Standard Deviation</i> )
SERMs	Moduladores seletivos dos recetores de estrogénios (do inglês <i>Selective estrogen receptor modulators</i> )
Tam	Tamoxifeno
Tos <sup>-</sup>	lão Tosilato
UV	Ultravioleta
VIS	Visível
δ	Desvio químico
λ <sub>máx</sub>	Comprimento de onda da máxima absorção

# I. Introdução

## 1.1. Cianinas

A história das cianinas inicia em 1856 quando Greville Williams obtém, acidentalmente, um composto colorido, ao fazer reagir quinolina, que possuía lepidina como impurezas, com iodeto de isopentilo e hidróxido de sódio. A cor azul do produto obtido conferiu-lhe o nome de cianina (do grego *Kianos*, que significa azul escuro), tendo este conceito rapidamente passado a representar uma diversidade de corantes [1-3]. Poucos anos depois da sua descoberta, este tipo de compostos começaram a ser utilizadas na fotografia, nomeadamente no processo de revelação, como sensibilizadores de haletos de prata, impulsionando assim o estudo e síntese de novos compostos [4].

As cianinas são compostos catiónicos, pertencentes à família dos corantes polimetínicos, constituídos por duas subunidades heterocíclicas azotadas terminais, separadas por uma cadeia mono- ou polimetínica de número ímpar (designada por cromóforo) [5]. Uma das subunidades heterocíclicas funciona como doadora e outra como aceitadora de eletrões (figura 1) [6].



$X=Y$  ou  $X \neq Y = N, O, S, Se, C(CH_3)_2, \dots$

$Z^- = Tos^-, I^-, Br^-, Cl^-, \dots$

$n = 0, 1, 2, 3, \dots$

Figura 1 Esquema geral da estrutura das cianinas

As cianinas são classificadas de acordo com o tamanho da cadeia cromófora, a qual se relaciona com o número de grupos metino ( $n$ ) existentes entre as duas subunidades heterocíclicas terminais, sendo que  $n$  pode variar entre 0, 1, 2, 3, (...). As diferentes classes designam-se assim por cianinas ( $n=0$ ), carbocianinas ( $n=1$ ), pentametincianinas ( $n=2$ ), heptametincianinas ( $n=3$ ), entre outras. O limite do comprimento da cadeia metínica é apenas controlado pelas possibilidades sintéticas e pela estabilidade química dos corantes sintetizados que, normalmente, diminui à medida que esta aumenta. Relativamente às subunidades heterocíclicas azotadas, as mais comuns são o benzotiazole, benzoxazole, indole, benzimidazole e a quinolina [3, 5]. Deve-se referir ainda que estes compostos podem ser simétricos ou assimétricos, consoante os grupos terminais e os grupos substituintes ligados aos átomos de azoto sejam idênticos ou diferentes [7-9].

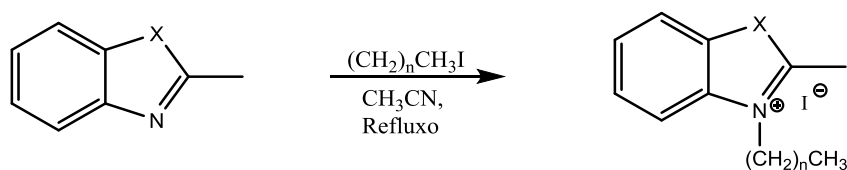
### 1.1.1. Características das cianinas

As cianinas têm sido objeto de estudo devido a fatores como a sua facilidade sintética, ao seu baixo custo de síntese, à sua relativa estabilidade, bem como aos seus coeficientes de absorção molar elevados e intensidades médias de fluorescência. Ainda de realçar que estes corantes absorvem numa gama muito larga do espectro eletromagnético, desde os 340 nm até aos 1400 nm, gama correspondente ao intervalo que vai do ultravioleta (UV) ao infravermelho (IV), estando a sua cor relacionada com a interação de ressonância entre os átomos de azoto nos extremos da cadeia conjugada. A posição de absorção é alterada através de simples modificações estruturais, tais como o tamanho da cadeia metínica ou alteração do núcleo heterocíclico [3, 6, 9, 10].

### 1.1.2. Síntese de sais de amónio quaternário

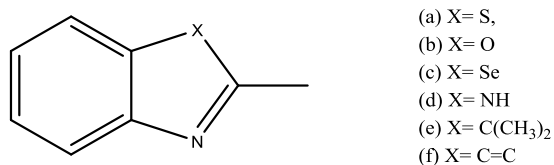
Para a síntese das carbocianinas é necessário proceder previamente à síntese dos seus precursores, os sais de amónio quaternário.

Os sais de amónio quaternário podem ser sintetizados por uma simples reação de quaternização de aminas terciárias ou através da troca aniônica de sais comercialmente disponíveis. Estes compostos são principalmente sintetizados através de duas vias: por fusão *in situ* da base heterocíclica com um reagente alquilante ou por refluxo da base heterocíclica com um agente alquilante na presença de um solvente polar, como por exemplo o acetonitrilo (esquema 1) [11]. Recentemente, a técnica de micro-ondas começou também a ser utilizada na síntese destes sais, devido à diminuição do tempo reacional, bem como a obtenção de produtos mais puros e com melhores rendimentos ( $\eta$ ) [12].



Esquema 1 Síntese geral de sais de amónio quaternário

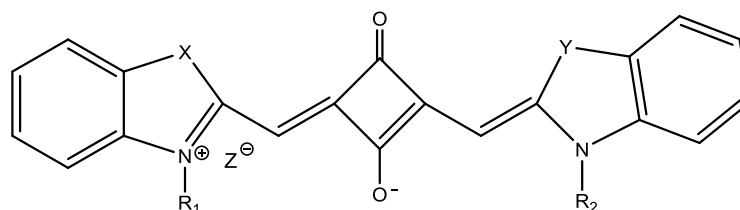
A variedade sintética dos sais de amónio quaternário é elevada, devido à existência de diversas bases heterocíclicas, como por exemplo: o benzotiazole (a), benzoxazole (b), benzosselenazole (c), benzimidazole (d), 3-H-indole (e), quinolina (f), entre outros (figura 2) [13].



**Figura 2** Bases heterocíclicas precursoras de sais de amônio quaternário

A elevada diversidade de sais de amônio quaternário deve-se também à possibilidade da introdução de grupos substituintes nas diferentes bases heterocíclicas.

Santos e colaboradores compararam o efeito da introdução de átomos pesados (como por exemplo do iodo) na posição 6 da parte aromática de cianinas escuras (figura 3) versus o efeito de compostos com a mesma estrutura, mas na ausência de um grupo substituinte [14]. Santos e colaboradores obtiveram melhores resultados na eficiência da produção de oxigênio molecular singuleto para composto substituído, apresentando assim um grande potencial como fotossensibilizador a utilizar na terapia fotodinâmica [14].



X e Y = N, O, S, Se, C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>,...  
 Z<sup>-</sup> = Tos<sup>-</sup>, I<sup>-</sup>, Br<sup>-</sup>, Cl<sup>-</sup>, ...

**Figura 3** Estrutura química dos corantes cianínicos escuras.

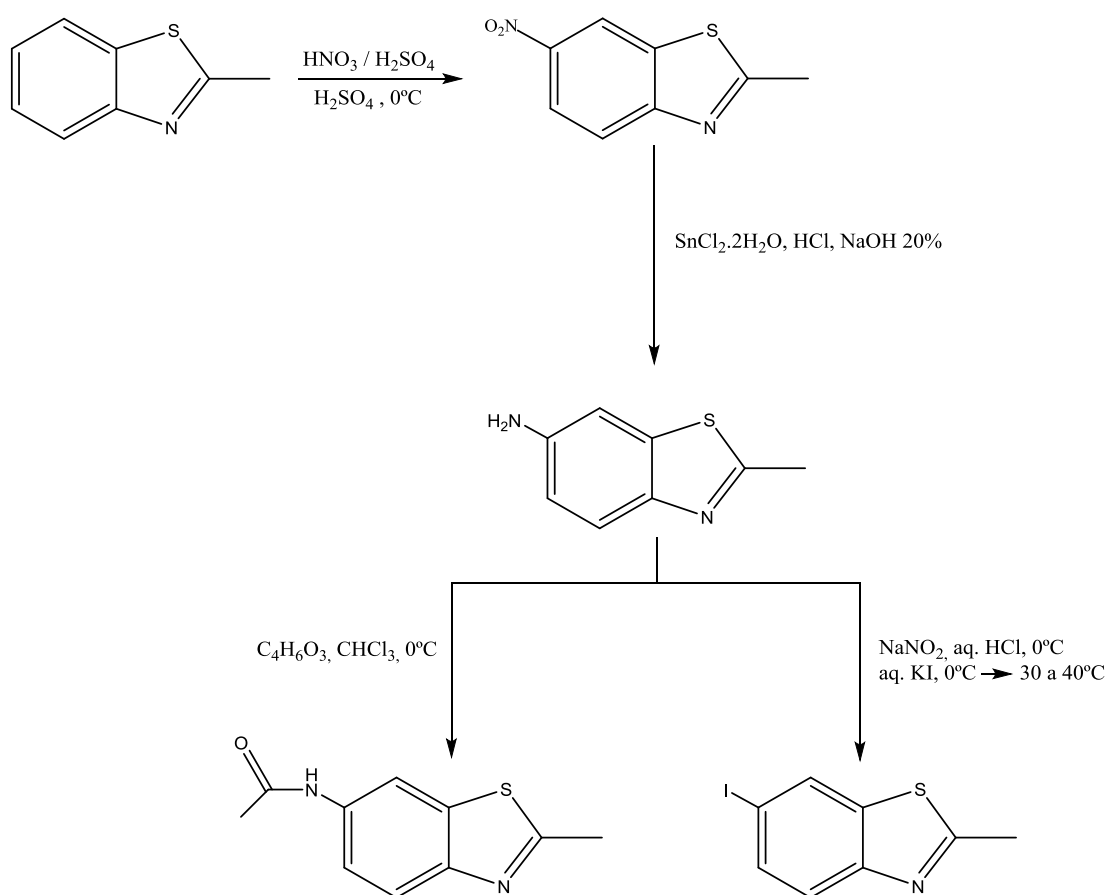
Um dos objetivos deste trabalho será a introdução de grupos substituintes nomeadamente o grupo amino, acetamido, iodo e o metoxi, na posição 6 do 2-metilbenzotiazole.

O composto 2-metil-6-nitrobenzotiazole é o precursor necessário à síntese do 6-amino-2-metilbenzotiazole. Assim, a nitração do 2-metilbenzotiazole é conseguida ao se fazer reagir a base heterocíclica com uma mistura de ácido sulfúrico e ácido nítrico, na presença de ácido sulfúrico, a uma temperatura inferior a 5 °C [14, 15]. Após a obtenção do derivado nitrado, o 6-amino-2-metilbenzotiazole é obtido através de uma redução do grupo nitroso. A reação de redução pode ser feita recorrendo a diversas vias, nomeadamente: através da sonicação de uma mistura do derivado nitrado, com uma solução de etanol 80%, ácido clorídrico concentrado e ferro em pó [15]; através do refluxo de uma mistura do derivado nitrado com o

cloreto de estanho di-hidratado e ácido clorídrico concentrado, sendo posteriormente a solução basificada com uma solução de hidróxido de sódio 20% [16]; ou ainda através da reação do composto nitrado com paládio em carvão ativado e formato de amônio, em tetrahidrofurano e metanol (MetOH) [14].

O 6-amino-2-metilbenzotiazole é o precursor necessário à síntese da *N*-(2-metilbenzotiazol-6-il)acetamida, a qual pode ser obtida ao se fazer reagir com o anidrido acético seco, em clorofórmio, durante uma hora e a uma temperatura inferior a 5 °C, e do 6-iodo-2-metilbenzotiazole, o qual é obtido através da reação do 6-amino-2-metilbenzotiazole com uma solução de nitrito de sódio, na presença de ácido clorídrico concentrado e água, e em seguida adicionada uma solução de iodeto de potássio. Após esta última adição, a mistura é aquecida a 30-40 °C e posteriormente lavada com diclorometano e uma solução de bissulfito de sódio 5% [14].

No esquema 2 poder-se-á observar o resumo da síntese geral destes compostos.

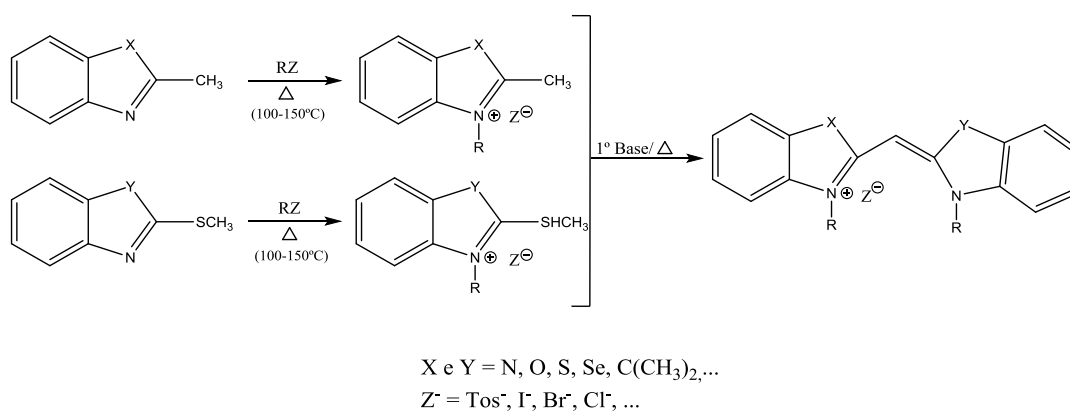


Esquema 2 Resumo esquemático das reações de substituição da posição 6 da base heterocíclica.

### 1.1.3. Síntese de cianinas

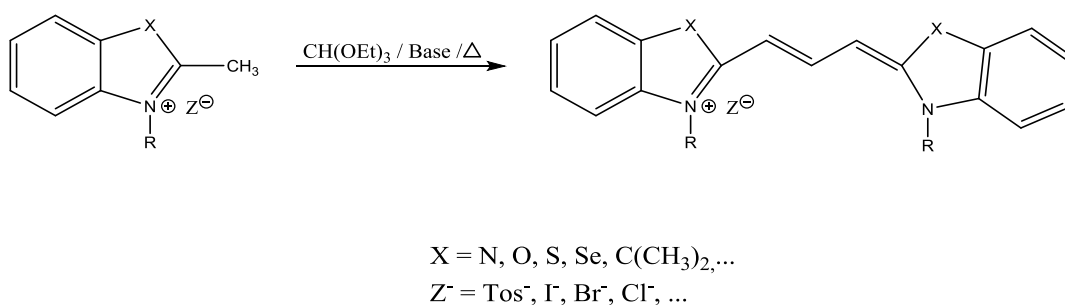
O processo utilizado para a síntese de cianinas depende do comprimento da cadeia polimetínica pretendido. De uma maneira geral, a síntese de cianinas são simples adições nucleofílicas, precedidas ou seguidas de reações de eliminação, ocorrendo desprotonação e remoção de grupos. O precursor-chave são sais de amônio quaternário de 2- ou 4- metilbenzoazóis que, na presença de bases, originam bases metilénicas nucleofílicas (bases de Fischer) [6].

As monometinocianinas simétricas e assimétricas são principalmente sintetizadas pelo método do tioalquilo. Este método consiste na condensação de dois sais de amônio quaternário heterocíclicos: um dos sais apresenta na sua constituição um grupo metilo reativo e o outro um grupo tioalquilo, sendo este último o grupo abandonante (esquema 3). Este método é o mais comum devido aos bons  $\eta$  [3, 6, 17].



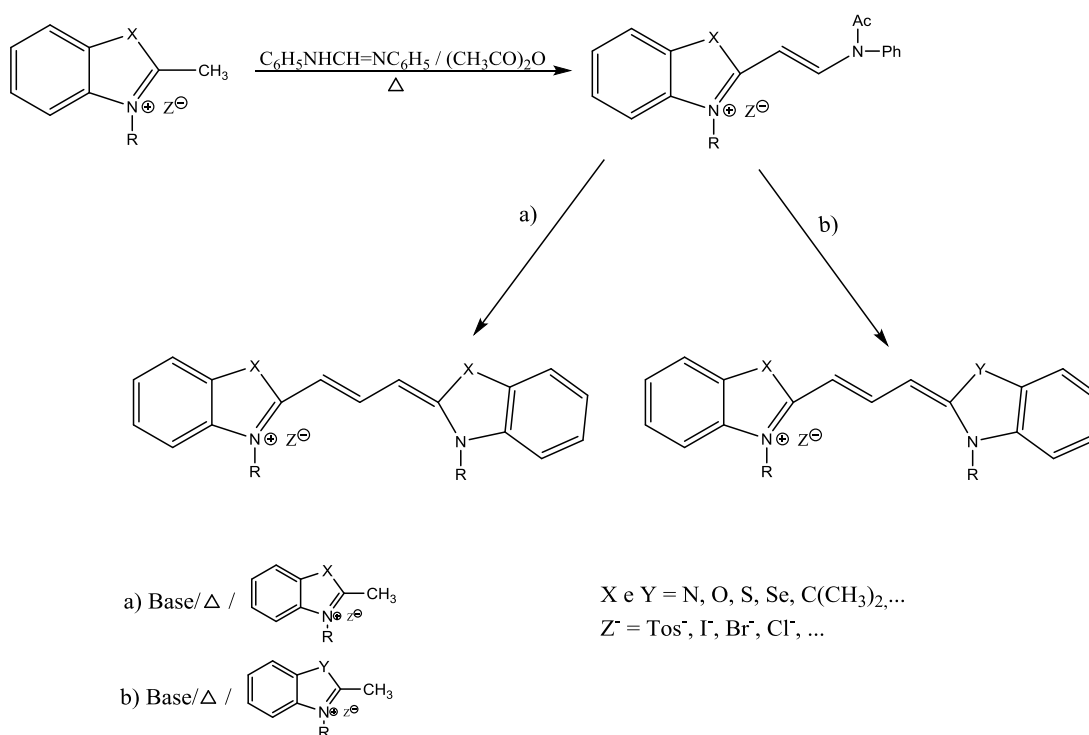
**Esquema 3** Método de síntese das monometinocianinas (método do tioalquilo). Adaptado de Almeida [6].

Quanto à síntese de trimetinocianinas (carbocianinas) simétricas a abordagem comumente utilizada é a do ortoéster. Este método envolve a condensação de dois sais de amônio quaternário pela ação de um ortoéster (normalmente o trietilortoformiato), sob condições básicas (normalmente piridina). No entanto, este método não permite a síntese de carbocianinas assimétricas (esquema 4) [5].



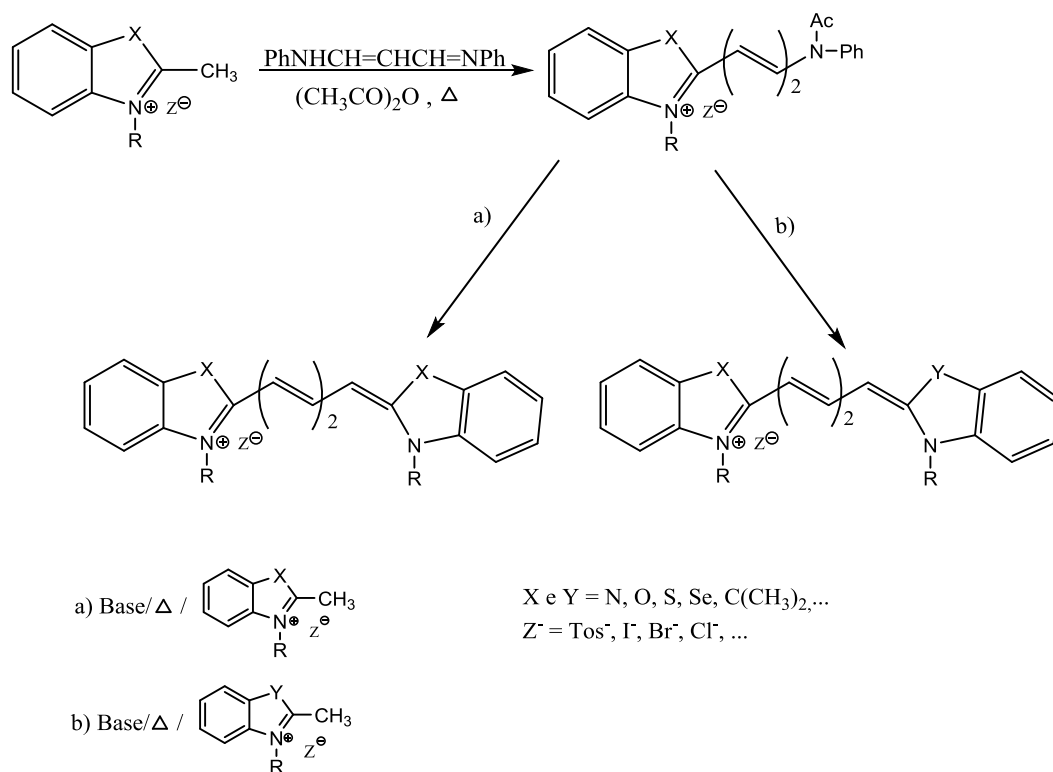
**Esquema 4** Método de síntese das trimetinocianinas simétricas (método do ortoéster). Adaptado de Almeida [6].

Para a síntese das carbocianinas assimétricas pode-se utilizar o método da *N,N'*-difetilformamidina. Este método consiste primeiramente na formação de um intermediário, o sal anilinovinilo, pela reação de um sal de amónio quaternário contendo um grupo metilo reativo, com a difetilformamidina, na presença de anidrido acético (esquema 5). Procede-se depois à condensação deste sal intermediário com um sal de amónio quaternário heterocíclico diferente do primeiro (b). Este método apresenta a vantagem de poder ser também utilizado na síntese de carbocianinas simétricas. Neste caso, faz-se reagir o sal intermediário com o mesmo sal de amónio quaternário utilizado inicialmente (a) [5].



**Esquema 5** Método de síntese das trimetinocianinas simétricas e assimétricas (método da difetilformamidina). Adaptado de Almeida [6].

O método da *N'*-(3-(fenilimino)propenil)anilina é um método idêntico ao da difetilformamidina mas que conduz à formação de pentametincianinas. Consiste na condensação de um sal quaternário de amónio, contendo um grupo metilo reativo, com a *N'*-(3-(fenilimino)propenil)anilina na presença de anidrido acético (esquema 6). O sal intermediário obtido reage depois, na presença de uma base, com um sal de amónio quaternário igual ou diferente ao primeiro utilizado, para originar as pentametincianinas simétricas (a) ou assimétricas (b), respetivamente [6].



**Esquema 6** Método de síntese das pentametinoanilinas (método da *N'*-(3-(fenilimino)propenil)anilina). Adaptado de Almeida [6].

No entanto, como referido anteriormente, a fotoestabilidade das cianinas com maior cadeia metínica (como as pentametino e heptametinoanilinas) é relativamente baixa, quando comparada com a dos corantes de menor cadeia metínica (como as monometinoanilinas e as trimetinoanilinas). De maneira a contrariar esta instabilidade, é frequente a introdução de carbociclos na cadeia insaturada, por substituição de uma unidade etilénica, de modo a estabilizar as cianinas através da rigidificação. Exemplos desta abordagem são as cianinas esquarílicas (figura 3) [3].

#### 1.1.4. Aplicações das cianinas

Após a descoberta de Williams, o interesse pela síntese destes compostos aumentou, nomeadamente para o seu uso na coloração de têxteis. No entanto, estes compostos mostraram ser pouco eficazes, devido à sua fraca resistência à luz. O contínuo estudo destes compostos levou à descoberta das suas propriedades fotossensíveis, nomeadamente a capacidade de transmitir sensibilidade à luz a emulsões de halogeneto de prata numa região do espectro no qual o haleto de prata geralmente não é sensível sendo então integradas no mundo da fotografia, como referido anteriormente [1, 2]. Desde então, foram descobertas múltiplas aplicações para estes corantes. Na década de 90, estes compostos começaram a ser utilizados na produção de meios de gravação ótica (CD,DVD), tintas industriais, lasers e materiais foto-refratários [1, 18]. Devido à sua possível natureza hidrofóbica e catiónica, características que permitem uma forte interação com o ADN, as cianinas têm sido aplicadas como sondas fluorescentes na deteção e sequenciação de ADN, bem como em ensaios imunológicos, em citometria de fluxo, na microscopia de fluorescência, em estudos de potencial de membrana e na marcação de proteínas [13, 19-21]. Nos últimos anos, têm também sido estudadas como possíveis ligandos para separação de biomoléculas por cromatografia de afinidade. Esta abordagem deve-se ao facto das cianinas, uma vez ligadas a um suporte cromatográfico, poderem estabelecer interações específicas com vários tipos de moléculas hidrófobas, hidrofílicas e iónicas [22]. Estudos sugerem que estes compostos apresentam um elevado potencial terapêutico na doença de Alzheimer, devido à sua capacidade de inibir a agregação da proteína tau, bem como os péptidos beta amiloide [23, 24]. Além disso, estes corantes têm também sido estudados como possíveis agentes antitumorais, através da terapia fotodinâmica, funcionando como fotossensibilizadores [25, 26].

### 1.2. Cianinas e o Cancro

As cianinas são moléculas lipofílicas catiónicas e o seu mecanismo de ação em células cancerígenas parece estar principalmente associado à mitocôndria. Diversos estudos indicam que, em resposta à hiperpolarização da membrana mitocondrial, estes compostos acumulam-se preferencialmente na matriz mitocondrial [27, 28]. Anderson e colaboradores, ao estudarem os efeitos citotóxicos de algumas tiocarbocianinas em linhas celulares do cancro do cólon, sugerem que o mecanismo de ação destes compostos consiste na inibição da cadeia respiratória, nomeadamente devido à sua interação com a NADH-ubiquinona redutase [29]. Além disso, um estudo realizado por Ming-Li e colaboradores, sugere que a aplicação de carbocianinas em células do cancro hepatocelular promove a inibição da DNA primase (enzima responsável pela catálise da síntese do *primer* de RNA, o qual apresenta um papel fundamental na replicação do ADN). Assim, a inibição desta enzima implica a inibição da proliferação celular e promove a apoptose [30].

### 1.3. Cancro

O cancro é a principal causa de morte nos países desenvolvidos e a segunda nos países em desenvolvimento. Apesar dos avanços científicos, em 2012 a organização mundial de saúde, reportou 14 milhões de novos casos e 8,2 milhões de mortes associadas a esta patologia, sendo ainda estimado um aumento de 70% em novos casos nas próximas duas décadas [31].

A idade, predisposição genética, fatores ambientais (radiação, poluição, entre outros) e estilo de vida (dieta, tabaco, álcool, entre outros), são os principais fatores de risco para o desenvolvimento de cancro [31]. Estes fatores de stress induzem normalmente alterações genéticas e epigenéticas em células normais, resultando em células disfuncionais.

Segundo Vogelstein, são as alterações em proto-oncogenes e genes supressores de tumor os principais fatores na formação de tumores. Os proto-oncogenes são genes cujos produtos proteicos são responsáveis pela sinalização, proliferação e divisão celulares controlada. Ao sofrerem mutações, estes genes passam a poder estar mais ativos, perdendo o controlo da divisão celular, o que leva a uma proliferação celular aberrante. Os genes supressores de tumor têm como função proteger o ADN de possíveis mutações, através da supervisão de pontos críticos presentes na divisão, transcrição, proliferação e apoptose celulares. Importa ainda referir que estes genes regulam negativamente os oncogenes. Assim, a sua inativação cria instabilidade na proliferação e morte celular, favorecendo por isso o processo neoplásico [32, 33]. Outra característica das células cancerígenas é a sua elevada taxa metabólica. De modo a conseguir sustentar a sua elevada necessidade de nutrientes, estas promovem a formação de novos vasos sanguíneos, ao expressarem constantemente indutores da angiogénese, como o caso do fator de crescimento endotelial vascular. A formação anormal de uma vasta rede vascular bem com a ausência da expressão de caderinas (E-caderina, P-caderina, N-caderina), levam à extravasão das células e, conseqüentemente, à metastização [34]. Estas características únicas como o potencial ilimitado de replicação, a evasão à apoptose, as perdas de inibição de crescimento, bem como a capacidade invasiva das células malignas, contribuem para um mau prognóstico clínico do doente e para a progressão da doença [33].

Outro dos fatores também muito associados à formação de tumores é o metabolismo hormonal, principal causa dos cancros designados por homono-dependentes, dos quais se destaca o cancro da mama.

### 1.3.1. Cancro da Mama

O cancro da mama é a segunda principal causa de morte na mulher, o qual afeta atualmente cerca de 1,7 milhões de pacientes e representa cerca de 15% das mortes por cancro, em todo o mundo [35, 36]. Anualmente, em Portugal, são detetados cerca de 6000 novos casos de cancro da mama e cerca de 1500 mulheres morrem com esta doença [37]. O cancro da mama é um tumor maligno que se desenvolve a partir de células epiteliais do tecido mamário, o qual podem invadir tecidos vizinhos ou formar metástases em diferentes áreas do corpo [38]. Estas células respondem geralmente a sinais extracelulares, fatores de crescimento e hormonas circulantes, que podem contribuir para a proliferação desregulada e para a sua sobrevivência, resultando na sua malignidade. Fatores de risco como o envelhecimento, fatores genéticos, história familiar, período menstrual e obesidade, aumentam a hipótese de a mulher vir a desenvolver cancro da mama [39].

O cancro da mama é um tipo de cancro considerado altamente heterogéneo, o qual apresenta fenótipos e perfis morfológicos muito distintos. Existem assim vários tipos de cancro da mama descritos na comunidade científica, baseando-se no seu perfil de expressão genética: recetor hormonal positivo (cancro hormono-dependente, relacionado com os recetores de estrogénio (ER) e recetores de progesterona (PR)), recetor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2) positivo e o triplo negativo (ausência dos recetores ER, PR e HER2), sendo este último o que apresenta pior prognóstico devido à falta de tratamentos alvo e à sua elevada possibilidade de reaparecimento [35].

O cancro hormono-dependente representa cerca de 85% de todos os cancros da mama [35]. O 17 $\beta$ -estradiol, a hormona que se encontra biologicamente mais ativa no tecido mamário, apresenta-se como um dos principais agentes hormonais responsáveis pelo desenvolvimento da mama durante a puberdade, devido ao seu papel no estímulo da proliferação celular [40, 41]. Evidências clínicas sugerem que existe uma ligação entre a acumulação/exposição continuada a estrogénios com o aumento do risco de desenvolvimento de cancro da mama [41]. Assim, fatores como a gravidez e menopausa tardias, a dieta e os contraceptivos orais, exemplos claros do aumento da concentração de estrogénio, podem favorecer o aparecimento da doença [42, 43].

Atualmente, o mecanismo mais aceite pelo qual os estrogénios atuam na promoção do cancro da mama, é o da sua ligação ao recetor de estrogénio alfa (ER $\alpha$ ). O ER $\alpha$ , bem como o recetor de estrogénio beta (ER $\beta$ ), pertence à família dos recetores nucleares de fatores de transcrição [40]. O ER $\alpha$  é maioritariamente expresso no útero, ovários, mama, rins, ossos e fígado e o ER $\beta$  é principalmente encontrado nos ovários, no sistema nervoso central, próstata, cólon, rins, bem como no sistema imunitário e, embora ambos os ER se encontrem principalmente no núcleo, estes podem também ser encontrados no citoplasma, na membrana celular e na mitocôndria [44].

A ligação do estrogénio ao ER promove a sua dimerização, e é esta alteração conformacional que permite a ligação do ER aos elementos de resposta ao estrogénio (EREs)- motivos palindrómicos de ADN (palindromic DNA motifs) - situados nas regiões regulatórias dos genes sensíveis a estrogénio. Existem dois domínios do ER - AF1 e AF2- cuja função é mediar a ativação da transcrição, ao recrutarem outras proteínas importantes no complexo transcricional, como co-ativadores e co-repressores. O ER regula a expressão de diversos genes, controlando por isso funções celulares como a proliferação, angiogénese e apoptose, funções estas que são exploradas pelas células cancerígenas da mama como importantes vias de sobrevivência, e estimuladas pelo estrogénio [40-42, 45, 46].

Atualmente, sabe-se que o ER $\alpha$  se encontra pouco expresso nas células mamárias saudáveis ( $\leq 10\%$ ), enquanto que nas células do cancro da mama este se encontra sobreexpresso, encontrando-se presente em cerca de 50-80% dos novos casos de cancro da mama [47, 48]. Contrariamente ao ER $\alpha$ , o ER $\beta$  encontra-se mais expresso nas células saudáveis da mama do que nas células cancerígenas. No entanto, o papel deste recetor no processo de carcinogénese ainda é muito controverso. Enquanto que estudos indicam que a sua presença nas células cancerígenas apresenta uma melhor resposta à terapia hormonal, outros sugerem que a sua expressão está correlacionada com a expressão do recetor do fator de crescimento epidérmico, o qual promove crescimento e a sensibilidade anti-hormonal, afetando a eficácia da terapia hormonal [47, 48]. Assim, a sobreexpressão do ER $\alpha$  e o seu papel importante na progressão do cancro da mama, tornam-no um alvo terapêutico importante.

### **1.3.1.1. Fármacos utilizados na terapia do cancro da mama hormono-dependente**

Atualmente, cerca de 85% dos doentes que sofrem de cancro da mama hormono-dependente apresentam uma taxa de sobrevivência acima dos cinco anos após o diagnóstico, maioritariamente devido à aplicação de terapias hormonais [35].

A terapia hormonal deste tipo de cancro baseia-se em pelo menos num dos seguintes princípios: i) interferência na ligação do estrogénio aos ER e/ou aos promotores da expressão dos genes que este regula; ii) redução ou eliminação do ER; iii) redução da concentração de estrogénio, através da inibição da sua biossíntese [49].

Atualmente, a utilização de moduladores seletivos dos recetores de estrogénios (SERMs), anti-estrogénios ou inibidores da biossíntese de estrogénios, especificamente, inibidores da aromatase (IAs), são as terapias mais comuns [50].

Os anti-estrogénios funcionam como antagonistas hormonais, ao competirem com o estrogénio na sua ligação aos ERs. A este grupo de fármacos pertencem, por exemplo, o tamoxifeno (Tam) e o fulvestrant [51, 52].

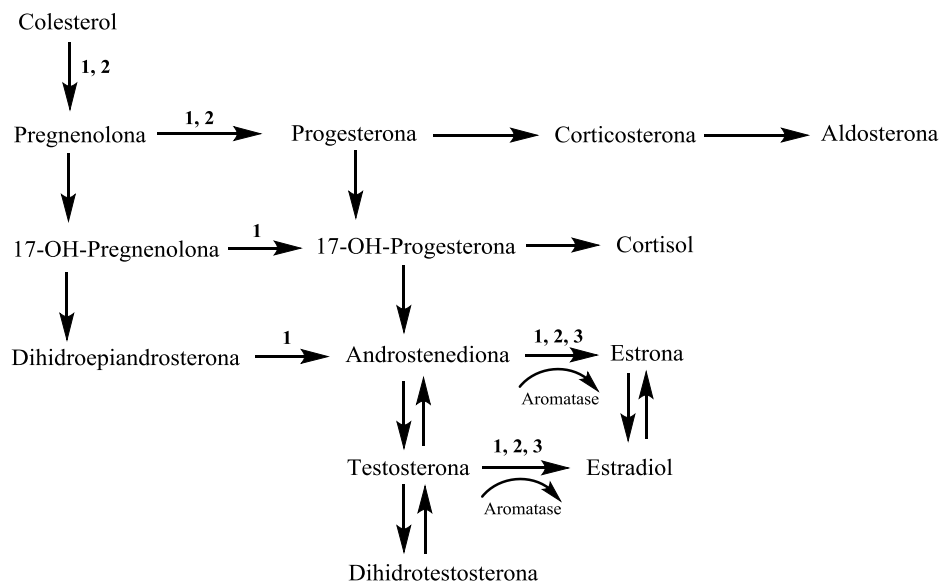
Em 1970, o Tam foi testado com sucesso no tratamento do cancro da mama, ao inibir especificamente o ER. A sua introdução revolucionou a forma de tratamento do cancro da mama, sendo este aplicado como adjuvante no tratamento do cancro, após cirurgia, como também aplicado como primeira linha de tratamento, como forma de prevenção em mulheres com elevado risco de desenvolverem cancro da mama [40, 53]. O Tam pertence também à classe dos SERMs, pois atua tanto de forma agonista, em tecidos como os ossos, fígado e sistema cardiovascular e como antagonistas nas glândulas mamárias, ovário e útero [42, 50]. No entanto, apesar da sua eficácia, o Tam é apenas capaz de prevenir a existência de recaídas em cerca de 50% dos casos e o seu uso encontra-se limitado a cinco anos de tratamento [52, 54].

Relativamente ao fulvestrant, este é utilizado em mulheres pós-menopáusicas, aquando do reaparecimento da doença. A ligação reversível do fulvestrant ao ER inibe a dimerização do recetor, o AF1 e AF2 ficam inativos e a instabilidade do complexo fulvestrant-ER resulta na rápida degradação do ER. Assim, o fulvestrant liga-se, bloqueia e acelera a degradação do ER, inibindo a expressão de genes dependentes de estrogénio [45, 52, 54].

Para além da administração de anti-estrogénios, a redução dos níveis de concentração de estrogénios nos tumores através do uso de inibidores de enzimas, representa a segunda forma de ação da terapia hormonal no cancro da mama. Tal diminuição da concentração de estrogénios pode ser obtida através do uso de IAs. Os estrogénios são sintetizados em vários tecidos humanos. Na sua síntese intervém, entre outras enzimas, o complexo monooxigenase aromatase P450 (CYP19), ou seja, a aromatase. Esta enzima catalisa a conversão de androgénios (androstenediona e testosterona) a estrogénios (estrone e estradiol) e constitui o último passo na síntese do estradiol. A aromatase está presente no retículo endoplasmático liso da placenta e nas células da granulosa dos folículos ovarianos [53]. Apesar dos ovários serem a principal fonte de estrogénios circulantes, a aromatase está também presente nos tecidos periféricos, incluindo no tecido adiposo, músculos, cérebro, ossos, coração, mama e vasos sanguíneos [49, 55]. Após a menopausa, quando os ovários cessam a produção de estrogénio por perda dos seus folículos, a maioria dos estrogénios são sintetizados através da conversão periférica extra-gonadal da testosterona, nomeadamente no tecido adiposo e músculo. Os IAs podem inibir a produção de estrogénios nos diversos locais onde estes são sintetizados [53].

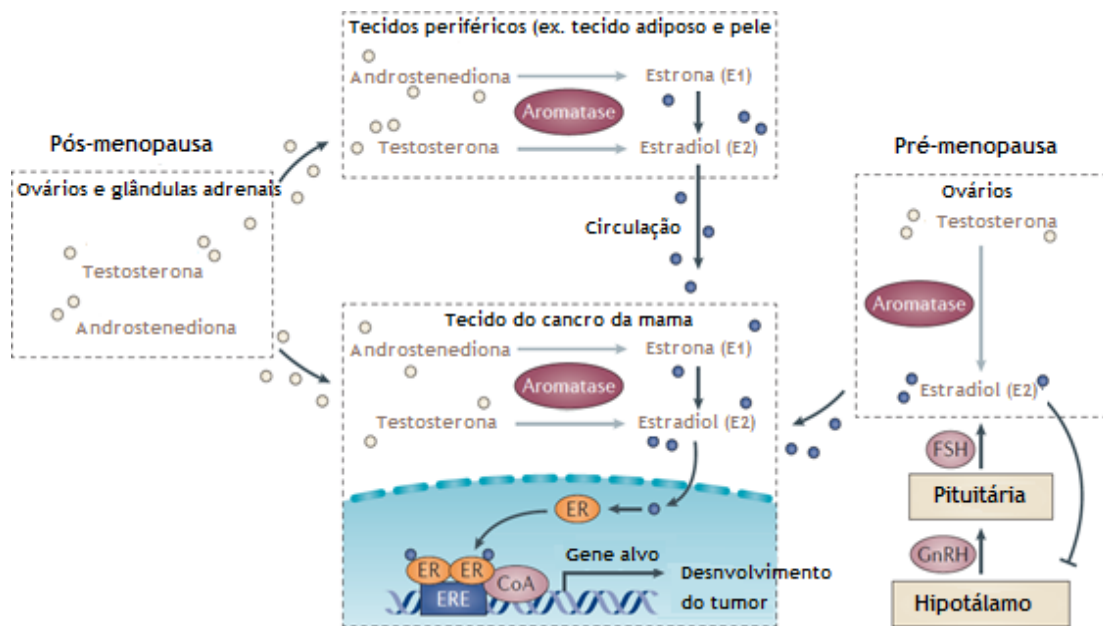
Atualmente, existem três gerações de IAs utilizados como segunda linha de tratamento: a primeira geração, da qual faz parte a aminoglutetimida; a segunda geração, constituída pelo fadrozole e o vorozole; terceira geração, a qual inclui o letrozole, anastrozole e exesmetano [49].

A utilização da primeira e segunda geração destes fármacos é limitada devido aos seus efeitos adversos e à sua baixa seletividade para a enzima. Assim, a terceira geração é a comumente mais utilizada, uma vez que para além de apresentar menos efeitos secundários, apresenta uma maior capacidade supressora da atividade da aromatase. Esta geração pode ainda ser dividida em duas classes: IAs não esteroides (letrozole e anastrozole), os quais se ligam reversivelmente à enzima aromatase e esteroides (exesmetano), que ligam irreversivelmente à enzima (esquema 7) [49, 56].



**Esquema 7** Vias metabólicas diferentemente inibidas pelos vários IAs. 1- Primeira geração de IAs (aminoglutemida) reduzem a síntese de aldosterona e cortisol, e de estrona e estradiol; 2- Segunda geração de IAs (fadrozole) reduzem a síntese de aldosterona e cortisol, como também de estrona e estradiol; 3- Terceira geração de IAs (anastrozole, letrozole, exesmetano) bloqueiam apenas a conversão de androstenediona e testosterona a estrona e estradiol. Adaptado de Fabian [49].

Contudo, o tratamento recorrendo a IAs só pode ser aplicado a mulheres que se encontrem na pós-menopausa. Embora os IAs consigam bloquear a atividade da aromatase no ovário de mulheres pré-menopáusicas, a diminuição dos níveis de estrogénio induz um efeito compensatório e, conseqüentemente promove um aumento da libertação de gonadotrofinas por parte do sistema hipotálamo-pituitária, o que torna ineficaz a inibição da produção de estrogénio nos ovários. Assim sendo, os IAs apenas podem ser administrados a mulheres pós-menopáusicas que não apresentam função ovariana (esquema 8) [49, 57, 58].



**Esquema 8** Na mulher pré-menopáusicas, os ovários são os principais produtores de estrogénio, e a sua biossíntese é regulada pelo hipotálamo e pela pituitária através da hormona libertadora de gonadotrofinas (GnRH) e pela hormona foliculo-estimulante (FSH). Na mulher pós-menopáusicas, os estrogénios são sintetizados nos tecidos periféricos através da ação da aromatase. As células cancerígenas da mama ER+ expressam também a enzima aromatase, promovendo a síntese intratumoral de estrogénios. CoA-co-ativador; ERE- elemento de resposta ao estrogénio. Adaptado de Ma [63].

Os IAs de terceira geração são atualmente a terapia de eleição em mulheres pós-menopáusicas com cancro hormono-dependente, tanto numa fase inicial como numa fase de metastização.

De uma forma geral, a terapia hormonal com recurso a estes fármacos, está a melhorar o prognóstico dos doentes quando comparada com o uso do Tam durante um período de cinco anos. Aliás, estudos indicam que o uso de IAs após 2-3 anos de terapia com o Tam aumenta o tempo de sobrevivência sem a doença, quando comparado com uso contínuo do Tam. No entanto, o facto dos IAs apenas poderem ser utilizados em mulheres após a menopausa, deixa vulneráveis as mulheres pré-menopáusicas (anualmente, cerca de 30%) que sofrem de cancro da mama, a não ser que lhes seja administrado o Tam como adjuvante quimiopreventivo. Felizmente a relação risco/benefício para o uso do Tam é favorável em mulheres que se encontram na pré-menopausa [49, 58].

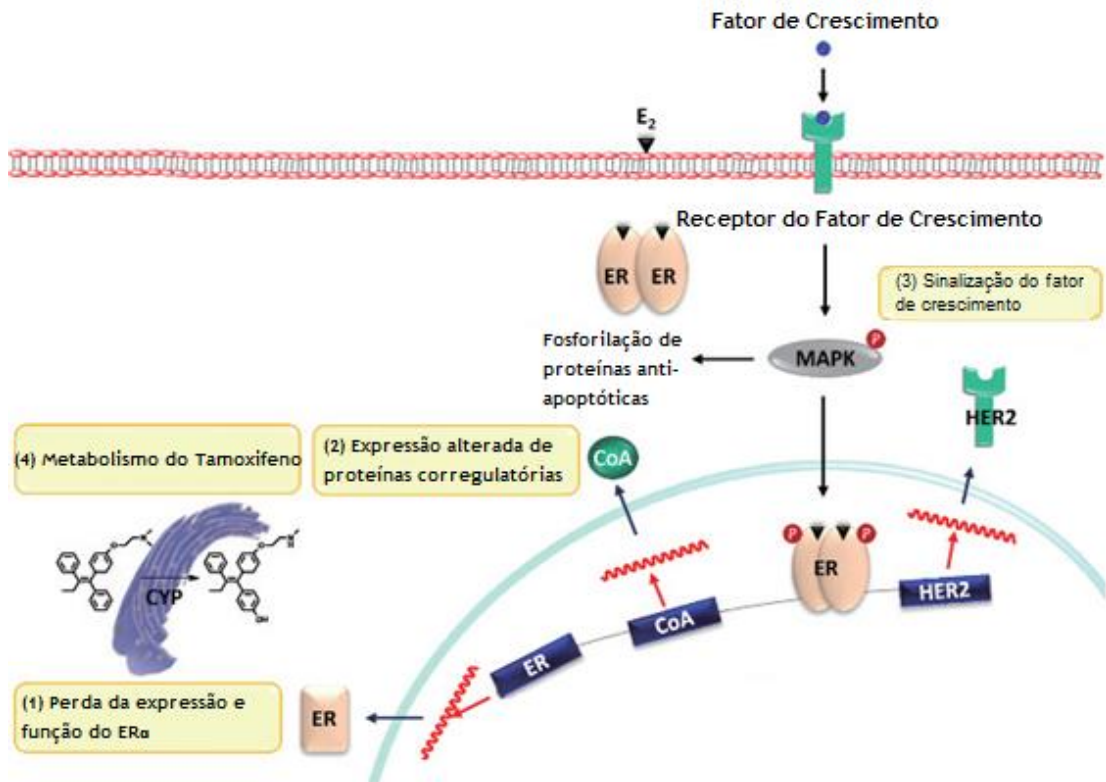
### 1.3.1.2. Desenvolvimento de novas terapias

A necessidade do desenvolvimento de novas terapias para o cancro da mama surge na sequência das terapias acima descritas apresentarem diversos efeitos secundários preocupantes, devido à sua baixa seletividade para as células do cancro da mama, bem como ao desenvolvimento de resistência à terapia hormonal atualmente utilizada.

Relativamente ao Tam, este apresenta como efeitos adversos a possibilidade de promover o desenvolvimento de cancros uterinos, trombozes venosas profundas, embolismos pulmonares, sangramento vaginal, depressão, hipertensão, entre outros [49, 56]. Quanto aos IAs, de uma forma geral, o seu uso pode provocar perda óssea o que aumenta o risco de fraturas (os IAs são também antagonistas da produção de estrogénios no tecido ósseo, contrariamente ao Tam que atua como agonista, em mulheres pós-menopáusicas), artralgia, perda de libido, fadiga, afrontamentos (ondas de calor) ou seja, sintomas relacionados com a privação de estrogénios [49, 58-60].

A resistência aos fármacos utilizados é comum em todos os tipos de cancro da mama, independentemente das diferentes estratégias de tratamento aplicadas. Embora a terapia endócrina tenha obtido enorme sucesso, cerca de 20-30% de casos apresentam resistência terapêutica. Os cancros ou já apresentam um fenótipo resistente ou desenvolvem resistência após longos períodos de exposição à terapia. O estudo feito por Fisher e colaboradores, o qual avalia a utilização do Tam como adjuvante durante cinco ou dez anos, mostra que após dez anos de terapia com o Tam, há um aumento de reaparecimentos do cancro, bem como um aumento dos efeitos secundários, quando comparado com a aplicação da terapia durante cinco anos [61].

Acredita-se que o desenvolvimento de resistência à terapia hormonal se deva tanto a fatores genéticos como a fatores epigenéticos [35]. A resistência à terapia com o Tam resulta sobretudo da ativação do ER na ausência de estrogénio (modificações pós-tradução do ER); na hipersensibilidade do ER a baixas concentrações de estrogénios circulantes (devido a possíveis mutações no ER) ou ainda devido à ativação do ER, em vez da sua inibição, pelos antagonistas dos estrogénios (devido ao aumento da expressão de proteínas co-ativadoras mediadoras da atividade do ER), [42, 62]. O Tam é uma pró-droga que necessita de ser metabolizada para formar os metabolitos farmacologicamente ativos, como a 4-hidroxitamoxifeno ou a 4-hidroxi-*N*-desmetiltamoxifeno (endoxifeno), reação catalisada pelo CYP, nomeadamente pela CYP3A4/5 e a CYP2D6. Assim, a alteração do seu metabolismo torna-se também um mecanismo de resistência (esquema 9) [40].



**Esquema 9** Esquema representativo de diferentes mecanismos de resistência ao Tam: (1) Perda da expressão e função do ER $\alpha$ , levando à ausência do alvo molecular para o Tam, (2) alteração da expressão de co-ativadores e co-reguladores importantes na transcrição do gene do ER, (3) Fator de crescimento independente de ligando, o qual ativa a sinalização de cascatas que levam à ativação de cinases e à fosforilação do ER, (4) alteração da disponibilidade de metabolitos ativos do Tam. Adaptado de Chang [40].

Relativamente à resistência dos IAs, esta deve-se a múltiplos fatores, por exemplo: ao microambiente tumoral, à perda da expressão do ER, a mutações no ESR 1, à sobreexpressão do ER ou mutação dos seus co-reguladores, à interferência nos processos de apoptose e senescência ou à sobreexpressão do recetor do fator de crescimento epidérmico [63].

## **II. Objetivos**

Este trabalho apresenta como principais objetivos: primeiro, a síntese de novas carbocianinas simétricas 6-substituídas e segundo, o estudo da possível aplicação destes compostos no cancro da mama.

Para alcançar estes objetivos, desenvolveram-se os seguintes estudos:

- Síntese de carbocianinas a partir de precursores heterocíclicos também sintetizados ou comercialmente disponíveis, derivados de bases aromáticas heterocíclicas, como o benzotiazole e a indolenina, através de métodos descritos na literatura (lit.) ou adaptados desta;
- Ação das diferentes carbocianinas na proliferação e viabilidade celulares em células epiteliais cancerígenas e em fibroblastos saudáveis da derme humana;
- Estudo da localização intracelular das carbocianinas através da microscopia confocal de varredura a laser.

### **III. Materiais e Métodos**

### 3.1. Preâmbulo

Para a síntese das carbocianinas apresentadas, escolheram-se diversos grupos substituintes a introduzir na posição 6, bem como dois tamanhos diferentes para a cadeia *N*-alquílica. Um dos grupos funcionais escolhidos, por exemplo, o grupo amino, é dos principais grupos presentes em diversos fármacos, devido à sua capacidade de ligar a muitos alvos terapêuticos, incluindo recetores e enzimas [64]. Minami e colaboradores, ao estudar o possível poder antitumoral de diversas carbocianinas, em linhas celulares de leucemia e melanoma, chegaram à conclusão que a presença de núcleos tricíclicos nestes compostos, como por exemplo o benzoindole, seria um fator importante para a atividade antitumoral das carbocianinas [65].

Um estudo anteriormente realizado com carbocianinas, no qual foi avaliada a toxicidade de carbocianinas com diferentes tamanhos da cadeia *N*-alquílica, em linhas celulares do cancro da mama e fibroblastos da derme humana, mostrou que os resultados mais promissores foram obtidos para as carbocianinas que apresentavam uma cadeia *N*-alquílica de cinco e onze carbonos [66]. Baseando-nos nestes resultados, decidiu-se sintetizar carbocianinas com cadeias *N*-alquílicas de cinco e onze carbonos.

Este capítulo encontra-se dividido em duas partes: a primeira parte será referente à síntese orgânica dos compostos em estudo, bem como dos seus precursores e uma segunda parte, alusiva aos métodos utilizados na componente biológica, nomeadamente nos estudos de citotoxicidade.

### 3.2. Reagentes e Equipamentos

Todos os reagentes cuja síntese não se encontra descrita foram adquiridos à Sigma-Aldrich Company (St. Louis, Missouri, EUA) e eram analiticamente puros. Os solventes utilizados, sempre que necessário, foram secos sobre peneiros moleculares 4Å. As reações foram acompanhadas por cromatografia em camada fina (c.c.f.) utilizando placas de sílica Merck Kieselgel GF254 com 0.20 mm de espessura. O eluente utilizado encontra-se na descrição dos métodos de síntese de cada composto. Após eluição das placas cromatográficas, estas foram observadas à luz UV ao comprimento de onda 254 nm e/ou 365 nm.

Os pontos de fusão foram determinados em tubos capilares abertos, num aparelho medidor de ponto de fusão (p.f.) Büchi 530, e não foram corrigidos.

Os espectros de visível (VIS) foram realizados num espectrofotómetro Thermo Scientific Evolution 160, utilizando como solvente MetOH e células de 1 cm de espessura.

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Protão (RMN <sup>1</sup>H) e Ressonância Magnética Nuclear de Carbono (RMN <sup>13</sup>C) foram efetuados num espectrómetro Bruker Avance III de 400

MHz operando a 9,4 t, sendo o RMN  $^1\text{H}$  obtido a 400,13 MHz e o RMN  $^{13}\text{C}$  a 100,61 MHz, sendo depois processados com o software TOPSPIN 3.1 (Fitchburg, Wisconsin, EUA), utilizando tetrametilsilano (TMS) como padrão interno para o  $\text{CDCl}_3$  e o sinal residual do solvente para o  $\text{DMSO-}d_6$  à temperatura de 298 K. Na descrição de cada espectro os dados espectroscópicos são descritos da seguinte maneira: solvente; desvio químico ( $\delta$ ) em ppm e apresentado relativamente ao sinal de TMS ou a sinais residuais para o  $\text{DMSO-}d_6$  ou  $\text{CDCl}_3$ , o número de prótons a que corresponde o sinal, a multiplicidade do sinal [singuleto (s), duplete (d), duplo duplete (dd), tripleto (t), quarteto (q), quinteto (quint.) e multiplete (m)], o valor da constante de acoplamento ( $J$  em Hz) e a atribuição do sinal aos prótons correspondentes. Nos dados de RMN  $^{13}\text{C}$  são apresentados o  $\delta$  (ppm) igualmente apresentado relativamente ao sinal TMS ou a sinais residuais dos solventes usados e a atribuição do tipo de carbono na molécula.

Para a obtenção dos espectros no IV recorreu-se ao espectrofotómetro de IV com Transformada de Fourier (FTIR), num equipamento Thermo Fisher Scientific Nicolet iS10: smart iTR equipado com um acessório de ATR com um cristal de diamante, sendo processados com o software OMNIC 8.2 (Thermo Fisher Scientific, Inc).

Para a aquisição dos espectros de IV, colocaram-se as amostras, na forma de pastilha de KBr, num suporte para pastilhas, e registou-se o espectro, utilizando-se como referência o espectro do ar, à temperatura ambiente. Os espectros das amostras foram adquiridos entre  $4000$  e  $600\text{ cm}^{-1}$ , a partir da média de trinta e dois varrimentos com uma resolução espectral de  $4\text{ cm}^{-1}$ . Na descrição dos espectros obtidos, é indicada a frequência máxima da banda de absorção ( $\nu_{\text{máx}}\text{ cm}^{-1}$ ) e a atribuição dessa banda a um grupo de átomos relevante na estrutura do composto.

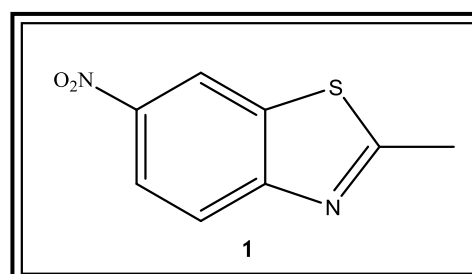
### 3.3. Síntese de Carbocianinas

#### 3.3.1. Síntese de precursores de sais de amónio quaternário

##### 3.3.1.1. Síntese do 2-metil-6-nitrobenzotiazole (1)

A uma solução de 2-metilbenzotiazole (30,3g; 25,8 mL) e  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado (120 mL), arrefecida num banho de gelo, adicionou-se, lentamente, uma mistura de  $\text{HNO}_3$  concentrado (24,6 mL) e  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado (18 mL). Após a adição completa da

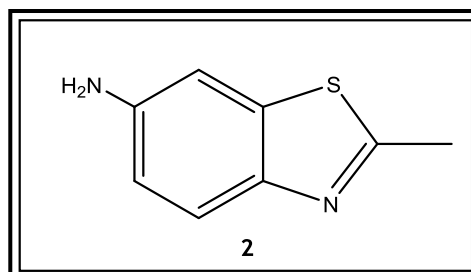
mistura, retirou-se a reação do banho de gelo, deixando-a a agitar à temperatura ambiente, durante cerca de 3h30m. A reação foi acompanhada por c.c.f. (sílica,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MetOH}$ , 10%). Terminada a reação, adicionou-se gelo à mistura, deixando-a a  $4\text{ }^\circ\text{C}$  durante 24h. Após a precipitação completa do composto, este foi filtrado sob pressão reduzida e posteriormente



recristalizado de MetOH. Obteve-se então o 2-metil-6-nitrobenzotiazole, com um  $\eta$  de 90% (64% e 76%) [14, 15], sob a forma de agulhas amarelas. Este composto apresenta: p.f. 159-160 °C [166-167 °C] [14, 15]. RMN  $^1\text{H}$  (400,13 MHz; DMSO- $d_6$ ;  $\delta$  em ppm)  $\delta$  2,88 (3H, s,  $\text{CH}_3$ ), 8,08 (1H, d,  $J=9,0$  Hz, 4- $\text{CH}$ ), 8,30 (1H, dd,  $J=8,9$  Hz; 2,5Hz, 5- $\text{CH}$ ), 9,10 (1H, d,  $J=2,0$  Hz, 7- $\text{CH}$ ).

### 3.3.1.2. Síntese do 6-amino-2-metilbenzotiazole (2)

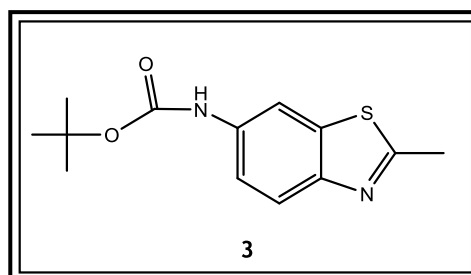
Ao 2-metil-6-nitrobenzotiazole (3,01 g; 15,4 mmol) adicionou-se cloreto de estanho di-hidratado (28,6 g; 12,7 mmol), MetOH (42 mL) e HCl concentrado (42 mL). A mistura reacional foi colocada em refluxo, sob agitação, a uma temperatura controlada de 100 °C, durante 1h. A reação foi acompanhada por c.c.f. (sílica,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ /MetOH, 5%).



Terminada a reação, procedeu-se à evaporação do MetOH. A mistura obtida foi então deitada sobre gelo, à qual se adicionaram pequenos volumes de uma solução de NaOH a 20%, até se alcançar um pH=10. A solução, de aspeto leitoso, foi filtrada sob pressão reduzida e a massa branca resultante lavada com  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Após evaporação do  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , obteve-se o 6-amino-2-metilbenzotiazole, na forma de um sólido amarelo, com um  $\eta$  de 82% (76%) [16]. Este composto apresenta: p.f.118-119 °C [120-123 °C] [16]. RMN  $^1\text{H}$  (400,13 MHz; DMSO- $d_6$ ;  $\delta$  em ppm)  $\delta$  2,66 (3H, s,  $\text{CH}_3$ ), 5,27 (2H, s,  $\text{NH}_2$ ), 6,72 (1H, dd,  $J=8,6$  Hz, 5- $\text{CH}$ ), 7,01 (1H, s, 7- $\text{CH}$ ), 7,53 (1H, d,  $J=8,7$  Hz, 4- $\text{CH}$ ).

### 3.3.1.3. Síntese do tert-butil-(2-metilbenzo[d]tiazol-6-il)carbamato (3)

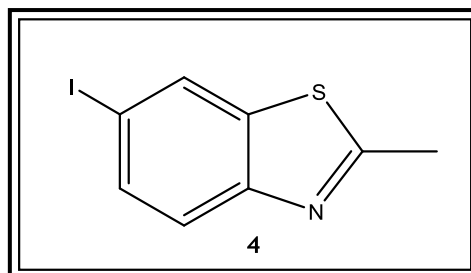
A 6-amino-2-metilbenzotiazole (2,00 g; 12,19 mmol), o dicarbonato de di-tert-butilo (BOC) (2,93 g; 13,40 mmol) e o  $\text{CHCl}_3$  seco (1 mL), foram colocados num balão de fundo redondo e foram sonicados durante 1 hora. A reação decorreu num banho de água à temperatura ambiente e foi seguida por c.c.f. (sílica,  $\text{CHCl}_3$  /MetOH, 5%).



Terminada a reação, adicionou-se éter dietílico à mistura, de modo a remover o BOC que não reagiu. O produto foi purificado por recristalização com éter dietílico. Obteve-se assim o tert-butil-(2-metilbenzo[d]tiazol-6-il)carbamato, na forma de um sólido verde cristalino com um  $\eta$  de 67%. Este composto apresenta: p.f.133-134 °C. RMN  $^1\text{H}$  (400,13 MHz; DMSO- $d_6$ ;  $\delta$  em ppm)  $\delta$  1,49 (9H, s,  $\text{CH}_3$ ), 2,74 (3H, s,  $\text{CH}_3$ ), 7,44 (1H, dd,  $J= 8,8$ ; 2,2 Hz, 5- $\text{CH}$ ), 7,77 (1H, d,  $J= 8,8$  Hz, 4- $\text{CH}$ ), 8,18 (1H, s, 7- $\text{CH}$ ), 9,57 (1H, s, - $\text{NH}$ ).

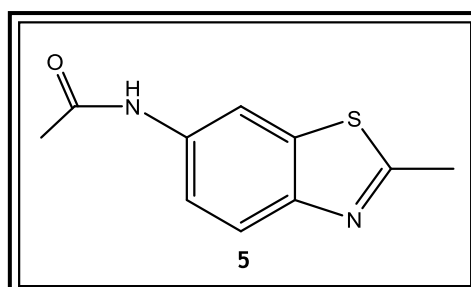
### 3.3.1.4. Síntese do 6-iodo-2-metilbenzotiazole (4)

A uma mistura de 6-amino-2-metilbenzotiazole (1,01 g; 6,16 mmol), HCl (2,73 mL) e H<sub>2</sub>O (2,73 mL), previamente arrefecida num banho de gelo, foi adicionado, gota a gota, NaNO<sub>2</sub> (0,75 g; 10,90 mmol) em H<sub>2</sub>O (3,43 mL) e, 30 minutos depois, KI (1,83 g; 10,90 mmol) em H<sub>2</sub>O (2,12 mL). Após 10 minutos da adição de KI, a reação foi retirada do gelo de modo a atingir a temperatura ambiente gradualmente. Em seguida, aqueceu-se a mistura a 35 °C, durante 15 minutos. O sólido castanho-escuro formado foi lavado com CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> e lavado com uma solução aquosa de NaHSO<sub>3</sub> (5%), até que a fase orgânica adquirisse uma cor amarelada. A fase orgânica foi depois seca em Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro e evaporada à secura. O sólido obtido foi recristalizado de etanol. Obteve-se assim o 6-iodo-2-metilbenzotiazole, um sólido laranja claro, com um  $\eta$  de 40% (79%) [14]. Este composto apresenta: p.f. 120-122 °C [140-141 °C] [14]. RMN <sup>1</sup>H (400,13 MHz; CDCl<sub>3</sub>;  $\delta$  em ppm)  $\delta$  2,82 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 7,68 (1H, d,  $J$ = 8,6 Hz, 4-CH), 7,73 (1H, dd,  $J$ = 8,6; 1,7 Hz, 5-CH), 8,16 (1H, d,  $J$ = 1,6 Hz, 7-CH).



### 3.3.1.5. Síntese da N-(2-metilbenzotiazol-6-il)acetamida (5)

O 6-amino-2-metilbenzotiazole (2,00 g; 12,2 mmol) foi dissolvido no menor volume possível de CHCl<sub>3</sub>. À solução, arrefecida em banho de gelo e sob agitação, foi adicionado, gota a gota, anidrido acético seco (1,4 mL; 14,6 mmol). A reação durou 3h e a sua evolução acompanhada por c.c.f. (sílica, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MetOH, 10%). Terminada a reação, a fase orgânica foi lavada com uma solução aquosa de NaHCO<sub>3</sub> a 5% e água destilada. A fase orgânica foi seca com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro e posteriormente evaporada. O sólido foi lavado com éter dietílico e filtrado sob pressão reduzida. Obteve-se então o N-(2-metilbenzotiazole-6-il)acetamida, sob a forma de um sólido cinzento, com um  $\eta$  de 87% (83%) [67]. Este composto apresenta: p.f. 137-138 °C [149-150 °C] [67]. RMN <sup>1</sup>H (400,13 MHz; DMSO-*d*<sub>6</sub>;  $\delta$  em ppm)  $\delta$  2,08 (3H, s, COCH<sub>3</sub>), 2,75 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 7,49 (1H, dd,  $J$ = 8,8; 2,1 Hz, 5-CH), 7,82 (1H, d,  $J$ = 8,8 Hz, 4-CH), 8,40 (1H, d,  $J$ = 2,1 Hz, 7-CH), 10,15 (1H, s, -NH).



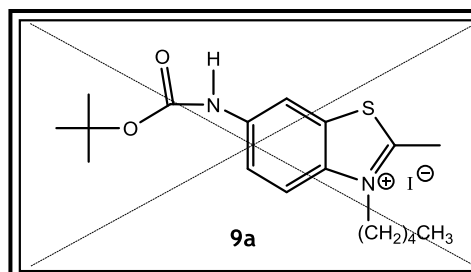
### 3.3.2. Síntese de sais de amónio quaternário precursores das carbocianinas

Para além das bases heterocíclicas sintetizadas, anteriormente referidas, foram ainda utilizadas na síntese de sais de amónio quaternário o 6-metoxi-2-metilbenzotiazole (6), o 2,3,3-trimetil-3H-indole (7) e o 1,1,2-trimetil-1H-benzo[e]indole (8), tendo sido obtidos comercialmente.

**Processo geral:** Aqueceu-se em refluxo de acetonitrilo (10 mL/g base heterocíclica) uma mistura de uma base heterocíclica com um agente alquilante (1-iodopentano ou 1-iodoundecano) durante um determinado período de tempo (5-30 dias), tendo as reações sido acompanhadas por c.c.f. (sílica, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MetOH, 10%). Quando a reação terminou, adicionou-se éter dietílico, deixando-se várias horas a 4°C. O sal de amónio quaternário precipitado foi depois filtrado sob pressão reduzida, lavado com éter dietílico e posteriormente caracterizado por RMN <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C e IV.

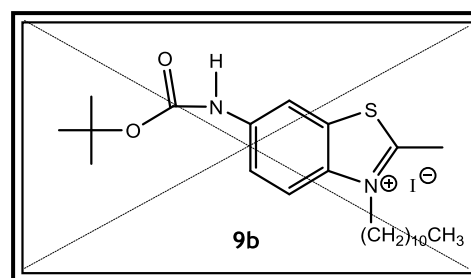
#### 3.3.2.1. Síntese do iodeto de 6-((tert-butoxicarbonil)amino)-2-metil-3-pentilbenzo[d]tiazol-3-io (9a)

De forma a obter o sal **9a**, fez-se reagir o composto **3** (1,03 g; 3,88 mmol) com o 1-iodopentano (2,53 mL; 19,4 mmol), sob agitação e em refluxo de acetonitrilo. Passados 15 dias de refluxo a mistura reacional foi retirada e a esta adicionada éter dietílico, formando-se um óleo. Procedeu-se à tentativa de recristalização do composto com acetonitrilo, no entanto sem sucesso. A dificuldade no isolamento do composto pretendido não permitiu a sua caracterização.



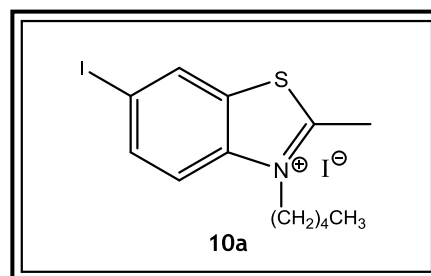
#### 3.3.2.2. Síntese do iodeto de 6-((tert-butoxicarbonil)amino)-2-metil-3-undecilbenzo[d]tiazol-3-io (9b)

Para a obtenção do sal **9b**, fez-se reagir o composto **3** (0,54 g; 2,04 mmol) com o 1-iodoundecano (2,54 mL; 10,2 mmol), sob agitação e em refluxo de acetonitrilo. Passados 15 dias de refluxo, verificou-se que não tinha ocorrido alquilação do composto **3**. Deixou-se a reagir durante mais 5 dias, mas sem qualquer alteração.



### 3.3.2.3. Síntese do iodeto de 6-iodo-2-metil-3-pentilbenzo[d]tiazol-3-io (10a)

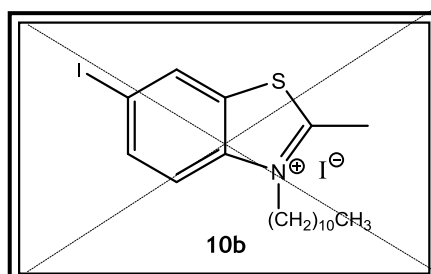
O sal **10a** foi obtido a partir do 6-iodo-2-metilbenzotiazole (0,50 g; 18,18 mmol) com o 1-iodopentano (0,72 mL; 5,46 mmol), sob agitação e em refluxo de acetonitrilo (10 mL). Passados 10 dias de refluxo a mistura reacional foi retirada e a esta adicionada éter dietílico. O precipitado obtido foi filtrado a pressão reduzida. Ao filtrado, após remoção do éter, foram adicionados mais três



equivalentes de agente alquilante. Este processo foi repetido mais uma vez de modo a se obter um  $\eta$  considerável. Obteve-se assim o produto pretendido, um sólido verde, com um  $\eta$  de 33%. Este composto apresenta: p.f. 215-217 °C. RMN  $^1\text{H}$  (400,13 MHz; DMSO- $d_6$ ;  $\delta$  em ppm) 0,88 (3H, t,  $J = 7,1$  Hz,  $\text{N}(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$ ), 1,26-1,47 (4H, m,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$ ), 1,82 (2H, quint.,  $J = 7,7$  Hz,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$ ), 3,20 (3H, s, 2- $\text{CH}_3$ ), 4,68 (2H, t,  $J = 7,7$  Hz,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$ ), 8,14 (1H, d,  $J = 8,9$  Hz, 4- $\text{CH}$ ), 8,20 (1H, dd,  $J = 8,8; 1,7$  Hz, 5- $\text{CH}$ ), 8,86 (1H, d,  $J = 1,6$  Hz, 7- $\text{CH}$ ). RMN  $^{13}\text{C}$  (100,61 MHz; DMSO- $d_6$ ;  $\delta$  em ppm)  $\delta$  14,21 ( $\text{N}(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$ ), 17,38 (2- $\text{CH}_3$ ), 22,20 ( $\text{CH}_2$ ), 27,92 ( $\text{CH}_2$ ), 28,37 ( $\text{CH}_2$ ), 49,83 ( $\text{NCH}_2$ ), 118,97 ( $\text{CH}$ ), 131,54 (C), 133,06 ( $\text{CH}$ ), 138,22 ( $\text{CH}$ ), 140,93 (C), 169,44 (C), 177,79 (2-C). IV ( $\nu_{\text{máx}} \text{ cm}^{-1}$ ; KBr) 3054 ( $\text{CH}_{\text{arom.}}$ ), 2951 ( $\text{CH}_{\text{alq.}}$ ), 2864 ( $\text{CH}_{\text{alq.}}$ ), 1568 ( $\text{C}=\text{C}_{\text{arom.}}$ ), 1453 ( $\text{C}=\text{C}_{\text{arom.}}$ ).

### 3.3.2.4. Síntese do iodeto de 6-iodo-2-metil-3-undecilbenzo[d]tiazol-3-io (10b)

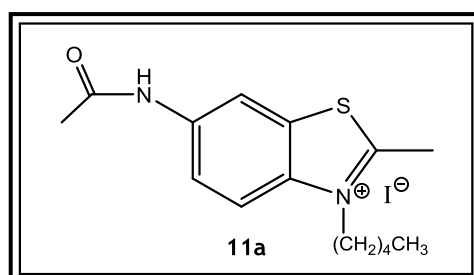
Para se obter o sal **10b** fez-se reagir o 6-iodo-2-metilbenzotiazole (0,50 g; 18,18 mmol) com o 1-iodoundecano (1,27 mL; 5,49 mmol), sob agitação e em refluxo de acetonitrilo (10 mL). Passados 10 dias de refluxo a mistura reacional foi retirada e a esta adicionada éter dietílico. Este processo foi repetido



mais duas vezes. No entanto, devido ao difícil isolamento e aos muito baixos  $\eta$ , foi impossível a obtenção do composto desejado.

### 3.3.2.5. Síntese do iodeto de 6-acetamida-2-metil-3-pentilbenzotiazol-3-io (11a)

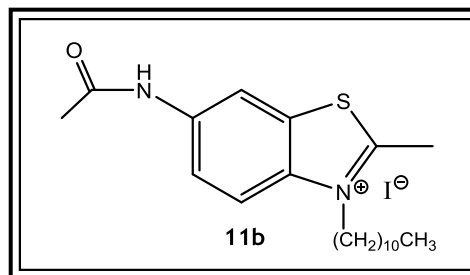
À *N*-(2-metilbenzo[d]tiazol-6-il)acetamida (1,00 g; 4,86 mmol) adicionou-se 1-iodopentano (4,81 g; 24,3 mmol), sob agitação e em refluxo de acetonitrilo (20 mL), durante 5 dias. Obteve-se assim o sal iodeto de 6-acetamida-2-metil-3-pentilbenzotiazol-3-io, um sólido de cor bege, com um  $\eta$  de 63%. Este composto apresenta: p.f. 224-225



°C. RMN  $^1\text{H}$  (400,13 MHz; DMSO- $d_6$ ;  $\delta$  em ppm)  $\delta$  0,88 (3H, t,  $J=7,0$  Hz,  $\text{N}(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$ ), 1,27-1,47 (4H, m,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$ ), 1,84 (2H, quint.,  $J=8,0$ ; 7,6 Hz,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$ ), 2,14 (3H, s,  $\text{NHCOCH}_3$ ), 3,16 (3H, s,  $\text{CH}_3$ ), 4,64 (2H, t,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$ ), 7,81 (1H, dd,  $J=9,2$ ; 2,1 Hz, 5- $\text{CH}$ ), 8,25 (1H, d,  $J=9,2$  Hz, 4- $\text{CH}$ ), 8,84 (1H, d,  $J=2,0$  Hz, 7- $\text{CH}$ ), 10,51 (1H, s,  $\text{NHCOCH}_3$ ). RMN  $^{13}\text{C}$  (100,61 MHz; DMSO- $d_6$ ;  $\delta$  em ppm)  $\delta$  14,20 ( $\text{N}(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$ ), 17,17 (2- $\text{CH}_3$ ), 22,17 ( $\text{CH}_2$ ), 24,48 ( $\text{NHCOCH}_3$ ), 27,99 ( $\text{CH}_2$ ), 28,39 ( $\text{CH}_2$ ), 49,68 ( $\text{NCH}_2$ ), 113,30 (7- $\text{CH}$ ), 117,56 (4- $\text{CH}$ ), 121,58 (5- $\text{CH}$ ), 130,45 (3a- $\text{C}$ ), 136,83 (7a- $\text{C}$ ), 139,38 (6- $\text{C}$ ), 169,76 ( $\text{NHCOCH}_3$ ), 175,31 (2- $\text{C}$ ). IV ( $\nu_{\text{máx}} \text{ cm}^{-1}$ ; KBr) 3462 (NH), 3038 ( $\text{CH}_{\text{arom.}}$ ), 2951 ( $\text{CH}_{\text{alq.}}$ ), 2932 ( $\text{CH}_{\text{alq.}}$ ), 2865 ( $\text{CH}_{\text{alq.}}$ ), 1677 ( $\text{C=O}$ ), 1589 ( $\text{C=C}_{\text{arom.}}$ ), 1458 ( $\text{C=C}_{\text{arom.}}$ ).

### 3.3.2.6. Síntese do iodeto de 6-acetamida-3-undecil-2-metilbenzotiazol-3-io (11b)

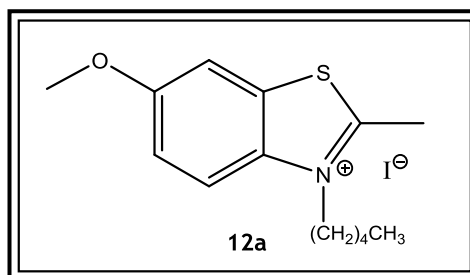
À *N*-(2-metilbenzo[*d*]tiazol-6-il)acetamida (1,01 g; 4,92 mmol) adicionou-se 1-iodoundecano (6,95 g; 24,60 mmol) e acetonitrilo (20 mL). A mistura foi colocada em refluxo, durante 7 dias. Obteve-se assim o sal iodeto de 6-acetamida-3-undecil-2-metilbenzotiazol-3-io, um sólido cinzento, com um  $\eta$  de 67%. Este composto apresenta: p.f. 121-123 °C.



RMN  $^1\text{H}$  (400,13 MHz; DMSO- $d_6$ ;  $\delta$  em ppm)  $\delta$  0,86 (3H, t,  $\text{N}(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_3$ ), 1,19-1,33 (14H, m,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$ ), 1,41 (2H, q,  $J=7,4$  Hz,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$ ), 1,82 (2H, quint.,  $J=7,9$  Hz,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$ ), 2,14 (3H, s,  $\text{NHCOCH}_3$ ), 3,16 (3H, s,  $\text{CH}_3$ ), 4,64 (2H, t,  $J=7,8$  Hz,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$ ), 7,81 (1H, dd,  $J=9,1$ ; 2,0 Hz, 5- $\text{CH}$ ), 8,25 (1H, d,  $J=9,2$  Hz, 4- $\text{CH}$ ), 8,84 (1H, s, 7- $\text{CH}$ ), 10,51 (1H, s,  $\text{NHCOCH}_3$ ). RMN  $^{13}\text{C}$  (100,61 MHz; DMSO- $d_6$ ;  $\delta$  em ppm)  $\delta$  14,43 ( $\text{N}(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_3$ ), 17,23 (2- $\text{CH}_3$ ), 22,56 ( $\text{CH}_2$ ), 24,58 ( $\text{NHCOCH}_3$ ), 26,34 ( $\text{CH}_2$ ), 28,31 ( $\text{CH}_2$ ), 29,04 ( $\text{CH}_2$ ), 29,15 ( $\text{CH}_2$ ), 29,31 ( $\text{CH}_2$ ), 29,39 ( $\text{CH}_2$ ), 29,43 ( $\text{CH}_2$ ), 31,74 ( $\text{CH}_2$ ), 49,68 ( $\text{NCH}_2$ ), 113,30 (7- $\text{CH}$ ), 117,59 (4- $\text{CH}$ ), 121,43 (5- $\text{CH}$ ), 130,54 (3a- $\text{C}$ ), 136,78 (7a- $\text{C}$ ), 139,50 (6- $\text{C}$ ), 169,48 ( $\text{NHCOCH}_3$ ), 175,41 (2- $\text{C}$ ). IV ( $\nu_{\text{máx}} \text{ cm}^{-1}$ ; KBr) 3497 (NH), 3041 ( $\text{CH}_{\text{arom.}}$ ), 2919 ( $\text{CH}_{\text{alq.}}$ ), 2851 ( $\text{CH}_{\text{alq.}}$ ), 1672 ( $\text{C=O}$ ), 1589 ( $\text{C=C}_{\text{arom.}}$ ), 1458 ( $\text{C=C}_{\text{arom.}}$ ).

### 3.3.2.7. Síntese do iodeto de 6-metoxi-2-metil-3-pentilbenzotiazol-3-io (12a)

Ao 6-metoxi-2-metilbenzotiazole (6) (0,50 g; 2,79 mmol) adicionou-se 1-iodopentano (2,76 g; 13,9 mmol) e acetonitrilo (10 mL). A mistura foi colocada em refluxo, durante 7 dias. Obteve-se assim o sal iodeto de 6-metoxi-2-metil-3-pentilbenzotiazol-3-io, um sólido de cor verde, com um  $\eta$  de 74%.

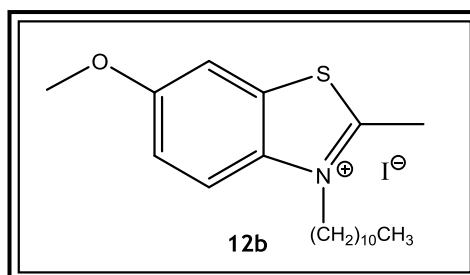


Apresenta: p.f. 123-124 °C. RMN  $^1\text{H}$  (400,13 MHz; DMSO- $d_6$ ;  $\delta$  em ppm)  $\delta$  0,88 (3H, t,  $J=7,0$  Hz,

$\text{N}(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$ ), 1,27-1,46 (4H, m,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$ ), 1,83 (2H, quint.,  $J=7,8$  Hz,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$ ), 3,16 (3H, s,  $\text{CH}_3$ ), 3,91 (3H, s,  $\text{OCH}_3$ ), 4,67 (2H, t,  $J=7,8$  Hz,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$ ), 7,47 (1H, dd,  $J=9,3; 2,6$  Hz, 5-CH), 8,01 (1H, s, 7-CH), 8,24 (1H, d,  $J=9,3$  Hz, 4-CH). RMN  $^{13}\text{C}$  (100,61 MHz;  $\text{DMSO}-d_6$ ;  $\delta$  em ppm)  $\delta$  14,23 ( $\text{N}(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$ ), 17,22 (2- $\text{CH}_3$ ), 22,21 ( $\text{CH}_2$ ), 28,09 ( $\text{CH}_2$ ), 28,40 ( $\text{CH}_2$ ), 49,74 ( $\text{NCH}_2$ ), 56,70 ( $\text{OCH}_3$ ), 107,17 (4- $\text{CH}$ ), 118,22 (5- $\text{CH}$ ), 119,11 (7- $\text{CH}$ ), 131,28 (7a- $\text{C}$ ), 135,50 (3a- $\text{C}$ ), 159,40 (6- $\text{C}$ ), 174,44 (2- $\text{C}$ ). IV ( $\nu_{\text{máx}} \text{cm}^{-1}$ ; KBr) 3057 ( $\text{CH}_{\text{arom.}}$ ), 2894 ( $\text{CH}_{\text{alq.}}$ ), 2866 ( $\text{CH}_{\text{alq.}}$ ), 2843 ( $\text{CH}_{\text{alq.}}$ ), 1451 ( $\text{C}=\text{C}_{\text{arom.}}$ ), 1254 (C-O), 1047 (C-O).

### 3.3.2.8. Síntese do iodeto de 6-metoxi-2-metil-3-undecilbenzotiazol-3-io (12b)

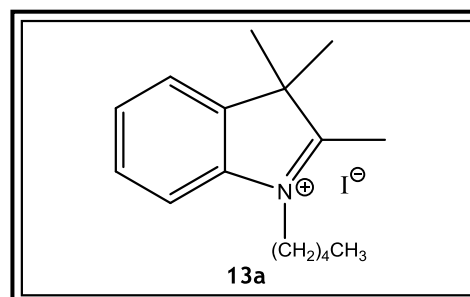
Ao 6-metoxi-2-metilbenzotiazole (6) (0,50 g; 2,79 mmol) adicionou-se 1-iodoundecano (3,94 g; 13,9 mmol) e acetonitrilo (10 mL). A mistura foi colocada em refluxo, durante 6 dias. Obteve-se assim o sal iodeto de 6-metoxi-2-metil-3-undecilbenzotiazol-3-io, um sólido de cor amarelo claro, com um  $\eta$  de 44%. Este composto apresenta: p.f. 87-88 °C. RMN



$^1\text{H}$  (400,13 MHz;  $\text{DMSO}-d_6$ ;  $\delta$  em ppm)  $\delta$  0,85 (3H, t,  $J=6,7$  Hz,  $\text{N}(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_3$ ), 1,19-1,35 (14H, m,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$ ), 1,41 (2H, quint.,  $J=10,4; 5,4$  Hz,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$ ), 1,82 (2H, t,  $J=7,7$  Hz,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$ ), 3,15 (3H, s,  $\text{CH}_3$ ), 3,90 (3H, s,  $\text{OCH}_3$ ), 4,66 (2H, t,  $J=7,8$  Hz,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$ ), 7,46 (1H, dd,  $J=9,3; 2,6$  Hz, 5-CH), 8,01 (1H, s, 7-CH), 8,24 (1H, d,  $J=9,3$  Hz, 4-CH). RMN  $^{13}\text{C}$  (100,61 MHz;  $\text{DMSO}-d_6$ ;  $\delta$  em ppm)  $\delta$  14,40 ( $\text{N}(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_3$ ), 17,22 (2- $\text{CH}_3$ ), 22,54 ( $\text{CH}_2$ ), 28,36 ( $\text{CH}_2$ ), 29,02 ( $\text{CH}_2$ ), 29,12 ( $\text{CH}_2$ ), 29,27 ( $\text{CH}_2$ ), 29,36 ( $\text{CH}_2$ ), 29,40 ( $\text{CH}_2$ ), 31,72 ( $\text{CH}_2$ ), 49,78 ( $\text{NCH}_2$ ), 56,69 ( $\text{OCH}_3$ ), 107,11 (4- $\text{CH}$ ), 118,22 (5- $\text{CH}$ ), 119,11 (7- $\text{CH}$ ), 131,27 (7a- $\text{C}$ ), 135,48 (3a- $\text{C}$ ), 159,41 (6- $\text{C}$ ), 174,36 (2- $\text{C}$ ). IV ( $\nu_{\text{máx}} \text{cm}^{-1}$ ; KBr) 3043 ( $\text{CH}_{\text{arom.}}$ ), 2922 ( $\text{CH}_{\text{alq.}}$ ), 2852 ( $\text{CH}_{\text{alq.}}$ ), 1451 ( $\text{C}=\text{C}_{\text{arom.}}$ ), 1264 (C-O), 1050 (C-O).

### 3.3.2.9. Síntese do iodeto de 2,3,3-trimetil-1-pentil-3H-indol-1-io (13a)

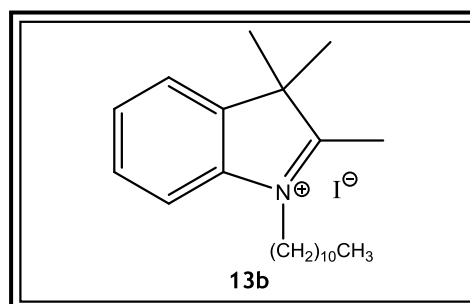
Obtido a partir do aquecimento em refluxo de acetonitrilo do 2,3,3-trimetil-indole (7) (1,00 g; 6,28 mmol) com 1-iodopentano (5,01 g; 25,3 mmol). A mistura reacional manteve-se em refluxo durante 10 dias. A formação de óleo levou à sua lavagem com éter dietílico a quente, obtendo-se por fim o iodeto de 2,3,3-trimetil-1-pentil-3H-indol-1-io, com um  $\eta$  de 62% (50%) [68]. Este apresenta: p.f. 132-133 °C [138-139 °C] [68]. RMN  $^1\text{H}$  (400,13 MHz;



DMSO-*d*<sub>6</sub>; δ em ppm) δ 0,89 (3H, t, *J*= 7,0 Hz, N(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>3</sub>), 1,29-1,47 (4H, m, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1,55 (6H, s, C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1,84 (2H, quint., *J*= 7,8 Hz, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2,85 (3H, s, 2-CH<sub>3</sub>), 4,45 (2H, t, *J*= 7,8 Hz, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) 7,58-7,69 (2H, m, 5,6-CH), 7,83-7,88 (1H, m, 7-CH), 7,95-8,01 (1H, m, 4-CH). RMN <sup>13</sup>C (100,61 MHz; DMSO-*d*<sub>6</sub>; δ em ppm) δ 14,24 (N(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>3</sub>), 14,60 (2-CH<sub>3</sub>), 22,25 (CH<sub>2</sub>), 22,52 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 27,44 (CH<sub>2</sub>), 28,49 (CH<sub>2</sub>), 48,09 (NCH<sub>2</sub>), 54,64 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 115,97 (4-CH), 124,01 (7-CH), 129,42 (5-CH), 129,89 (6-CH), 141,52 (7a-C), 142,34 (3a-C), 196,85 (2-C). IV (ν<sub>máx</sub> cm<sup>-1</sup>; KBr) 3031 (CH<sub>arom.</sub>), 2969 (CH<sub>alq.</sub>), 2953 (CH<sub>alq.</sub>), 2866 (CH<sub>alq.</sub>), 1625 (C=C<sub>arom.</sub>), 1453 (C=C<sub>arom.</sub>).

### 3.3.2.10. Síntese do iodeto de 2,3,3-trimetil-1-undecil-3H-indol-1-íon (13b)

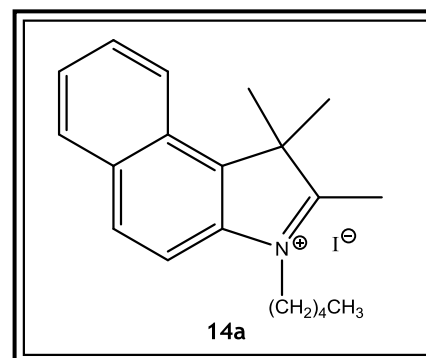
Obtido a partir do aquecimento em refluxo de acetonitrilo do 2,3,3-trimetil-indole (7) (1,00 g; 6,28 mmol) com 1-iodoundecano (4,88 g; 15,4 mmol). A mistura reacional manteve-se em refluxo durante 10 dias. A formação de óleo levou à sua lavagem com éter dietílico a quente. Obteve-se por fim o iodeto de 2,3,3-trimetil-1-undecil-3H-indol-1-íon, com um η



de 25%. Este apresenta-se como um óleo. Este composto apresenta: RMN <sup>1</sup>H (400,13 MHz; DMSO-*d*<sub>6</sub>; δ em ppm) δ 0,85 (3H, t, *J*= 6,6 Hz, N(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>3</sub>), 1,15-1,48 (16H, m, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>8</sub>CH<sub>3</sub>), 1,55 (6H, s, C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1,84 (2H, quint., *J*= 7,8 Hz, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2,85 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 4,46 (2H, t, *J*= 7,7 Hz, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 7,59-7,63 (2H, m, 5,6-CH), 7,82-7,89 (1H, m, 7-CH), 7,96-8,03 (1H, m, 4-CH). RMN <sup>13</sup>C (100,61 MHz; DMSO-*d*<sub>6</sub>; δ em ppm) δ 14,43 (N(CH<sub>2</sub>)<sub>10</sub>CH<sub>3</sub>), 14,61 (2-CH<sub>3</sub>), 22,52 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 22,56 (CH<sub>2</sub>), 26,36 (CH<sub>2</sub>), 27,73 (CH<sub>2</sub>), 29,07 (CH<sub>2</sub>), 29,16 (CH<sub>2</sub>), 29,26 (CH<sub>2</sub>), 29,38 (CH<sub>2</sub>), 29,42 (CH<sub>2</sub>), 31,74 (CH<sub>2</sub>), 48,13 (NCH<sub>2</sub>), 54,64 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 115,97 (4-CH), 124,01 (7-CH), 129,42 (5-CH), 129,89 (6-CH), 141,52 (7a-C), 142,34 (3a-C), 196,85 (2-C). IV (ν<sub>máx</sub> cm<sup>-1</sup>; KBr) 3025 (CH<sub>arom.</sub>), 2921 (CH<sub>alq.</sub>), 2852 (CH<sub>alq.</sub>), 1625 (C=C<sub>arom.</sub>), 1463 (C=C<sub>arom.</sub>).

### 3.3.2.11. Síntese do iodeto de 1,1,2-trimetil-3-pentil-1H-benzo[e]indol-3-íon (14a)

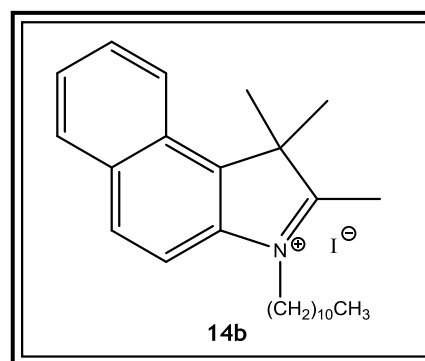
Obtido a partir de 1,1,2-trimetilbenzo[e]indole (8) (1,00 g; 4,79 mmol) por aquecimento em refluxo de acetonitrilo com o 1-iodopentano (2,84 g; 14,4 mmol). Verificou-se a formação de um óleo negro que se lavou posteriormente com éter dietílico a quente, de modo a material de partida e possíveis contaminantes. Recristalizou-se de acetonitrilo, obtendo-se assim o



produto pretendido, sob a forma de cristais pretos e com um  $\eta$  de 70%. Este apresenta: p.f. 153-154 °C. RMN  $^1\text{H}$  (400,13 MHz; DMSO- $d_6$ ;  $\delta$  em ppm)  $\delta$  0,90 (3H, t,  $J = 7,1$  Hz,  $\text{N}(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$ ), 1,30-1,50 (4H, m,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$ ), 1,77 (6H, s,  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 1,90 (2H, quint.,  $J = 8,1; 7,5$  Hz,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$ ), 2,95 (3H, s,  $\text{CH}_3$ ), 4,58 (2H, t,  $J = 7,7$  Hz,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$ ), 7,74 (2H, t,  $J = 7,6$  Hz, 8- $\text{CH}$ ), 7,80 (1H, t,  $J = 7,8$  Hz, 7- $\text{CH}$ ), 8,16 (1H, d,  $J = 8,9$  Hz, 9- $\text{CH}$ ), 8,23 (1H, d,  $J = 7,7$  Hz, 5- $\text{CH}$ ), 8,30 (1H, d,  $J = 8,9$  Hz, 4- $\text{CH}$ ), 8,38 (1H, d,  $J = 8,3$  Hz, 6- $\text{CH}$ ). RMN  $^{13}\text{C}$  (100,61 MHz; DMSO- $d_6$ ;  $\delta$  em ppm)  $\delta$  14,24 ( $\text{N}(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$ ), 14,44 (2- $\text{CH}_3$ ), 22,12 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 22,29 ( $\text{CH}_2$ ), 27,65 ( $\text{CH}_2$ ), 28,48 ( $\text{CH}_2$ ), 48,35 ( $\text{NCH}_2$ ), 55,97 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 113,80 (9- $\text{CH}$ ), 123,89 (6- $\text{CH}$ ), 127,69 (5a- $\text{C}$ ), 127,75 (8- $\text{CH}$ ), 128,91 (7- $\text{CH}$ ), 130,18 (5- $\text{CH}$ ), 131,17 (4- $\text{CH}$ ), 133,49 (9a- $\text{C}$ ), 137,44 (3a- $\text{C}$ ), 138,94 (10- $\text{C}$ ), 196,71 (2- $\text{C}$ ). IV ( $\nu_{\text{máx}} \text{ cm}^{-1}$ ; KBr) 3056 ( $\text{CH}_{\text{arom.}}$ ), 2950 ( $\text{CH}_{\text{alq.}}$ ), 2928 ( $\text{CH}_{\text{alq.}}$ ), 2866 ( $\text{CH}_{\text{alq.}}$ ), 1580 ( $\text{C}=\text{C}_{\text{arom.}}$ ), 1455 ( $\text{C}=\text{C}_{\text{arom.}}$ ).

### 3.3.2.12. Síntese do iodeto 1,1,2-trimetil-3-undecil-1H-benzo[e]indol-3-íon (14b)

Obtido a partir de 1,1,2-trimetilbenzo[e]indole (8) (1,00 g; 4,79 mmol) por aquecimento em refluxo de acetonitrilo (10 mL) com o 1-iodoundecano (4,05 g; 14,4 mmol). Verificou-se a formação de óleo o qual foi posteriormente lavado com éter etílico a quente, de modo a remover o material de partida e possíveis contaminantes. Recristalizou-se de acetonitrilo, obtendo-se assim o produto pretendido, sob a forma de



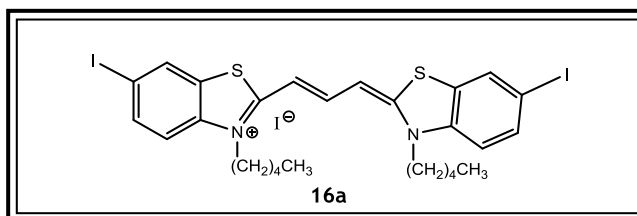
cristais verdes escuros e com um  $\eta$  de 65%. Este apresenta: p.f. 132-133 °C. RMN  $^1\text{H}$  (400,13 MHz; DMSO- $d_6$ ;  $\delta$  em ppm)  $\delta$  0,84 (3H, t,  $J = 7,0; 6,5$  Hz,  $\text{N}(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_3$ ), 1,14-1,38 (14H, m,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$ ), 1,45 (2H, quint.,  $J = 7,2$  Hz,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$ ), 1,77 (6H, s,  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 1,89 (2H, quint.,  $J = 7,8$  Hz,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$ ), 2,95 (3H, s,  $\text{CH}_3$ ), 4,58 (2H, t,  $J = 7,7$  Hz,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$ ), 7,75 (1H, t,  $J = 7,7$  Hz, 8- $\text{CH}$ ), 7,80 (1H, t,  $J = 7,8$  Hz, 7- $\text{CH}$ ), 8,16 (1H, d,  $J = 8,9$  Hz, 9- $\text{CH}$ ), 8,23 (1H, d,  $J = 8,0$  Hz, 5- $\text{CH}$ ), 8,30 (1H, d,  $J = 8,9$  Hz, 4- $\text{CH}$ ), 8,38 (1H, d,  $J = 8,4$  Hz, 6- $\text{CH}$ ). RMN  $^{13}\text{C}$  (100,61 MHz; DMSO- $d_6$ ;  $\delta$  em ppm)  $\delta$  14,36 ( $\text{N}(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_3$ ), 15,09 (2- $\text{CH}_3$ ), 22,17 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 22,53 ( $\text{CH}_2$ ), 26,38 ( $\text{CH}_2$ ), 28,02 ( $\text{CH}_2$ ), 29,14 ( $2 \times \text{CH}_2$ ), 29,28 ( $\text{CH}_2$ ), 29,40 ( $\text{CH}_2$ ), 29,42 ( $\text{CH}_2$ ), 31,71 ( $\text{CH}_2$ ), 48,66 ( $\text{NCH}_2$ ), 55,97 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 113,91 (9- $\text{CH}$ ), 123,88 (6- $\text{CH}$ ), 127,65 (8- $\text{CH}$ ), 127,67 (5a- $\text{C}$ ), 128,86 (7- $\text{CH}$ ), 130,13 (5- $\text{CH}$ ), 131,17 (4- $\text{CH}$ ), 133,49 (9a- $\text{C}$ ), 137,36 (3a- $\text{C}$ ), 138,91 (10- $\text{C}$ ), 196,62 (2- $\text{C}$ ). IV ( $\nu_{\text{máx}} \text{ cm}^{-1}$ ; KBr) 3055 ( $\text{CH}_{\text{arom.}}$ ), 2955 ( $\text{CH}_{\text{alq.}}$ ), 2923 ( $\text{CH}_{\text{alq.}}$ ), 2853 ( $\text{CH}_{\text{alq.}}$ ), 1581 ( $\text{C}=\text{C}_{\text{arom.}}$ ), 1467 ( $\text{C}=\text{C}_{\text{arom.}}$ ).

### 3.3.3. Síntese de carbocianinas

**Processo geral (método do ortoéster):** Aqueceu-se em refluxo uma mistura do sal de amônio quaternário sintetizado anteriormente, em piridina (10 mL/g de sal de amônio quaternário) e trietilortoformato (2 equivalentes). Acompanhou-se a reação por c.c.f. e após 1-5 dias verificou-se reação completa. Adicionou-se éter etílico e deixou-se a 4 °C em repouso. O sólido foi recristalizado com acetonitrilo e posteriormente filtrado sob vácuo e lavado várias vezes com éter dietílico. O sólido foi depois seco e caracterizado por RMN <sup>1</sup>H, RMN <sup>13</sup>C, IV e VIS.

#### 3.3.3.1. Síntese do iodeto de 6-iodo-2-((1E,3E)-3-(6-iodo-3-pentilbenzo[d]tiazole-2(3H)-ilideno)prop-1-en-1-il)-3-pentilbenzo[d]tiazol-3-io (16a)

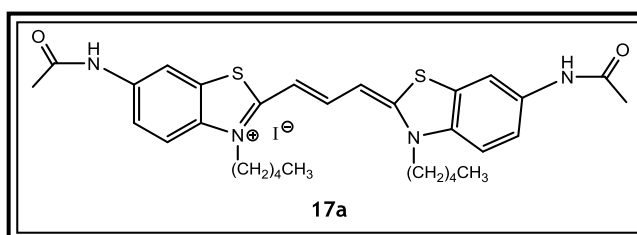
Uma solução do sal **10a** (0,11 g; 0,24 mmol) e trietilortoformato (0,08 mL; 0,47 mmol) em piridina seca (1 mL) foi aquecida sob refluxo durante um dia. Obteve-se então um sólido roxo,



com um  $\eta$  de 35%. Este composto apresenta: p.f. 245-247 °C. Vis:  $\lambda_{\text{máx}}$  (MetOH) 570 nm. RMN <sup>1</sup>H (400,13 MHz; DMSO-*d*<sub>6</sub>;  $\delta$  em ppm)  $\delta$  0,87 (6H, t, *J*=6,7 Hz, N(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>3</sub>), 1,25-1,45 (8H, m, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1,72 (4H, t, *J*= 7,4 Hz, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 4,30 (4H, t, *J*= 7,5 Hz, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 6,60 (2H, d, *J*= 12,8 Hz,  $\alpha$ ,  $\alpha'$ -CH), 7,57 (2H, d, *J*= 8,7 Hz, 4, 4'-CH), 7,78 (1H, t, *J*= 12,7 Hz, B-CH), 7,87 (2H, dd, *J*= 8,6; 1,8 Hz, 5,5'-CH), 8,40 (2H, d, *J*= 1,8 Hz, 7,7'-CH). RMN <sup>13</sup>C (100,61 MHz; DMSO-*d*<sub>6</sub>;  $\delta$  em ppm)  $\delta$  14,33 (N(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>3</sub>), 22,41 (CH<sub>2</sub>), 27,52 (CH<sub>2</sub>), 28,54 (CH<sub>2</sub>), 46,77 (NCH<sub>2</sub>), 89,72 (CH), 99,64 (CH), 115,84 (CH), 127,81 (C), 128,55 (C), 131,41 (CH), 136,91 (CH), 141,51 (C), 164,74 (C). IV ( $\nu_{\text{máx}}$  cm<sup>-1</sup>; KBr) 3055 (CH<sub>arom.</sub>), 2952 (CH<sub>alq.</sub>), 2926 (CH<sub>alq.</sub>), 2857 (CH<sub>alq.</sub>), 1630 (C=C<sub>arom.</sub>), 1579 (C=C).

#### 3.3.3.2. Síntese do iodeto de 6-acetamida-2-((1E,3E)-3-(6-acetamida-3-pentilbenzo[d]tiazole-2(3H)-ilideno)prop-1-en-1-il)-3-pentilbenzo[d]tiazol-3-io (17a)

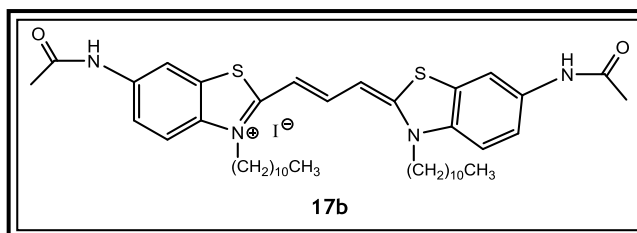
Uma solução do sal **11a** (0,22 g; 0,54 mmol) e trietilortoformato (0,18 mL; 1,07 mmol) em piridina seca (2,20 mL) foi aquecida sob refluxo durante dois dias. Obteve-se então um sólido verde brilhante, com um  $\eta$  de 41%.



Este composto apresenta: p.f. 287-288 °C. Vis:  $\lambda_{\text{máx}}$  (MetOH) 578 nm. RMN  $^1\text{H}$  (400,13 MHz; DMSO- $d_6$ ;  $\delta$  em ppm)  $\delta$  0,86 (6H, t,  $J= 6,9$  Hz,  $\text{N}(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$ ), 1,28-1,42 (8H, m,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$ ), 1,70 (4H, m,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$ ), 2,06 (6H, s,  $\text{NHCOCH}_3$ ), 4,22 (4H, t,  $J= 8,0$  Hz,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$ ), 6,46 (2H, d,  $J= 12,7$  Hz,  $\alpha, \alpha'-CH), 7,47-7,68 (5H, m, 4, 4', 5, 5'-CH; B-CH), 8,25 (2H, s, 7, 7'-CH), 10,25 (2H, s,  $\text{NHCOCH}_3$ ). RMN  $^{13}\text{C}$  (100,61 MHz; DMSO- $d_6$ ;  $\delta$  em ppm)  $\delta$  14,21 ( $\text{N}(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$ ), 22,36 ( $\text{CH}_2$ ), 24,24 ( $\text{NHCOCH}_3$ ), 27,53 ( $\text{CH}_2$ ), 28,59 ( $\text{CH}_2$ ), 46,63 ( $\text{NCH}_2$ ), 98,77 ( $\alpha, \alpha'-CH), 112,74 (7,7'-CH), 113,88 (4, 4'-CH), 119,50 (5, 5'-CH), 125,99 (7a, 7a'-C), 137,07 ( $\text{CNHCOCH}_3$ ), 137,17 (3a, 3a'-C), 145,66 (B-CH), 163,63 ( $\text{NHCOCH}_3$ ), 169,02 (2, 2'-C). IV ( $\nu_{\text{máx}}$   $\text{cm}^{-1}$ ; KBr) 3443 (NH), 3054 ( $\text{CH}_{\text{arom.}}$ ), 2955 ( $\text{CH}_{\text{alq.}}$ ), 2930 ( $\text{CH}_{\text{alq.}}$ ), 2859 ( $\text{CH}_{\text{alq.}}$ ), 1666 (C=O), 1603 (C=C).$$

### 3.3.3.3. Síntese do iodeto de 6-acetamida-2-((1E,3E)-3-(6-acetamida-3-undecilbenzo[d]tiazole-2(3H)-ilideno)prop-1-en-1-il)-3-undecilbenzo[d] tiazol-3-io (17b)

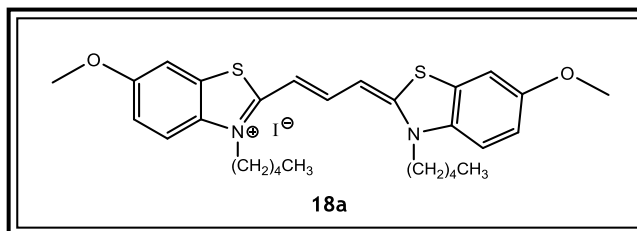
Ao 11b (0,59 g; 1,20 mmol) adicionou-se trietilortofornato (0,8 mL; 2,40 mmol) e piridina seca (5 mL). A mistura foi aquecida sob refluxo durante três dias. Obteve-se então o produto pretendido, um



sólido roxo brilhante, com um  $\eta$  de 40%. Este composto apresenta: p.f. 203-205 °C. Vis:  $\lambda_{\text{máx}}$  (MetOH) 578 nm. RMN  $^1\text{H}$  (400,13 MHz; DMSO- $d_6$ ;  $\delta$  em ppm)  $\delta$  0,83 (6H, t,  $\text{N}(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_3$ ), 1,22 (32H, m,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_8\text{CH}_3$ ), 1,72 (4H, quint.,  $J= 7,6$  Hz,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$ ), 2,08 (6H, s,  $\text{NHCOCH}_3$ ), 4,25 (4H, t,  $J= 8,2$  Hz,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$ ), 6,51 (2H, d,  $J= 12,8$  Hz,  $\alpha, \alpha'-CH), 7,32-7,84 (5H, m, 4, 4', 5, 5'-CH; B-CH), 8,32 (2H, s, 7, 7'-CH), 10,25 (2H, s,  $\text{NHCOCH}_3$ ). RMN  $^{13}\text{C}$  (100,61 MHz; DMSO- $d_6$ ;  $\delta$  em ppm)  $\delta$  14,20 ( $\text{N}(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_3$ ), 22,52 ( $\text{CH}_2$ ), 24,16 ( $\text{NHCOCH}_3$ ), 26,41 ( $\text{CH}_2$ ), 27,75 ( $\text{CH}_2$ ), 29,15 ( $\text{CH}_2$ ), 29,36 ( $\text{CH}_2$ ), 29,43 ( $\text{CH}_2$ ), 29,48 ( $\text{CH}_2$ ), 31,72 ( $\text{CH}_2$ ), 31,74 ( $\text{CH}_2$ ), 46,62 ( $\text{NCH}_2$ ), 98,81 ( $\alpha, \alpha'-CH), 112,77 (7,7'-CH), 113,90 (4, 4'-CH), 119,53 (5, 5'-CH), 126,02 (7a, 7a'-C), 137,11 (C), 145,71 (B-CH), 163,72 ( $\text{NHCOCH}_3$ ), 169,93 (2, 2'-C). IV ( $\nu_{\text{máx}}$   $\text{cm}^{-1}$ ; KBr) 3446 (NH), 3050 ( $\text{CH}_{\text{arom.}}$ ), 2953 ( $\text{CH}_{\text{alq.}}$ ), 2923 ( $\text{CH}_{\text{alq.}}$ ), 2852 ( $\text{CH}_{\text{alq.}}$ ), 1682 (C=O), 1593 (C=C).$$

### 3.3.3.4. Síntese do iodeto de 6-metoxi-2-((1E,3E)-3-(6-metoxi-3-pentilbenzo[d]tiazol-2(3H)-ilideno)prop-1-en-1-il)-3-pentilbenzo[d]tiazol-3-io (18a)

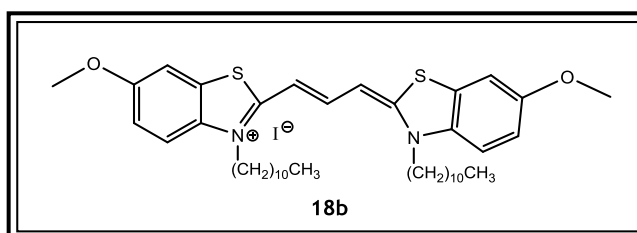
Ao **12a** (0,21 g; 0,56 mmol) adicionou-se trietilortoformato (0,19 mL; 1,11 mmol) e piridina seca (2,00 mL). A mistura foi aquecida sob refluxo durante dois dias. Obteve-se então um sólido azul escuro



brilhante, com um  $\eta$  de 38%. Este composto apresenta: p.f. 256-257 °C. Vis:  $\lambda_{\text{máx}}$  (MetOH) 573 nm. RMN  $^1\text{H}$  (400,13 MHz; DMSO- $d_6$ ;  $\delta$  em ppm)  $\delta$  0,88 (6H, t,  $J = 7,0$  Hz,  $\text{N}(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$ ), 1,26-1,47 (8H, m,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$ ), 1,70 (4H, q,  $J = 7,5$  Hz,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$ ), 3,81 (6H, s,  $\text{COCH}_3$ ), 4,26 (4H, t,  $J = 7,6$  Hz,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$ ), 6,51 (2H, d,  $J = 12,7$  Hz,  $\alpha$ ,  $\alpha'$ -CH), 7,11 (2H, dd,  $J = 9,0$ ; 2,5 Hz, 5, 5'-CH), 7,50-7,71 (5H, m, 4, 4', 7, 7'-CH; B-CH). RMN  $^{13}\text{C}$  (100,61 MHz; DMSO- $d_6$ ;  $\delta$  em ppm)  $\delta$  14,33 ( $\text{N}(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$ ), 22,40 ( $\text{CH}_2$ ), 27,60 ( $\text{CH}_2$ ), 28,59 ( $\text{CH}_2$ ), 46,68 ( $\text{NCH}_2$ ), 56,43 ( $\text{COCH}_3$ ), 98,57 ( $\alpha$ ,  $\alpha'$ -CH), 107,72 (4, 4'-CH), 114,68 (5, 5'-CH), 115,83 (7, 7'-CH), 124,84 (7a, 7a'-C), 135,67 (3a, 3a'-C), 145,70 (B-CH), 157,55 ( $\text{COCH}_3$ ), 163,51 (2, 2'-C). IV ( $\nu_{\text{máx}}$   $\text{cm}^{-1}$ ; KBr) 3030 ( $\text{CH}_{\text{arom.}}$ ), 2953 ( $\text{CH}_{\text{alq.}}$ ), 2921 ( $\text{CH}_{\text{alq.}}$ ), 2866 ( $\text{CH}_{\text{alq.}}$ ), 1604 (C=C), 1254 (C-O), 1048 (C-O).

### 3.3.3.5. Síntese do iodeto de 6-metoxi-2-((1E,3E)-3-(6-metoxi-3-undecilbenzo[d]tiazole-2(3H)-ilideno)prop-1-en-1-il)-undecilbenzo[d]tiazol-3-io (18b)

Uma mistura do sal **12b** (0,20 g; 0,44 mmol), trietilortoformato (0,15 mL; 0,88 mmol) e piridina seca (2,00 mL) foi aquecida sob refluxo durante um dia. Obteve-se o produto desejado, com um  $\eta$  de 35%. Este composto

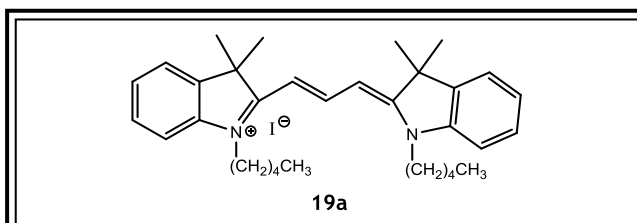


apresenta: p.f. 107-109 °C. Vis:  $\lambda_{\text{máx}}$  (MetOH) 573 nm. RMN  $^1\text{H}$  (400,13 MHz; DMSO- $d_6$ ;  $\delta$  em ppm)  $\delta$  0,81 (6H, t,  $J = 6,5$  Hz,  $\text{N}(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_3$ ), 1,07-1,43 (32H, m,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_8\text{CH}_3$ ), 1,70 (4H, q,  $J = 7,4$  Hz,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_8\text{CH}_3$ ), 3,81 (6H, s,  $\text{COCH}_3$ ), 4,26 (4H, t,  $J = 7,2$  Hz,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$ ), 6,47 (2H, d,  $J = 12,7$  Hz,  $\alpha$ ,  $\alpha'$ -CH), 7,13 (2H, d,  $J = 9,0$  Hz, 5, 5'-CH), 7,52-7,72 (5H, m, 4, 4', 7, 7'-CH; B-CH). RMN  $^{13}\text{C}$  (100,61 MHz; DMSO- $d_6$ ;  $\delta$  em ppm)  $\delta$  14,39 ( $\text{N}(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_3$ ), 22,56 ( $\text{CH}_2$ ), 26,41 ( $\text{CH}_2$ ), 27,83 ( $\text{CH}_2$ ), 29,18 (2x $\text{CH}_2$ ), 29,38 (2x $\text{CH}_2$ ), 29,46 ( $\text{CH}_2$ ), 31,75 ( $\text{CH}_2$ ), 46,68 ( $\text{NCH}_2$ ), 56,42 ( $\text{COCH}_3$ ), 98,60 ( $\alpha$ ,  $\alpha'$ -CH), 107,70 (4, 4'-CH), 114,71 (5, 5'-CH), 115,83 (7, 7'-CH), 126,85 (7a, 7a'-C), 135,66 (3a, 3a'-C), 145,65 (B-CH), 157,58

( $\underline{\text{COCH}_3}$ ), 163,51 (2, 2'- $\underline{\text{C}}$ ). IV ( $\nu_{\text{máx}} \text{ cm}^{-1}$ ; KBr) 3048 ( $\text{CH}_{\text{arom.}}$ ), 2953 ( $\text{CH}_{\text{alq.}}$ ), 2924 ( $\text{CH}_{\text{alq.}}$ ), 2851 ( $\text{CH}_{\text{alq.}}$ ), 1599 (C=C), 1253 (C-O), 1040 (C-O).

### 3.3.3.6. Síntese do iodeto de 2-((E)-3-((Z)-3,3-dimetil-1-pentilindolin-2-ilidene)prop-1-en-1-il)-3,3-dimetil-1-pentil-3H-indol-1-io (19a)

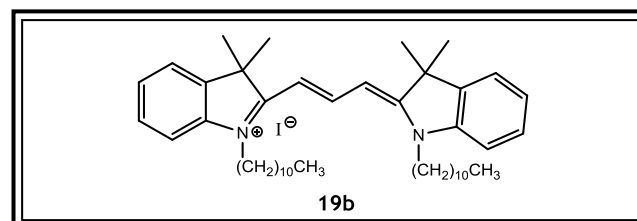
Uma mistura do sal 13a (0,50 g; 2,19 mmol), trietilortoformato (0,73 mL; 4,4 mmol) e piridina (5 mL) foram colocados em refluxo durante três dias. Obteve-se então um sólido roxo



brilhante, com um  $\eta$  de 30%. Este composto apresenta: p.f. 155-156 °C. Vis:  $\lambda_{\text{máx}}$  (MetOH) 549 nm. RMN  $^1\text{H}$  (400,13 MHz; DMSO- $d_6$ ;  $\delta$  em ppm)  $\delta$  0,89 (6H, t,  $J= 6,9$  Hz,  $\text{N}(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$ ), 1,25-1,48 (8H, m,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$ ), 1,70 (12H, s,  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 1,71-1,80 (4H, m,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$ ), 4,14 (4H, t,  $J= 7,5$  Hz,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$ ), 6,61 (2H, d,  $J= 13,3$  Hz,  $\alpha, \alpha'$ - $\underline{\text{CH}}$ ), 7,26-7,37 (2H, m, 6, 6'- $\underline{\text{CH}}$ ), 7,42-7,51 (4H, m, 4, 4', 5, 5'- $\underline{\text{CH}}$ ), 7,66 (2H, d,  $J= 7,4$  Hz, 7, 7'- $\underline{\text{CH}}$ ), 8,37 (1H, t,  $J= 13,7$  Hz,  $\beta$ - $\underline{\text{CH}}$ ). RMN  $^{13}\text{C}$  (100,61 MHz; DMSO- $d_6$ ;  $\delta$  em ppm)  $\delta$  14,32 ( $\text{N}(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$ ), 22,44 ( $\underline{\text{CH}_2}$ ), 27,27 ( $\underline{\text{CH}_2}$ ), 27,94 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 28,73 ( $\underline{\text{CH}_2}$ ), 44,29 ( $\text{NCH}_2$ ), 49,37 ( $\underline{\text{C}}(\text{CH}_3)_2$ ), 103,06 ( $\alpha, \alpha'$ - $\underline{\text{CH}}$ ), 112,04 (5, 5'- $\underline{\text{CH}}$ ), 123,01 (7, 7'- $\underline{\text{CH}}$ ), 125,66 (6, 6'- $\underline{\text{CH}}$ ), 129,13 (4, 4'- $\underline{\text{CH}}$ ), 141,11 (7a, 7a'- $\underline{\text{C}}$ ), 142,36 (3a, 3a'- $\underline{\text{C}}$ ), 150,36 ( $\beta$ - $\underline{\text{CH}}$ ), 174,26 (2, 2'- $\underline{\text{C}}$ ). IV ( $\nu_{\text{máx}} \text{ cm}^{-1}$ ; KBr) 3046 ( $\text{CH}_{\text{arom.}}$ ), 2955 ( $\text{CH}_{\text{alq.}}$ ), 2928 ( $\text{CH}_{\text{alq.}}$ ), 2853 ( $\text{CH}_{\text{alq.}}$ ), 1600 (C=C).

### 3.3.3.7. Síntese do iodeto de 2-((E)-3-((Z)-3,3-dimetil-1-undecilindolin-2-ilidene)prop-1-en-1-il)-3,3-dimetil-1-undecil-3H-indol-1-io (19b)

Ao sal 13b (0,57 g; 1,3 mmol) adicionaram-se trietilortoformato (0,433 mL; 2,6 mmol) e piridina (5 mL). A solução foi colocada sob refluxo durante um dia. Obteve-se

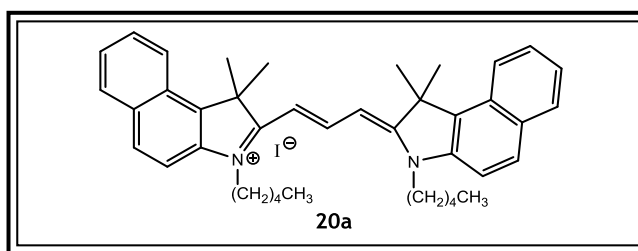


então um óleo rosa brilhante, com um  $\eta$  de 17%. Este composto apresenta: Vis:  $\lambda_{\text{máx}}$  (MetOH) 549 nm. RMN  $^1\text{H}$  (400,13 MHz; DMSO- $d_6$ ;  $\delta$  em ppm)  $\delta$  0,82 (6H, t,  $J= 6,7$  Hz,  $\text{N}(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_3$ ), 1,12-1,47 (32H, m,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_8\text{CH}_3$ ), 1,70 (12H, s,  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 1,72-1,78 (4H, m,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$ ), 4,15 (4H, t,  $J= 7,4$  Hz,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$ ), 6,61 (2H, d,  $J= 13,4$  Hz,  $\alpha, \alpha'$ - $\underline{\text{CH}}$ ), 7,26-7,33 (2H, m, 6, 6'- $\underline{\text{CH}}$ ), 7,40-7,51 (4H, m, 4, 4', 5, 5'- $\underline{\text{CH}}$ ), 7,65 (2H, d,  $J= 7,5$  Hz, 7, 7'- $\underline{\text{CH}}$ ), 8,37 (1H, t,  $J= 13,4$  Hz,  $\beta$ - $\underline{\text{CH}}$ ). RMN  $^{13}\text{C}$  (100,61 MHz; DMSO- $d_6$ ;  $\delta$  em ppm)  $\delta$  13,91 ( $\text{N}(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_3$ ), 22,07 ( $\underline{\text{CH}_2}$ ), 26,02 ( $\underline{\text{CH}_2}$ ), 27,02 ( $\underline{\text{CH}_2}$ ), 27,45 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 28,68 ( $\underline{\text{CH}_2}$ ), 28,75 ( $\underline{\text{CH}_2}$ ), 28,87 ( $\underline{\text{CH}_2}$ ), 28,90 ( $\underline{\text{CH}_2}$ ), 28,96 ( $\underline{\text{CH}_2}$ ), 31,26 ( $\underline{\text{CH}_2}$ ), 43,79 ( $\text{NCH}_2$ ), 48,87 ( $\underline{\text{C}}(\text{CH}_3)_2$ ),

102,66 ( $\alpha$ ,  $\alpha'$ -CH), 111,57 (5, 5'-CH), 122,52 (7, 7'-CH), 125,20 (6, 6'-CH), 128,64 (4, 4'-CH), 140,60 (7a, 7a'-C), 141,84 (3a, 3a'-C), 149,80 ( $\beta$ -CH), 173,75 (2, 2'-C). IV ( $\nu_{\text{máx}}$   $\text{cm}^{-1}$ ; KBr) 3052 ( $\text{CH}_{\text{arom.}}$ ), 2955 ( $\text{CH}_{\text{alq.}}$ ), 2923 ( $\text{CH}_{\text{alq.}}$ ), 2852 ( $\text{CH}_{\text{alq.}}$ ), 1615 (C=C).

### 3.3.3.8. Síntese do iodeto de 2-((1E,3Z)-3-(1,1-dimetil-3-pentil-1,3-dihidro-2H-benzo[e]indol-2-ilideno)prop-1-en-1-il)-1,1-dimetil-3-pentil-1H-benzo[e]indol-3-io (20a)

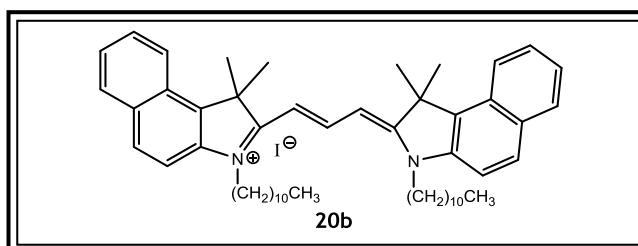
Obtida a partir do sal de amónio quaternário **14a** (0,52 g; 1,27 mmol) em refluxo com piridina (5 mL) e trietilortoformato (0,422 mL; 2,5 mmol). Obteve-se então um sólido castanho brilhante, com um  $\eta$  de 10%.



Este composto apresenta: p.f. 144-146 °C. Vis:  $\lambda_{\text{máx}}$  (MetOH) 588 nm. RMN  $^1\text{H}$  (400,13 MHz; DMSO- $d_6$ ;  $\delta$  em ppm)  $\delta$  0,90 (6H, t,  $J$ = 7,0 Hz,  $\text{N}(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$ ), 1,28-1,54 (8H, m,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$ ), 1,82 (4H, quint.,  $J$ = 7,5 Hz,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$ ), 2,02 (12H, s,  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 4,29 (4H, t,  $J$ = 7,5 Hz,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$ ), 6,61 (2H, d,  $J$ = 13,5 Hz,  $\alpha$ ,  $\alpha'$ -CH), 7,55 (2H, t,  $J$ = 7,5 Hz, 8, 8'-CH), 7,70 (2H, t,  $J$ = 7,0 Hz, 7, 7'-CH), 7,81 (2H, d,  $J$ = 8,9 Hz, 9, 9'-CH), 8,12 (4H, dd,  $J$ = 13,7; 7,4 Hz, 4, 4', 5, 5'-CH), 8,31 (2H, d,  $J$ = 8,6 Hz, 6, 6'-CH), 8,60 (1H, t,  $J$ = 13,5 Hz,  $\beta$ -CH). RMN  $^{13}\text{C}$  (100,61 MHz; DMSO- $d_6$ ;  $\delta$  em ppm)  $\delta$  14,33 ( $\text{N}(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$ ), 22,48 ( $\text{CH}_2$ ), 27,57 ( $\text{CH}_2$ ), 27,60 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 28,71 ( $\text{CH}_2$ ), 44,42 ( $\text{NCH}_2$ ), 51,05 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 102,58 ( $\alpha$ ,  $\alpha'$ -CH), 112,23 (9, 9'-CH), 122,64 (6, 6'-CH), 125,52 (8, 8'-CH), 127,87 (5a, 5a'-C), 128,37 (7, 7'-CH), 130,40 (5, 5'-CH), 130,95 (4, 4'-CH), 131,94 (9a, 9a'-C), 133,60 (9b, 9b'-C), 140,04 (3a, 3a'-C), 148,95 ( $\beta$ -CH), 175,52 (2, 2'-C). IV ( $\nu_{\text{máx}}$   $\text{cm}^{-1}$ ; KBr) 3053 ( $\text{CH}_{\text{arom.}}$ ), 2954 ( $\text{CH}_{\text{alq.}}$ ), 2928 ( $\text{CH}_{\text{alq.}}$ ), 2857 ( $\text{CH}_{\text{alq.}}$ ), 1625 (C=C $_{\text{arom.}}$ ), 1590 (C=C).

### 3.3.3.9. Síntese do iodeto de 2-((1E,3Z)-3-(1,1-dimetil-3-undecil-1,3-dihidro-2H-benzo[e]indol-2-ilideno)prop-1-en-1-il)-1,1-dimetil-3-undecil-1H-benzo[e]indol-3-io (20b)

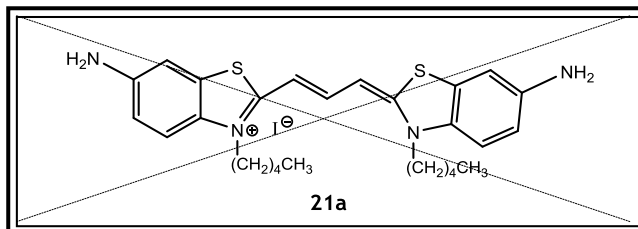
Obtida a partir do sal de amónio quaternário **14b** (0,53 g; 1,08 mmol) em refluxo com piridina (5 mL) e trietilortoformato (0,36 mL; 2,2 mmol). Obteve-se um óleo roxo, o



qual foi posteriormente lavado com éter diétilico quente e recristalizado de acetonitrilo. Obteve-se então um sólido roxo brilhante, com um  $\eta$  de 15%. Este composto apresenta: p.f. 105-106 °C. Vis:  $\lambda_{\text{máx}}$  (MetOH) 589 nm. RMN  $^1\text{H}$  (400,13 MHz; DMSO- $d_6$ ;  $\delta$  em ppm)  $\delta$  0,79 (6H, t,  $J=6,7$  Hz,  $\text{N}(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_3$ ), 1,07-1,51 (32H, m,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_8\text{CH}_3$ ), 1,80 (4H, quint.,  $J=7,8$  Hz,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_8\text{CH}_3$ ), 2,01 (12H, s,  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 4,27 (4H, t,  $J=7,2$  Hz,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$ ), 6,58 (2H, d,  $J=13,4$  Hz,  $\alpha$ ,  $\alpha'-CH), 7,54 (2H, t,  $J=7,6$  Hz, 8, 8'-CH), 7,69 (2H, t,  $J=7,8$  Hz, 7, 7'-CH), 7,78 (2H, d,  $J=8,9$  Hz, 9, 9'-CH), 8,10 (4H, dd,  $J=11,0$ ; 8,5 Hz, 4, 4', 5, 5'-CH), 8,30 (2H, d,  $J=8,6$  Hz, 6, 6'-CH), 8,59 (1H, t,  $J=13,5$  Hz,  $\beta$ -CH). RMN  $^{13}\text{C}$  (100,61 MHz; DMSO- $d_6$ ;  $\delta$  em ppm)  $\delta$  14,31 ( $\text{N}(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_3$ ), 22,48 ( $\text{CH}_2$ ), 26,36 ( $\text{CH}_2$ ), 27,54 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 27,73 ( $\text{CH}_2$ ), 29,09 ( $\text{CH}_2$ ), 29,18 ( $\text{CH}_2$ ), 29,26 ( $\text{CH}_2$ ), 29,28 ( $\text{CH}_2$ ), 29,37 ( $\text{CH}_2$ ), 31,65 ( $\text{CH}_2$ ), 44,34 ( $\text{NCH}_2$ ), 51,01 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 102,64 ( $\alpha$ ,  $\alpha'-CH), 112,16 (9, 9'-CH), 122,60 (6, 6'-CH), 125,54 (8, 8'-CH), 127,84 (5a, 5a'-C), 128,36 (7, 7'-CH), 130,37 (5, 5'-CH), 130,93 (4, 4'-CH), 131,92 (9a, 9a'-C), 133,59 (9b, 9b'-C), 139,94 (3a, 3a'-C), 148,87 ( $\beta$ -CH), 175,54 (2, 2'-CH). IV ( $\nu_{\text{máx}}$   $\text{cm}^{-1}$ ; KBr) 3053 ( $\text{CH}_{\text{arom.}}$ ), 2922 ( $\text{CH}_{\text{alq.}}$ ), 2850 ( $\text{CH}_{\text{alq.}}$ ), 1625 ( $\text{C}=\text{C}_{\text{arom.}}$ ), 1587 ( $\text{C}=\text{C}$ ).$$

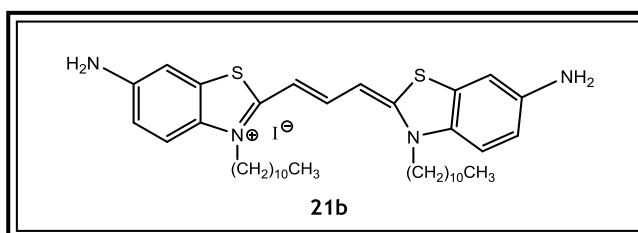
### 3.3.3.10. Síntese do iodeto de 6-amino-2-((1E,3E)-3-(6-amino-3-pentilbenzo[d]tiazole-2(3H)-ilideno)prop-1-en-1-il)-3-pentilbenzo[d]tiazol-3-io (21a)

Fez-se reagir o composto 17a com uma solução de HCl a 10%, em refluxo. Ao fim de um dia em refluxo, adicionou-se amoníaco à mistura e filtrou-se o sólido. Este processo repetiu-se mais duas vezes, de modo a garantir a hidrólise total. No entanto, aquando da análise por RMN observou-se que não tinha ocorrido a hidrólise do composto.



### 3.3.3.11. Síntese do iodeto de 6-amino-2-((1E,3E)-3-(6-amino-3-undecilbenzo[d]tiazol-2(3H)-ilideno)prop-1-en-1-il)-3-undecilbenzo[d]tiazol-3-io (21b)

Obteve-se o produto pretendido ao fazer reagir o composto 17b com uma solução de HCl a 10%, em refluxo. Ao fim de um dia em refluxo, adicionou-se amoníaco à mistura e filtrou-se o sólido. Este processo repetiu-se mais duas vezes, de modo a garantir a hidrólise total. Obteve-se um sólido castanho brilhante com



um  $\eta$  de 37%. Este composto apresenta p.f. 169-170 °C. Vis:  $\lambda_{\text{máx}}$  (MetOH) 593 nm. RMN  $^1\text{H}$  (400,13 MHz; DMSO- $d_6$ ;  $\delta$  em ppm)  $\delta$  0,84 (6H, t,  $\text{N}(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_3$ ), 1,07-1,46 (36H, m,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_8\text{CH}_3$ ), 1,57-1,81 (4H, m,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_8\text{CH}_3$ ), 4,18 (4H, t,  $J= 7,4$  Hz,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$ ), 5,59 (4H, s,  $\text{NH}_2$ ), 6,37 (2H, d,  $J= 12,7$  Hz,  $\alpha$ ,  $\alpha'$ -CH), 6,76 (2H, d,  $J= 8,8$  Hz, CH), 7,01 (2H, s, CH), 7,40 (2H, d,  $J= 9,4$  Hz, CH), 7,47 (1H, d,  $J= 12,8$  Hz, B-CH). RMN  $^{13}\text{C}$  (100,61 MHz; DMSO- $d_6$ ;  $\delta$  em ppm)  $\delta$  14,39 ( $\text{N}(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_3$ ), 22,56 (CH $_2$ ), 26,39 (CH $_2$ ), 27,82 (CH $_2$ ), 29,13 (CH $_2$ ), 29,16 (CH $_2$ ), 29,35 (CH $_2$ ), 29,36 (CH $_2$ ), 29,44 (CH $_2$ ), 31,74 (CH $_2$ ), 46,34 (NCH $_2$ ), 97,53 ( $\alpha$ ,  $\alpha'$ -CH), 106,15 (CH), 114,50 (CH), 114,97 (CH), 126,66 (C), 132,21 (C), 143,91 (B-CH), 147,67 (C), 160,93 (2, 2'-C). IV ( $\nu_{\text{máx}}$   $\text{cm}^{-1}$ ; KBr) 3406 ( $\text{NH}_2$ ), 3050 ( $\text{CH}_{\text{arom.}}$ ), 2953 ( $\text{CH}_{\text{alq.}}$ ), 2922 ( $\text{CH}_{\text{alq.}}$ ), 2851 ( $\text{CH}_{\text{alq.}}$ ), 1625 ( $\text{C}=\text{C}_{\text{arom.}}$ ), 1580 ( $\text{C}=\text{C}$ ).

### 3.4. Cultura de células

Neste trabalho foram utilizadas duas linhas celulares distintas: células epiteliais humanas de cancro da mama, às quais é atribuído o acrónimo MCF-7 (*Michigan Cancer Foundation-7*), sendo este referente ao instituto onde estas foram isoladas pela primeira vez, em 1970 [69]; e os fibroblastos da derme humana não cancerígenos, representadas pelo acrónimo NHDF (*Normal Human Dermal Fibroblasts*).

As células MCF-7 consistem numa linha celular, isoladas de uma efusão pleural de uma mulher caucasiana com 69 anos, a quem tinha sido diagnosticado adenocarcinoma mamário metastático. Estas possuem características aderentes e crescimento em monocamada [69]. As células MCF-7 foram cultivadas em caixas de 75  $\text{cm}^2$  e mantidas em meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM, Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, Missouri, USA) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, USA), 1% de antibiótico/antimicótico AB (10,000 unidades/ml de penicilina, 10 mg/ml de estreptomicina e 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de anfotericina B), a 37 °C numa atmosfera humidificada com 5% de  $\text{CO}_2$ . O meio de cultura foi substituído a cada dois-três dias.

As células NHDF são obtidas da derme de adultos e são células aderentes. Estas células foram cultivadas em caixas de 75  $\text{cm}^2$ , mantidas em meio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI, Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, Missouri, USA) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, Missouri, USA), 20 mM de L-glutamina (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, Missouri, USA), 10 mM de HEPES (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, Missouri, USA), 1 mM de piruvato de sódio (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, Missouri, USA) e 1% de antibiótico/antimicótico AB (10,000 unidades/ml de penicilina, 10 mg/ml de estreptomicina e 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de anfotericina B), a 37 °C numa atmosfera humidificada com 5% de  $\text{CO}_2$ . O meio de cultura foi substituído a cada dois-três dias.

Importa referir ainda que após preparação, os meios utilizados foram esterilizados através de filtração por uma membrana com um poro de 0,2  $\mu\text{m}$  e diâmetro 50 mm, sob um sistema de

vácuo em câmara de fluxo laminar vertical. O seu armazenamento é feito a 4 °C, sendo necessário um aquecimento prévio, num banho de água a 37 °C, para a sua utilização.

#### **3.4.1. Passagem de Células**

Procedeu-se à passagem celular sempre que era atingida uma confluência de 80-90%, permitindo assim diminuir a densidade celular, e conseqüentemente a contínua expansão celular. Como referido anteriormente, as células em estudo são aderentes, sendo assim necessário recorrer-se à adição de tripsina, de maneira a dissociá-las do frasco de cultura. O meio de cultura é em primeiro lugar aspirado, seguindo-se a adição de tripsina-EDTA 0,025% (Sigma-Aldrich®, Missouri, USA), cujo volume seja suficiente para cobrir as células. Esta é deixada a atuar durante dois a quatro minutos, a 37 °C. Através da observação microscópica, verifica-se se as células se encontram em solução. A suspensão é recolhida para um tubo *falcon*, o qual se encontra já com meio de cultura fresco (com o dobro do volume de tripsina utilizado), de modo a parar a ação da tripsina. A solução é então depois centrifugada durante cinco minutos, a 1000 rpm e a 25 °C. O sobrenadante é depois descartado e o *pellet* celular ressuspenso em meio de cultura fresco. A suspensão celular é dividida por novos frascos de cultura e estes tratados conforme acima mencionado.

#### **3.4.2. Contagem de células**

A contagem celular é feita após tripsinização e ressusensão do *pellet* com meio completo fresco. Para tal, retiraram-se 10 µl da suspensão celular para um *ependorf*, ao qual se adicionaram 10 µl de corante azul tripano 0,25%. Os 20 µl foram depois aplicados numa câmara de *Neubauer* (Marienfeld, Germany) permitindo a contagem das células viáveis, nos quatro quadrantes. O número estimado de células presentes em 1 mL pode ser calculado através da fórmula (1) e o número total de células existentes no frasco através de (2).

$$\text{N}^\circ \text{ Células/mL} = \text{Média células nos quadrantes} \times \text{Fator diluição} \times 10^4 \quad (1)$$

$$\text{N}^\circ \text{ Total células} = \text{N}^\circ \text{ células/mL} \times \text{Volume total de ressusensão} \quad (2)$$

#### **3.4.3. Armazenamento de células**

Para se garantir a eternização das linhas celulares, estas são armazenadas através de congelamento. Para tal, procedeu-se em primeiro lugar, à tripsinização, processo este que se encontra descrito anteriormente. As células foram seguidamente diluídas em meio de cultura (DMEM no caso das células MCF-7 e RPMI no caso das células NHDF), ao qual se adicionou um agente crioprotetor, o dimetilsulfóxido (DMSO) e as alíquotas de 1 mL colocadas em tubos criogénicos. Numa primeira fase, os tubos criogénicos foram colocados à temperatura de -20 °C, durante quatro horas passando depois para a temperatura de -80°C durante um a três dias e finalmente armazenadas em azoto líquido (-180 °C).

### 3.4.4. Ensaios de Citotoxicidade

Após contagem das células, procedeu-se à cultura de células em placas *multiwells* de 96 poços (Orange Scientific, Bélgica), aos quais foram adicionados 100 µL de suspensão celular, com uma densidade de  $2 \times 10^4$  células por poço. As placas foram depois colocadas numa incubadora AutoFlow DHD CO<sub>2</sub> Air-Jacketed Incubator, a 37 °C numa atmosfera humidificada com 5% de CO<sub>2</sub> e 95% Ar, durante 48h. Ao fim de 48h, o meio foi substituído por meio fresco e os compostos em estudo adicionados, exceto no caso dos poços destinados ao controlo (células em meio fresco). As concentrações estudadas foram 2 µg/mL, 20 µg/mL, 50 µg/mL e 100 µg/mL, tendo sido realizados triplicados para todas. Após 48h de incubação das células na presença dos compostos em estudo, a 37 °C numa atmosfera humidificada com 5% de CO<sub>2</sub> e 95% Ar, o meio foi aspirado e os poços lavados duas vezes com 100µL de tampão fosfato salino (PBS) 1%.

Para avaliar a citotoxicidade dos compostos foram utilizadas duas metodologias diferentes: o ensaio de Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) e o doseamento de proteínas pelo método do ácido bicinonínico (BCA). Os ensaios foram feitos em triplicado.

#### 3.4.4.1. Ensaio de viabilidade pelo método MTT

A viabilidade celular foi inicialmente quantificada com recurso ao ensaio de MTT, um ensaio colorimétrico que permite quantificar a viabilidade celular. Este método consiste na redução do sal MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) (Sigma-Aldrich®, Missouri, USA), pelas desidrogenases das células metabolicamente ativas, em formazano, um composto insolúvel em água. A solubilização do formazano é feita com DMSO. No entanto, a lavagem dos poços não retirava a totalidade dos compostos em estudo. Sendo os compostos corantes (carbocianinas), aquando da dissolução dos cristais de formazano, estes também eram dissolvidos, influenciando a leitura espectrofotométrica, falseando assim os resultados. De notar que estes compostos absorvem na mesma gama de comprimento de onda à qual é feita a leitura (570 nm), daí a sua interferência.

#### 3.4.4.2. Doseamento de proteínas pelo método BCA

O método do ácido bicinonínico é um ensaio bioquímico utilizado na determinação de concentração de proteínas. Este consiste, em primeiro lugar, na redução do Cu<sup>2+</sup> do sulfato de cobre, pelas ligações peptídicas das proteínas, em Cu<sup>+</sup>. A quantidade de Cu<sup>2+</sup> reduzido é proporcional à concentração de proteína presente na amostra. Seguidamente, duas moléculas de BCA quelatam o Cu<sup>+</sup>, formando um complexo de cor roxa, o qual absorve fortemente ao comprimento de onda de 562 nm [70].

A cada poço da placa *multiwell* são adicionados 200 µL de BCA (Novagen, Massachusetts, USA) e, em seguida, procede-se à ressuspensão celular com ajuda de uma micropipeta. Os 200 µL da ressuspensão são depois transferidos para uma nova placa *multiwell* de 96 poços, e

a cada um são adicionados 4  $\mu\text{L}$  de sulfato de cobre (Novagen, Massachusetts, USA). A placa é então protegida da luz e deixada à temperatura ambiente durante duas horas. Procede-se à leitura das absorvâncias num espectrofotómetro a 562 nm. A média das absorvâncias relativa ao controlo foi definida como 100%. Os restantes valores obtidos foram considerados em relação ao ensaio controlo, sendo a proliferação celular expressa em percentagem. Os compostos **16a,b-20a-b** foram utilizados nos ensaios de toxicidade. Para além destes foram ainda utilizados quatro compostos previamente sintetizados pelo grupo de investigação de Síntese em Química Orgânica, da Universidade da Beira Interior. Na tabela 1 podem-se encontrar as suas estruturas, às quais foram atribuídos os números **22a-b** e **23a-b**.

**Tabela 1** Estrutura das carbocianinas previamente sintetizadas e utilizadas nos ensaios

Carbocianina	Estrutura
22a	
22b	
23a	
23b	

### 3.5. Microscopia confocal de varrimento a laser (CLSM)

A identificação da internalização dos compostos em estudo foi feita recorrendo ao CLSM. Após tripsinização e contagem das células, procedeu-se à cultura das mesmas numa placa de 35 mm (Orange Scientific, Bélgica) cuja superfície foi revestida previamente com colagénio, tendo sido preparados e cedidos pelo grupo de “Doenças Cardiovasculares”, pertencente ao Centro de Investigação em Ciências da Saúde. Passadas 48h, o meio foi renovado e as células incubadas com os compostos em estudo durante 1h e 12h, a 37 °C numa atmosfera humidificada com 5% de CO<sub>2</sub> e 95% Ar. Após o tempo de incubação, o meio e os compostos foram aspirados e a placa lavada com PBS 1%.

Quanto ao ensaio de CLSM, começou por se fazer um varrimento do espectro de emissão, de forma a determinar o comprimento de onda onde a emissão destes compostos é máxima (neste caso 532 nm). As imagens foram adquiridas com uma ampliação de 40x.

### **3.6. Análise estatística**

Os resultados apresentados encontram-se expressos com média e desvio padrão, sendo a análise e a elaboração dos gráficos realizada através do software *GraphPad Prism 6*. Para a análise estatística dos resultados foi utilizado o teste Two-Way ANOVA seguido do teste de Turkey e o teste-t de Student com um intervalo de significância de 95%, considerando os grupos com diferenças estatisticamente significativas quando  $p < 0,05$  e os dados expressos em média  $\pm$  SD.

O teste Two-Way ANOVA seguido do teste de Turkey foi aplicado para comparar a proliferação celular entre os diferentes compostos e as diferentes concentrações.

O teste-t de Student foi utilizado para comparar os resultados do ensaio de MTT com o ensaio de doseamento de proteínas; utilizado para comparar o doseamento de proteínas entre os diferentes tempos de crescimento, no ensaio da curva de crescimento.

## **IV. Resultados e Discussão**

## 4.1. Preâmbulo

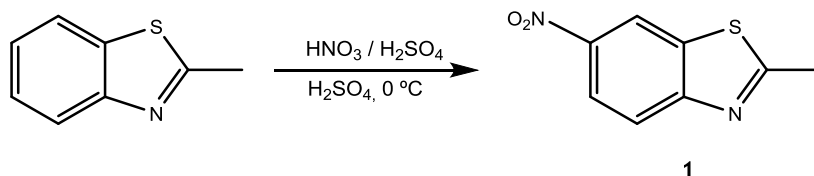
Este trabalho teve como objetivo a síntese de carbocianinas com diferentes grupos substituintes na posição 6 e a sua possível aplicação no cancro da mama. Pretende-se então proceder a estudos iniciais de toxicidade celular das carbocianinas em estudo, em linhas celulares do cancro da mama e fibroblastos da derme humana, bem como o estudo da sua localização intracelular nas células MCF-7. Assim, na primeira parte deste capítulo serão apresentados e discutidos os resultados da síntese das carbocianinas, bem como dos seus precursores. Assim, serão indicados para cada composto o  $\eta$ , p.f., caracterização espectroscópica por RMN  $^1\text{H}$ , RMN  $^{13}\text{C}$ , IV, e no caso das carbocianinas também por visível. Numa segunda parte deste capítulo serão apresentados e discutidos os resultados obtidos para os ensaios de proliferação e viabilidade celular, bem como os resultados obtidos no estudo da localização intracelular das carbocianinas nas células MCF-7.

## 4.2. Síntese das carbocianinas

### 4.2.1. Síntese dos precursores de sais de amónio quaternário

#### 4.2.1.1. Síntese do 2-metil-6-nitrobenzotiazole (1)

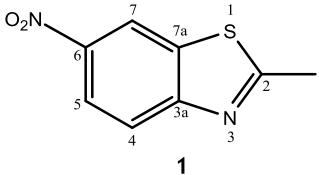
O composto 1 foi obtido através de uma reação de nitração, ao fazer reagir o 2-metilbenzotiazole (obtido comercialmente) com uma mistura de  $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$ , à temperatura ambiente (esquema 10). O composto foi obtido após recristalização com MetOH, obtendo-se um  $\eta$  de 90%, superior ao descrito na lit. (64% e 76%), possivelmente devido ao aproveitamento das águas mãe [14, 15]. Relativamente a p.f. (159-160 °C), embora este seja ligeiramente diferente do descrito na lit. (166-167 °C) [14, 15], permite-nos concluir que o composto 1 apresenta uma elevada pureza, devido ao seu estreito intervalo de fusão, tendo a pureza sido também comprovada por c.c.f. e RMN  $^1\text{H}$ .



Esquema 10 Síntese do 2-metil-6-nitrobenzotiazole

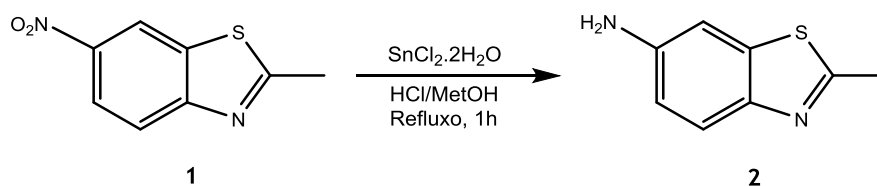
O composto **1** foi caracterizado por RMN  $^1\text{H}$ . No espectro observam-se dois dupletos que integram para um próton cada, ao  $\delta$  de 8,08 e 9,10 ppm; um duplo duplete que integra para um próton ao  $\delta$  de 8,30 ppm, sendo estes prótons correspondentes aos três prótons aromáticos. Observa-se ainda, um singuleto de três prótons ao  $\delta$  de 2,88 ppm, correspondente ao grupo metilo. O desaparecimento do sinal correspondente ao próton da posição 6 é também indicativo do sucesso da reação de substituição. Estes dados encontram-se concordantes com a lit. [14, 15]. Os dados físicos e espectroscópicos do 2-metil-6-nitrobenzotiazole (**1**) encontram-se resumidos na tabela 2.

Tabela 2 Dados físicos e espectroscópicos e  $\eta$  do composto **1**

Composto	 <p style="text-align: center;"><b>1</b></p>
$\eta$	90% [64%, 76%] <sup>[14, 15]</sup>
p.f. (°C) <sup>[lit.]</sup>	159-160 [166-167] <sup>[14]</sup>
Forma cristalina	Agulhas amarelas
RMN $^1\text{H}$ (400,13 MHz; DMSO- $d_6$ ; $\delta$ em ppm)	2,88 (3H, s, $\text{CH}_3$ ) 8,08 (1H, d, $J = 9,0$ Hz, 4- $\text{CH}$ ) 8,30 (1H, dd, $J = 8,9; 2,5$ Hz, 5- $\text{CH}$ ) 9,10 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, 7- $\text{CH}$ )

#### 4.2.1.2. Síntese do 6-amino-2-metilbenzotiazole (**2**)

O composto **2** foi sintetizado através da redução do grupo nitro do composto **1** na presença de um excesso de  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  em HCl concentrado à temperatura de 100 °C, de acordo com o método referido na lit. (esquema 11) [14, 16]. Ao composto **1**, previamente dissolvido em MetOH, foi adicionado gota a gota uma solução de  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  na presença de HCl concentrado, tendo-se obtido o 6-amino-2-metilbenzotiazole (**2**). Para esta reação obteve-se um bom  $\eta$  (82%), superior ao descrito na lit. (76%). Relativamente ao p.f. obtido (118-119 °C), este encontra-se próximo dos valores encontrados na lit. (120-123 °C), e o seu estreito intervalo de fusão permite-nos concluir que este se encontra com uma elevada pureza. Através de c.c.f. conseguiu-se também verificar a pureza do composto **2**.



**Esquema 11** Síntese do 6-amino-2-metilbenzotiazole

O composto **2** foi caracterizado por RMN  $^1\text{H}$ , o qual apresenta a totalidade de sinais esperados. Assim, surge um duplete ao  $\delta$  de 7,53 ppm, correspondente ao próton aromático 4; ao  $\delta$  de 7,01 ppm surge um singuleto correspondente ao próton aromático 7 e a 6,72 ppm um duplo duplete, correspondente ao próton aromático 5. Surgem ainda, ao  $\delta$  de 2,66 ppm, um sinal sob a forma de singuleto de três prótons, correspondente ao grupo metilo da posição 2. Por ultimo, ao  $\delta$  de 5,27 ppm surge o singuleto de dois prótons, sinal correspondente aos dois prótons do grupo amino, confirmado pela troca com  $\text{D}_2\text{O}$ . O  $\eta$ , dados físicos e espectroscópicos do 6-amino-2-metilbenzotiazole (**2**) encontram-se resumidos na tabela 3.

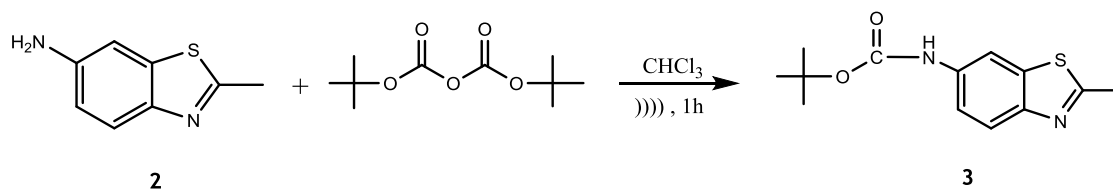
**Tabela 3** Dados físicos e espectroscópicos e  $\eta$  do composto **2**

Composto	<p style="text-align: center;"><b>2</b></p>
$\eta$	82% [76%] <sup>[16]</sup>
p.f. (°C) <sup>[lit.]</sup>	118-119 [120-123] <sup>[16]</sup>
Forma cristalina	Sólido amarelo
RMN $^1\text{H}$ (400,13 MHz; $\text{DMSO}-d_6$ ; $\delta$ em ppm)	2,66 (3H, s, $\text{CH}_3$ ) 5,27 (2H, s, $\text{NH}_2$ ) 6,72 (1H, dd, $J = 8,6$ Hz, 5- $\text{CH}$ ) 7,01 (1H, s, 7- $\text{CH}$ ) 7,53 (1H, d, $J = 8,7$ Hz, 4- $\text{CH}$ )

#### 4.2.1.3. Síntese do tert-butil-(2-metilbenzo[d]tiazol-6-il)carbamato (**3**)

A utilização do grupo amino como substituinte na posição 6 implica a sua proteção, antes da síntese dos sais de amônio quaternário, e a sua posterior desproteção. Tal deve-se à possível alquilação pelos agentes alquilantes utilizados, nos dois átomos de azoto, sendo por isso necessária a síntese do composto **3**. O composto **3** foi sintetizado através da adição de um grupo protetor, o BOC, sendo o procedimento adaptado de Amira e colaboradores [71]. A

mistura de composto **2**, BOC e clorofórmio foi sonicada durante uma hora (esquema 12). O crude foi depois lavado e recristalizado com éter dietílico, obtendo-se o produto pretendido. Quanto ao  $\eta$  obtido, este foi consideravelmente bom (67%) e, relativamente ao p.f., obteve-se um intervalo estreito de fusão (133-134 °C), característica que nos permite concluir que o composto se encontra puro.



**Esquema 12** Síntese do tert-butil-(2-metilben[d]zotiazol-6-il)carbamato

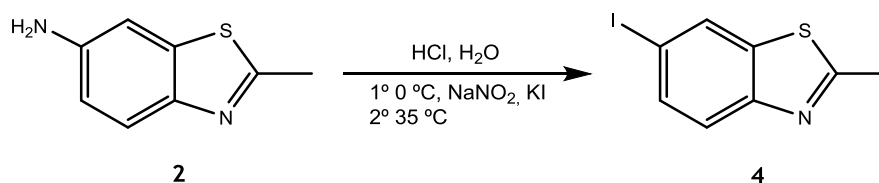
O composto **3** foi caracterizado por RMN <sup>1</sup>H, apresentando todos os sinais esperados. Assim, relativamente aos prótons aromáticos, o espetro apresenta um singuleto ao  $\delta$  de 8,18 ppm correspondente ao próton 7; um duplete ao  $\delta$  de 7,77 ppm correspondente ao próton 4 e um duplo duplete a 7,44 ppm correspondente ao próton 5. Os sinais correspondentes aos prótons dos grupos metilo encontram-se aos  $\delta$  de 1,49 ppm e 2,74 ppm, ambos singuletos, que integram para nove prótons (referentes aos grupos metilo do grupo protetor) e três prótons (referentes ao grupo metilo na posição 2), respetivamente. Ainda de referir que o singuleto correspondente ao próton do grupo amino se encontra a 9,57 ppm, desaparecendo com a troca com D<sub>2</sub>O. O  $\eta$ , dados físicos e espectroscópicos do tert-butil-2-metilbenzotiazol-6-ilcarbamato (**3**) encontram-se resumidos na tabela 4.

**Tabela 4** Dados físicos e espectroscópicos e  $\eta$  do composto **3**

Composto	<p><b>3</b></p>
$\eta$	67%
p.f. (°C)	133-134
Forma cristalina	Sólido verde cristalino
RMN <sup>1</sup> H (400,13 MHz; DMSO-d <sub>6</sub> ; $\delta$ em ppm)	1,49 (9H, s, CH <sub>3</sub> ) 2,74 (3H, s, CH <sub>3</sub> ) 7,44 (1H, dd, J= 8,8; 2,2 Hz, 5-CH) 7,77 (1H, d, J= 8,8 Hz, 4-CH) 8,18 (1H, s, 7-CH) 9,57 (1H, s, NH)

#### 4.2.1.4. Síntese do 6-iodo-2-metilbenzotiazole (4)

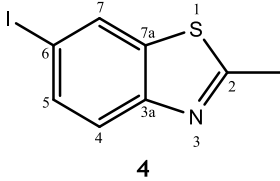
O composto 4 foi obtido por substituição do grupo amino do anel aromático do composto 2 pelo iodo, segundo o procedimento descrito na lit. [14]. O composto 4 foi obtido ao fazer-se reagir o composto 2 juntamente com excesso de  $\text{NaNO}_2$  e KI, na presença de HCl e água, inicialmente num banho de gelo e posteriormente aquecido a  $35^\circ\text{C}$  (esquema 13). Depois de devidamente tratado o crude com  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  e uma solução de  $\text{NaHSO}_3$  (5%), obteve-se o produto pretendido, sob a forma de um pó laranja claro. O  $\eta$  obtido (40%), mostrou-se consideravelmente inferior ao descrito na lit. (79%), possivelmente pelo facto de não ter sido feito um reaproveitamento das águas-mãe [14]. Relativamente ao p.f., obteve-se intervalo de fusão ( $120\text{-}122^\circ\text{C}$ ) muito diferente do descrito na lit. ( $140\text{-}141^\circ\text{C}$ ) [14]. No entanto, o estreito intervalo de fusão e os resultados obtidos pela c.c.f., permitem-nos concluir que o composto se encontra puro.



Esquema 13 Síntese do 6-iodo-2-metilbenzotiazole

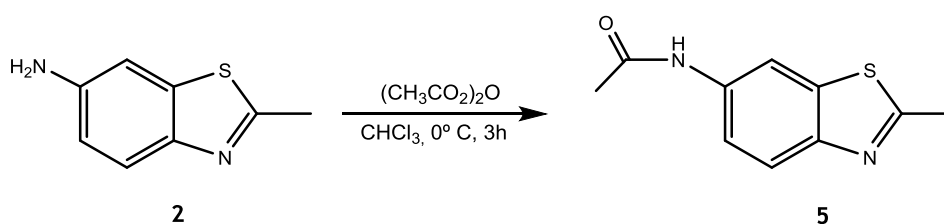
O composto 4 foi caracterizado por RMN  $^1\text{H}$ , apresentando um duplete ao  $\delta$  de 8,16 ppm o qual integra para um próton, sendo este correspondente ao próton aromático 7. Os prótons aromáticos 4 e 5 aparecem sob a forma de duplete e duplo duplete aos  $\delta$  de 7,68 ppm e 7,73 ppm, respetivamente. Por fim, os prótons referentes ao grupo metilo aparecem ao  $\delta$  de 2,82 ppm sob a forma de singuleto. A substituição dos grupos funcionais na posição 6 pode ser confirmada pelo desaparecimento dos sinais correspondentes ao grupo amino, anteriormente a 5,27 ppm. Os dados físicos e espectroscópicos do 6-iodo-2-metilbenzotiazole (4) encontram-se resumidos na tabela 5.

Tabela 5 Dados físicos e espectroscópicos e  $\eta$  do composto 4

Composto	 <p style="text-align: center;"><b>4</b></p>
$\eta$	40% [79%] <sup>[14]</sup>
p.f. (°C) <sup>[lit.]</sup> Forma cristalina	120-122 [140-141] <sup>[14]</sup> Sólido laranja claro
RMN <sup>1</sup> H (400, 13 MHz; CDCl <sub>3</sub> ; $\delta$ em ppm)	2,82 (3H, s, CH <sub>3</sub> ) 7,68 (1H, d, J= 8,6 Hz, 4-CH) 7,73 (1H, dd, J= 8,6; 1,7 Hz 5-CH) 8,16 (1H, d, J= 1,6 Hz, 7-CH)

#### 4.2.1.5. Síntese da *N*-(2-metilbenzotiazol-6-il)acetamida (5)

O composto 5 foi obtido por reação do composto 2, previamente dissolvido em clorofórmio seco, com anidrido acético seco, num banho de gelo, durante três horas (esquema 14). A mistura obtida foi depois lavada com uma solução aquosa de NaHCO<sub>3</sub> (5%), permitindo obter o produto desejado, com um  $\eta$  de 87%, um pouco superior ao encontrado na lit. (83%) [67]. Relativamente ao p.f. obtido para este composto (137-138 °C), embora seja diferente do apresentado na lit. (149-150 °C), o seu estreito intervalo de fusão permite-nos concluir que este se encontra puro [67]. Esta conclusão é também apoiada pelos resultados da c.c.f. obtidos.

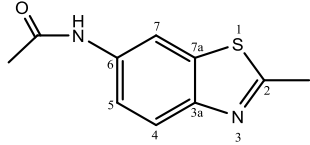


Esquema 14 Síntese da *N*-(2-metilbenzotiazol-6-il)acetamida

O composto 5 foi caracterizado por RMN <sup>1</sup>H, apresentando a totalidade de sinais esperados. Assim, o espectro apresenta dois singletos cuja integração é para três prótons: um ao  $\delta$  de 2,08 ppm correspondente ao grupo metilo do grupo amida e outro, a 2,75 ppm, referente ao grupo metilo da posição 2. Relativamente aos sinais dos prótons aromáticos, estes encontram-se aos  $\delta$  de 7,49 ppm (como duplo duplete e referente ao próton 5), 7,82 ppm (como duplete e referente ao próton 4) e 8,40 ppm (como duplete e referente ao próton 7), todos integrando

para um próton. Por último e a campos mais baixos aparece o sinal do próton ligado ao azoto do grupo acetamido, ao  $\delta$  de 10,15 ppm, sob a forma de singuleto e integrando para um próton. O  $\eta$ , dados físicos e espectroscópicos da *N*-(2-metilbenzotiazol-6-il)acetamida (5) encontram-se resumidos na tabela 6.

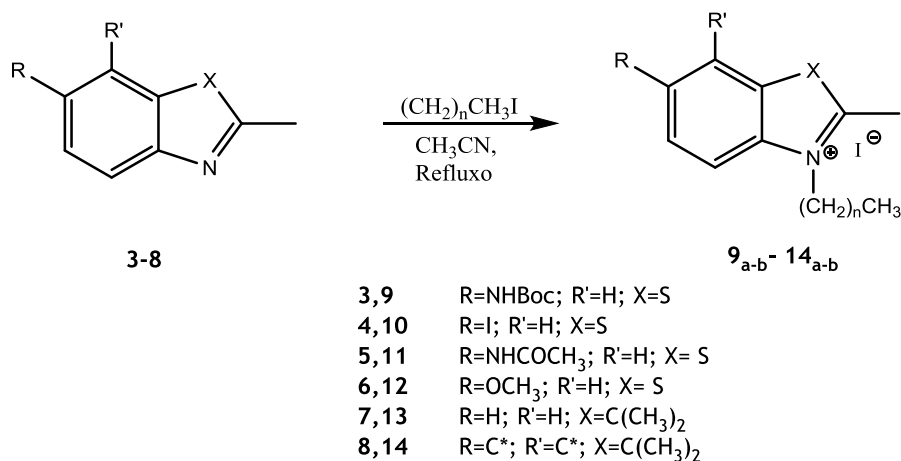
Tabela 6 Dados físicos e espectroscópicos e  $\eta$  do composto 5

Composto	 <p style="text-align: center;">5</p>
$\eta$	87% [83%] <sup>[67]</sup>
p.f. (°C) Forma cristalina	137-138 [149-150] <sup>[67]</sup> Sólido verde claro
RMN <sup>1</sup> H (400,13 MHz; DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ; $\delta$ em ppm)	2,08 (3H, s, NHCOCH <sub>3</sub> ) 2,75 (3H, s, 2-CH <sub>3</sub> ) 7,49 (1H, dd, <i>J</i> = 8,8; 2,1 Hz, 5-CH) 7,82 (1H, d, <i>J</i> = 8,8 Hz, 4-CH) 8,40 (1H, d, <i>J</i> = 2,1 Hz, 7-CH) 10,15 (1H, s, -NH)

#### 4.2.2. Síntese de sais de amónio quaternário

Os sais de amónio quaternário adquirem um papel essencial neste trabalho, uma vez que são os precursores na síntese das carbocianinas.

Os sais de amónio quaternário foram sintetizados ao fazer-se reagir uma base heterocíclica com um agente alquilante adequado. Quanto aos núcleos heterocíclicos utilizados neste estudo, foram: o 2,3,3-trimetil-3H-indole (7) e o 1,1,2-trimetil-1H-benzo[e]indole (8) e derivados do 2-metilbenzotiazole, variando apenas o grupo substituinte na posição 6. Os grupos utilizados foram: o grupo amino (protegido com o BOC) (3), iodo (4), acetamido (5) e metoxi (6), tendo este último sido obtido comercialmente (esquema 15). Quanto aos agentes alquilantes, foram utilizados o 1-iodopentano e 1-iodoundecano.



n= 4 (a), 10 (b)

**Esquema 15** Sais de amônio quaternário sintetizados

A síntese de sais de amônio quaternário é, geralmente, realizada por duas vias: na primeira recorre-se à fusão *in situ* da base heterocíclica com um reagente alquilante, utilizando-se ou não o produto resultante imediatamente no passo seguinte sem prévio isolamento. Na segunda via procede-se ao refluxo da base heterocíclica com o reagente alquilante na presença de um solvente polar, normalmente acetonitrilo. Embora este último processo permita a obtenção de produtos com maior grau de pureza, é um processo bastante mais demorado.

No caso da síntese dos compostos **9-14** (a e b) recorreu-se à segunda via, ao refluxo em acetonitrilo. As reações foram acompanhadas por c.c.f. usando como eluente uma mistura de MeOH e CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> a 10%. Este método apresentou  $\eta$  satisfatórios para a maioria dos sais quaternários sintetizados, tendo apenas os sais **10a** e **13b** apresentado  $\eta$  mais baixos (33% e 25%, respetivamente).

Relativamente à análise dos espectros RMN <sup>1</sup>H observam-se duas zonas características nestes compostos: uma zona referente à cadeia alquílica, situada a campos mais altos (0.8-5.0 ppm) e a campos mais baixos (7-9 ppm) a zona dos prótons aromáticos. Note-se que os sais de amônio quaternário sintetizados apresentam todos os sinais teoricamente esperados.

A utilização do grupo amino como substituinte na posição 6 implica a sua proteção, devido à possível alquilação dos dois átomos de azoto existentes no composto, como referido anteriormente. Após a proteção do grupo, procedeu-se à tentativa de síntese do sal de amônio quaternário respetivo. No entanto, verificou-se a formação de um óleo no caso do produto **9a** e, no caso do **9b** não ocorreu reação de alquilação. Assim, tentou-se recristalizar o composto **9a**, mas sem sucesso.

O sal **10a** foi obtido através do refluxo em acetonitrilo do 6-iodo-2-metilbenzotiazole (previamente sintetizado) com o 1-iodopentano. O estreito intervalo de fusão obtido para o composto **16a** (215-217 °C) permite-nos concluir que este apresenta uma elevada pureza, conclusão também apoiada pela c.c.f.. O composto foi obtido com um  $\eta$  razoável, no entanto dos mais baixos quando comparados com os restantes sais sintetizados.

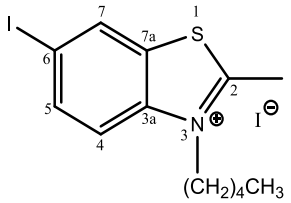
O composto **16a** foi caracterizado por RMN  $^1\text{H}$ , RMN  $^{13}\text{C}$  e IV. Quanto ao espectro de RMN  $^1\text{H}$ , este apresenta todos os sinais esperados, permitindo-nos confirmar a estrutura do produto pretendido. Este apresenta dois sinais referentes aos dois grupos metilo: a 0,88 ppm sob a forma de tripleto encontra-se o sinal correspondente ao grupo metilo da cadeia *N*-alquílica e a 3,20 ppm sob a forma de singuleto encontra-se o grupo metilo presente da posição 2. Os grupos metileno são encontrados entre os  $\delta$  de 1,26 ppm e 4,68 ppm, sendo este último o sinal correspondente ao grupo metileno ligado ao átomo de azoto. Os prótons aromáticos encontram-se a 8,14 ppm, 8,20 ppm e a 8,86 ppm, integrando todos para um próton.

Relativamente ao espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ , importa referir os sinais referentes aos grupos metilo, nomeadamente a  $\delta$  de 14,21 ppm e 17,38 ppm e ainda o sinal correspondente ao grupo metileno ligado ao azoto da cadeia *N*-alquílica presente ao  $\delta$  de 49,83 ppm. Por último, os sinais referentes ao anel aromático encontram-se entre 118,97 ppm e 138,22 ppm. Os sinais dos carbonos quaternários encontram-se entre 131,54 ppm e 177,79 ppm.

O espectro de IV do sal **10a** apresenta duas bandas de absorção a  $1453\text{ cm}^{-1}$  e  $1568\text{ cm}^{-1}$ , as quais se referem à deformação axial da ligação C=C aromática. Verifica-se ainda bandas de absorção a  $2864\text{ cm}^{-1}$ ,  $2951\text{ cm}^{-1}$  referentes à deformação axial das ligações C-H alifáticas da cadeia alquílica. Já a  $3054\text{ cm}^{-1}$  aparece a banda referente à vibração dos grupos C-H aromáticos.

Os dados espectroscópicos obtidos confirmam a síntese do composto pretendido e a sua caracterização encontra-se resumida na tabela 7.

Tabela 7 Dados físicos, espectroscópicos e  $\eta$  do composto 10a.

Composto	$\eta$	p.f. (°C) Forma cristalina	RMN $^1\text{H}$ (400,13 MHz; DMSO- $d_6$ ; $\delta$ em ppm)	RMN $^{13}\text{C}$ (100,61 MHz; DMSO- $d_6$ ; $\delta$ em ppm)	$\nu_{\text{máx}}$ ( $\text{cm}^{-1}$ ) KBr
 <p style="text-align: center;"><b>10a</b></p>	33%	215-217 Sólido castanho	0,88 (3H, t, $J=7,1$ Hz, $\text{N}(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$ ) 1,26-1,47 (4H, m, $\text{NCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$ ) 1,82 (2H, quint., $J=7,7$ Hz, $\text{NCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$ ) 3,20 (3H, s, 2- $\text{CH}_3$ ) 4,68 (2H, t, $J=7,7$ Hz, $\text{NCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$ ) 8,14 (1H, d, $J=8,9$ Hz, 4- $\text{CH}$ ) 8,20 (1H, dd, $J=8,8; 1,7$ Hz, 5- $\text{CH}$ ) 8,86 (1H, d, $J=1,6$ Hz, 7- $\text{CH}$ )	14,21 ( $\text{N}(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$ ) 17,38 (2- $\text{CH}_3$ ) 22,20 ( $\text{CH}_2$ ) 27,92 ( $\text{CH}_2$ ) 28,37 ( $\text{CH}_2$ ) 49,83 ( $\text{NCH}_2$ ) 118,97 ( $\text{CH}$ ) 131,54 (C) 133,06 ( $\text{CH}$ ) 138,22 ( $\text{CH}$ ) 140,93 (C) 169,44 (C) 177,79 (2-C)	3054 ( $\text{CH}_{\text{arom.}}$ ) 2951 ( $\text{CH}_{\text{alq.}}$ ) 2864 ( $\text{CH}_{\text{alq.}}$ ) 1568 ( $\text{C}=\text{C}_{\text{arom.}}$ ) 1453 ( $\text{C}=\text{C}_{\text{arom.}}$ )

Os sais **11a** e **11b** foram obtidos através do refluxo em acetonitrilo do composto **5** (previamente sintetizado) com o agente alquilante respectivo, como se mostra no esquema 15.

Relativamente aos p.f., mesmo não estando descritos na lit., podemos concluir que ambos os sais se encontram puros, visto o intervalo de fusão ser pequeno (224-225 °C para **11a** e 121-123 °C para **11b**). De referir que ambos os compostos foram obtidos com bons  $\eta$ , com o composto **11b** (67%) a apresentar um  $\eta$  ligeiramente superior ao composto **11a** (63%).

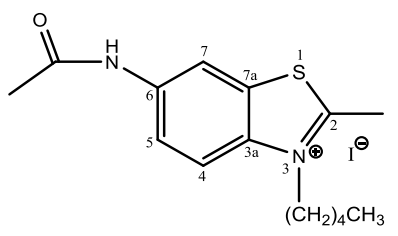
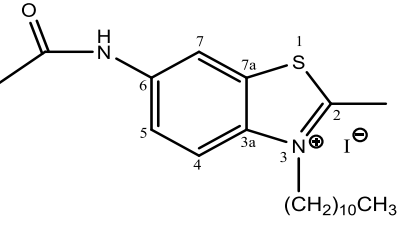
Os compostos **11a** e **11b** foram caracterizados por RMN  $^1\text{H}$ , RMN  $^{13}\text{C}$  e IV. No que diz respeito ao RMN  $^1\text{H}$  dos sais **11a** e **11b**, estes apresentam um tripleto a 0,86-0,88 ppm devido ao grupo metilo, pertencente à cadeia alquílica e entre 1,19 ppm e 4,64 ppm encontram-se os sinais correspondentes aos grupos metileno, sendo este último sinal (4,64 ppm) referente ao  $\text{NCH}_2$ , apresentando-se sob a forma de tripleto e integrando para dois protões. Os restantes sinais referentes aos dois grupos metilo encontram-se a 2,14 ppm e 3,16 ppm, ambos sob a forma de singletos e integrando para três protões, correspondentes ao metilo do grupo acetamido e ao metilo localizado na posição 2, respetivamente. A campos mais baixos, nomeadamente a 7,81, 8,25 e a 8,84 ppm encontram-se os sinais característicos dos protões aromáticos, sob a forma de duplo duplete e dois dupletos respetivamente, todos integrando para um protão. De referir ainda que ao  $\delta$  de 10,51 ppm se encontra o singuleto referente ao protão ligado ao azoto do grupo substituinte.

O RMN  $^{13}\text{C}$  vem reforçar a confirmação do produto pretendido, apresentando sinais característicos como o sinal a 49,68 ppm correspondente ao  $\text{NCH}_2$ , a 24,48-24,58 ppm correspondente ao metilo do grupo substituinte  $\text{NHOCH}_3$  e ainda os sinais característicos dos carbonos do anel aromático entre 113,30 ppm e 121,58 ppm, no caso do composto **11a** e entre 113,30 ppm e 121,43 ppm para o composto **11b**. Os carbonos quaternários encontram-se entre 130,45 ppm e 175,31 ppm e entre 130,54 ppm e 175,41 ppm, para **11a** e **11b**, respetivamente.

O espetro de IV destes sais apresenta uma banda de absorção a  $3462\text{ cm}^{-1}$  no caso do sal **11a** e a  $3497\text{ cm}^{-1}$  no caso do sal **11b**, ambos referentes à vibração das ligações ao N-H do grupo substituinte. As bandas localizadas a  $1458\text{ cm}^{-1}$  e  $1589\text{ cm}^{-1}$  referem-se às vibrações das ligações C=C aromáticas, em ambos os sais. Já a  $1677\text{ cm}^{-1}$  e a  $1672\text{ cm}^{-1}$  (para **11a** e **11b**, respetivamente) aparecem as bandas referentes ao carbonilo do grupo substituinte. Verifica-se ainda bandas de absorção a  $2865\text{ cm}^{-1}$ ,  $2932\text{ cm}^{-1}$  e  $2951\text{ cm}^{-1}$  para o sal **11a** e a  $2851\text{ cm}^{-1}$  e  $2919\text{ cm}^{-1}$  para o sal **11b**, sendo estas referentes à deformação axial associada às ligações C-H presentes na cadeia alquílica. Já a  $3038\text{ cm}^{-1}$  e  $3041\text{ cm}^{-1}$  aparece a banda referente à vibração dos grupos C-H do anel aromático, para o sal **11a** e **11b**, respetivamente.

Os dados espectroscópicos obtidos confirmam a síntese do composto pretendido e a sua caracterização encontra-se resumida na tabela 8.

Tabela 8 Dados físicos, espectroscópicos e  $\eta$  dos compostos 11a e 11b.

Composto	$\eta$	p.f. (°C) Forma cristalina	RMN $^1\text{H}$ (400,13 MHz; DMSO- $d_6$ ; $\delta$ em ppm)	RMN $^{13}\text{C}$ (100,61 MHz; DMSO- $d_6$ ; $\delta$ em ppm)	$\nu_{\text{máx}}$ ( $\text{cm}^{-1}$ ) KBr
 <p>11a</p>	63%	224-225 Sólido bege	0,88 (3H, t, $J = 7,0$ Hz, $\text{N}(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$ ) 1,27-1,47 (4H, m, $\text{NCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$ ) 1,84 (2H, quint., $J = 8,0; 7,6$ Hz, $\text{NCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$ ) 2,14 (3H, s, $\text{NHCOCH}_3$ ) 3,16 (3H, s, 2- $\text{CH}_3$ ) 4,64 (2H, t, $\text{NCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$ ) 7,81 (1H, dd, $J = 9,2; 2,1$ Hz, 5- $\text{CH}$ ) 8,25 (1H, d, $J = 9,2$ Hz, 4- $\text{CH}$ ) 8,84 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, 7- $\text{CH}$ ) 10,51 (1H, s, $\text{NHCOCH}_3$ )	14,20 ( $\text{N}(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$ ) 17,17 (2- $\text{CH}_3$ ) 22,17 ( $\text{CH}_2$ ) 24,48 ( $\text{NHCOCH}_3$ ) 27,99 ( $\text{CH}_2$ ) 28,39 ( $\text{CH}_2$ ) 49,68 ( $\text{NCH}_2$ ) 113,30 (7- $\text{CH}$ ) 117,56 (4- $\text{CH}$ ) 121,58 (5- $\text{CH}$ ) 130,45 (7a-C) 136,83 (3a-C) 139,38 (6-C) 169,76 ( $\text{NHCOCH}_3$ ) 175,31 (2-C)	3462 (NH) 3038 ( $\text{CH}_{\text{arom.}}$ ) 2951 ( $\text{CH}_{\text{alq.}}$ ) 2932 ( $\text{CH}_{\text{alq.}}$ ) 2865 ( $\text{CH}_{\text{alq.}}$ ) 1677 (C=O) 1589 (C=C $_{\text{arom.}}$ ) 1458 (C=C $_{\text{arom.}}$ )
 <p>11b</p>	67%	121-123 Pó cinzento	0,86 (3H, t, $J = 6,7$ Hz, $\text{N}(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_3$ ) 1,19-1,33 (14H, m, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$ ) 1,41 (2H, q, $J = 7,4$ Hz, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$ ) 1,82 (2H, quint., $J = 7,9$ Hz, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$ ) 2,14 (3H, s, $\text{NHCOCH}_3$ ) 3,16 (3H, s, 2- $\text{CH}_3$ ) 4,64 (2H, t, $J = 7,8$ Hz, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$ ) 7,81 (1H, dd, $J = 9,1; 2,0$ Hz, 5- $\text{CH}$ ) 8,25 (1H, d, $J = 9,2$ Hz, 4- $\text{CH}$ ) 8,84 (1H, s, 7- $\text{CH}$ ) 10,51 (1H, s, $\text{NHCOCH}_3$ )	14,43 ( $\text{N}(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_3$ ) 17,23 (2- $\text{CH}_3$ ) 22,56 ( $\text{CH}_2$ ) 24,58 ( $\text{NHCOCH}_3$ ) 26,34 ( $\text{CH}_2$ ) 28,31 ( $\text{CH}_2$ ) 29,04 ( $\text{CH}_2$ ) 29,15 ( $\text{CH}_2$ ) 29,31 ( $\text{CH}_2$ ) 29,39 ( $\text{CH}_2$ ) 29,43 ( $\text{CH}_2$ ) 31,74 ( $\text{CH}_2$ ) 49,68 ( $\text{NCH}_2$ ) 113,30 (7- $\text{CH}$ ) 117,59 (4- $\text{CH}$ ) 121,43 (5- $\text{CH}$ ) 130,54 (7a-C) 136,78 (3a-C) 139,50 (6-C) 169,48 ( $\text{NHCOCH}_3$ ) 175,41 (2-C)	3497 (NH) 3041 ( $\text{CH}_{\text{arom.}}$ ) 2919 ( $\text{CH}_{\text{alq.}}$ ) 2851 ( $\text{CH}_{\text{alq.}}$ ) 1672 (C=O) 1589 (C=C $_{\text{arom.}}$ ) 1458 (C=C $_{\text{arom.}}$ )

Os sais **12a** e **12b** foram obtidos através do refluxo em acetonitrilo do 6-metoxi-2-metilbenzotiazole com o agente alquilante respectivo, como se mostra no esquema 15.

Relativamente aos p.f., o estreito intervalo de fusão obtido em ambos os compostos (123-124 °C para **12a** e 87-88 °C para o **12b**) permite-nos concluir que estes apresentam uma elevada pureza. A pureza destes compostos foi também comprovada por c.c.f.. Os  $\eta$  obtidos foram satisfatórios, tendo o composto **12a** apresentado um  $\eta$  superior (74%) ao composto **12b** (44%).

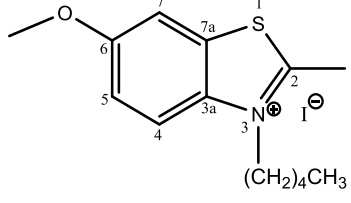
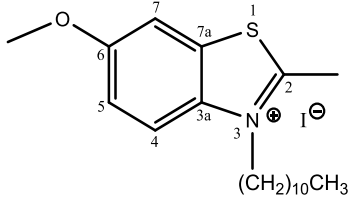
Os compostos **12a** e **12b** foram caracterizados por RMN  $^1\text{H}$ , RMN  $^{13}\text{C}$  e IV. Relativamente ao RMN  $^1\text{H}$  dos sais **12a** e **12b**, estes apresentam um tripleto a 0,88 e 0,85 ppm, devido ao grupo metilo pertencente à cadeia alquílica. Entre 1,19 ppm e 4,66-4,67 ppm encontram-se os grupos metileno, sendo este último sinal (4,66-4,67 ppm) referente ao  $\text{NCH}_2$ . Os restantes grupos metilo encontram-se a 3,16 ppm e 3,91 ppm (no caso do **12a**) e entre 3,15 ppm e 3,90 ppm (no caso do **12b**) correspondentes ao  $\text{CH}_3$  localizado na posição 2 e ao  $\text{OCH}_3$ , respetivamente. A campos mais baixos, nomeadamente a 7,46-7,47, 8,01 e 8,24 ppm encontram-se os sinais característicos dos prótons aromáticos, sob a forma de duplo duplete, singuleto e duplete, respetivamente, e todos integrando para um próton.

O RMN  $^{13}\text{C}$  vem igualmente confirmar a estrutura do produto pretendido, apresentando sinais característicos como o sinal a 49,74-49,78 ppm correspondente a  $\text{NCH}_2$ , a 56,69-56,70 ppm correspondente ao metilo do grupo substituinte  $\text{OCH}_3$ . Os sinais característicos do anel aromático encontram-se entre 107,17 ppm e 119,11 ppm para o composto **12a** e entre 107,11 ppm e 119,11 ppm para o composto **12b**. Os sinais correspondentes aos carbonos quaternários encontram-se entre os  $\delta$  de 131,28 ppm e 174,44 ppm e entre 131,27 ppm e 174,36 ppm, para **12a** e **12b**, respetivamente.

Quanto ao espectro de IV, este apresenta a 1047  $\text{cm}^{-1}$  e 1254  $\text{cm}^{-1}$  para **12a** e 1050  $\text{cm}^{-1}$  e 1264  $\text{cm}^{-1}$  para **12b**, as bandas de absorção relativas à vibração da ligação C-O do grupo substituinte. A banda de absorção referente às vibrações das ligações dos núcleos aromáticos (C=C) encontra-se a 1451  $\text{cm}^{-1}$  para **12a** e **12b**. Observa-se ainda a presença de bandas de absorção correspondentes às ligações da cadeia alquílica, nomeadamente a 2843, 2866 e 2894  $\text{cm}^{-1}$  para **12a** e a 2852  $\text{cm}^{-1}$  e 2922  $\text{cm}^{-1}$  para **12b**. Por último, de referir a presença da banda referente às ligações C-H do anel aromático a 3057  $\text{cm}^{-1}$  e 3043  $\text{cm}^{-1}$ , para **12a** e **12b**, respetivamente.

Os dados espectroscópicos obtidos confirmam a síntese do composto pretendido e a sua caracterização encontra-se resumida na tabela 9.

Tabela 9 Dados físicos, espectroscópicos e  $\eta$  dos compostos 12a e 12b.

Composto	$\eta$	p.f. (°C) Forma cristalina	RMN $^1\text{H}$ (400,13 MHz; DMSO- $d_6$ ; $\delta$ em ppm)	RMN $^{13}\text{C}$ (100,61 MHz; DMSO- $d_6$ ; $\delta$ em ppm)	$\nu_{\text{máx}}$ ( $\text{cm}^{-1}$ ) KBr
 <p><b>12a</b></p>	74%	123-124 Cristais verdes	0,88 (3H, t, $J=7,0$ Hz, $\text{N}(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$ ) 1,27-1,46 (4H, m, $\text{NCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$ ) 1,83 (2H, quint., $J=7,8$ Hz, $\text{NCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$ ) 3,16 (3H, s, 2- $\text{CH}_3$ ) 3,91 (3H, s, $\text{OCH}_3$ ) 4,67 (2H, t, $J=7,8$ Hz, $\text{NCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$ ) 7,47 (1H, dd, $J=9,3; 2,6$ Hz, 5- $\text{CH}$ ) 8,01 (1H, s, 7- $\text{CH}$ ) 8,24 (1H, d, $J=9,3$ Hz, 4- $\text{CH}$ )	14,23 ( $\text{N}(\text{CH}_2)_4\text{CCH}_3$ ) 17,22 (2- $\text{CH}_3$ ) 22,21 ( $\text{CH}_2$ ) 28,09 ( $\text{CH}_2$ ) 28,40 ( $\text{CH}_2$ ) 49,74 ( $\text{NCH}_2$ ) 56,70 ( $\text{OCH}_3$ ) 107,17 (4- $\text{CH}$ ) 118,22 (5- $\text{CH}$ ) 119,11 (7- $\text{CH}$ ) 131,28 (7a- $\text{C}$ ) 135,50 (3a- $\text{C}$ ) 159,40 (6- $\text{C}$ ) 174,44 (2- $\text{C}$ )	3057 ( $\text{CH}_{\text{arom.}}$ ) 2894 ( $\text{CH}_{\text{alq.}}$ ) 2866 ( $\text{CH}_{\text{alq.}}$ ) 2843 ( $\text{CH}_{\text{alq.}}$ ) 1451 ( $\text{C}=\text{C}_{\text{arom.}}$ ) 1254 (C-O) 1047 (C-O)
 <p><b>12b</b></p>	44%	87-88 Sólido amarelo claro	0,85 (3H, t, $J=6,7$ Hz, $\text{N}(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_3$ ) 1,19-1,35 (14H, m, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$ ) 1,41 (2H, quint., $J=10,4; 5,4$ Hz, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$ ) 1,82 (2H, t, $J=7,7$ Hz, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$ ) 3,15 (3H, s, 2- $\text{CH}_3$ ) 3,90 (3H, s, $\text{OCH}_3$ ) 4,66 (2H, t, $J=7,8$ Hz, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$ ) 7,46 (1H, dd, $J=9,3; 2,6$ Hz, 5- $\text{CH}$ ) 8,01 (1H, s, 7- $\text{CH}$ ) 8,24 (1H, d, $J=9,3$ Hz, 4- $\text{CH}$ )	14,40 ( $\text{N}(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_3$ ) 17,22 (2- $\text{CH}_3$ ) 22,54 ( $\text{CH}_2$ ) 26,28 ( $\text{CH}_2$ ) 28,36 ( $\text{CH}_2$ ) 29,02 ( $\text{CH}_2$ ) 29,12 ( $\text{CH}_2$ ) 29,27 ( $\text{CH}_2$ ) 29,36 ( $\text{CH}_2$ ) 29,40 ( $\text{CH}_2$ ) 31,72 ( $\text{CH}_2$ ) 49,78 ( $\text{NCH}_2$ ) 56,69 ( $\text{OCH}_3$ ) 107,11 (4- $\text{CH}$ ) 118,22 (5- $\text{CH}$ ) 119,11 (7- $\text{CH}$ ) 131,27 (7a- $\text{C}$ ) 135,48 (3a- $\text{C}$ ) 159,41 (6- $\text{C}$ ) 174,36 (2- $\text{C}$ )	3043 ( $\text{CH}_{\text{arom.}}$ ) 2922 ( $\text{CH}_{\text{alq.}}$ ) 2852 ( $\text{CH}_{\text{alq.}}$ ) 1451 ( $\text{C}=\text{C}_{\text{arom.}}$ ) 1264 (C-O) 1050 (C-O)

Os sais **13a** e **13b** foram obtidos através do refluxo em acetonitrilo do 2,3,3-trimetil-indole com o agente alquilante respetivo, como se mostra no esquema 15.

Quanto ao p.f. obtido para o composto **13a**, embora seja ligeiramente diferente ao descrito na lit. (138-139 °C), o seu estreito intervalo de fusão (132-133 °C) sugere uma elevada pureza. Importa referir que os resultados espectroscópicos obtidos para o composto **13a** são concordantes com a lit. [68].

O  $\eta$  obtido para o sal **13a** (62%) foi relativamente bom, apresentando-se superior ao descrito na lit. (50%) [68]. No entanto, o  $\eta$  obtido para o composto **13b** foi menor (25%) e o mais baixo quando comparado com os restantes sais de amónio quaternário sintetizados.

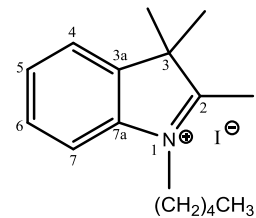
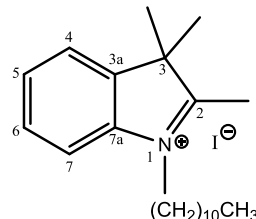
Relativamente ao espectro de RMN  $^1\text{H}$ , observam-se todos os sinais previstos para a estrutura proposta. De salientar os sinais correspondentes aos grupos metilo: sob a forma de tripleto, a 0,85-0,89 ppm o sinal correspondente ao grupo metilo da cadeia *N*-alquílica, a 1,55 ppm encontra-se o sinal correspondente aos grupos metilo característicos do anel heterocíclico da indolenina, sob a forma de um singuleto de seis protões e, por último, a 2,85 ppm encontra-se um singuleto devido ao grupo metilo da posição 2. Os sinais referentes aos grupos metileno da cadeia *N*-alquílica encontram-se entre 1,29-4,45 ppm para o sal **13a** e entre 1,15-4,46 ppm para o sal **13b**, sendo este último o sinal correspondente ao grupo metileno ligado ao átomo de azoto  $\text{NCH}_2$ , o qual se apresenta sob a forma de um tripleto. Para o sal **13a**, os sinais correspondentes aos protões aromáticos encontram-se sob a forma de multipletos: a 7,58-7,69 ppm (integrando para dois protões), 7,83-7,88 ppm e a 7,95-8,01 ppm, os quais integram para um protão cada. Para o sal **13b**, os sinais correspondentes aos protões aromáticos encontram-se sob a forma de multipletos: a 7,59-7,63 ppm (integrando para dois protões), 7,82-7,89 ppm e a 7,96-8,03 ppm os quais integram para um protão cada (para o sal **13b**).

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  vem igualmente confirmar a estrutura do produto pretendido, apresentando todos os sinais esperados. Importa salientar os sinais correspondentes ao carbono do grupo metileno ligado ao azoto da cadeia *N*-alquílica ( $\text{NCH}_2$ ), a 48,09 ppm e 48,13 ppm para o sal **13a** e **13b**, respetivamente; o sinal correspondente aos grupos metilo da indolenina, a 22,52 ppm e os sinais dos carbonos referentes ao anel aromático entre 115,97 ppm e 129,89 ppm e os sinais correspondentes aos carbonos quaternários encontram-se entre 54,64 ppm e 196,85 ppm, para ambos os compostos.

O espectro de IV apresenta duas bandas de absorção relativas às ligações C=C aromáticas a  $1453\text{ cm}^{-1}$  e a  $1625\text{ cm}^{-1}$  para **13a** e a  $1463\text{ cm}^{-1}$  e  $1625\text{ cm}^{-1}$  para **14b**. As bandas de absorção relativas à vibração das ligações C-H da cadeia *N*-alquílica surgem a 2866, 2953,  $2969\text{ cm}^{-1}$  para **13a** e a 2852 e  $2921\text{ cm}^{-1}$  para **13b**. Surgem por fim as bandas de absorção referentes às ligações C-H aromáticas a  $3031\text{ cm}^{-1}$  e a  $3025\text{ cm}^{-1}$ , para **13a** e **13b**, respetivamente.

Os dados espectroscópicos obtidos confirmam a presença do produto desejado e a sua descrição encontra-se resumida na tabela 10.

Tabela 10 Dados físicos, espectroscópicos e  $\eta$  dos compostos 13a e 13b.

Composto	$\eta$	p.f. (°C) [lit.] Forma cristalina	RMN $^1\text{H}$ (400,13 MHz; DMSO- $d_6$ ; $\delta$ em ppm)	RMN $^{13}\text{C}$ (100,61 MHz; DMSO- $d_6$ ; $\delta$ em ppm)	$\nu_{\text{máx}}$ ( $\text{cm}^{-1}$ ) KBr
 <p><b>13a</b></p>	62% [50%] <sup>[68]</sup>	132-133 [138-139] <sup>[68]</sup> Cristais beges	0,89 (3H, t, $J=7,0$ Hz, $\text{N}(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$ ) 1,29-1,47 (4H, m, $\text{NCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$ ) 1,55 (6H, s, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ) 1,84 (2H, quint., $J=7,8$ Hz, $\text{NCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$ ) 2,85 (3H, s, 2- $\text{CH}_3$ ) 4,45 (2H, t, $J=7,8$ Hz, $\text{NCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$ ) 7,58-7,69 (2H, m, 5,6- $\text{CH}$ ) 7,83-7,88 (1H, m, 7- $\text{CH}$ ) 7,95-8,01 (1H, m, 4- $\text{CH}$ )	14,24 ( $\text{N}(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$ ) 14,60 (2- $\text{CH}_3$ ) 22,25 ( $\text{CH}_2$ ) 22,52 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ) 27,44 ( $\text{CH}_2$ ) 28,49 ( $\text{CH}_2$ ) 48,09 ( $\text{NCH}_2$ ) 54,64 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ) 115,97 (4- $\text{CH}$ ) 124,01 (7- $\text{CH}$ ) 129,42 (5- $\text{CH}$ ) 129,89 (6- $\text{CH}$ ) 141,52 (7a- $\text{C}$ ) 142,34 (3a- $\text{C}$ ) 196,85 (2- $\text{C}$ )	3031 ( $\text{CH}_{\text{arom.}}$ ) 2969 ( $\text{CH}_{\text{alq.}}$ ) 2953 ( $\text{CH}_{\text{alq.}}$ ) 2866 ( $\text{CH}_{\text{alq.}}$ ) 1625 ( $\text{C}=\text{C}_{\text{arom.}}$ ) 1453 ( $\text{C}=\text{C}_{\text{arom.}}$ )
 <p><b>13b</b></p>	25%	Óleo vermelho	0,85 (3H, t, $J=6,6$ Hz, $\text{N}(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_3$ ) 1,15-1,48 (16H, m, $\text{NCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_8\text{CH}_3$ ) 1,55 (6H, s, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ) 1,84 (2H, quint., $J=7,8$ Hz, $\text{NCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$ ) 2,85 (3H, s, $\text{CH}_3$ ) 4,46 (2H, t, $J=7,7$ Hz, $\text{NCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$ ) 7,59-7,63 (2H, m, 5, 6- $\text{CH}$ ) 7,82-7,89 (1H, m, 7- $\text{CH}$ ) 7,96-8,03 (1H, m, 4- $\text{CH}$ )	14,43 ( $\text{N}(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_3$ ) 14,61 (2- $\text{CH}_3$ ) 22,52 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ) 22,56 ( $\text{CH}_2$ ) 26,36 ( $\text{CH}_2$ ) 27,73 ( $\text{CH}_2$ ) 29,07 ( $\text{CH}_2$ ) 29,16 ( $\text{CH}_2$ ) 29,26 ( $\text{CH}_2$ ) 29,38 ( $\text{CH}_2$ ) 29,42 ( $\text{CH}_2$ ) 31,74 ( $\text{CH}_2$ ) 48,13 ( $\text{NCH}_2$ ) 54,64 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ) 115,97 (4- $\text{CH}$ ) 124,01 (7- $\text{CH}$ ) 129,42 (5- $\text{CH}$ ) 129,89 (6- $\text{CH}$ ) 141,52 (7a- $\text{C}$ ) 142,34 (3a- $\text{C}$ ) 196,85 (2- $\text{C}$ )	3025 ( $\text{CH}_{\text{arom.}}$ ) 2852 ( $\text{CH}_{\text{alq.}}$ ) 2921 ( $\text{CH}_{\text{alq.}}$ ) 1625 ( $\text{C}=\text{C}_{\text{arom.}}$ ) 1463 ( $\text{C}=\text{C}_{\text{arom.}}$ )

Os sais **14a** e **14b** foram obtidos através do refluxo em acetonitrilo do 1,1,2-trimetilbenz[e]indole com o agente alquilante respectivo, como se mostra no esquema 15.

Relativamente aos p.f., obtidos para os compostos **14a** (153-154 °C) e **14b** (132-133 °C), a existência de intervalo de fusão estreito sugere uma elevada pureza, tendo esta sido também confirmada por c.c.f.. Obtiveram-se bons  $\eta$  para ambos os compostos, nomeadamente 70% e 65%, para **14a** e **14b**, respetivamente.

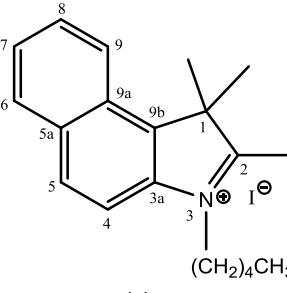
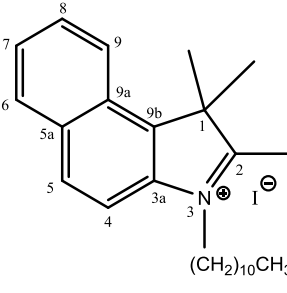
No que diz respeito ao RMN  $^1\text{H}$  dos sais **14a** e **14b**, estes apresentam um tripleto a 0,84-0,90 ppm devido ao grupo metilo pertencente à cadeia alquílica e entre 1,14 ppm e 4,58 ppm encontram-se os sinais correspondentes aos grupos metileno da cadeia *N*-alquílica, sendo este último sinal (4,58 ppm) referente ao  $\text{NCH}_2$ , apresentando-se sob a forma de tripleto e integrando para dois protões. Os restantes grupos metilo encontram-se a 2,95 ppm, sob a forma de singuleto de seis protões, correspondentes aos grupos metilo ligados ao carbono da posição 1. A campos mais baixos, encontram-se os sinais correspondentes aos dois anéis aromáticos, nomeadamente: a 7,74-7,75 e 7,80 ppm, ambos tripletos de um protão cada; a 8,16, 8,23, 8,30 e 8,38 ppm, todos dupletos e cada um integrando para um protão.

O RMN  $^{13}\text{C}$  vem reforçar a confirmação do produto pretendido. Importa referir o sinal referente ao grupo metileno ligado ao azoto da cadeia *N*-alquílica presente a 48,35 ppm e a 48,66 ppm, para **14a** e **14b**, respetivamente; o sinal referente aos grupos metilo da indolenina que, para o sal **14a**, se encontra ao  $\delta$  de 22,12 ppm e para o sal **14b** ao  $\delta$  de 22,17 ppm. Por último, os sinais referentes aos dois anéis aromáticos encontram-se entre 113,80 ppm e 131,17 ppm para o sal **14a** e entre 113,91 ppm e 131,17 ppm para o sal **14b**. Os sinais correspondentes aos carbonos quaternários encontram-se entre 55,97-196,71 ppm e entre 55,97-196,62 ppm, para o sal **14a** e **14b** respetivamente.

O espectro de IV destes sais apresenta duas bandas de absorção a  $1455\text{ cm}^{-1}$  e  $1580\text{ cm}^{-1}$  no caso do sal **14a** e a  $1467\text{ cm}^{-1}$  e  $1581\text{ cm}^{-1}$  no caso do sal **11b**, ambas referentes às vibrações das ligações C=C aromáticas. Já a  $2866\text{ cm}^{-1}$ ,  $2928\text{ cm}^{-1}$  e  $2950\text{ cm}^{-1}$  para o sal **14a** e a  $2853\text{ cm}^{-1}$ ,  $2923\text{ cm}^{-1}$  e  $2955\text{ cm}^{-1}$  para o sal **14b**, encontram-se as bandas referentes à deformação axial das ligações C-H presentes na cadeia alquílica. Verifica-se ainda a  $3056\text{ cm}^{-1}$  e  $3055\text{ cm}^{-1}$  a presença das bandas referentes aos C-H do anel aromático, para o sal **14a** e **14b**, respetivamente.

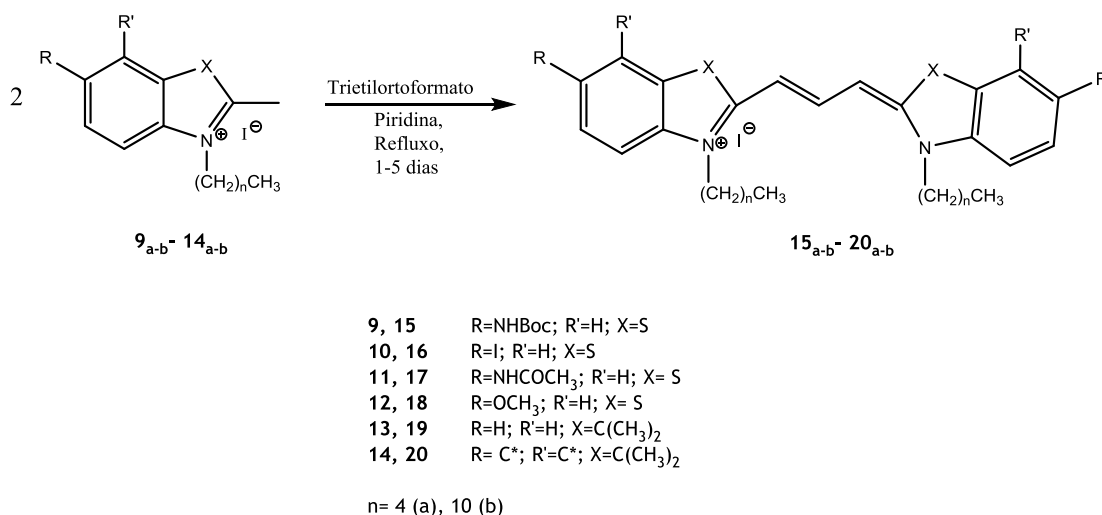
Os dados espectroscópicos obtidos confirmam a síntese do composto pretendido e a sua caracterização encontra-se resumida na tabela 11.

Tabela 11 Dados físicos, espectroscópicos e  $\eta$  dos compostos 14a e 14b.

Composto	$\eta$	p.f. (°C) [lit.] Forma cristalina	RMN <sup>1</sup> H (400,13 MHz; DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ; $\delta$ em ppm)	RMN <sup>13</sup> C (100,61 MHz; DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ; $\delta$ em ppm)	$\nu_{\text{máx}}$ (cm <sup>-1</sup> ) KBr
 <p><b>14a</b></p>	70%	153-154 Cristais pretos	<p>0,90 (3H, t, <i>J</i> = 7,1 Hz, N(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>3</sub>)            1,30-1,50 (4H, m, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)            1,77 (6H, s, C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)            1,90 (2H, quint., <i>J</i> = 8,1; 7,5 Hz, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)            2,95 (3H, s, CH<sub>3</sub>)            4,58 (2H, t, <i>J</i> = 7,7 Hz, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)            7,74 (2H, t, <i>J</i> = 7,6 Hz, 8-CH)            7,80 (1H, t, <i>J</i> = 7,8 Hz, 7-CH)            8,16 (1H, d, <i>J</i> = 8,9 Hz, 9-CH)            8,23 (1H, d, <i>J</i> = 7,7 Hz, 5-CH)            8,30 (1H, d, <i>J</i> = 8,9 Hz, 4-CH)            8,38 (1H, d, <i>J</i> = 8,3 Hz, 6-CH)</p>	<p>14,24 (N(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>3</sub>)            14,44 (2-CH<sub>3</sub>)            22,12 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)            22,29 (CH<sub>2</sub>)            27,65 (CH<sub>2</sub>)            28,48 (CH<sub>2</sub>)            48,35 (NCH<sub>2</sub>)            55,97 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)            113,80 (9-CH)            123,89 (6-CH)            127,69 (5a-C)            127,75 (8-CH)            128,91 (7-CH)            130,18 (5-CH)            131,17 (4-CH)            133,49 (9a-C)            137,44 (9b-C)            138,94 (3a-C)            196,71 (2-C)</p>	<p>3056 (CH<sub>arom.</sub>)            2950 (CH<sub>alq.</sub>)            2928 (CH<sub>alq.</sub>)            2866 (CH<sub>alq.</sub>)            1580 (C=C<sub>arom.</sub>)            1455 (C=C<sub>arom.</sub>)</p>
 <p><b>14b</b></p>	65%	132-133 Cristais pretos	<p>0,84 (3H, t, <i>J</i> = 7,0; 6,5 Hz, N(CH<sub>2</sub>)<sub>10</sub>CH<sub>3</sub>)            1,14-1,38 (14H, m, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>CH<sub>3</sub>)            1,45 (2H, quint., <i>J</i> = 7,2 Hz, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>CH<sub>3</sub>)            1,77 (6H, s, C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)            1,89 (2H, quint., <i>J</i> = 7,8 Hz, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)            2,95 (3H, s, CH<sub>3</sub>)            4,58 (2H, t, <i>J</i> = 7,7 Hz, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)            7,75 (1H, t, <i>J</i> = 7,7 Hz, 8-CH)            7,80 (1H, t, <i>J</i> = 7,8 Hz, 7-CH)            8,16 (1H, d, <i>J</i> = 8,9 Hz, 9-CH)            8,23 (1H, d, <i>J</i> = 8,0 Hz, 5-CH)            8,30 (1H, d, <i>J</i> = 8,9 Hz, 4-CH)            8,38 (1H, d, <i>J</i> = 8,4 Hz, 6-CH)</p>	<p>14,36 (N(CH<sub>2</sub>)<sub>10</sub>CH<sub>3</sub>)            15,09 (2-CH<sub>3</sub>)            22,17 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)            22,53 (CH<sub>2</sub>)            26,38 (CH<sub>2</sub>)            28,02 (CH<sub>2</sub>)            29,14 (2xCH<sub>2</sub>)            29,28 (CH<sub>2</sub>)            29,40 (CH<sub>2</sub>)            29,42 (CH<sub>2</sub>)            31,71 (CH<sub>2</sub>)            48,66 (NCH<sub>2</sub>)            55,97 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)            113,91 (9-CH)            123,88 (6-CH)            127,65 (8-CH)            127,67 (5a-C)            128,86 (7-CH)            130,13 (5-CH)            131,17 (4-CH)            133,49 (9a-C)            137,36 (9b-C)            138,91 (3a-C)            196,62 (2-C)</p>	<p>3055 (CH<sub>arom.</sub>)            2955 (CH<sub>alq.</sub>)            2923 (CH<sub>alq.</sub>)            2853 (CH<sub>alq.</sub>)            1581 (C=C<sub>arom.</sub>)            1467 (C=C<sub>arom.</sub>)</p>

### 4.2.3. Síntese de Carbocianinas

O método escolhido para a síntese das cianinas foi o método do ortoéster. Este método é o mais adequado à síntese de carbocianinas simétricas, para além de apresentar bons  $\eta$  e permitir obter uma elevada pureza dos produtos. Neste método faz-se reagir dois equivalentes do sal de amónio quaternário com trietilortoformato num refluxo de piridina, durante 1-5 dias (esquema 16). O processo geral encontra-se descrito anteriormente no ponto 3.3.3.



Esquema 16 Procedimento geral da síntese de carbocianinas

#### 4.2.3.1. Síntese de tiocarbocianinas

Para a síntese deste grupo de cianinas recorreu-se aos sais de amónio quaternário obtidos a partir da base heterocíclica 2-metilbenzotiazole substituída na posição 6 com diferentes grupos, nomeadamente com o grupo amino, iodo, acetamido e metoxi.

A síntese das aminocarbocianinas (**15a** e **15b**) pelo método tradicional, descrito anteriormente, não foi bem-sucedida. A formação de um óleo na síntese do sal de amónio quaternário **9a** e o insucesso na tentativa de recristalização, implicou que se procedesse à síntese da carbocianina, sem prévio isolamento do seu sal precursor. Assim, após se verificar a formação de alguma quantidade do sal **9a**, confirmada por c.c.f., procedeu-se à evaporação do acetonitrilo, à qual se seguiu a adição de piridina e trietilortoformato. No entanto, também esta abordagem se mostrou ineficiente. Assim, o insucesso do método anterior levou à procura de uma nova via de síntese de aminocarbocianinas.

O composto **16a** foi obtido ao se fazer-se reagir dois equivalentes do sal **10a** na presença de piridina e trietilortoformato (esquema 16). A análise dos espetros de RMN <sup>1</sup>H e RMN <sup>13</sup>C vem comprovar a estrutura do produto pretendido.

Quanto ao p.f., o estreito intervalo de fusão obtido para o composto **16a** (245-247 °C) permite-nos concluir que este apresenta elevada pureza, sendo esta também comprovada por c.c.f.. O  $\eta$  obtido foi razoável (35%).

Na análise do espectro no VIS em MetOH, verificou-se a presença de uma banda típica das cianinas, bem definida a 570 nm.

Quanto ao espectro de RMN  $^1\text{H}$ , verifica-se a presença dos sinais referentes à cadeia *N*-alquílica, nomeadamente: a 0,87 ppm encontra-se um tripleto de seis protões devido ao grupo metilo da cadeia *N*-alquílica; entre os  $\delta$  de 1,25 ppm e 4,30 ppm encontram-se os sinais referentes aos grupos metileno, sendo este último (4,30 ppm) correspondente ao grupo metileno ligado ao átomo de azoto. A 6,60 ppm podemos encontrar um duplete de dois protões, sinal relativo aos protões  $\alpha$  e  $\alpha'$  e a 7,78 ppm encontra-se um tripleto relativo ao protão  $\beta$ . Os sinais correspondentes aos protões aromáticos encontram-se a 7,57 ppm (duplete), 7,87 ppm (duplo duplete) e 8,40 ppm (duplete), os quais integram para dois protões cada um.

Na análise do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  verifica-se a existência de todos os sinais esperados para a estrutura do produto pretendido. O sinal relativo ao grupo metilo encontra-se a 14,33 ppm, enquanto que os sinais representativos dos grupos metileno podem ser encontrados entre os  $\delta$  de 22,41 ppm e 46,77 ppm, sendo este último sinal referente ao grupo metileno ligado ao átomo de azoto.

O espectro de IV da carbocianina **16a** apresenta uma banda de absorção a  $1579\text{ cm}^{-1}$  representativa da deformação axial da ligação C=C aromática e a  $1630\text{ cm}^{-1}$ , uma banda de absorção referente à deformação axial associada à ligação C=C da cadeia metínica. Verifica-se ainda bandas a  $2857\text{ cm}^{-1}$ ,  $2926\text{ cm}^{-1}$  e  $2952\text{ cm}^{-1}$  referentes à deformação axial das ligações C-H presentes na cadeia alquílica. A  $3055\text{ cm}^{-1}$  localiza-se a banda referente à vibração das ligações C-H do anel aromático.

Os dados espectroscópicos obtidos confirmam a síntese do composto pretendido e a sua caracterização encontra-se resumida na tabela 12.

Tabela 12 Dados físicos, espectroscópicos e  $\eta$  do composto 16a.

Composto	$\eta$	p.f. (°C) Forma cristalina	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	RMN $^1\text{H}$ (400,13 MHz; DMSO- $d_6$ ; $\delta$ em ppm)	RMN $^{13}\text{C}$ (100,61 MHz; DMSO- $d_6$ ; $\delta$ em ppm)	$\nu_{\text{máx}}$ ( $\text{cm}^{-1}$ ) KBr
<p style="text-align: center;"><b>16a</b></p>	35%	245-247	570	0,87 (6H, t, $J = 6,7$ Hz, $\text{N}(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$ ) 1,25-1,45 (8H, m, $\text{NCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$ ) 1,72 (4H, t, $J = 7,4$ Hz, $\text{NCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$ ) 4,30 (4H, t, $J = 7,5$ Hz, $\text{NCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$ ) 6,60 (2H, d, $J = 12,8$ Hz, $\alpha$ , $\alpha'$ -CH) 7,57 (2H, d, $J = 8,7$ Hz, 4, 4'-CH) 7,78 (1H, t, $J = 12,7$ Hz, $\beta$ -CH) 7,87 (2H, dd, $J = 8,6; 1,8$ Hz, 5, 5'-CH) 8,40 (2H, d, $J = 1,8$ Hz, 7, 7'-CH)	14,33 ( $\text{N}(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$ ) 22,41 ( $\text{CH}_2$ ) 27,52 ( $\text{CH}_2$ ) 28,54 ( $\text{CH}_2$ ) 46,77 ( $\text{NCH}_2$ ) 89,72 ( $\text{CH}$ ) 99,64 ( $\text{CH}$ ) 115,84 ( $\text{CH}$ ) 127,81 ( $\text{C}$ ) 128,55 ( $\text{C}$ ) 131,41 ( $\text{CH}$ ) 136,91 ( $\text{CH}$ ) 141,51 ( $\text{C}$ ) 164,74 ( $\text{C}$ )	3055 ( $\text{CH}_{\text{arom.}}$ ) 2952 ( $\text{CH}_{\text{alq.}}$ ) 2926 ( $\text{CH}_{\text{alq.}}$ ) 2857 ( $\text{CH}_{\text{alq.}}$ ) 1630 ( $\text{C}=\text{C}_{\text{arom.}}$ ) 1579 ( $\text{C}=\text{C}$ )

As carbocianinas **17a** e **17b** foram obtidas ao fazer-se reagir dois equivalentes dos respetivos sais (**11a** e **11b**) na presença de piridina e trietilortoformato (esquema 16).

Relativamente aos p.f., mesmo não estando descritos na lit., podemos concluir que ambas as carbocianinas se encontram puras, devido ao estreito intervalo de fusão (287-288 °C e 203-205 °C para **17a** e **17b** respetivamente). A síntese das carbocianinas **17a** e **17b** apresenta bons  $\eta$ , na ordem dos 40%, apresentando-se como os melhores  $\eta$ , quando comparados com os obtidos para as restantes carbocianinas.

Na análise dos espectros no VIS em MetOH, verificaram-se a presença de bandas típicas das cianinas, bem definidas a 578 nm para ambos os compostos. Estas duas cianinas apresentam o mesmo valor de  $\lambda_{\text{máx}}$ , visto apresentarem uma estrutura semelhante, já que o que varia é apenas o comprimento da cadeia *N*-alquílica, factor que não interfere no valor de  $\lambda_{\text{máx}}$ .

Relativamente à análise dos espetros de RMN  $^1\text{H}$  de **17a** e **17b**, verifica-se a campos mais altos a presença dos sinais relativos à cadeia alquílica nomeadamente entre 0,83-0,86 ppm onde se localiza um tripleto a integrar para seis protões devido aos grupos metilo da cadeia *N*-alquílica e entre 1,22-4,25 ppm os sinais relativos aos grupos metileno da cadeia *N*-alquílica. De referir que o sinal localizado a 4,22-4,25 ppm, o qual integra para quatro protões, corresponde ao grupo metileno ligado ao átomo de azoto. Já a campos mais baixos encontram-se os sinais relativos aos protões aromáticos: no caso da carbocianina **17a**, entre 7,47 ppm e 7,68 ppm encontra-se um multipletto correspondente a quatro protões aromáticos e ao protão  $\beta$ , e a 8,25 ppm encontra-se um singuleto de dois protões; quanto ao **17b** o multipletto está localizado entre 7,32 ppm e 7,84 ppm onde se encontra também o protão  $\beta$  e a 8,32 ppm um singuleto integrante para dois protões. Ainda a campos mais baixos, nomeadamente a 10,25 ppm o singuleto correspondente ao  $\text{NH}$  do grupo substituinte acetamido. Importa referir ainda que a 6,46 ppm e a 6,51 ppm se encontram os protões  $\alpha$  e  $\alpha'$  para **17a** e **17b** respetivamente.

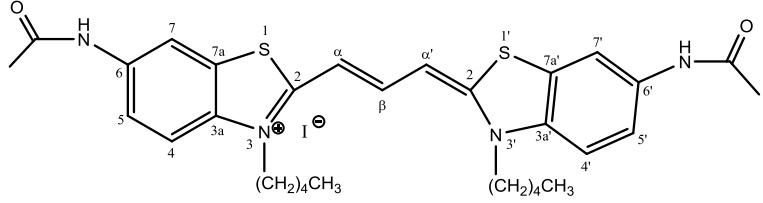
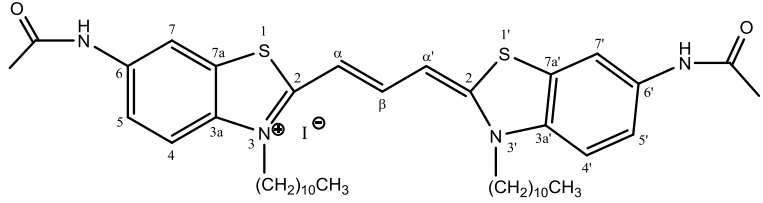
O RMN  $^{13}\text{C}$  vem igualmente confirmar a estrutura do produto pretendido, apresentando todos os sinais esperados. A 14,20-14,21 ppm encontram-se os sinais correspondentes ao grupo metilo da cadeia *N*-alquílica e a 24,16-24,24 ppm encontram-se os sinais correspondentes ao grupo metilo do grupo substituinte  $\text{NHCOCH}_3$ . A 46,62-46,63 ppm podemos encontrar o sinal correspondente a  $\text{NCH}_2$ . De referir a presença dos sinais correspondentes aos carbonos  $\alpha$  e  $\alpha'$  a 98,77-98,81 ppm e o sinal relativo ao carbono  $\beta$  a 145,66-145,71 ppm. Os sinais característicos do anel aromático encontram-se entre 112,74 e 119,50 ppm e entre 112,77 e 119,53 ppm, para **17a** e **17b**, respetivamente. Os sinais relativos aos carbonos quaternários encontram-se entre 125,99-169,02 ppm e 126,02-169,93 ppm, para os compostos **17a** e **17b** respetivamente.

O espetro de IV destas carbocianinas apresenta uma banda de absorção a  $3443\text{ cm}^{-1}$  no caso do **17a** e a  $3446\text{ cm}^{-1}$  no caso do **17b**, ambas referentes à vibração das ligações N-H do grupo substituinte. A banda localizada a  $1603\text{ cm}^{-1}$  e a  $1593\text{ cm}^{-1}$  refere-se à ligação C=C da cadeia

metínica. Já a  $1666\text{ cm}^{-1}$  e a  $1682\text{ cm}^{-1}$  (para **17a** e **17b**, respetivamente) aparecem as bandas de absorção referentes ao carbonilo do grupo substituinte. Verifica-se ainda bandas a  $2859\text{ cm}^{-1}$ ,  $2930\text{ cm}^{-1}$  e  $2955\text{ cm}^{-1}$  para o composto **17a** e a  $2852\text{ cm}^{-1}$ ,  $2923\text{ cm}^{-1}$  e  $2953\text{ cm}^{-1}$  para o composto **17b**, sendo estas referentes à deformação axial das ligações C-H presentes na cadeia alquílica. A  $3054\text{ cm}^{-1}$  e  $3050\text{ cm}^{-1}$  aparece a banda referente às ligações C-H aromáticas, para **17a** e **17b**, respetivamente.

Os dados espectroscópicos obtidos confirmam a síntese do composto pretendido e a sua caracterização encontra-se resumida na tabela 13.

Tabela 13 Dados físicos, espectroscópicos e  $\eta$  dos compostos 17a e 17b.

Composto	$\eta$	p.f. (°C) Forma cristalina	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	RMN $^1\text{H}$ (400,13 MHz; DMSO- $d_6$ ; $\delta$ em ppm)	RMN $^{13}\text{C}$ (100,61 MHz; DMSO- $d_6$ ; $\delta$ em ppm)	$\nu_{\text{máx}}$ ( $\text{cm}^{-1}$ ) KBr
 <p style="text-align: center;"><b>17a</b></p>	41%	287-288 Sólido verde brilhante	578	0,86 (6H, t, $J=6,9$ Hz, $\text{N}(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$ ) 1,28-1,42 (8H, m, $\text{NCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$ ) 1,70 (4H, m, $\text{NCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$ ) 2,06 (6H, s, $\text{NHCOCH}_3$ ) 4,22 (4H, t, $J=8,0$ Hz, $\text{NCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$ ) 6,46 (2H, d, $J=12,7$ Hz, $\alpha, \alpha'$ -CH) 7,47-7,68 (5H, m, 4, 5-CH; $\beta$ -CH) 8,25 (2H, s, 7-CH) 10,25 (2H, s, $\text{NHCOCH}_3$ )	14,21 ( $\text{N}(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$ ) 22,36 (CH <sub>2</sub> ) 24,24 ( $\text{NHCOCH}_3$ ) 27,53 (CH <sub>2</sub> ) 28,59 (CH <sub>2</sub> ) 46,63 (NCH <sub>2</sub> ) 98,77 ( $\alpha, \alpha'$ -CH) 112,74 (7, 7'-CH) 113,88 (4, 4'-CH) 119,50 (5, 5'-CH) 125,99 (7a, 7a'-C) 137,07 (CNHCOCH <sub>3</sub> ) 137,17 (3a, 3a'-C) 145,66 ( $\beta$ -CH) 163,63 ( $\text{NHCOCH}_3$ ) 169,02 (2, 2'-C)	3443 (NH) 3054 ( $\text{CH}_{\text{arom.}}$ ) 2955 ( $\text{CH}_{\text{alq.}}$ ) 2930 ( $\text{CH}_{\text{alq.}}$ ) 2859 ( $\text{CH}_{\text{alq.}}$ ) 1666 (C=O) 1603 (C=C)
 <p style="text-align: center;"><b>17b</b></p>	40%	203-205 Sólido roxo	578	0,83 (6H, t, $J=6,5$ Hz, $\text{N}(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_3$ ) 1,22 (32H, m, $\text{NCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_8\text{CH}_3$ ) 1,72 (4H, quint., $J=7,6$ Hz, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$ ) 2,08 (6H, s, $\text{NHCOCH}_3$ ) 4,25 (4H, t, $J=8,2$ Hz, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$ ) 6,51 (2H, d, $J=12,8$ Hz, $\alpha, \alpha'$ -CH) 7,32-7,84 (5H, m, 4, 5-CH; $\beta$ -CH) 8,32 (2H, s, 7-CH) 10,25 (2H, s, $\text{NHCOCH}_3$ )	14,20 ( $\text{N}(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_3$ ) 22,52 (CH <sub>2</sub> ) 24,16 ( $\text{NHCOCH}_3$ ) 26,41 (CH <sub>2</sub> ) 27,75 (CH <sub>2</sub> ) 29,15 (CH <sub>2</sub> ) 29,36 (CH <sub>2</sub> ) 29,43 (CH <sub>2</sub> ) 29,48 (CH <sub>2</sub> ) 31,72 (CH <sub>2</sub> ) 31,74 (CH <sub>2</sub> ) 46,62 (NCH <sub>2</sub> ) 98,81 ( $\alpha, \alpha'$ -CH) 112,77 (7, 7'-CH) 113,90 (4, 4'-CH) 119,53 (5, 5'-CH) 126,02 (7a, 7a'-C) 137,11 (CNHCOCH <sub>3</sub> ) 137,22 (3a, 3a'-C) 145,71 ( $\beta$ -CH) 163,72 ( $\text{NHCOCH}_3$ ) 169,93 (2, 2'-C)	3446 (NH) 3050 ( $\text{CH}_{\text{arom.}}$ ) 2953 ( $\text{CH}_{\text{alq.}}$ ) 2923 ( $\text{CH}_{\text{alq.}}$ ) 2852 ( $\text{CH}_{\text{alq.}}$ ) 1682 (C=O) 1593 (C=C)

As carbocianinas **18a** e **18b** foram obtidas ao fazer-se reagir dois equivalentes dos respectivos sais (**12a** e **12b**) na presença de piridina e trietilortoformato (esquema 16).

Relativamente aos p.f., o estreito intervalo de fusão (256-257 °C e 107-109 °C para **18a** e **18b** respetivamente) permite-nos concluir que ambos os compostos se encontram puros. Os  $\eta$  obtidos foram satisfatórios (38% e 35%, para o **18a** e **18b**, respetivamente).

Na análise dos espectros no VIS em MetOH, verificaram-se a presença de bandas típicas das cianinas, bem definidas a 573 nm para ambos os compostos. Estas duas cianinas apresentam o mesmo valor de  $\lambda_{\text{máx}}$ , visto apresentarem uma estrutura semelhante, já que o que varia é apenas o comprimento da cadeia *N*-alquílica, factor que não interfere no valor de  $\lambda_{\text{máx}}$ .

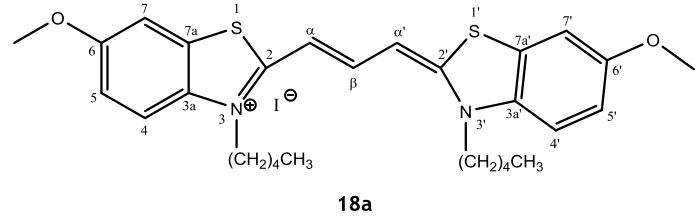
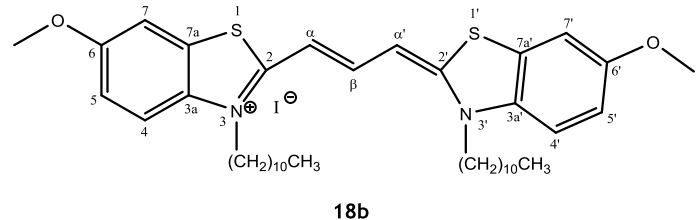
Relativamente à análise dos espetros de RMN  $^1\text{H}$  de **18a** e **18b**, verifica-se a campos mais altos a presença dos sinais relativos à cadeia alquílica nomeadamente de um tripleto de seis protões a 0,81-0,88 ppm relativo ao grupo metilo e entre 1,07-4,26 ppm os sinais relativos aos grupos metileno. De referir que o sinal localizado a 4,26 ppm, o qual integra para quatro protões, corresponde ao grupo  $\text{NCH}_2$ . Ao  $\delta$  de 3,81 ppm encontra-se um singuleto de seis protões, sendo este relativo ao metilo do grupo substituinte ( $\text{COCH}_3$ ). Já a campos mais baixos encontram-se os protões referentes ao anel aromático: no caso da carbocianina **18a** encontra-se um duplo duplete a 7,11 ppm o qual integra para dois protões e entre 7,50 ppm e 7,71 ppm encontra-se um multiplete correspondente a quatro protões aromáticos e ao protão  $\beta$ . Quanto ao **18b** o duplete encontra-se a 7,13 ppm e o multiplete está localizado entre 7,52 ppm e 7,72 ppm onde se localiza também o sinal correspondente ao protão  $\beta$ . Importa referir ainda que a 6,51 ppm e a 6,47 ppm se encontram os protões  $\alpha$  e  $\alpha'$  para **18a** e **18b** respetivamente.

O RMN  $^{13}\text{C}$  vem igualmente confirmar o produto pretendido, apresentando sinais característicos como o sinal a 46,68 ppm correspondente a  $\text{NCH}_2$ . Já o sinal encontrado a 56,43 ppm correspondente ao metilo do grupo substituinte  $\text{COCH}_3$ . De referir a presença dos sinais correspondentes aos carbonos  $\alpha$  e  $\alpha'$  a 98,57-98,60 ppm e a 145,65-145,70 ppm correspondente ao carbono  $\beta$ . Os sinais característicos do anel aromático encontram-se entre 107,72-115,83 ppm para o composto **18a** e entre 107,70-115,83 ppm, para o composto **18b**. Os sinais relativos aos carbonos quaternários encontram-se entre 124,84 ppm e 163,51 ppm e entre 126,85 ppm e 163,51 ppm, para **18a** e **18b**.

O espetro de IV destas carbocianinas apresenta uma banda a  $1048\text{ cm}^{-1}$  e a  $1254\text{ cm}^{-1}$  para **18a** e a  $1040\text{ cm}^{-1}$  e  $1253\text{ cm}^{-1}$  para **18b**, referentes à ligação C-O do grupo substituinte. Já a  $1604\text{ cm}^{-1}$  (**18a**) e a  $1599\text{ cm}^{-1}$  (**18b**) encontram-se as bandas referentes à ligação C=C da cadeia metínica. Verificam-se ainda bandas a  $2866\text{ cm}^{-1}$ ,  $2921\text{ cm}^{-1}$  e  $2953\text{ cm}^{-1}$  para o composto **18a** e a  $2851\text{ cm}^{-1}$ ,  $2924\text{ cm}^{-1}$  e  $2953\text{ cm}^{-1}$  para o composto **18b**, sendo estas referentes à deformação axial das ligações C-H alifáticas da cadeia alquílica. Já a  $3030\text{ cm}^{-1}$  e  $3048\text{ cm}^{-1}$  aparece a banda referente aos C-H do anel aromático, para **18a** e **18b**, respetivamente.

Os dados espectroscópicos obtidos confirmam a síntese do composto pretendido e a sua caracterização encontra-se resumida na tabela 14.

Tabela 14 Dados físicos, espectroscópicos e  $\eta$  dos compostos 18a e 18b.

Composto	$\eta$	p.f. (°C) Forma cristalina	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	RMN $^1\text{H}$ (400,13 MHz; DMSO- $d_6$ ; $\delta$ em ppm)	RMN $^{13}\text{C}$ (100,61 MHz; DMSO- $d_6$ ; $\delta$ em ppm)	$\nu_{\text{máx}}$ ( $\text{cm}^{-1}$ ) KBr
 <p><b>18a</b></p>	38%	256-257 Azul escuro brilhante	573	0,88 (6H, t, $J = 7,0$ Hz, $\text{N}(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$ ) 1,26-1,47 (8H, m, $\text{NCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$ ) 1,70 (4H, q, $J = 7,5$ Hz, $\text{NCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$ ) 3,81 (6H, s, $\text{COCH}_3$ ) 4,26 (4H, t, $J = 7,6$ Hz, $\text{NCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$ ) 6,51 (2H, d, $J = 12,7$ Hz, $\alpha, \alpha'$ -CH) 7,11 (2H, dd, $J = 9,0; 2,5$ Hz, 5, 5'-CH) 7,50-7,71 (5H, m, 4, 4', 7, 7'-CH; $\beta$ -CH)	14,33 ( $\text{N}(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$ ) 22,40 ( $\text{CH}_2$ ) 27,60 ( $\text{CH}_2$ ) 28,59 ( $\text{CH}_2$ ) 46,68 ( $\text{NCH}_2$ ) 56,43 ( $\text{COCH}_3$ ) 98,57 ( $\alpha, \alpha'$ -CH) 107,72 (4, 4'-CH) 114,68 (5, 5'-CH) 115,83 (7, 7'-CH) 124,84 (7a, 7a'-C) 135,67 (3a, 3a'-C) 145,70 ( $\beta$ -CH) 157,55 ( $\text{COCH}_3$ ) 163,51 (2, 2'-C)	3030 ( $\text{CH}_{\text{arom.}}$ ) 2953 ( $\text{CH}_{\text{alq.}}$ ) 2921 ( $\text{CH}_{\text{alq.}}$ ) 2866 ( $\text{CH}_{\text{alq.}}$ ) 1604 (C=C) 1254 (C-O) 1048 (C-O)
 <p><b>18b</b></p>	35%	107-109 Sólido roxo brilhante	573	0,81 (6H, t, $J = 6,6$ Hz, $\text{N}(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_3$ ) 1,07-1,43 (32H, m, $\text{NCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_8\text{CH}_3$ ) 1,70 (4H, q, $J = 7,4$ Hz, $\text{NCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_8\text{CH}_3$ ) 3,81 (6H, s, $\text{COCH}_3$ ) 4,26 (4H, t, $J = 7,2$ Hz, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$ ) 6,47 (2H, d, $J = 12,7$ Hz, $\alpha, \alpha'$ -CH) 7,13 (2H, d, $J = 9,0$ Hz, 5, 5'-CH) 7,52-7,72 (5H, m, 4, 4', 7, 7'-CH; $\beta$ -CH)	14,39 ( $\text{N}(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_3$ ) 22,56 ( $\text{CH}_2$ ) 26,41 ( $\text{CH}_2$ ) 27,83 ( $\text{CH}_2$ ) 29,18 ( $2 \times \text{CH}_2$ ) 29,38 ( $2 \times \text{CH}_2$ ) 29,46 ( $\text{CH}_2$ ) 31,75 ( $\text{CH}_2$ ) 46,68 ( $\text{NCH}_2$ ) 56,42 ( $\text{COCH}_3$ ) 98,60 ( $\alpha, \alpha'$ -CH) 107,70 (4, 4'-CH) 114,71 (5, 5'-CH) 115,83 (7, 7'-CH) 126,85 (7a, 7a'-C) 135,66 (3a, 3a'-C) 145,65 ( $\beta$ -CH) 157,58 ( $\text{COCH}_3$ ) 163,51 (2, 2'-C)	3048 ( $\text{CH}_{\text{arom.}}$ ) 2953 ( $\text{CH}_{\text{alq.}}$ ) 2924 ( $\text{CH}_{\text{alq.}}$ ) 2851 ( $\text{CH}_{\text{alq.}}$ ) 1599 (C=C) 1253 (C-O) 1040 (C-O)

#### 4.2.3.2. Síntese de Indocarbocianinas

As carbocianinas **19a** e **19b** foram obtidas ao fazer-se reagir dois equivalentes dos respectivos sais (**13a** e **13b**) na presença de piridina e trietilortoformato (esquema 16).

Relativamente ao p.f., mesmo não estando descrito na lit., concluímos que a carbocianina **19a** se encontra pura, visto o intervalo de fusão ser pequeno (155-156 °C). O  $\eta$  obtido para **19a** foi razoável (30%), contrariamente ao obtido para o composto **19b** (17%).

Relativamente aos espectros no VIS em MetOH, verificaram-se a presença de bandas típicas das cianinas, bem definidas a 549 nm para ambos os compostos.

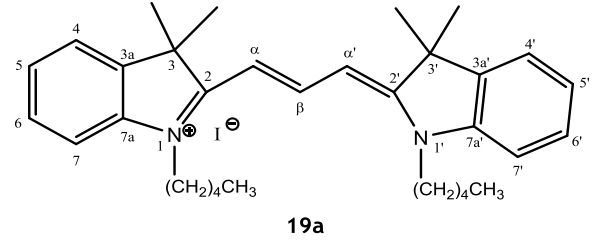
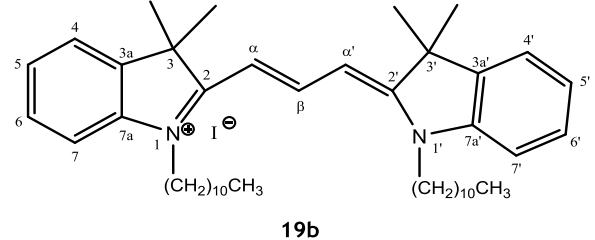
Relativamente à análise dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  de **19a** e **19b**, verifica-se a campos mais altos a presença dos sinais relativos à cadeia alquílica nomeadamente entre 0,82-0,89 ppm onde se localiza um tripleto de seis protões, correspondente do grupo metilo e entre 1,25 ppm e 4,14 ppm para o sal **19a** e entre 1,12 ppm e 4,15 ppm para o sal **19b**, os sinais referentes aos grupos metileno. De referir que o sinal localizado a 4,14 ppm e 4,15 ppm, o qual integra para quatro protões, corresponde ao grupo  $\text{NCH}_2$ , do sal **19a** e **19b** respetivamente. Aos  $\delta$  de 1,70 ppm encontra-se um singuleto de doze protões, sendo este relativo ao isopropil ( $\text{CCH}_3)_2$ ). Ao  $\delta$  de 6,61 ppm encontra-se o duplete referente aos protões  $\alpha$  e  $\alpha'$  da cadeia metínica. Já a campos mais baixos encontram-se os sinais dos protões aromáticos: no caso da carbocianina **19a** encontram-se dois multipletos a 7,26-7,37 ppm integrando para dois protões e a 7,42-7,51 ppm integrando para quatro protões aromáticos; ainda a 7,66 ppm encontra-se um duplete de dois protões. Quanto ao **19b** os seus protões aromáticos encontram-se a 7,26-7,33 ppm (sinal que integra para dois protões), a 7,40-7,51 ppm (sinal que integra para quatro protões), os quais se apresentam sob a forma de multiplete; e ainda ao  $\delta$  de 7,65 ppm um duplete integrando para dois protões. Por último, a 8,37 ppm encontra-se o sinal correspondente ao protão  $\beta$  da cadeia metínica.

O RMN  $^{13}\text{C}$  vem igualmente confirmar o produto pretendido, apresentando sinais característicos como o sinal a 44,29 ppm correspondente a  $\text{NCH}_2$ . O sinal encontrado a 27,94 ppm refere-se aos dois grupos metilo ligados ao carbono na posição 1. De referir a presença dos sinais correspondentes aos carbonos  $\alpha$  e  $\alpha'$  103,06 ppm e o sinal correspondente ao carbono  $\beta$  a 150,36 ppm. Os sinais característicos do anel aromático podem ser encontrados entre 112,04 ppm e 142,37 ppm para o composto **19a**. Relativamente ao composto **19b**, o sinal referente ao grupo metileno ligado ao azoto encontra-se a 43,79 ppm e o sinal correspondente aos dois grupos metilo da posição 1 encontram-se a 27,45 ppm. Os  $\delta$  correspondentes aos carbonos  $\alpha$  e  $\alpha'$  encontram-se a 102,66 ppm enquanto que o sinal relativo ao carbono  $\beta$  se encontra a 149,80 ppm. Por último, os sinais referentes aos carbonos aromáticos encontram-se entre 112,04 ppm e 129,13 ppm para o composto **19a** e entre 111,57 ppm e 128,64 ppm para **19b**. Já os sinais correspondentes aos carbonos quaternários localizam-se entre 49,37 ppm e 174,26 ppm para o composto **19a** e entre 48,87 ppm e 173,75 ppm para **19b**.

O espectro de IV destas carbocianinas apresenta uma banda a  $1600\text{ cm}^{-1}$  (**19a**) e a  $1615\text{ cm}^{-1}$  (**19b**) referente à ligação C=C da cadeia metínica. Verificam-se ainda bandas a  $2853\text{ cm}^{-1}$ ,  $2928\text{ cm}^{-1}$  e  $2955\text{ cm}^{-1}$  para o composto **19a** e a  $2852\text{ cm}^{-1}$ ,  $2923\text{ cm}^{-1}$  e  $2955\text{ cm}^{-1}$  para o composto **19b**, sendo estas referentes à deformação axial das ligações C-H presentes na cadeia alquílica. Já a  $3046\text{ cm}^{-1}$  e  $3052\text{ cm}^{-1}$  aparece a banda referente à deformação axial das ligações C-H do anel aromático, para **19a** e **19b**, respetivamente.

Os dados espectroscópicos obtidos confirmam a síntese do composto pretendido e a sua caracterização encontra-se resumida na tabela 15.

Tabela 15 Dados físicos, espectroscópicos e  $\eta$  dos compostos 19a e 19b.

Composto	$\eta$	p.f. (°C) Forma cristalina	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	RMN $^1\text{H}$ (400,13 MHz; DMSO- $d_6$ ; $\delta$ em ppm)	RMN $^{13}\text{C}$ (100,61 MHz; DMSO- $d_6$ ; $\delta$ em ppm)	$\nu_{\text{máx}}$ ( $\text{cm}^{-1}$ ) KBr
 <p><b>19a</b></p>	30%	155-156 Sólido roxo brilhante	549	0,89 (6H, t, $J=6,9$ Hz, $\text{N}(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$ ) 1,25-1,48 (8H, m, $\text{NCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$ ) 1,70 (12H, s, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ) 1,71-1,80 (4H, m, $\text{NCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$ ) 4,14 (4H, t, $J=7,5$ Hz, $\text{NCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$ ) 6,61 (2H, d, $J=13,3$ Hz, $\alpha, \alpha'$ -CH) 7,26-7,37 (2H, m, 6, 6'-CH) 7,42-7,51 (4H, m, 4, 4', 5, 5'-CH) 7,66 (2H, d, $J=7,4$ Hz, 7, 7'-CH) 8,37 (1H, t, $J=13,7$ Hz, $\beta$ -CH)	14,32 ( $\text{N}(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$ ) 22,44 ( $\text{CH}_2$ ) 27,27 ( $\text{CH}_2$ ) 27,94 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ) 28,73 ( $\text{CH}_2$ ) 44,29 ( $\text{NCH}_2$ ) 49,37 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ) 103,06 ( $\alpha, \alpha'$ -CH) 112,04 (5, 5'-CH) 123,01 (7, 7'-CH) 125,66 (6, 6'-CH) 129,13 (4, 4'-CH) 141,11 (7a, 7a'-C) 142,36 (3a, 3a'-C) 150,36 ( $\beta$ -CH) 174,26 (2, 2'-C)	3046 ( $\text{CH}_{\text{arom.}}$ ) 2955 ( $\text{CH}_{\text{c.c.}}$ ) 2928 ( $\text{CH}_{\text{alq.}}$ ) 2853 ( $\text{CH}_{\text{alq.}}$ ) 1600 (C=C)
 <p><b>19b</b></p>	17%	Óleo rosa brilhante	549	0,82 (6H, t, $J=6,7$ Hz, $\text{N}(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_3$ ) 1,12-1,47 (32H, m, $\text{NCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_8\text{CH}_3$ ) 1,70 (12H, s, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ) 1,72-1,78 (4H, m, $\text{NCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$ ) 4,15 (4H, t, $J=7,4$ Hz, $\text{NCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$ ) 6,61 (2H, d, $J=13,4$ Hz, $\alpha, \alpha'$ -CH) 7,26-7,33 (2H, m, 6, 6'-CH) 7,40-7,51 (4H, m, 4, 4', 5, 5'-CH) 7,65 (2H, d, $J=7,5$ Hz, 7, 7'-CH) 8,37 (1H, t, $J=13,4$ Hz, $\beta$ -CH)	13,91 ( $\text{N}(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_3$ ) 22,07 ( $\text{CH}_2$ ) 26,02 ( $\text{CH}_2$ ) 27,02 ( $\text{CH}_2$ ) 27,45 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ) 28,68 ( $\text{CH}_2$ ) 28,75 ( $\text{CH}_2$ ) 28,87 ( $\text{CH}_2$ ) 28,90 ( $\text{CH}_2$ ) 28,96 ( $\text{CH}_2$ ) 31,26 ( $\text{CH}_2$ ) 43,79 ( $\text{NCH}_2$ ) 48,87 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ) 102,66 ( $\alpha, \alpha'$ -CH) 111,57 (5, 5'-CH) 122,52 (7, 7'-CH) 125,20 (6, 6'-CH) 128,64 (4, 4'-CH) 140,60 (7a, 7a'-C) 141,84 (3a, 3a'-C) 149,80 ( $\beta$ -CH) 173,75 (2, 2'-C)	3052 ( $\text{CH}_{\text{arom.}}$ ) 2955 ( $\text{CH}_{\text{c.c.}}$ ) 2923 ( $\text{CH}_{\text{alq.}}$ ) 2852 ( $\text{CH}_{\text{alq.}}$ ) 1615 (C=C)

As carbocianinas **20a** e **20b** foram obtidas ao fazer-se reagir dois equivalentes dos respectivos sais (**14a** e **14b**) na presença de piridina e trietilortoformato (esquema 16).

Relativamente aos p.f., mesmo não estando descritos na lit., podemos concluir que ambas as carbocianinas se encontram puras, devido ao estreito intervalo de fusão (144-146 °C e 105-106 °C para **20a** e **20b** respetivamente). Os  $\eta$  obtidos foram muito baixos, nomeadamente 10% para **20a** e 15% para **20b**.

Na análise dos espectros no VIS em MetOH, verificaram-se bandas típicas de cianinas, bem definidas a 588 nm e 589 nm para **20a** e **20b**, respetivamente. A presença de mais um anel aromático na constituição destas carbocianinas implica um aumento no valor da absorção máxima, comparando com as carbocianinas descritas anteriormente.

Relativamente à análise dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  de **20a** e **20b**, verifica-se a campos mais altos a presença dos sinais relativos à cadeia alquílica nomeadamente entre 0,79-0,90 ppm onde se localiza um tripleto que integra para seis protões, relativo ao grupo metilo e entre 1,07-4,29 ppm os sinais referentes aos grupos metileno da cadeia *N*-alquílica. De referir que o sinal localizado a 4,27-4,29 ppm, o qual integra para quatro protões, corresponde ao grupo  $\text{NCH}_2$ . Aos  $\delta$  de 2,01-2,02 ppm encontra-se um singuleto de doze protões, sendo este relativo ao isopropil ( $\text{CCH}_3$ )<sub>2</sub>. A 6,58-6,61 ppm encontra-se o duplete referente aos protões  $\alpha$  e  $\alpha'$  da cadeia metínica. Já a campos mais baixos encontram-se os sinais referentes aos protões aromáticos: no caso da carbocianina **20a** encontram-se dois tripletos a 7,55 ppm e 7,70 ppm integrando para dois protões cada. Também se encontram dois dupletos a 7,81 ppm (integra para dois protões) e a 8,31 ppm (integra para dois protões) e um duplo duplete a 8,12 ppm (integra para quatro protões). Por último, a 8,60 ppm encontra-se o sinal do protão  $\beta$  da cadeia metínica. Quanto ao espectro de  $^1\text{H}$  para o composto **20b**, os sinais referentes aos protões aromáticos encontram-se a 7,54 ppm, 7,69 ppm, apresentando-se estes sob a forma de tripleto e integrando para dois protões cada; a 7,78 ppm, 8,10 ppm e 8,30 ppm, apresentando-se o primeiro e último sob a forma de dupletos (os quais integram para dois protões cada), sendo o segundo um duplo duplete que integra para quatro protões. De salientar a presença do sinal do protão  $\beta$  a 8,59 ppm sob a forma de tripleto.

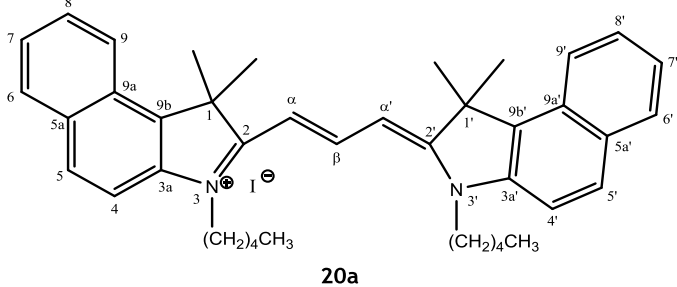
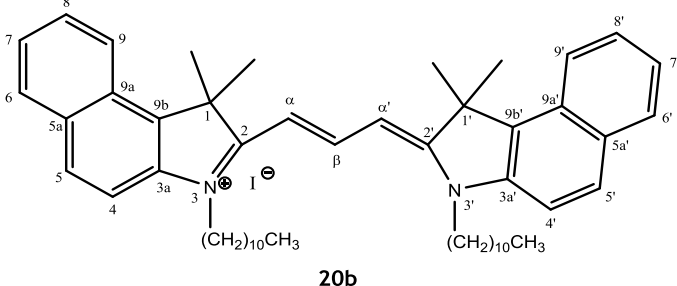
O RMN  $^{13}\text{C}$  vem confirmar o produto pretendido, apresentando sinais característicos como o sinal referente ao  $\text{NCH}_2$  a 44,34-44,42 ppm. Ao  $\delta$  de 27,54-27,60 ppm encontram-se os sinais correspondentes aos carbonos do isopropilo da posição 1. Os sinais referentes aos carbonos  $\alpha$  e  $\alpha'$  encontram-se a 102,58 ppm e 102,64 ppm para **20a** e **20b**, respetivamente, enquanto que o sinal referente ao carbono  $\beta$  se encontra a 148,95 ppm (para **20a**) e 148,87 ppm (para **20b**).

Relativamente ao espectro de IV destas carbocianinas, este apresenta uma banda de absorção a  $1590\text{ cm}^{-1}$  e a  $1587\text{ cm}^{-1}$ , referente à ligação C=C da cadeia metínica, para **20a** e **20b**, respetivamente. A  $1625\text{ cm}^{-1}$  pode-se encontrar a banda de absorção alusiva às ligações C=C do anel aromático, para ambas as carbocianinas. Observa-se ainda bandas de absorção a 2857

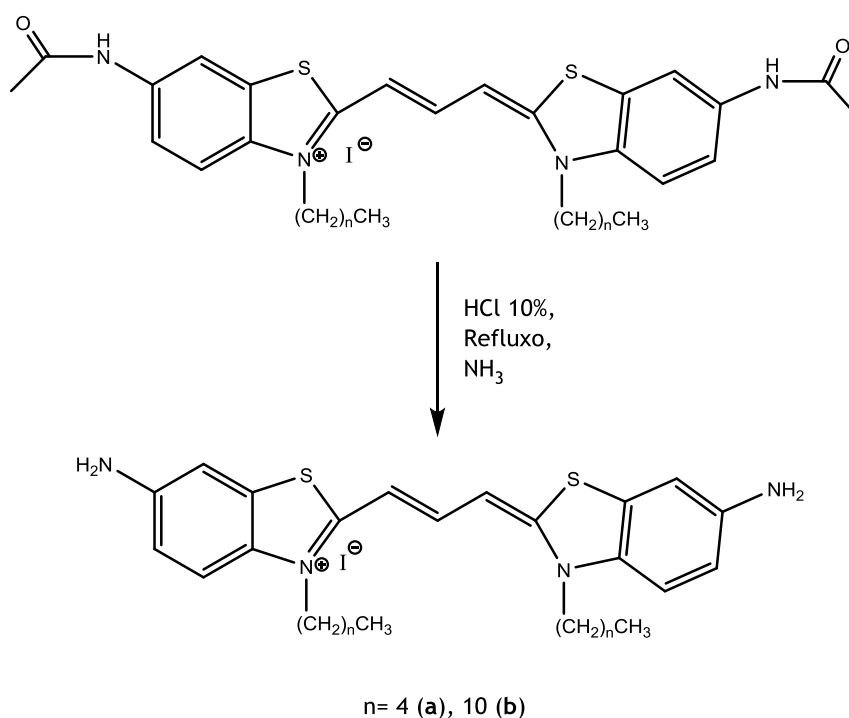
$\text{cm}^{-1}$ ,  $2928 \text{ cm}^{-1}$  e  $2954 \text{ cm}^{-1}$  para o composto **20a** e a  $2850 \text{ cm}^{-1}$  e  $2922 \text{ cm}^{-1}$  para o composto **20b**, sendo estas referentes à deformação axial referentes a ligações C-H presentes na cadeia alquílica. Já a  $3053 \text{ cm}^{-1}$  aparece a banda de absorção referente às ligações C-H aromáticas, para **20a** e **20b**.

Os dados espectroscópicos obtidos confirmam a síntese do composto pretendido e a sua caracterização encontra-se resumida na tabela 16.

Tabela 16 Dados físicos, espectroscópicos e  $\eta$  dos compostos 20a e 20b.

Composto	$\eta$	p.f. (°C) Forma cristalina	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	RMN $^1\text{H}$ (400,13 MHz; DMSO- $d_6$ ; $\delta$ em ppm)	RMN $^{13}\text{C}$ (100,61 MHz; DMSO- $d_6$ ; $\delta$ em ppm)	$\nu_{\text{máx}}$ ( $\text{cm}^{-1}$ ) KBr
 <p>20a</p>	10%	144-146 Sólido castanho brilhante	588	<p>0,90 (6H, t, <math>J=7,0</math> Hz, <math>\text{N}(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3</math>)            1,28-1,54 (8H, m, <math>\text{NCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3</math>)            1,82 (4H, quint., <math>J=7,5</math> Hz, <math>\text{NCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3</math>)            2,02 (12H, s, <math>\text{C}(\text{CH}_3)_2</math>)            4,29 (4H, t, <math>J=7,5</math> Hz, <math>\text{NCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3</math>)            6,61 (2H, d, <math>J=13,5</math> Hz, <math>\alpha, \alpha'</math>-CH)            7,55 (2H, t, <math>J=7,5</math> Hz, 8, 8'-CH)            7,70 (2H, t, <math>J=7,0</math> Hz, 7, 7'-CH)            7,81 (2H, d, <math>J=8,9</math> Hz, 9, 9'-CH)            8,12 (4H, dd, <math>J=13,7; 8,5</math> Hz, 4, 4', 5, 5'-CH)            8,31 (2H, d, <math>J=8,6</math> Hz, 6, 6'-CH)            8,60 (1H, t, <math>J=13,5</math> Hz, <math>\beta</math>-CH)</p>	<p>14,33 (<math>\text{N}(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3</math>)            22,48 (<math>\text{CH}_2</math>)            27,57 (<math>\text{CH}_2</math>)            27,60 (<math>\text{C}(\text{CH}_3)_2</math>)            28,71 (<math>\text{CH}_2</math>)            44,42 (<math>\text{NCH}_2</math>)            51,05 (<math>\text{C}(\text{CH}_3)_2</math>)            102,58 (<math>\alpha, \alpha'</math>-CH)            112,23 (9, 9'-CH)            122,64 (6, 6'-CH)            125,52 (8, 8'-CH)            127,87 (5a, 5a'-C)            128,37 (7, 7'-CH)            130,40 (5, 5'-CH)            130,95 (4, 4'-CH)            131,94 (9a, 9a'-C)            133,60 (9b, 9b'-C)            140,04 (3a, 3a'-C)            148,95 (<math>\beta</math>-CH)            175,52 (2, 2'-C)</p>	<p>3053 (<math>\text{CH}_{\text{arom.}}</math>)            2954 (<math>\text{CH}_{\text{alq.}}</math>)            2928 (<math>\text{CH}_{\text{alq.}}</math>)            2857 (<math>\text{CH}_{\text{alq.}}</math>)            1625 (<math>\text{C}=\text{C}_{\text{arom.}}</math>)            1590 (<math>\text{C}=\text{C}</math>)</p>
 <p>20b</p>	15%	105-106 Sólido roxo brilhante	589	<p>0,79 (6H, t, <math>J=6,7</math> Hz, <math>\text{N}(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_3</math>)            1,07-1,51 (32H, m, <math>\text{NCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_8\text{CH}_3</math>)            1,80 (4H, quint., <math>J=7,8</math> Hz, <math>\text{NCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_8\text{CH}_3</math>)            2,01 (12H, s, <math>\text{C}(\text{CH}_3)_2</math>)            4,27 (4H, t, <math>J=7,2</math> Hz, <math>\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3</math>)            6,58 (2H, d, <math>J=13,4</math> Hz, <math>\alpha, \alpha'</math>-CH)            7,54 (2H, t, <math>J=7,6</math> Hz, 8, 8'-CH)            7,69 (2H, t, <math>J=7,8</math> Hz, 7, 7'-CH)            7,78 (2H, d, <math>J=8,9</math> Hz, 9, 9'-CH)            8,10 (4H, dd, <math>J=11,0; 8,5</math> Hz, 4, 4', 5, 5'-CH)            8,30 (2H, d, <math>J=8,6</math> Hz, 6, 6'-CH)            8,59 (1H, t, <math>J=13,5</math> Hz, <math>\beta</math>-CH)</p>	<p>14,31 (<math>\text{N}(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_3</math>)            22,48 (<math>\text{CH}_2</math>)            26,36 (<math>\text{CH}_2</math>)            27,54 (<math>\text{C}(\text{CH}_3)_2</math>)            27,73 (<math>\text{CH}_2</math>)            29,09 (<math>\text{CH}_2</math>)            29,18 (<math>\text{CH}_2</math>)            29,26 (<math>\text{CH}_2</math>)            29,28 (<math>\text{CH}_2</math>)            29,37 (<math>\text{CH}_2</math>)            31,65 (<math>\text{CH}_2</math>)            44,34 (<math>\text{NCH}_2</math>)            51,01 (<math>\text{C}(\text{CH}_3)_2</math>)            102,64 (<math>\alpha, \alpha'</math>-CH)            112,16 (9, 9'-CH)            122,60 (6, 6'-CH)            125,54 (8, 8'-CH)            127,84 (5a, 5a'-C)            128,36 (7, 7'-CH)            130,37 (5, 5'-CH)            130,93 (4, 4'-CH)            131,92 (9a, 9a'-C)            133,59 (9b, 9b'-C)            139,94 (3a, 3a'-C)            148,87 (<math>\beta</math>-CH)            175,54 (2, 2'-CH)</p>	<p>3053 (<math>\text{CH}_{\text{arom.}}</math>)            2922 (<math>\text{CH}_{\text{alq.}}</math>)            2850 (<math>\text{CH}_{\text{alq.}}</math>)            1625 (<math>\text{C}=\text{C}_{\text{arom.}}</math>)            1587 (<math>\text{C}=\text{C}</math>)</p>

Como referido anteriormente, o insucesso na obtenção das aminocarbocianinas através do método anteriormente descrito, levou à procura de uma nova via de síntese para estes compostos. A nova abordagem escolhida para esta síntese passa pela hidrólise da tiocarbocianina que apresenta como substituinte o grupo acetamido. A hidrólise consiste no refluxo das carbocianinas **17a** e **17b** com uma solução de HCl a 10% durante um dia, sendo esta posteriormente neutralizada com amoníaco. Este procedimento é repetido mais duas vezes, de forma a originar os produtos **21a** e **21b** (esquema 17). No entanto, apenas o composto **21b** foi obtido com sucesso.



**Esquema 17** Síntese geral das aminocarbocianinas

O composto **21b** apresenta elevada pureza, confirmada pelo estreito intervalo de fusão obtido (169-170 °C). Quanto ao  $\eta$  obtido (37%), pode-se dizer que foi satisfatório, tendo em conta o processo de síntese deste composto.

Relativamente ao espectro no VIS em MetOH, verifica-se a presença de uma banda bem definida a 593 nm.

O composto **21b** foi caracterizado por RMN  $^1\text{H}$ , RMN  $^{13}\text{C}$ , IV e visível. Relativamente à análise do espectro de RMN  $^1\text{H}$ , encontramos os sinais referentes à cadeia alquílica a campos mais baixos, nomeadamente do grupo metilo, a 0,84 ppm, sob a forma de tripleto integrando para seis prótons e os sinais dos grupos metileno encontram-se entre 1,07 ppm e 4,18 ppm, sendo este último referente ao  $\text{NCH}_2$ . O sinal correspondente ao grupo amino do grupo substituinte

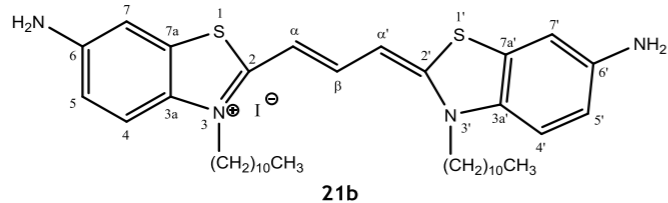
aparece a 5,59 ppm sob a forma de singuleto, o qual integra para quatro prótons e confirmado pela troca com D<sub>2</sub>O. Ao  $\delta$  de 6,37 ppm situa-se o sinal referente ao próton  $\alpha$  da cadeia metínica, sob a forma de duplete. Já os sinais referentes ao anel aromático, podem ser encontrados a 6,76 ppm (duplete), 7,01 (singuleto) ppm e 7,40 ppm (duplete), todos integrando para dois prótons. De referir ainda a presença do sinal do próton  $\beta$  a 7,47 ppm. O sucesso da reação de hidrólise pode também ser confirmada pelo desaparecimento total do sinal relativo ao grupo metilo do grupo substituinte, previamente encontrado a 2,08 ppm.

O espectro de RMN <sup>13</sup>C permite-nos também confirmar a estrutura do composto pretendido. O grupo metilo da cadeia *N*-alquílica encontra-se a 14,39 ppm, enquanto que os grupos metileno se encontram entre 22,56 ppm e 46,34 ppm.

Relativamente ao espectro de IV, este apresenta uma banda de absorção a 1580 cm<sup>-1</sup>, referente à ligação C=C da cadeia metínica e a 1625 cm<sup>-1</sup> pode-se encontrar a banda de absorção alusiva às ligações C=C do anel aromático. Observa-se ainda as bandas de absorção a 2851 cm<sup>-1</sup>, 2922 cm<sup>-1</sup> e 2953 cm<sup>-1</sup>, referentes à deformação axial referentes a ligações C-H presentes na cadeia alquílica. Já a 3050 cm<sup>-1</sup> aparece a banda de absorção referente à ligação C-H do anel aromático. Por último, encontramos a banda referente ao grupo amino a 3406 cm<sup>-1</sup>. O espectro de IV permitiu também confirmar a hidrólise total do composto **17b**, uma vez que a banda de absorção referente ao carbonilo do grupo acetamido (encontrada a 1682 cm<sup>-1</sup>) desapareceu na totalidade.

Os dados espectroscópicos obtidos confirmam a síntese do composto pretendido e a sua caracterização encontra-se resumida na tabela 17.

Tabela 17 Dados físicos, espectroscópicos e  $\eta$  do composto 21b.

Composto	$\eta$	p.f. (°C) Forma cristalina	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	RMN $^1\text{H}$ (400,13 MHz; DMSO- $d_6$ ; $\delta$ em ppm)	RMN $^{13}\text{C}$ (100,61 MHz; DMSO- $d_6$ ; $\delta$ em ppm)	$\nu_{\text{máx}}$ ( $\text{cm}^{-1}$ ) KBr
 <p>21b</p>	37%	169-170 Sólido castanho brilhante	593	0,84 (6H, t, $\text{N}(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_3$ ) 1,07-1,46 (36H, m, $\text{NCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_8\text{CH}_3$ ) 1,57-1,81 (4H, m, $\text{NCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_8\text{CH}_3$ ) 4,18 (4H, t, $J=7,4$ Hz, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$ ) 5,59 (4H, s, $\text{NH}_2$ ) 6,37 (2H, d, $J=12,7$ Hz, $\alpha, \alpha'$ -CH) 6,76 (2H, d, $J=8,8$ Hz, CH) 7,01 (2H, s, CH) 7,40 (2H, d, $J=9,4$ Hz, CH) 7,47 (1H, d, $J=12,8$ Hz, $\beta$ -CH)	14,39 ( $\text{N}(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_3$ ) 22,56 (CH <sub>2</sub> ) 26,39 (CH <sub>2</sub> ) 27,82 (CH <sub>2</sub> ) 29,13 (CH <sub>2</sub> ) 29,16 (CH <sub>2</sub> ) 29,35 (CH <sub>2</sub> ) 29,36 (CH <sub>2</sub> ) 29,44 (CH <sub>2</sub> ) 31,74 (CH <sub>2</sub> ) 46,34 (NCH <sub>2</sub> ) 97,53 (CH) 106,15 (CH) 114,50 (CH) 114,97 (CH) 126,66 (C) 132,21 (C) 143,91 (CH) 147,67 (C) 160,93 (C)	3406 ( $\text{NH}_2$ ) 3050 ( $\text{CH}_{\text{arom.}}$ ) 2953 ( $\text{CH}_{\text{alq.}}$ ) 2922 ( $\text{CH}_{\text{alq.}}$ ) 2851 ( $\text{CH}_{\text{alq.}}$ ) 1625 ( $\text{C}=\text{C}_{\text{arom.}}$ ) 1580 (C=C)

Após a síntese das diversas carbocianinas, partiu-se para a realização dos ensaios de citotoxicidade, nomeadamente ensaios de proliferação (através do doseamento de proteínas pelo método BCA) e viabilidade celular (através do método de MTT). Para além dos ensaios de citotoxicidade, procedeu-se também à identificação da internalização dos compostos em estudo, pela técnica de CLSM. No entanto, os ensaios de citotoxicidade e a identificação da internalização dos compostos apenas foram realizados para os compostos 17a, 17b, 18a, 18b, 19a, 20a, 20b, 22a, 22b, 23a e 23b, por serem os que se encontravam disponíveis.

### 4.3. Curva de crescimento celular através do doseamento de proteínas

De forma a estudar a legitimidade da aplicação do método BCA para o estudo da proliferação celular, procedeu-se, em primeiro lugar, a um ensaio em branco, isto é, sem a incubação das células com os compostos em estudo. Este ensaio serviu assim para avaliar se, após o tempo de duplicação celular, a duplicação do número de células seria acompanhada pelo aumento da concentração de proteína. Assim, procedeu-se ao doseamento de proteínas após 48h e 96h à cultura das células, uma vez que o tempo de duplicação celular para a linha celular MCF-7 é de cerca de 36h. Os resultados obtidos podem ser observados na figura 4.

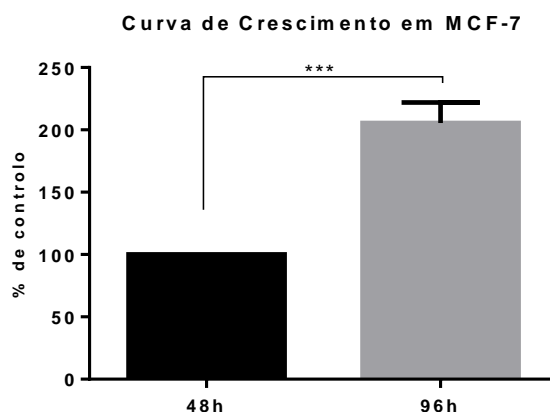


Figura 4 Doseamento de proteínas pelo método BCA às 48h e 96 horas após cultura das células MCF-7. O gráfico apresenta a média  $\pm$  SD com n=3. Comparação feita recorrendo ao t-teste

Os resultados obtidos no doseamento de proteínas para ambos os intervalos de tempo, indicam-nos que existe uma correlação direta entre a quantidade de proteínas e o número de células. Como seria expectável, acompanhada da duplicação celular existe também a

duplicação da concentração proteica. Este método torna-se então válido para o estudo da proliferação celular.

## **4.4. Estudos de citotoxicidade**

### **4.4.1. Otimização das condições experimentais**

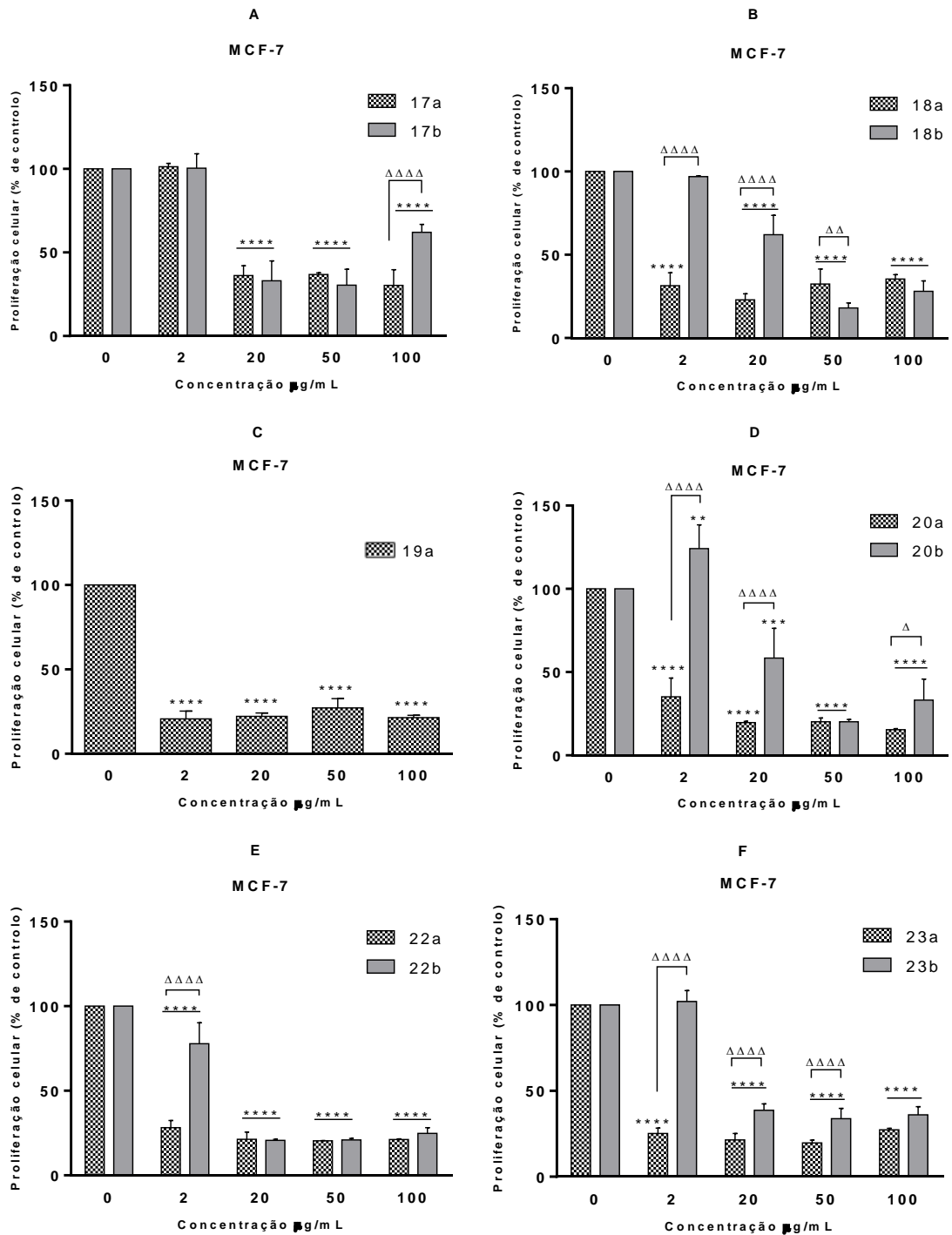
De maneira a fazer um primeiro screening das concentrações de carbocianina a utilizar, foram escolhidas quatro concentrações de trabalho, nomeadamente: 20 µg/mL, 200 µg/mL, 500 µg/mL e 1000 µg/mL. No entanto, verificou-se que estes compostos a elevadas concentrações interferiam com o ensaio de MTT, devido a restos de composto que não se conseguiam remover, mesmo após a lavagem dos poços com PBS (1%). Sendo os compostos corantes (carbocianinas), aquando da dissolução dos cristais de formazano, estes também eram dissolvidos, influenciando a leitura espectralométrica e falseando assim os resultados. Assim, em primeiro lugar, procedeu-se à diluição das soluções de trabalho, passando a ser estudadas as seguintes concentrações: 2 µg/mL, 20 µg/mL, 50 µg/mL e 100 µg/mL. Para a determinação da viabilidade celular realizou-se o ensaio de MTT apenas para a concentração de 2 µg/mL de modo a evitar falsos resultados. Para avaliar a proliferação celular utilizou-se o doseamento de proteínas pelo método BCA. A complementaridade da informação obtida por estes dois métodos permitiu-nos estudar a citotoxicidade dos compostos sintetizados.

Por forma a otimizar as condições experimentais realizaram-se também ensaios de dois compostos simultaneamente em *multi-wells* de 24 poços (*multi-wells* cujas condições experimentais já estavam previamente testadas pelo grupo de trabalho) e em *multi-wells* de 96 poços, por forma a agilizar o grande número de ensaios a ser efetuado.

### **4.4.2. Doseamento de proteínas pelo método BCA**

A citotoxicidade destes compostos foi avaliada em duas linhas celulares, nomeadamente MCF-7 e NHDF. Em primeiro lugar serão apresentados os resultados obtidos com recurso ao método BCA (avalia a proliferação celular) e por último serão comparados os resultados obtidos com o ensaio de MTT (avalia a viabilidade celular). De referir que o estudo da viabilidade celular apenas foi realizado para a linha celular MCF-7.

Na figura 5 encontram-se os resultados obtidos para os compostos estudados na linha celular MCF-7.



**Figura 5** Efeito citotóxico das carbocianinas na linha celular MCF-7 após 48h de incubação. Resultados obtidos pelo método BCA. Proliferação celular expressa em percentagem de controlo. (\*- controlo vs restantes concentrações), ( $\Delta$ - a vs b). Os gráficos apresentam a média  $\pm$  SD com n=3. Comparação feita recorrendo ao teste *Two Way ANOVA*, seguido do teste de Turkey para os gráficos A-F exceto para o gráfico C, para o qual se utilizou o *t*-teste para o (\*\*\*\*P<0,0001), ( $\Delta$

Começou por se avaliar o efeito citotóxico dos compostos **17a** e **17b** na linha celular MCF-7. Quando a linha celular é incubada com estas carbocianinas, durante 48h e em diferentes concentrações verifica-se que há uma diminuição da proliferação celular em relação ao controlo a partir da concentração de 20 µg/mL. No entanto, a citotoxicidade de ambos os compostos mantém-se após esta concentração. Estes dois compostos diferem estruturalmente apenas no tamanho da cadeia *N*-alquílica e, por isso, a análise dos resultados sugere que a toxicidade destas carbocianinas é apenas limitada ao seu grupo substituinte e não pelo tamanho da cadeia alquílica, para concentrações mais baixas.

Relativamente aos resultados obtidos para o composto **18a**, verifica-se uma elevada toxicidade a partir da concentração mais baixa (2 µg/mL), a qual se manteve para as restantes concentrações. Relativamente ao composto **18b**, este parece ter um comportamento de dose-resposta, devido ao aumento gradual da sua toxicidade, à medida que se aumenta a sua concentração.

O gráfico **D** apresenta os resultados respeitantes aos compostos **20a** e **20b**. Relativamente ao primeiro, os resultados indicam uma elevada toxicidade logo a partir da concentração de 2 µg/mL, a qual se mantém nas restantes concentrações. Relativamente à carbocianina **20b**, os resultados sugerem que esta não apresenta toxicidade para a concentração de 2 µg/mL, começando a ser tóxica às concentrações seguintes, à semelhança do que se observa nos compostos **17a**, **17b** e **18b**.

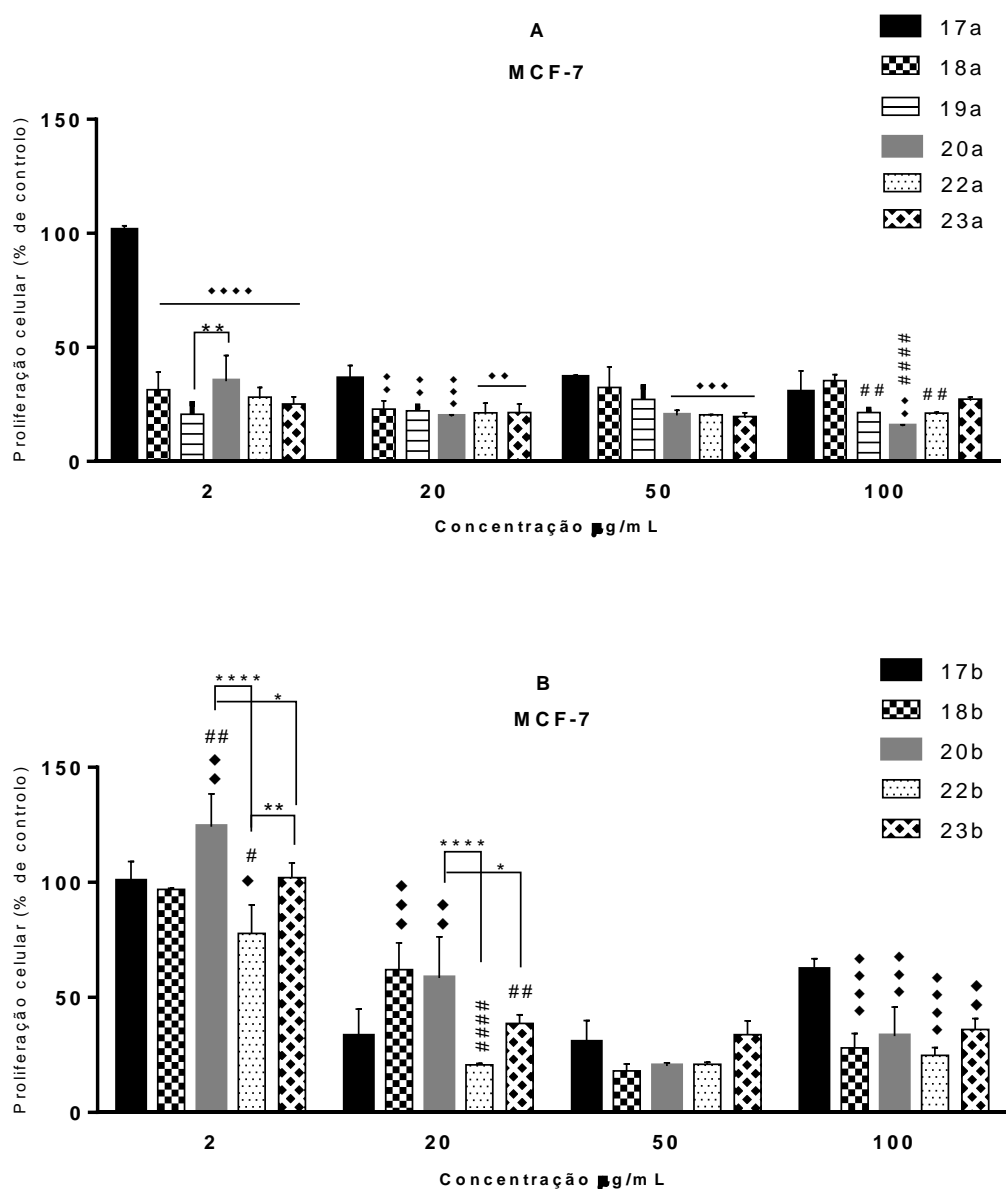
Relativamente aos compostos **19a**, **22a** e **23a**, estes à semelhança dos compostos **18a** e **20a**, apresentam elevada toxicidade a partir da concentração mais baixa, a qual se mantém para as restantes concentrações. Os resultados correspondentes ao composto **22b** indicam-nos que este composto, tal como observado para os compostos **17a**, **17b**, **18b**, **20b** e **23b**, não apresenta toxicidade para a concentração mais baixa, apresentando elevada toxicidade para as restantes concentrações estudadas. Contrariamente aos restantes compostos com cadeia *N*-alquílica de onze átomos de carbono, o composto **22b** apresenta toxicidade logo a partir da primeira concentração em estudo.

A análise dos resultados dos compostos estudados sugere que, exceto no caso dos compostos **17a** e **17b**, existem diferenças estatisticamente significativas entre os compostos com a cadeia *N*-alquílica de cinco carbonos e a de onze carbonos, principalmente para as concentrações de 2 µg/mL e 20 µg/mL. Estes resultados sugerem que o tamanho da cadeia *N*-alquílica é um fator importante para o poder citotóxico das carbocianinas estudadas.

Os resultados obtidos parecem estar de acordo com outros estudos, nomeadamente com o estudo de Minami e colegas. Segundo estes, a introdução de uma cadeia alquílica maior, embora beneficiasse a lipofilicidade destes compostos, promovia uma diminuição da atividade citotóxica [65]. Onoe e colaboradores ao estudarem cianinas com diferentes tamanhos da cadeia *N*-alquílica, verificaram também que a difusão passiva dos compostos que apresentavam cadeias maiores, era menor [72]. Segundo Onoe e colaboradores, estes

resultados podem dever-se ao facto do aumento da hidrofobicidade da cadeia alquílica, diretamente proporcional ao seu tamanho, o qual implica a aglomeração das moléculas e, conseqüentemente, a diminuição da concentração de moléculas disponíveis para sofrerem a difusão passiva pela membrana celular [72]. No entanto, de referir que estes estudos foram realizados em células diferentes das utilizadas neste trabalho.

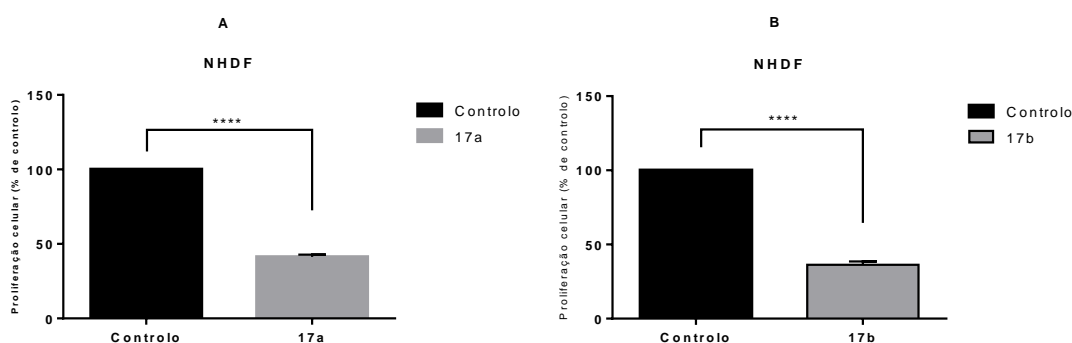
A figura 6 representa o resumo dos resultados obtidos, estando os dois gráficos divididos de acordo com o tamanho da cadeia *N*-alquílica.



**Figura 6** Resultados obtidos na linha celular MCF-7 para os compostos com cadeia *N*-alquílica de (A) cinco carbonos e (B) de onze carbonos. Resultados obtidos pelo método BCA. Proliferação celular expressa em percentagem de controlo. (♦ vs 17), (# vs 18). Os gráficos apresentam a média ± SD com n=3. Comparação feita recorrendo ao teste *Two Way ANOVA*, seguido do teste de Turkey. (\*\*P<0,01), (♦♦♦♦P<0,0001), (♦♦♦P<0,001), (♦♦P<0,01), (####P<0,0001), (##P<0,01).

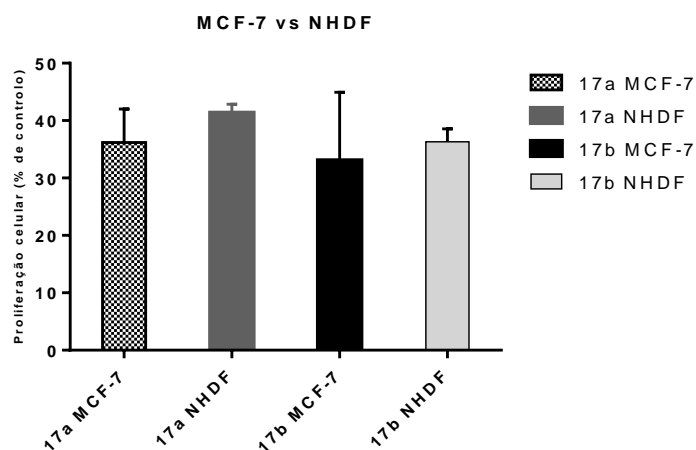
Os resultados sugerem que, quando comparados os diversos compostos, o tamanho da cadeia *N*-alquílica poderá ser o fator determinante na citotoxicidade dos compostos em estudo. No entanto, não se pode descartar o possível efeito da restante estrutura.

Após o estudo da proliferação celular nas células MCF-7, procedemos ao estudo da proliferação celular nas células NHDF, quando na presença do composto 17a e 17b, para a concentração de 20 µg/mL (a primeira concentração que apresentou toxicidade nas células MCF-7 para estes dois compostos). Os resultados obtidos encontram-se na figura 7.



**Figura 7** Resultados obtidos para o doseamento de proteínas nas células NHDF na presença de 20 µg/mL dos compostos 17a (A) e 17b (B). Resultados obtidos pelo método BCA. Proliferação celular expressa em percentagem de controlo. Os gráficos apresentam a média ± SD com n=3. Comparação feita recorrendo ao teste-t de Student (\*\*\*\* P<0,0001).

Os resultados obtidos mostram que estes dois compostos apresentam elevada toxicidade para a concentração de 20 µg/mL, na linha celular NHDF. Os resultados obtidos para ambas as linhas celulares encontram-se representados na figura 8.

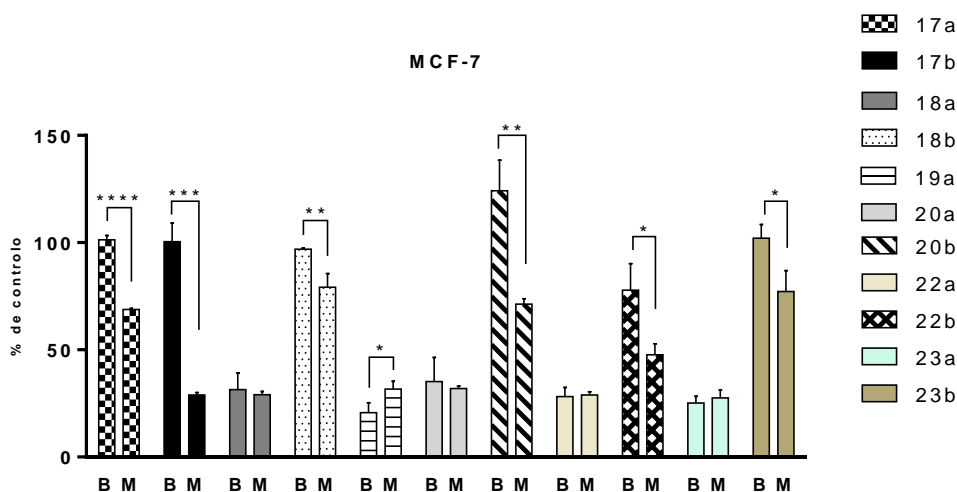


**Figura 8** Comparação dos resultados obtidos para o doseamento de proteínas nas células MCF-7 e NHDF na presença de 20 µg/mL dos compostos 17a e 17b. Resultados obtidos pelo método BCA. Proliferação celular expressa em percentagem de controlo. Os gráficos apresentam a média ± SD com n=3. Comparação feita recorrendo ao teste-t de Student.

Estes resultados mostram que não existe uma seletividade na toxicidade destes compostos para a concentração de 20 µg/ml, o que sugere que estes dois compostos, na concentração em estudo, não são viáveis para possível aplicação terapêutica do cancro da mama. No entanto, a realização do estudo da toxicidade destes compostos deve ser feita para a concentração mais baixa utilizada neste estudo, de modo a averiguar se existe uma possível seletividade.

#### 4.4.3. Ensaio de viabilidade pelo método MTT

O ensaio de MTT consiste na redução do sal MTT em formazano, sendo esta redução dependente das desidrogenases das células metabolicamente ativas. A mitocôndria assume assim um papel importante na redução deste composto, pelo que alguns autores afirmam que este é um método que avalia atividade e, conseqüentemente, a viabilidade mitocondrial [73]. De forma a determinar a viabilidade celular, procedeu-se então ao ensaio de MTT. O ensaio foi realizado apenas para a concentração de 2 µg/mL de forma a evitar possíveis interferências na leitura das absorvâncias. Os resultados obtidos encontram-se representados na figura 9, juntamente com os resultados obtidos no ensaio de proliferação celular, para a mesma concentração.



**Figura 9** Resultados obtidos através dos dois métodos: BCA (B) e MTT (M) para a concentração de 2 µg/mL, na linha celular MCF-7. Resultados expressos em percentagem de controlo. Os gráficos apresentam a média ± SD com n=3. Comparação feita recorrendo ao teste-t de Student. (\*\*\*\*P<0,0001), (\*\*\*P<0,001), (\*\*P<0,01), (\*P<0,05).

A análise dos resultados indica que há diferenças estatisticamente significativas, para os compostos 17a, 17b, 18b, 19a, 20b, 22b e 23b, entre o ensaio de proliferação e o ensaio de viabilidade. Importa ainda salientar, que as diferenças mais significativas entre a relação viabilidade /proliferação celular estão principalmente associadas às carbocianinas cuja estrutura apresenta cadeias N-alquílicas com onze carbonos. Embora não pareça haver um

aumento da proliferação celular, o ensaio de MTT sugere que há uma diminuição da viabilidade celular podendo colocar-se a hipótese das células se encontrarem num processo inicial de apoptose. Relativamente aos compostos que não apresentam diferenças quando comparados os dois métodos, podemos colocar como hipótese que houve morte celular.

Diversos estudos sugerem que a ação citotóxica de compostos catiónicos lipofílicos, como é o caso das carbocianinas, está associada à mitocôndria. No entanto, importa referir que o mecanismo de toxicidade mitocondrial apresentado por estes compostos ainda não está totalmente conhecido. Um dos possíveis mecanismos de toxicidade é sugerido por Napolitano e colaboradores, ao concluírem que determinadas tiocarbocianinas podem interferir com o complexo I da cadeia respiratória, nomeadamente com a atividade da NADH-ubiquinona redutase, o que implica uma diminuição da produção de adenosina trifosfato (ATP) e a consequente apoptose celular [74].

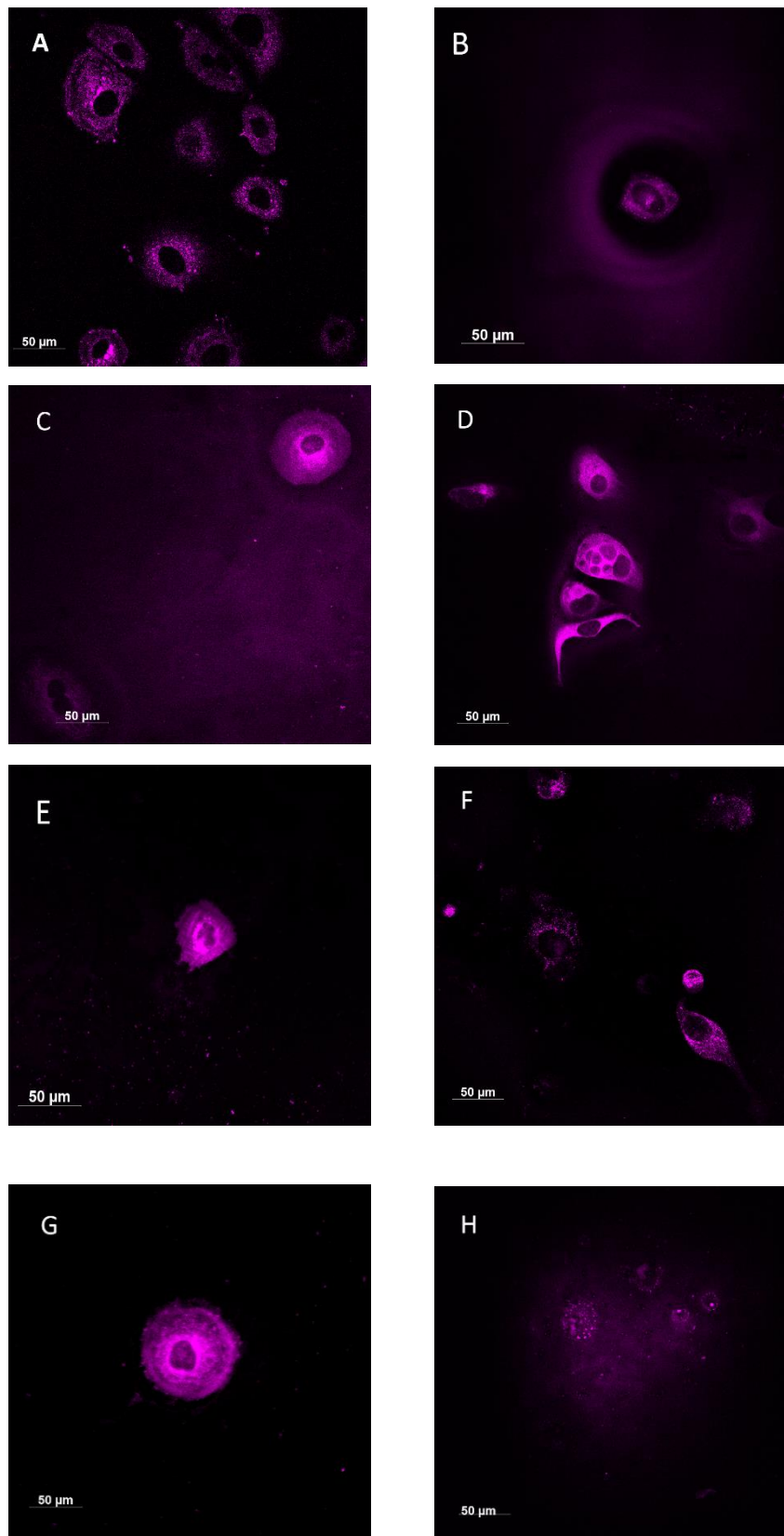
#### 4.5. Identificação da internalização dos compostos por CLSM

Os resultados obtidos nos estudos de citotoxicidade, levaram-nos a colocar a hipótese de que os compostos com cadeia *N*-alquílica maior podiam não conseguir atravessar a membrana celular e, conseqüentemente, apresentar uma menor toxicidade. De modo a se perceber se estes compostos eram internalizados pelas células MCF-7, bem como a sua possível localização intracelular, as células MCF-7 foram incubadas com os diversos compostos em estudo durante uma e doze horas, sendo posteriormente analisadas por CLSM.

A figura 10 é composta por imagens representativas do comportamento geral das diferentes carbocianinas.

Os resultados demonstram que todas as carbocianinas têm capacidade de penetrar a membrana celular, contrariando assim a hipótese acima mencionada. Quanto à sua localização intracelular, estes compostos encontram-se maioritariamente ligados ao citoplasma, à exceção do composto **17b** que parece também apresentar uma ação nuclear. No entanto, o seu mecanismo de ação é ainda desconhecido.

Relativamente aos compostos com cadeia *N*-alquílica de cinco carbonos (**17a**, **18a**, **19a**, **20a**, **22a**, **23a**), o seu mecanismo de ação parece estar associado ao aparecimento de vacúolos (apenas a imagem referente ao composto **18a** se encontra representada na figura 10-D). Assim, a presença de um citoplasma vacuolizado sugere que não estamos perante um processo apoptótico, mas sim um processo de necrose. Esta observação está de acordo com os resultados que obtivemos nos estudos de toxicidade. Quanto aos compostos com cadeia *N*-alquílica de onze carbonos, os resultados já sugerem uma morte celular programada. A célula, após uma 1 hora de incubação com o composto **20b**, parece iniciar o seu processo apoptótico, uma vez que apresenta alterações na conformação da sua membrana celular, bem como possível condensação nuclear (imagem E).



**Figura 10** Imagem CLSM de células MCF-7 após a incubação com (A) 17b durante 1 hora (B) 17b durante 12 horas (C) 18a durante 1 hora (D) 18a durante 12 horas (E) 20b durante 1 hora (F) 20b durante 12 horas (G) 22b durante 1 hora (H) 22b durante 12 horas. Ampliação 40x. Comprimento de onda de 532 nm.

## **V. Conclusão e Perspetivas Futuras**

As principais conclusões que se podem retirar dos resultados obtidos neste trabalho são:

- Os compostos sintetizados foram todos caracterizados por RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e IV, tendo sido comprovadas as estruturas dos produtos pretendidos;
- Os resultados obtidos no estudo relativo à proliferação e viabilidade dos compostos sintetizados, como é óbvio não nos permitem tirar ilações sobre mecanismos de ação. Contudo, podemos considerar que este trabalho preliminar nos permite sugerir que alguns dos compostos estudados estão associados a processos de apoptose e que sobre estes se deveria aprofundar o estudo do seu efeito;
- Os resultados obtidos sugerem que o tamanho da cadeia *N*-alquílica se apresenta como um fator importante na toxicidade destes compostos. No entanto, a importância da restante estrutura não pode ser descorada.

Como perspetivas futuras, e tal como acima referimos, esta foi uma abordagem preliminar, como tal, os compostos sintetizados e não estudados, nomeadamente os compostos **16a**, **19b** e **21b**, devem integrar os próximos estudos. A síntese de novos compostos, nomeadamente com diferentes tamanhos da cadeia metínica, substituintes em outras posições do anel aromático, bem como novas bases heterocíclicas, deve ser estudado. É importante ainda referir que a continuação do trabalho desta dissertação deve, no futuro, incluir ensaios com as células NHDF. Deve-se igualmente fazer ensaios de citometria de fluxo, para confirmação dos processos de apoptose, determinação do IC50 dos compostos sintetizados e confirmação da localização intracelular destes, através de ensaios de imunofluorescência.

## **VI. Referências Bibliográficas**

- [1] A. Mishra, R.K. Behera, P.K. Behera, B.K. Mishra, G.B. Behera, Cyanines during the 1990s: A Review, *Chemical Reviews*, (2000) 1973-2011.
- [2] R.M. Christie, *Colour Chemistry*, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2001.
- [3] F.M. Hamer, *Chemistry of Heterocyclic Compounds- The Cyanine dyes and related compounds*, Interscience Publishers, New York, 1964.
- [4] K. Sung-Hoon, *Functional Dyes*, Elsevier, Oxford, 2006.
- [5] M. Mojzych, M. Henary, Synthesis of Cyanine Dyes, *Topics in Heterocyclic Chemistry*, 14 (2008) 1-9.
- [6] P. Almeida, *Cianinas, a cor não visível da fotografia*, (1999).
- [7] L. Streckowski, *Heterocyclic Polymethine Dyes Synthesis: Properties and Applications*, in: *Topics in Heterocyclic Chemistry*, vol. 14, Springer, Verlag Berlin Heidelberg, 2008.
- [8] S. Yarmoluk, V. Kovalska, M. Losytsky, Symmetric cyanine dyes for detecting nucleic acids, *Biotechnic & Histochemistry*, 83 (2008) 131-145.
- [9] K. Hunger, *Industrial Dyes - Chemistry, Properties, Applications*, Wiley-VCH, Weinheim, 2003.
- [10] S.S. Ramos, L.V. Reis, R.E.F. Boto, P.F. Santos, P. Almeida, Synthesis and dynamic study of new ortho-(alkylchalcogen)acetanilide atropisomers. A second look at the hydrolysis of quaternary 2-methylbenzazol-3-ium salts, *Tetrahedron Letters*, 54 (2013) 5441-5444.
- [11] O. Kappe, D. Dallinger, S. Murphree, *Practical Microwave Synthesis for Organic Chemists: Strategies, Instruments and Protocols*, Wiley-VCH, Weinheim, 2009.
- [12] A. de la Hoz, A. Diaz-Ortiz, A. Moreno, Microwaves in organic synthesis. Thermal and non-thermal microwave effects, *Chemical Society Reviews*, 34 (2005) 164-178.
- [13] A.J. Winstead, G. Nyambura, R. Matthews, D. Toney, S. Oyaghire, Synthesis of quaternary heterocyclic salts, *Molecules*, 18 (2013) 14306-14319.
- [14] P. Santos, L.V. Reis, I. Duarte, J.P. Serrano, P. Almeida, A.S. Oliveira, L.F.V. Ferreira, Synthesis and photochemical evaluation of iodinated squarylium cyanine dyes, *Helvetica Chimica Acta*, 88 (2005) 1135-1143.
- [15] V. Hrobarikova, P. Hrobarik, P. Gajdos, I. Fitis, M. Fakis, P. Persephonis, P. Zahradnik, Benzothiazole-based fluorophores of donor-pi-acceptor-pi-donor type displaying high two-photon absorption, *The Journal of Organic Chemistry*, 75 (2010) 3053-3068.
- [16] I. Caleta, M. Grdisa, D. Mrvos-Sermek, M. Cetina, V. Tralic-Kulenovic, K. Pavelic, G. Karminski-Zamola, Synthesis, crystal structure and antiproliferative evaluation of some new substituted benzothiazoles and styrylbenzothiazoles, *Farmaco*, 59 (2004) 297-305.
- [17] K. Venkataraman, *The chemistry of synthetic dyes*, Academic Press, Nova Iorque, 1971.

- [18] K.G. Vladimirova, A.Y. Freidzon, A.A. Bagatur'yants, G.V. Zakharova, A.K. Chibisov, M.V. Alfimov, Modeling the structure, absorption spectra, and cis-trans isomerization of thiocarbocyanine dyes, *High Energy Chemistry*, 42 (2008) 275-282.
- [19] J.W. Park, Y. Kim, K.J. Lee, D.J. Kim, Novel cyanine dyes with vinylsulfone group for labeling biomolecules, *Bioconjugate Chemistry*, 23 (2012) 350-362.
- [20] M.V. Kvach, A.V. Ustinov, I.A. Stepanova, A.D. Malakhov, M.V. Skorobogaty, V.V. Shmanai, V.A. Korshun, A Convenient Synthesis of Cyanine Dyes: Reagents for the Labeling of Biomolecules, *European Journal of Organic Chemistry*, (2008) 2107-2117.
- [21] B. Chipon, G. Clavé, C. Bouteiller, M. Massonneau, P.-Y. Renard, A. Romieu, Synthesis and post-synthetic derivatization of a cyanine-based amino acid. Application to the preparation of a novel water-soluble NIR dye, *Tetrahedron Letters*, 47 (2006) 8279-8284.
- [22] R.E. Boto, U. Anyanwu, F. Sousa, P. Almeida, J.A. Queiroz, Thiocarbocyanine as ligand in dye-affinity chromatography for protein purification. II. Dynamic binding capacity using lysozyme as a model, *Biomedical Chromatography : BMC*, 23 (2009) 987-993.
- [23] E. Chang, E.E. Congdon, N.S. Honson, K.E. Duff, J. Kuret, Structure-activity relationship of cyanine tau aggregation inhibitors, *Journal of Medicinal Chemistry*, 52 (2009) 3539-3547.
- [24] K. Chegaev, A. Federico, E. Marini, B. Rolando, R. Fruttero, M. Morbin, G. Rossi, V. Fugnanesi, A. Bastone, M. Salmona, N.B. Badiola, L. Gasparini, S. Cocco, C. Ripoli, C. Grassi, A. Gasco, NO-donor thiocarbocyanines as multifunctional agents for Alzheimer's disease, *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 23 (2015) 4688-4698.
- [25] M. Panigrahi, S. Dash, S. Patel, B.K. Mishra, Syntheses of cyanines: a review, *Tetrahedron*, 68 (2012) 781-805.
- [26] M. Krieg, J. Bilitz, Structurally Modified Trimethine Thiocarbocyanine Dyes, *Biochemical Pharmacology*, 51 (1996) 1461-1467.
- [27] J.S. Modica-Napolitano, M. Kulawiec, K.K. Singh, Mitochondria and human cancer, *Current Molecular Medicine*, 7 (2007) 121-131.
- [28] A. Oseroff, D. Ohuoha, G. Ara, D. Mcauliffe, J. Foley, L. Cincotta, Intramitochondrial dyes allow selective in vitro photolysis of carcinoma cells, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83 (1986) 9729-9733.
- [29] W.M. Anderson, D.L. Delinck, L. Benninger, J.M. Wood, S.T. Smiley, L.B. Chen, Cytotoxic effect of thiocarbocyanine dyes on human colon carcinoma cells and inhibition of bovine heart mitochondrial NADH-ubiquinone reductase activity via a rotenone-type mechanism by two of the dyes, *Biochemical Pharmacology*, 45 (1993) 691-696.
- [30] Z.-M. Li, Z.-C. Liu, Z.-Z. Guan, X.-F. Zhu, J.-M. Zhou, B.-F. Xie, G.-K. Feng, Z.-Y. Zhu, W.-Q. Jiang, Inhibition of DNA primase and induction of apoptosis by 3,3'-diethyl-9-methylthia-carbocyanine iodide in hepatocellular carcinoma BEL-7402 cells, *World Journal of Gastroenterology*, 10 (2004) 514-520.
- [31] O.M.d. Saúde, in, [www.who.int](http://www.who.int), Consultado em junho 2016.

- [32] B. Vogelstein, K.W. Kinzler, Cancer genes and the pathways they control, *Nature Medicine*, 10 (2004) 789-799.
- [33] D. Hanahan, R.A. Weinberg, Hallmarks of cancer: the next generation, *Cell*, 144 (2011) 646-674.
- [34] G. Berx, F. van Roy, Involvement of members of the cadherin superfamily in cancer, *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 1 (2009) 3129-3158.
- [35] Y. Tang, Y. Wang, M.F. Kiani, B. Wang, Classification, Treatment Strategy, and Associated Drug Resistance in Breast Cancer, *Clinical Breast Cancer*, (2016) 10.1016/j.clbc.2016.1005.1012.
- [36] J. Anampa, D. Makower, J.A. Sparano, Progress in adjuvant chemotherapy for breast cancer: an overview, *BMC Medicine*, 13 (2015) 195.
- [37] L.P.C. Cancro, in, [www.ligacontracancro.pt/cancro-da-mama/](http://www.ligacontracancro.pt/cancro-da-mama/), Consultado em junho 2016.
- [38] D. Delen, G. Walker, A. Kadam, Predicting breast cancer survivability: a comparison of three data mining methods, *Artificial Intelligence in Medicine*, 34 (2005) 113-127.
- [39] J.M. Jerez-Aragonés, J.A. Gómez-Ruiz, G. Ramos-Jiménez, J. Muñoz-Pérez, E. Alba-Conejo, A combined neural network and decision trees model for prognosis of breast cancer relapse, *Artificial Intelligence in Medicine*, 27 (2003) 45-63.
- [40] M. Chang, Tamoxifen resistance in breast cancer, *Biomolecules and Therapeutics*, 20 (2012) 256-267.
- [41] J. Russo, I.H. Russo, The role of estrogen in the initiation of breast cancer, *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 102 (2006) 89-96.
- [42] S. Ali, R.C. Coombes, Endocrine-responsive breast cancer and strategies for combating resistance, *Nature Reviews Cancer*, 2 (2002) 101-112.
- [43] C.M. Mansfield, A review of the etiology of breast cancer, *Journal of the National Medical Association*, 85 (1993) 217-221.
- [44] C.K. Osborne, R. Schiff, Mechanisms of endocrine resistance in breast cancer, *Annual Review of Medicine*, 62 (2011) 233-247.
- [45] C.K. Osborne, A. Wakeling, R.I. Nicholson, Fulvestrant: an oestrogen receptor antagonist with a novel mechanism of action, *British Journal of Cancer*, 90 (2004) S2-6.
- [46] C.M. Klinge, Estrogen receptor interaction with estrogen response elements, *Nucleic Acids Research*, 29 (2001) 2905-2919.
- [47] J.M. Knowlden, J.M.W. Gee, J.F.R. Robertson, I.O. Ellis, R.I. Nicholson, A possible divergent role for the oestrogen receptor alpha and beta subtypes in clinical breast cancer, *International Journal of Cancer*, 89 (2000) 209-212.

- [48] M. Jia, K. Dahlman-Wright, J.A. Gustafsson, Estrogen receptor alpha and beta in health and disease, *Best Practice & Research. Clinical Endocrinology & Metabolism*, 29 (2015) 557-568.
- [49] C.J. Fabian, The what, why and how of aromatase inhibitors: hormonal agents for treatment and prevention of breast cancer, *International Journal of Clinical Practice*, 61 (2007) 2051-2063.
- [50] M. Kittaneh, S. Gluck, Exemestane in the adjuvant treatment of breast cancer in postmenopausal women, *Breast Cancer: Basic and Clinical Research*, 5 (2011) 209-226.
- [51] K.L. Jones, A review of adjuvant hormonal therapy in breast cancer, *Endocrine Related Cancer*, 11 (2004) 391-406.
- [52] R.W. Carlson, The History and Mechanism of Action of Fulvestrant, *Clinical Breast Cancer*, 6 (2005) S5-S8.
- [53] J. Hoffmann, A. Sommer, Anti-hormone Therapy: Principles of Endocrine Therapy of Cancer, *Topics in Medicinal Chemistry*, 1 (2006) 19-82.
- [54] W. Zwart, V. Theodorou, J.S. Carroll, Estrogen receptor-positive breast cancer: a multidisciplinary challenge, *Wiley Interdisciplinary Reviews. Systems Biology and Medicine*, 3 (2011) 216-230.
- [55] S.E. Bulun, K. Zeitoun, H. Sasano, E.R. Simpson, Aromatase in Aging Women, *Seminars in Reproductive Endocrinology*, 17 (1999) 349-358.
- [56] S. Ohno, Tolerability of Therapies Recommended for the Treatment of Hormone Receptor-Positive Locally Advanced or Metastatic Breast Cancer, *Clinical Breast Cancer*, 16 (2016) 238-246.
- [57] D. de Ziegler, C. Mattenberger, C. Luyet, I. Romoscanu, N.F. Irion, F. Bianchi-Demicheli, Clinical use of aromatase inhibitors (AI) in premenopausal women, *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 95 (2005) 121-127.
- [58] V.C. Jordan, Tamoxifen (ICI46,474) as a targeted therapy to treat and prevent breast cancer, *British Journal of Pharmacology*, 147 (2006) S269-276.
- [59] K.J. Baatjes, J.P. Apffelstaedt, M.J. Kotze, M. Conradie, Postmenopausal Breast Cancer, Aromatase Inhibitors, and Bone Health: What the Surgeon Should Know, *World Journal of Surgery*, 40 (2016) 2149-2156.
- [60] S. Servitja, T. Martos, M.R. Sanz, N. Garcia-Giralt, D. Prieto-Alhambra, L. Garrigos, X. Nogues, I. Tusquets, Skeletal adverse effects with aromatase inhibitors in early breast cancer: evidence to date and clinical guidance, *Therapeutic Advances in Medical Oncology*, 7 (2015) 291-296.
- [61] B. Fisher, J. Dignam, J. Bryant, N. Wolmark, Five Versus More Than Five Years of Tamoxifen for Lymph Node-Negative Breast Cancer: Updated Findings From the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-14 Randomized Trial, *Journal of the National Cancer Institute*, 93 (2001) 684-690.

- [62] A. Ring, M. Dowsett, Mechanisms of tamoxifen resistance, *Endocrine Related Cancer*, 11 (2004) 643-658.
- [63] C.X. Ma, T. Reinert, I. Chmielewska, M.J. Ellis, Mechanisms of aromatase inhibitor resistance, *Nature Reviews Cancer*, 15 (2015) 261-275.
- [64] S.D. Sarker, L. Nahar, *Chemistry for Pharmacy Students General, Organic and Natural Product Chemistry*, John Wiley & Sons Ltd, Inglaterra, 2007.
- [65] I. Minami, Y. Kozai, H. Nomura, T. Tashiro, Cyanine dyes, new potent antitumor agents, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 30 (1982) 3106-3120.
- [66] S. Ferreira, Estudo da citotoxicidade de compostos derivados das cianinas em culturas celulares, in: *Ciências, Universidade da Beira Interior, Covilhã*, 2015.
- [67] A. Pardal, Cianinas como ligandos para a purificação de proteínas por cromatografia de afinidade in: *Ciências, Universidade da Beira Interior, Covilhã*, 2000.
- [68] A.C. Pardal, S.S. Ramos, P.F. Santos, L.V. Reis, P. Almeida, Synthesis and Spectroscopic Characterisation of N-Alkyl Quaternary Ammonium Salts Typical Precursors of Cyanines, *Molecules*, 7 (2002) 320-330.
- [69] A.S. Levenson, V.C. Jordan, MCF-7: The first hormone-responsive breast cancer cell line, *Cancer Research* 57 (1997) 3071-3078.
- [70] P.K. Smith, G.T. Hermanson, A.K. Mallia, F.H. Gartner, M.D. Frovenzano, E.K. Fujimoto, N.M. Goeke, B.J. Olson, D.C. Klenk, R.I. Krohn, Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid, *Analytical Biochemistry*, 150 (1985) 76-85.
- [71] A. Amira, H. K'tir, M. Berredjem, N.-E. Aouf, A simple, rapid, and efficient N-Boc protection of amines under ultrasound irradiation and catalyst-free conditions, *Monatshefte für Chemie - Chemical Monthly*, 145 (2013) 509-515.
- [72] S. Onoe, T. Temma, Y. Shimizu, M. Ono, H. Saji, Investigation of cyanine dyes for in vivo optical imaging of altered mitochondrial membrane potential in tumors, *Cancer Medicine*, 3 (2014) 775-786.
- [73] J. van Meerloo, G.J.L. Kaspers, J. Cloos, Cell sensitivity assays: The MTT assay, in: I.A. Cree (Ed.) *Cancer Cell Culture-Methods and Protocols*, vol. 731, Humana Press, Nova Iorque, 2011, pp. 237-245.
- [74] Josephine S. Modica-Napolitano, J.R. Aprile, Delocalized lipophilic cations selectively target the mitochondria of carcinoma cells, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 49 (2001) 63-70.