

# **Avaliação de Cianinas como Potenciais Agentes Antiproliferativos para o Tratamento do Cancro**

**Ana Alexandra Fernandes Maia**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
**Bioquímica**  
(2<sup>o</sup> ciclo de estudos)

Orientador: Professor Doutor Samuel Martins Silvestre  
Coorientadores: Professor Doutor Paulo Jorge da Silva Almeida  
Mestre João Paulo Lourenço Serrano

**setembro 2020**



# Agradecimentos

Em primeiro lugar, um enorme obrigado ao meu orientador Professor Doutor Samuel Silvestre e aos meus coorientadores Professor Doutor Paulo Almeida e Mestre João Serrano. Por toda a disponibilidade, paciência e dedicação demonstradas ao longo destes meses, assim como pela compreensão e confiança que me foram legadas, mas também por todos os momentos de descontração proporcionados.

À Professora Doutora Maria João Nunes e ao Professor Doutor Renato Boto pela ajuda a nível laboratorial, essencialmente na área de síntese orgânica. Obrigada por todo o conhecimento transmitido.

À Professora Doutora Adriana Santos e à técnica Ana Borges por todo o apoio e ajuda, principalmente na microscopia de fluorescência.

A todos os que caminharam ao meu lado e que ao longo destes anos se tornaram pilares imprescindíveis. Aos que estão comigo desde o início e aos que foram chegando ao longo destes cinco anos, um enorme obrigada! À família que criámos e que esteve sempre presente, que nos piores momentos me suportou, me levantou e me deu força para continuar esta jornada. Foram muitos os momentos partilhados e as histórias vividas. O meu obrigado mais sincero às Marlenes, começámos e acabámos esta jornada juntas. Às Bárbaras, à Laura, à Ana Alexandra, ao Beirão, à Tatiana, ao Joel, à Xana, ao Filipe, à Mariana, ao Emanuel, ao Francês e ao Duarte, que apesar de chegar mais tarde, ocupa um lugar igualmente importante. Ao Nuno por toda a paciência e tempo perdido comigo. A vocês que sei que levo comigo para vida.

Aos meus desde sempre, a quem esteve comigo antes desta jornada começar, à Mariana, à Paula, à Filipa, à Daniela e ao Jorge. Obrigada por mesmo de longe, me acompanharem e me darem força sempre que foi preciso.

Por fim, mas sem dúvida alguma a quem teve o maior impacto nestes cinco anos, à minha Mãe, Irmão e Avós, sem vocês isto não seria possível. Um obrigada não chega, por todo o carinho, dedicação, apoio incondicional e por todos os sacrifícios que fizeram para hoje estar aqui. Obrigada por me deixarem viver os meus sonhos e por fazerem sempre parte deles!



## Resumo

Atualmente, o cancro é uma das doenças com maior incidência a nível mundial. O crescimento populacional, assim como o elevado envelhecimento, associados a fatores ambientais de risco e a fatores genéticos, têm contribuído para o agravamento das taxas de morbidade e mortalidade. Todavia, nos dias de hoje, existem variados tratamentos associados a esta doença, encontrando-se entre os mais importantes, a quimioterapia, a radioterapia e a terapia fotodinâmica. A aplicação adequada destas terapias, em conjunto com um diagnóstico atempado e eficiente, aumentam significativamente as probabilidades de cura dos pacientes. Dentro da terapia fotodinâmica, as cianinas têm sido amplamente testadas nos últimos anos. Estas são corantes constituídos por dois anéis heterocíclicos unidos por uma cadeia metínica com um número ímpar de carbonos. Ao longo dos anos estes compostos têm sido aplicados em áreas distintas da ciência, sendo utilizados como agentes fotossensíveis e agentes antiproliferativos. Este trabalho de dissertação tem como objetivos principais a síntese e a caracterização espectroscópica de novas monometinocianinas com potencial anticancerígeno e a correspondente avaliação biológica *in vitro*, nomeadamente, do seu potencial antiproliferativo em diversas linhas celulares, assim como estudos adicionais de microscopia de fluorescência e, ainda, estudos computacionais complementares. Na síntese de monometinocianinas realizada neste trabalho obtiveram-se rendimentos moderados a bons, sendo que os melhores resultados foram obtidos na síntese das monometinocianinas assimétricas (72% e 68%). No *screening* inicial realizado a uma concentração de 10  $\mu\text{M}$  selecionaram-se as cianinas que apresentaram um maior potencial antiproliferativo e que demonstraram ter seletividade para as células cancerígenas. Após essa seleção, procedeu-se à realização do cálculo da metade da concentração inibitória máxima ( $\text{IC}_{50}$ ). Dos sete compostos testados, destaca-se uma das monometinocianinas com elevado potencial anticancerígeno, especialmente na linha celular Caco-2 ( $\text{IC}_{50} = 0,01 \mu\text{M}$ ) e seletividade para esta linha celular cancerígena. No entanto, serão necessários mais estudos biológicos neste contexto, de forma a elucidar o seu mecanismo de ação e a respetiva localização celular.

## Palavras-chave

Cianinas;cancro;agentes antiproliferativos;fluorescência



# Abstract

Currently, cancer is one of the diseases with the highest incidence worldwide. Population growth, as well as high growth, associated with environmental risk factors and genetic factors, have contributed to the worsening of morbidity and mortality rates. However, nowadays, there are several treatments associated with this disease, being among the most important, chemotherapy, radiotherapy and photodynamic therapy. The application of these therapies, along with a timely and efficient diagnosis, increases the patient's chances of cure. Within photodynamic therapy, cyanine dyes have been extensively tested over the years. These are dyes composed of two heterocyclic rings joined by a metal chain with an odd number of carbons. Over the years these compounds have been processed in different areas in different fields of science, being used as photosensitive agents and antiproliferative agents. This dissertation work has as main objectives the synthesis and spectroscopic characterization of new monomethine cyanine dyes with anticancer potential and a corresponding *in vitro* biological evaluation, namely, their antiproliferative potential in several cell lines, as well as complementary studies of fluorescence microscopy and, further, complementary computational studies, whenever possible. In the synthesis of monomethine cyanine dyes performed in this work, obtained results varied from improved to good, and the best results were obtained in the synthesis of asymmetric monomethine cyanine dyes (72% and 68%). In the initial screening performed at a concentration of 10  $\mu\text{M}$ , cyanine dyes that dissipate a greater antiproliferative potential and that were shown to have selectivity for cancer cells, were selected. After this selection, calculations of half of the maximum inhibitory concentration ( $\text{IC}_{50}$ ) were performed. Of the seven compounds tested, one of the monomethine cyanine dyes stands out, with high anticancer potential especially in the Caco-2 cell line ( $\text{IC}_{50} = 0.01 \mu\text{M}$ ) and selectivity for this cancer cell line (280). However, more biological studies in this context will be required, in order to elucidate its mechanism of action and its cell location.

## Keywords

Cyanine dyes;cancer;antiproliferative agents;fluorescence



# Índice

## Capítulo 1 – Introdução

|   |    |
|---|----|
| 1. Introdução.....  | 3  |
| 1.1. Cancro e Abordagens Terapêuticas.....  | 3  |
| 1.2. Cianinas .....   | 4  |
| 1.2.1. Definição e Propriedades Gerais .....  | 4  |
| 1.2.2. Principais Métodos de Síntese.....   | 7  |
| 1.2.3. Principais Aplicações.....   | 10 |
| 1.2.3.1. Não Biológicas .....   | 10 |
| 1.2.3.2. Biológicas.....  | 10 |
| 1.2.3.2.1. Ação Anticancerígena .....   | 10 |
| 1.2.3.2.2. Outras Aplicações Biológicas.....  | 20 |
| 1.2.4. Cianinas como Sondas Fluorescentes – enfoque na citometria de fluxo e microscopia de fluorescência ..... | 23 |
| 1.2.4.1. Citometria de Fluxo .....  | 24 |
| 1.2.4.2. Microscopia de Fluorescência .....   | 27 |
| 1.3. Objetivos .....  | 29 |

## Capítulo 2 – Materiais e Métodos

|   |    |
|---|----|
| 2. Materiais e Métodos .....  | 33 |
| 2.1. Síntese de Monometinocianinas.....   | 33 |
| 2.1.1. Síntese do nitrito de isoamilo.....  | 36 |
| 2.1.2. Síntese das monometinocianinas simétricas <b>9-11</b> .....  | 37 |
| 2.1.2.1. Brometo de ( <i>Z</i> )-3-(2-metoxi-2-oxoetil)-2-((3-(2-metoxi-2-oxoetil)benzo[ <i>d</i> ]tiazol-2(3 <i>H</i> )-ilideno)metil)benzo[ <i>d</i> ]tiazol-3-io ( <b>9</b> )..... | 37 |
| 2.1.2.2. Iodeto de ( <i>Z</i> )-3-pentil-2-((3-pentilbenzo[ <i>d</i> ]tiazol-2(3 <i>H</i> )-ilideno)metil)benzo[ <i>d</i> ]tiazol-3-io ( <b>10</b> ) .....                            | 37 |
| 2.1.2.3. Iodeto de ( <i>Z</i> )-3-decil-2-((3-decilbenzo[ <i>d</i> ]tiazol-2(3 <i>H</i> )-ilideno)metil)benzo[ <i>d</i> ]tiazol-3-io ( <b>11</b> ).....                               | 38 |
| 2.1.3. Síntese das monometinocianinas assimétricas <b>12 e 13</b> .....   | 38 |
| 2.1.3.1. Iodeto de ( <i>Z</i> )-3-etil-2-((3-pentilbenzo[ <i>d</i> ]tiazol-2(3 <i>H</i> )-ilideno)metil)benzo[ <i>d</i> ]tiazol-3-io ( <b>12</b> ) .....                              | 38 |

|   |    |
|---|----|
| 2.1.3.2. Iodeto de (Z)-2-((3-decilbenzo[d]tiazol-2(3H)-ilideno)metil)-3-etilbenzo[d]tiazol-3-íolo ( <b>13</b> ) ..... | 39 |
| 2.2. Avaliação Biológica .....  | 39 |
| 2.2.1. Avaliação da Proliferação Celular .....  | 40 |
| 2.2.1.1. Culturas Celulares .....   | 40 |
| 2.2.1.2. Passagem e Contagem de Células.....  | 41 |
| 2.2.1.3. Preparação de Soluções .....   | 42 |
| 2.2.1.4. Ensaio de Viabilidade Celular pelo método de MTT .....   | 42 |
| 2.2.2. Microscopia de Ótica Comum .....   | 43 |
| 2.2.3. Microscopia de Fluorescência .....   | 44 |
| 2.2.4. Análises Estatísticas .....  | 44 |
| 2.3. Estudos <i>in silico</i> .....   | 44 |

### Capítulo 3 – Resultados e Discussão

|   |    |
|---|----|
| 3. Resultados e Discussão .....   | 48 |
| 3.1. Síntese das monometinocianinas .....                               | 48 |
| 3.1.1. Síntese do nitrito de isoamilo.....                              | 48 |
| 3.1.2. Síntese das monometinocianinas simétricas <b>9-11</b> .....      | 48 |
| 3.1.3. Síntese das monometinocianinas assimétricas <b>12 e 13</b> ..... | 50 |
| 3.2. Avaliação Biológica.....   | 51 |
| 3.2.1. Avaliação da Proliferação Celular .....                          | 51 |
| 3.2.1.1. Ensaio da Viabilidade Celular (MTT).....                       | 52 |
| 3.2.1.1.1. <i>Screening</i> inicial.....                                | 52 |
| 3.2.1.1.2. Ensaio de IC <sub>50</sub> e Avaliação de Seletividade.....  | 57 |
| 3.2.1.1.3. Ensaio na Presença e Ausência de luz.....                    | 60 |
| 3.2.2. Microscopia Ótica Comum.....                                     | 62 |
| 3.2.3. Microscopia de Fluorescência .....                               | 65 |

### Capítulo 4 – Conclusões e Perspetivas Futuras

|   |    |
|---|----|
| 4. Conclusões e Perspetivas Futuras ..... | 78 |
|---|----|

## **Bibliografia**

|                    |    |
|--------------------|----|
| Bibliografia ..... | 82 |
|--------------------|----|

## **Anexos**

|  |     |
|--|-----|
| Anexo I – Espectros de RMN $^1\text{H}$ correspondente à cianina <b>9</b> .....        | 93  |
| Anexo II – Espectros de RMN $^1\text{H}$ correspondente à cianina <b>10</b> .....      | 94  |
| Anexo III – Espectros de RMN $^1\text{H}$ correspondente à cianina <b>11</b> .....     | 95  |
| Anexo IV – Espectros de RMN $^1\text{H}$ correspondente à cianina <b>12</b> .....      | 96  |
| Anexo V – Espectros de RMN $^1\text{H}$ correspondente à cianina <b>13</b> .....       | 97  |
| Anexo VI – Espectros de RMN $^{13}\text{C}$ correspondente à cianina <b>9</b> .....    | 98  |
| Anexo VII – Espectros de RMN $^{13}\text{C}$ correspondente à cianina <b>10</b> .....  | 99  |
| Anexo VIII – Espectros de RMN $^{13}\text{C}$ correspondente à cianina <b>11</b> ..... | 100 |
| Anexo IX – Espectros de RMN $^{13}\text{C}$ correspondente à cianina <b>12</b> .....   | 101 |
| Anexo X – Espectros de RMN $^{13}\text{C}$ correspondente à cianina <b>13</b> .....    | 102 |
| Anexo XI – Caracterização da Fonte Luminosa .....                                      | 103 |



# Lista de Esquemas

|   |    |
|---|----|
| Esquema 1. Método de síntese de monometinocianinas (método do tioalquilo) .....   | 8  |
| Esquema 2. Método de síntese das monometinocianinas simétricas (método descrito por <i>Fisher e Hamer</i> ) .....         | 8  |
| Esquema 3. Método de síntese de trimetinocianinas simétricas (método do <i>orto</i> -éster) ....                          | 8  |
| Esquema 4. Método de síntese de trimetinocianinas simétricas e assimétricas (método da difenilformamidina) .....          | 9  |
| Esquema 5. Método de síntese de pentametinocianinas simétricas e assimétricas (método de 1-anilino-3-anilprop-1-eno)..... | 9  |
| Esquema 6. Exemplo representativo do método de síntese de cloroheptametinocianinas simétricas e assimétricas. ....        | 10 |
| Esquema 7. Método da síntese das monometinocianinas <b>9-11</b> .....   | 48 |
| Esquema 9. Método da síntese das monometinocianinas <b>12 e 13</b> .....  | 50 |

# Lista de Figuras

|  |    |
|--|----|
| Figura 1. Estrutura geral das cianinas .....   | 5  |
| Figura 2. Exemplos representativos de apocianinas, hemicianinas, azacianinas, merocianinas e cianinas esquarílicas .....                     | 6  |
| Figura 3. Esquema geral da PDT associado ao diagrama de <i>Jablonski</i> , adaptado de <i>Swamyet al.</i> , 2020 .....                       | 12 |
| Figura 4. Estruturas das cianinas anticancerígenas <b>1-5</b> aplicadas na PDT .....   | 13 |
| Figura 5. Estruturas das cianinas anticancerígenas <b>6-8</b> aplicadas em PDT .....   | 15 |
| Figura 6. Estruturas das cianinas esquarílicas <b>9-14</b> .....   | 16 |
| Figura 7. Estrutura da cianina <b>15</b> (CY-TPP) estudada em ensaios de citotoxicidade na ausência de luz .....                             | 18 |
| Figura 8. Estrutura das monometinocianinas <b>16-21</b> estudadas em ensaios de citotoxicidade na ausência de luz .....                      | 19 |
| Figura 9. Estruturas das monometinocianinas <b>22-29</b> estudadas em ensaios de citotoxicidade na ausência de luz .....                     | 20 |
| Figura 10. Estruturas das metinocianinas <b>30-36</b> estudadas como potenciais antibacterianos .....  | 22 |
| Figura 11. Estruturas das cianinas <b>37a-d</b> , <b>38a-d</b> e <b>39a-c</b> estudadas como potenciais antibacterianos .....                | 23 |
| Figura 12. Estruturas das cianinas <b>40-42</b> avaliadas em ensaios de citometria de fluxo para estudos do ciclo celular e apoptose .....   | 26 |
| Figura 13. Estruturas das monometinocianinas <b>43</b> , <b>50</b> e <b>51</b> com possível utilização em citometria de fluxo .....          | 27 |
| Figura 14. Estrutura das pentametinocianinas <b>59-61</b> com possível aplicabilidade como fluoróforos em microscopia de fluorescência ..... | 28 |

|  |    |
|--|----|
| Figura 15. Estruturas das heptametinocianinas <b>62a-e</b> com possível utilização em microscopia confocal de fluorescência .....  | 29 |
| Figura 16. Estrutura das cianinas testadas <b>19</b> e <b>20</b> .....   | 35 |
| Figura 17. Estrutura da cianina utilizada como controlo positivo no ensaio na presença e ausência de radiação.....   | 43 |
| Figura 18. a) Curvas de IC <sub>50</sub> do controlo positivo e da cianina <b>16</b> na linha celular NHDF na ausência e presença de luz. b) Curvas de IC <sub>50</sub> do controlo positivo e da cianina <b>16</b> na linha celular Caco-2 na ausência e presença de luz.....   | 62 |
| Figura 19. Imagens de microscopia de fluorescência representativas da linha celular Caco-2 incubadas com a cianina <b>16</b> (b) e com a cianina <b>26</b> (c) numa concentração de 1 µM durante 24h (ambas apresentam sinal no canal verde). O controlo (a) foi marcado apenas com <i>Hoescht 33342</i> (canal azul)..... | 66 |



## Lista de Gráficos

Gráfico 1. *Screening* inicial de todos os compostos em estudo a uma concentração de 10  $\mu\text{M}$ , após uma exposição durante 72h. Os dados apresentados possuem os respectivos desvios padrão representativos de três experiências independentes realizadas. \*\*\*  $p < 0,001$  em relação ao controle (Teste *t* de *Student*) obtida em todos os ensaios ..... 53



# Lista de Tabelas

|  |    |
|--|----|
| Tabela 1. Tabela resumo representativa das estruturas das cianinas <b>1-31</b> em estudo.....  | 34 |
| Tabela 2. Ponto de fusão, rendimento e $\lambda_{\text{máx}}$ absorção UV-VIS para as cianinas <b>9-11</b> . .....   | 49 |
| Tabela 3. Sinais representativos de RMN $^1\text{H}$ das cianinas <b>9-11</b> e do respetivo sal precursor.<br>.....   | 49 |
| Tabela 4. Rendimento, ponto de fusão e o $\lambda_{\text{máx}}$ de absorção do espectro UV-VIS das cianinas <b>12 e 13</b> . .....   | 50 |
| Tabela 5. Sinais representativos de RMN $^1\text{H}$ das cianinas <b>12 e 13</b> e do respetivo sal precursor. ....  | 51 |
| Tabela 6. Valores de $\text{IC}_{50}$ em $\mu\text{M}$ das cianinas em estudo nas linhas celulares NHDF, Caco-2, MCF-7 e PC-3.....   | 58 |
| Tabela 7. Valores de seletividades dos compostos em estudo <b>14-16, 22 e 24-26</b> nas linhas celulares Caco-2, MCF-7 e PC-3. ....  | 59 |
| Tabela 8. Valores de $\text{IC}_{50}$ em $\mu\text{M}$ da cianina <b>16</b> e do controlo positivo na ausência e na presença de luz nas linhas celulares NHDF e Caco-2. .... | 61 |
| Tabela 9. Valores de seletividades dos compostos em estudo <b>16 e 26</b> na linha celular Caco-2. ....  | 62 |
| Tabela 10. Observação dos efeitos provocados pelos compostos <b>16 e 26</b> na linha celular Caco-2, na objetiva de 10x e na objetiva de 40x.....                            | 64 |
| Tabela 11. Resumo dos resultados dos estudos computacionais das diferentes absorções, características farmacocinéticas e excreções para os compostos <b>1-31</b> .....       | 70 |
| Tabela 12. Resumo dos resultados dos estudos computacionais da toxicidade, alerta <i>pains</i> e <i>druglikness</i> para os compostos <b>1-31</b> . ....                     | 71 |



# Lista de Abreviaturas, Acrónimos e Símbolos

|             |  |
|-------------|--|
| AB          | Antibiótico e antimicótico   |
| ADME        | Absorção, distribuição, metabolismo e excreção   |
| ADMET       | Absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade   |
| ATCC        | <i>American type culture collection</i>  |
| c.c.f       | Cromatografia de camada fina   |
| CTCs        | Células tumorais circulantes - do inglês, <i>Circulating tumor cells</i>   |
| CYP450      | Citocromo P450   |
| Cy-TPP      | Cianina trifenilfosfônio - do inglês, <i>Cyanine triphenylphosphonium</i>  |
| d           | Dupleto em RMN $^1\text{H}$  |
| DAKO        | Meio de montagem permanente  |
| DAPI        | 4060-diamidino-2-fenilindole - do inglês, <i>4060-diamidino-2-phenylindole</i>   |
| DMEM        | <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>  |
| DMSO        | Dimetilsulfóxido   |
| DMSO- $d_6$ | Dimetilsulfóxido hexadeuterado   |
| DNA         | Ácido desoxirribonucleico - do inglês, <i>deoxyribonucleic acid</i>  |
| ESOL        | Estimativa da solubilidade aquosa diretamente da estrutura molecular - do inglês, <i>Estimating aqueous solubility directly from molecular structure</i> |
| FBS         | Soro fetal bovino - do inglês, <i>Fetal bovine serum</i>   |
| FDA         | <i>Food and drug administration</i>  |
| FTIR        | Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier - do inglês, <i>Fourier transform infrared spectroscopy</i>                                  |
| Sext.       | Sexteto em $^1\text{H}$ RMN  |
| HEPES       | Ácido 2-[4-(2-hidroxiethyl)-1-piperazinil]-etanossulfônico - do inglês, <i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i>                        |
| IC $_{50}$  | Metade da concentração inibitória máxima - do inglês, <i>Half-maximal inhibitory concentration</i>   |
| ICG         | Indocianina verde - do inglês, <i>Green indocyanine</i>  |
| <i>J</i>    | Constante de acoplamento   |
| m           | Multiplete em RMN $^1\text{H}$   |
| MCF-7       | <i>Michigan Cancer Foundation-7 human breast adenocarcinoma cell line</i>  |
| MDR         | Resistência a múltiplos fármacos - do inglês, <i>Multiple drugs resistance</i>   |

|                     |  |
|---------------------|--|
| MTT                 | Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio - do inglês, <i>3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide</i> |
| NHDF                | Fibroblastos normais da derme humana - do inglês, <i>Normal human dermal fibroblasts</i>   |
| NIR                 | Infravermelho próximo - do inglês, <i>Near infrared</i>  |
| NIRF                | Fluorescência no infravermelho próximo - do inglês, <i>Near infrared fluorescence</i>  |
| Log S               | Solubilidade molar   |
| OATPs               | Polipéptidos orgânicos transportadores de aniões - do inglês, <i>Organic anion-transporting polypeptides</i>                                 |
| OATs                | Transportadores orgânicos aniônicos - do inglês, <i>Organic anion transporters</i>   |
| OCTS                | Transportadores orgânicos catiónicos - do inglês, <i>Organic cation transporters</i>   |
| Quint.              | Quinteto em RMN <sup>1</sup> H   |
| PAINS               | Compostos de interferência <i>pan-assay</i> - do inglês, <i>Pan-assay interference compounds</i>   |
| PBS                 | Tampão fosfato-salino - do inglês, <i>Phosphate-buffered saline</i>  |
| PC-3                | Linhas PC-3 de células humanas do cancro da próstata - do inglês, <i>PC-3 human prostate cancer cells</i>                                    |
| PDT                 | Terapia fotodinâmica - do inglês, <i>Photodynamic therapy</i>  |
| p.f.                | Ponto de fusão   |
| PI                  | Iodeto de propídio - do inglês, <i>Propidium iodide</i>  |
| PS                  | Fotossensibilizador - do inglês, <i>Photosensitizer</i>  |
| P-gp                | Glicoproteína-P - do inglês, <i>P-glycoprotein</i>   |
| REA                 | Relação estrutura-atividade  |
| RMN <sup>1</sup> H  | Ressonância magnética nuclear de próton  |
| RMN <sup>13</sup> C | Ressonância magnética nuclear de carbono-13  |
| RNA                 | Ácido ribonucleico – do inglês, <i>ribonucleic acid</i>  |
| ROS                 | Espécies reativas de oxigénio - do inglês, <i>Reactive oxygen species</i>  |
| RPMI                | <i>Roswell Park Memorial Institute</i>   |
| s                   | Singlete em RMN <sup>1</sup> H   |
| SD                  | Desvio padrão - do inglês, <i>Standard deviation</i>   |
| SMILES              | Especificação simplificada do sistema de entrada molecular - do inglês, <i>Simplified molecular input line entry specification</i>           |
| SP                  | Antibiótico  |
| S <sub>0</sub>      | Estado fundamental   |

|                          |   |
|--------------------------|---|
| $S_1$                    | Estado excitado   |
| t                        | Tripleto em RMN $^1\text{H}$                                      |
| TGI                      | Trato gastrointestinal  |
| TPP                      | Pirofosfato de tiamina - do inglês, <i>Thiamine pyrophosphate</i> |
| $T_1$                    | Estado tripleto excitado  |
| UV-VIS                   | Ultravioleta-visível  |
| $\lambda_{\text{máx}}$ , | Comprimento de onda máximo  |
| $\delta$                 | Desvio padrão   |
| $\nu_{\text{máx}}$       | Frequência máxima de banda de absorção                            |
| $\eta$                   | Rendimento reacional  |
| 5-FU                     | 5- Fluorouracilo  |
| 7-AAD                    | 7-Actinomicina D - do inglês, <i>7-actinomycin D</i>              |



# Capítulo 1



# 1. Introdução

## 1.1. Cancro e Abordagens Terapêuticas

O cancro é uma das doenças que está constantemente a ameaçar a saúde e, mesmo, a vida humana. A cada ano, aproximadamente, 5% da população mundial é diagnosticada com cancro e, cerca de 25% dos pacientes previamente diagnosticados acabam por falecer [1]. A sua elevada taxa de morbilidade e mortalidade têm vindo a ser uma preocupação cada vez maior [1-3]. As razões pelas quais estas taxas crescem rapidamente a nível mundial são, ainda, alvo de muitos estudos, tendo em conta a dada complexidade das mesmas. No entanto, tanto o crescimento exponencial da população, assim como o seu envelhecimento têm contribuindo para esta premissa [2].

Nos dias de hoje, existem vários fatores de risco para o cancro, tais como uma baixa atividade física, dietas inadequadas, tabaco, exposição a radiações e hormonas, entre outros. Para além destes fatores ambientais, esta doença pode estar também associada a mutações genéticas hereditárias, que levam as células a uma proliferação anormal, excessiva e descontrolada, normalmente causada por problemas na sinalização celular ou na apoptose [3]. Todavia, quando se realiza um diagnóstico atempado e eficiente, assim como um tratamento adequado e eficaz as probabilidades de cura aumentam significativamente [1].

Atualmente, são vários os tratamentos associados ao cancro, entre eles encontram-se a quimioterapia (mais usual), a radioterapia e a terapia fotodinâmica (PDT - do inglês, *Photodynamic therapy*), sendo as duas primeiras combináveis. Estas duas estratégias demonstraram ser eficazes em muitos casos, no entanto, existem alguns problemas, principalmente na quimioterapia, como a distribuição sistémica não específica do agente antitumoral, ocorrendo danos em tecidos saudáveis e, o desenvolvimento de resistência a diferentes fármacos [3]. Já a PDT, é um método relativamente recente utilizado como terapia contra o cancro e apresenta várias potenciais vantagens quando comparado, por exemplo, com a quimioterapia ou com a radioterapia [3-5]. No entanto, ainda tem pouca utilização, comparativamente com ambas as terapias convencionais já referidas [6]. As cianinas constituem um dos grupos de compostos mais utilizados na PDT, uma vez que absorvem na região do infravermelho próximo (NIR - do inglês, *Near infrared*) [1]. Esta terapia será descrita de um modo mais pormenorizado na secção 1.2.3.2.1 desta dissertação.

## 1.2. Cianinas

### 1.2.1. Definição e Propriedades Gerais

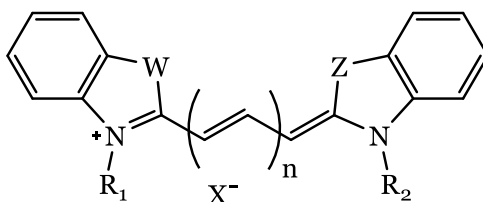
Em 1856, *Greville* deu origem ao processo de síntese das cianinas, cuja designação vem do grego *Kianos*. Esta denominação deve-se ao facto dos primeiros compostos sintetizados na época exibirem uma coloração azul [7]. Para além das obtidas por via sintética, também existem cianinas de origem natural. No entanto, estas apenas foram observadas mais tarde, primeiramente por *Wylér* e, posteriormente, por *Musso*, nos finais dos anos 60 e 70, respetivamente [8].

Uma cianina é composta por dois anéis heterocíclicos unidos por uma cadeia polimetínica, contendo um número ímpar de carbonos. Cada anel inclui, no mínimo, um átomo de nitrogénio na sua estrutura [7-9]. Estes corantes apresentam duas estruturas catiónicas, o que o lhes confere a capacidade de funcionarem como híbridos de ressonância [8, 9]. As formas de ressonância surgem devido à deslocalização de eletrões, entre os dois átomos de nitrogénio. Um destes átomos possui um par de eletrões livres e o outro exibe uma carga positiva, o que proporciona este “movimento” de eletrões. Como a cadeia metínica que liga os dois anéis é composta por ligações duplas conjugadas e, ela própria, possui uma deficiência de eletrões possibilita então a deslocalização de eletrões entre os nitrogénios [8, 9]. Desta forma, o par de eletrões livres funciona como centro básico da molécula, enquanto a carga positiva funciona como centro ácido [9]. A interação de ressonância destes corantes torna-os compostos orgânicos complexos, com um espectro de bandas de absorção intensas e estreitas, desde a região do visível até próximo do infravermelho, responsável pela produção de cores intensas. [5, 9].

A evolução de sensibilização espectral das cianinas tem vindo a ser alvo de investigação, tendo em conta do espectro eletrónico de absorção no visível, geralmente em soluções de etanol a 95% [5, 8]. Normalmente, as cianinas polimetínicas possuem bandas de absorção na zona do visível, no entanto, o aumento das suas cadeias metínicas provoca desvios batocrómicos, isto é, as suas bandas de absorção passam da zona do visível para zona do infravermelho, conseguindo ultrapassar os 1000 nm, no caso de algumas heptametincianinas [5]. Assim, os corantes que têm bandas de absorção em comprimentos de onda maiores são corantes com desvios batocrómicos para a gama do vermelho e/ou NIR e são considerados melhores sensibilizadores espectrais. Já os que absorvem luz em bandas de comprimentos de onda mais baixos têm menor sensibilização espectral e, por sua vez, são denominados por corantes com desvios hipsocrómicos para a gama dos azuis [5, 8].

A sensibilização espectral está intimamente relacionada com a estrutura e a natureza dos corantes. Por exemplo, quanto maior for a cadeia conjugada da cianina, maior será a sensibilização espectral da mesma, tal como corantes que tenham duas vias de transferência de cargas conjugadas são melhores sensibilizadores do que os que apenas têm uma via [5].

As cianinas podem-se subdividir consoante o número de grupos metino que constituem a cadeia entre os dois anéis (Figura 1). No caso de estar presente apenas um grupo metino ( $n=0$ ) trata-se de uma monometinocianina ou cianina, como são exemplos o corante azul quinolina e o vermelho etil. Já com três grupos metino ( $n=1$ ) denomina-se como trimetinocianina ou carbocianina, tendo como exemplos os corantes pinacianole e criptocianina. Com cinco grupos metino ( $n=2$ ) presentes a cianina classifica-se como pentametinocianina ou dicarbocianina, com sete ( $n=3$ ) trata-se de uma heptametinocianina ou tricarbocianina, e assim sucessivamente [8].



$W=Z$  ou  $W \neq Z = NR, O, S, -CH=CH-, C(CH_3)_2, \dots$

$X^- = \text{Tos}^-, I^-, Br^-, Cl^-, ClO_4^-, \dots$

$n=0$  Monometinocianina

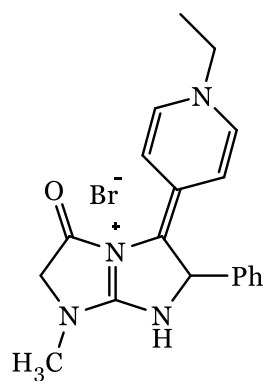
$n=1$  Trimetinocianina

$n=2$  Pentametinocianina

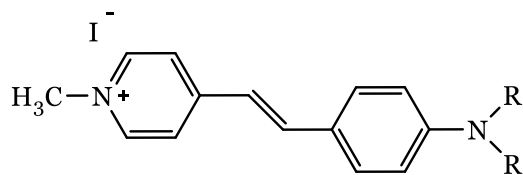
$n=3$  Heptametinocianina, ...

Figura 1. Estrutura geral das cianinas [7].

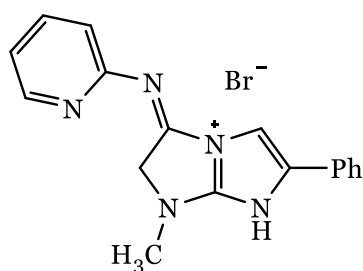
Além dos diferentes tipos de cianinas anteriormente referidos em função do comprimento da cadeia metínica, as cianinas podem subdividir-se, ainda, de acordo com os grupos dador e aceitador de elétrons em diversas classes tais como, apocianina, hemicianina, azacianina, merocianina e cianinas esquarílicas (Figura 2) [8, 10].



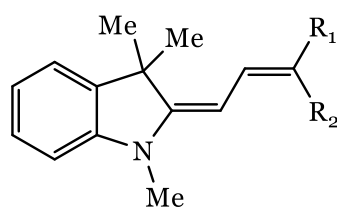
Apocianina



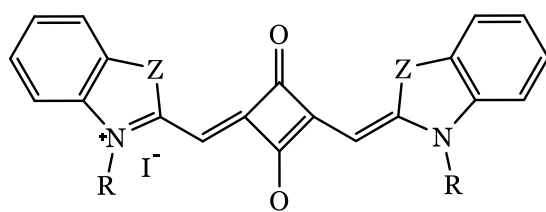
Hemicianina



Azacianina



Merocianina



Cianina esquarílica

Figura 2. Exemplos representativos de apocianinas [11], hemicianinas [12], azacianinas [11], merocianinas [13] e cianinas esquarílicas [7].

Nas apocianinas, ambos os anéis se encontram ligados diretamente, não existindo grupos metino a ligá-los. Este tipo de cianina tem sido alvo de poucos estudos, sendo que só se conhecem dois compostos desta classe, a eritoapocianina (vermelha) e o seu isómero xantoapocianina (amarela).

As hemicianinas, tal como as cianinas possuem dois átomos de nitrogénio ligados por uma cadeia conjugada com ligações duplas, no entanto, um dos átomos de nitrogénio não pertence ao anel heterocíclico.

O corante azacianina também pode ser denominado por aza-hemicianina. Todavia, a informação associada a este composto é diminuta.

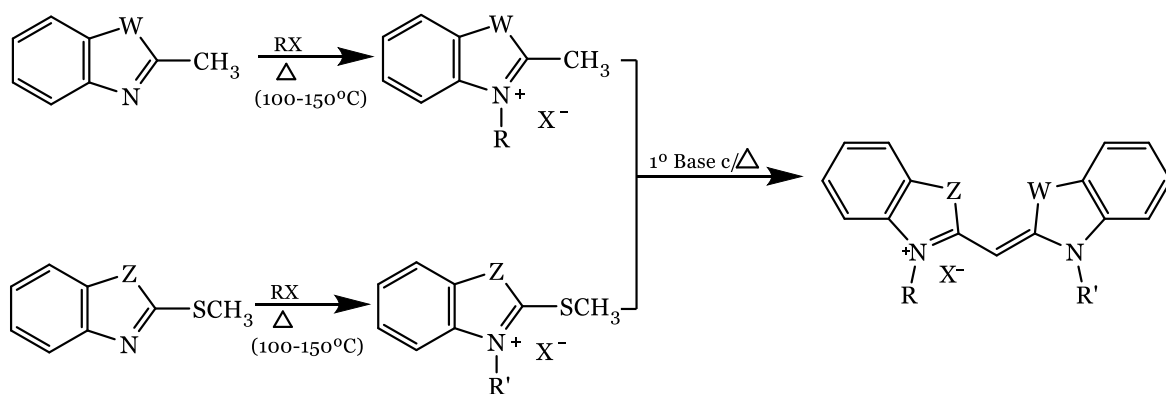
As merocianinas possuem um grupo carbonilo cíclico (dentro do anel) ou acíclico (fora do anel), que pode ser substituído pelo seu análogo tiocarbonilo. Consoante o número de grupos metino presentes existem diferentes classificações, no caso de não possuir nenhum grupo metino ( $n=0$ ) os anéis estão ligados diretamente, denominando-se por merocianina simples. Quando possui um grupo metino ( $n=1$ ) classifica-se como dimetinerocianina, com dois grupos ( $n=2$ ) tetrametinerocianina e com três grupos ( $n=3$ ) hexametinerocianina, e assim sucessivamente.

As cianinas esquarílicas são compostos 1,3-dissubstituídos resultantes da condensação de um equivalente do ácido esquárico com dois equivalentes molares de um aromático doador de elétrons [8].

### **1.2.2. Principais Métodos de Síntese**

A síntese de cianinas envolve, de um modo geral, um precursor chave (sais de amónio quaternário) que, quando em contacto com bases, formam bases metilénicas nucleofílicas (bases de Fischer). Os precursores chave possuem grupos metilo ativos (acídicos) nas posições 2 e/ou 4 e derivam de uma base heterocíclica, como o 2-metilpirimidina, 2-metilquinolina, 4-metilpirimidina ou 4-metilquinolina [8, 9]. No entanto, para cada classe de cianina existe um método geral de preparação.

A síntese de cianinas engloba habitualmente reações de adição nucleofílica simples, seguidas de reações de eliminação, através de desprotonações e/ou remoções de grupos abandonantes. Na preparação de monometinocianinas normalmente é utilizado o método do tioalquilo [7] (Esquema 1), embora o método (Esquema 2) descrito por *Fisher e Hamer* seja uma alternativa na síntese de monometinocianinas simétricas [14]. Nas trimetinocianinas simétricas, o método do orto-éster é o mais usual (Esquema 3), enquanto nas assimétricas destaca-se a abordagem da difenilformamida (Esquema 4) [7]. A síntese de pentametinocianinas é realizada através do método do 1-anilino-3-anilprop-1-eno, é aplicável tanto às simétricas como às assimétricas (Esquema 5) [7]. Tanto as pentametinocianinas, como as heptametinocianinas possuem baixa foto estabilidade, pelo que são comumente introduzidos carbociclos na cadeia insaturada, de forma a rigidificar a estrutura e, conseqüentemente, aumentar a estabilidade da mesma (Esquema 6) [5, 7, 15, 16].

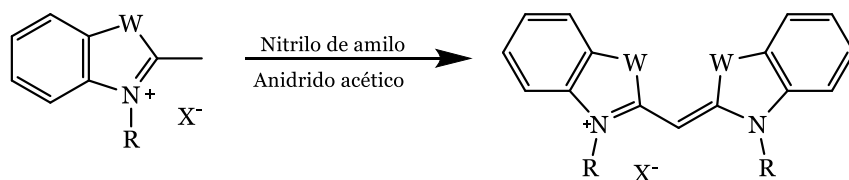


W=Z ou W≠Z = NR, O, S, -CH=CH-, C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, ...

X<sup>-</sup> = Tos<sup>-</sup>, I<sup>-</sup>, Br<sup>-</sup>, Cl<sup>-</sup>, ClO<sub>4</sub><sup>-</sup>, ...

R = CH<sub>3</sub>, (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, (CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>3</sub>, ...

Esquema 1. Método de síntese de monometinocianinas (método do tioalquilo) [7].

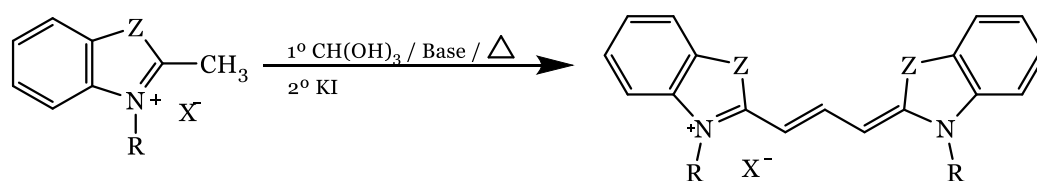


W=Z ou W≠Z = NR, O, S, -CH=CH-, C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, ...

X<sup>-</sup> = Tos<sup>-</sup>, I<sup>-</sup>, Br<sup>-</sup>, Cl<sup>-</sup>, ClO<sub>4</sub><sup>-</sup>, ...

R = CH<sub>3</sub>, (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, (CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>3</sub>, ...

Esquema 2. Método de síntese das monometinocianinas simétricas (método descrito por *Fisher e Hamer*) [14].

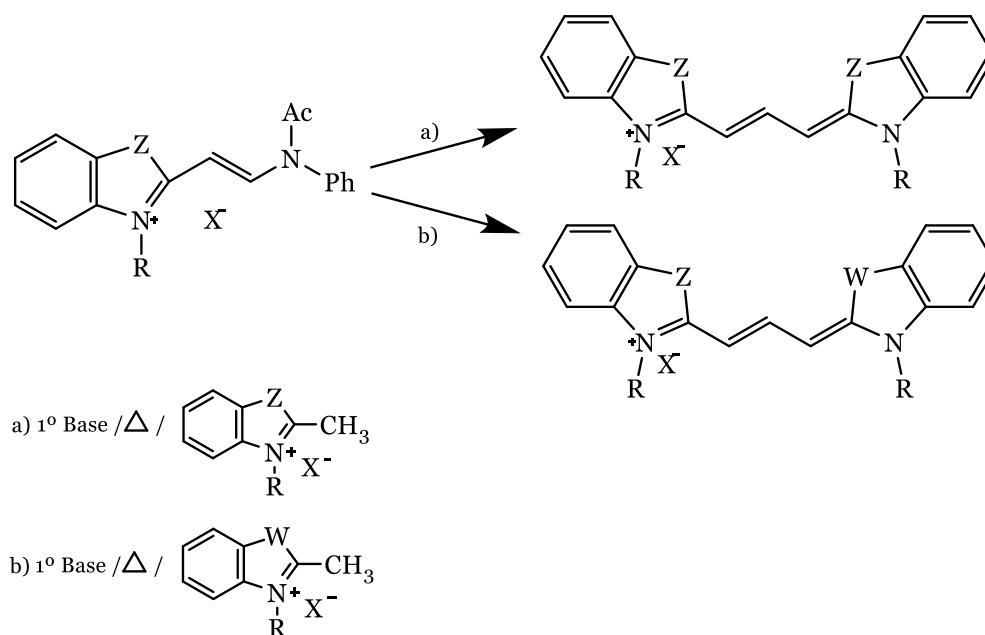


W=Z ou W≠Z = NR, O, S, -CH=CH-, C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, ...

X<sup>-</sup> = Tos<sup>-</sup>, I<sup>-</sup>, Br<sup>-</sup>, Cl<sup>-</sup>, ClO<sub>4</sub><sup>-</sup>, ...

R = CH<sub>3</sub>, (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, (CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>3</sub>, ...

Esquema 3. Método de síntese de trimetinocianinas simétricas (método do *orto*-éster) [7].

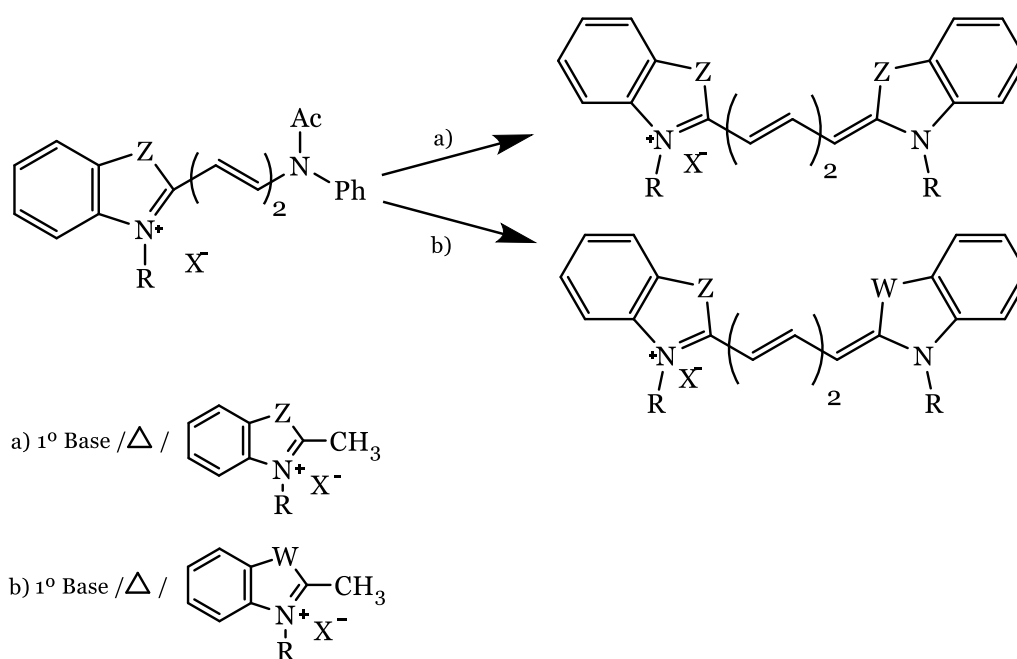


W=Z ou W $\neq$ Z = NR, O, S, -CH=CH-, C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, ...

X<sup>-</sup> = Tos<sup>-</sup>, I<sup>-</sup>, Br<sup>-</sup>, Cl<sup>-</sup>, ClO<sub>4</sub><sup>-</sup>, ...

R = CH<sub>3</sub>, (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, (CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>3</sub>, ...

Esquema 4. Método de síntese de trimetinoquininas simétricas e assimétricas (método da difenilformamida) [7].

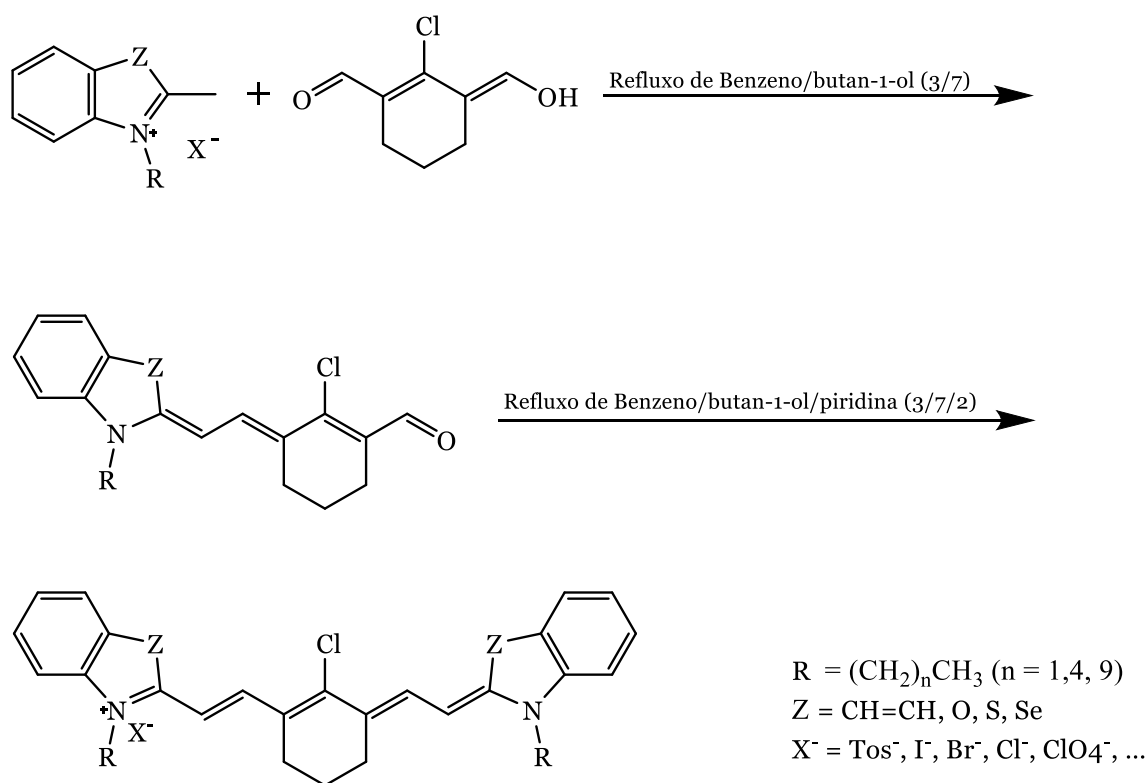


W=Z ou W $\neq$ Z = NR, O, S, -CH=CH-, C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, ...

X<sup>-</sup> = Tos<sup>-</sup>, I<sup>-</sup>, Br<sup>-</sup>, Cl<sup>-</sup>, ClO<sub>4</sub><sup>-</sup>, ...

R = CH<sub>3</sub>, (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, (CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>3</sub>, ...

Esquema 5. Método de síntese de pentametinoquininas simétricas e assimétricas (método de 1-anilino-3-anilprop-1-eno) [7].



Esquema 6. Exemplo representativo do método de síntese de cloroheptametincianinas simétricas e assimétricas [16].

### 1.2.3. Principais Aplicações

Devido às suas características e à diversidade de funções que desempenham, as cianinas têm vindo a demonstrar diversos usos e aplicações em campos da ciência bastante distintos, como a biologia, biotecnologia, bioquímica, física, engenharia, tecnologia, farmácia e medicina [5, 8, 15].

#### 1.2.3.1. Não Biológicas

Estes corantes possuem as mais diversas aplicações em diferentes áreas industriais, como na indústria têxtil, de materiais semicondutores, ou ainda, na indústria fotográfica. Outros exemplos das suas aplicações são a sua utilização como inibidores da corrosão, em ingredientes cosméticos, em tintas de impressão, em impressoras a laser ou em discos de gravação ótica (CD-R e DVD-R) [5, 8, 9, 15].

#### 1.2.3.2. Biológicas

##### 1.2.3.2.1. Ação Anticancerígena

A PDT é uma técnica bastante eficaz, seletiva, não invasiva e segura, o que permite um uso repetido da mesma [4, 17, 18]. Potencia os efeitos terapêuticos dos fármacos utilizados, uma

vez que permite a sua acumulação no local tumoral. Para além disto, a PDT possibilita o tratamento de tumores situados em locais mais profundos, devido ao alcance da luz NIR [1, 4]. Consiste, de uma forma muito resumida, na produção de espécies citotóxicas, geradas a partir de luz irradiada, de modo a causar danos nas células cancerígenas [17]. Envolve componentes essenciais não tóxicos, um fotossensibilizador (PS - do inglês, *Photosensitizer*) e uma fonte de luz visível ou NIR, que ao interagirem de forma sinérgica conseguem provocar danos celulares de duas formas, uma dependente de oxigénio (mais comum) e outra independente do mesmo [1, 17].

Um PS é uma molécula fotossensível que pode acumular-se em células ou tecidos específicos [1]. Para estes conseguirem penetrar mais facilmente os tecidos devem absorver dentro da chamada “janela” terapêutica, isto é, devem absorver essencialmente dentro do intervalo de 650-850 nm, uma vez que fontes luminosas com emissão em comprimentos de onda mais elevados, têm a capacidade de penetrar a pele a níveis mais profundos. Quando menor for o comprimento de onda a que o PS absorve, mais difícil será de atravessar os tecidos alvo [19]. Um PS ao ser irradiado a determinados comprimentos de onda absorve um eletrão e, consequentemente, passa do estado fundamental ( $S_0$ ) para o seu estado excitado ( $S_1$ ). Como seria de esperar, o estado de singlete excitado é muito instável, pelo que, ou perde energia e volta ao seu estado fundamental ou transforma-se no estado de tripleto excitado ( $T_1$ ), ocorrendo um processo denominado por cruzamento intersistemas [1, 18]. No caso de se dar a passagem do  $S_1$  para o  $S_0$ , a perda de energia gera uma emissão de luz visível, através de um processo de fluorescência ou calor. No entanto, o estado  $T_1$  pode ainda sofrer três tipos de reações diferentes [18]. As reações do tipo 1 e 2 são as responsáveis pelos danos celulares causados nas células cancerígenas, sendo que a formação de espécies reativas de oxigénio (ROS - do inglês, *Reactive oxygen species*) criados a partir da reação do tipo 2 ( $^1O_2$ ) podem provocar danos através da via apoptótica, necrótica ou por vias associadas à autofagia (Figura 3) [17, 18]. Nas reações do tipo 1, o  $T_1$  pode reagir com uma molécula de forma completamente independente de oxigénio [18].

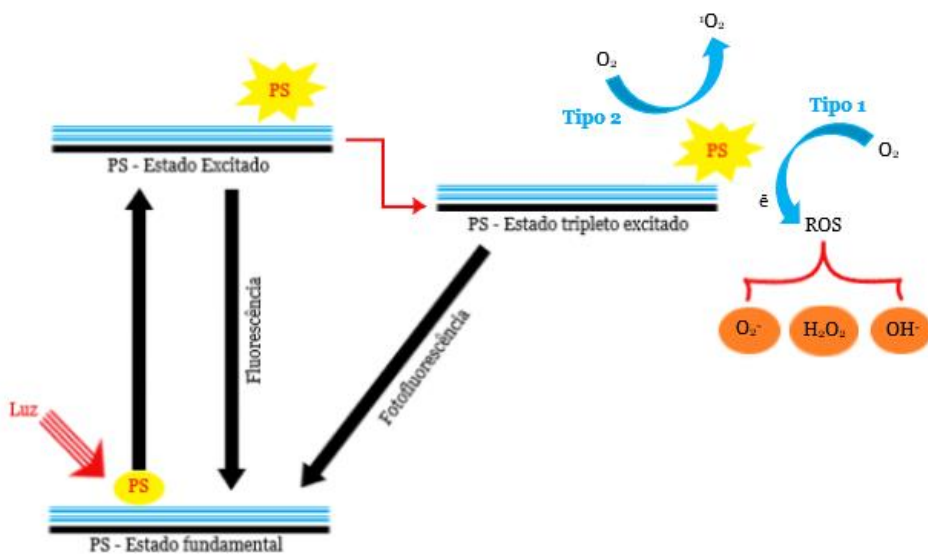


Figura 3. Esquema geral da PDT associado ao diagrama de Jablonski, adaptado de Swamyet al., 2020 [1].

Existem diferentes cianinas que já foram testadas e, que apresentaram resultados bastante positivos neste tipo de terapia, devido às propriedades fotofísicas das mesmas. Alguns exemplos representativos, incluem as heptametincianinas IR-780, IR-783, IR-808, MHI-14 e a indocianina verde (ICG - do inglês, *Green indocyanine*) (Figura 4) [20].

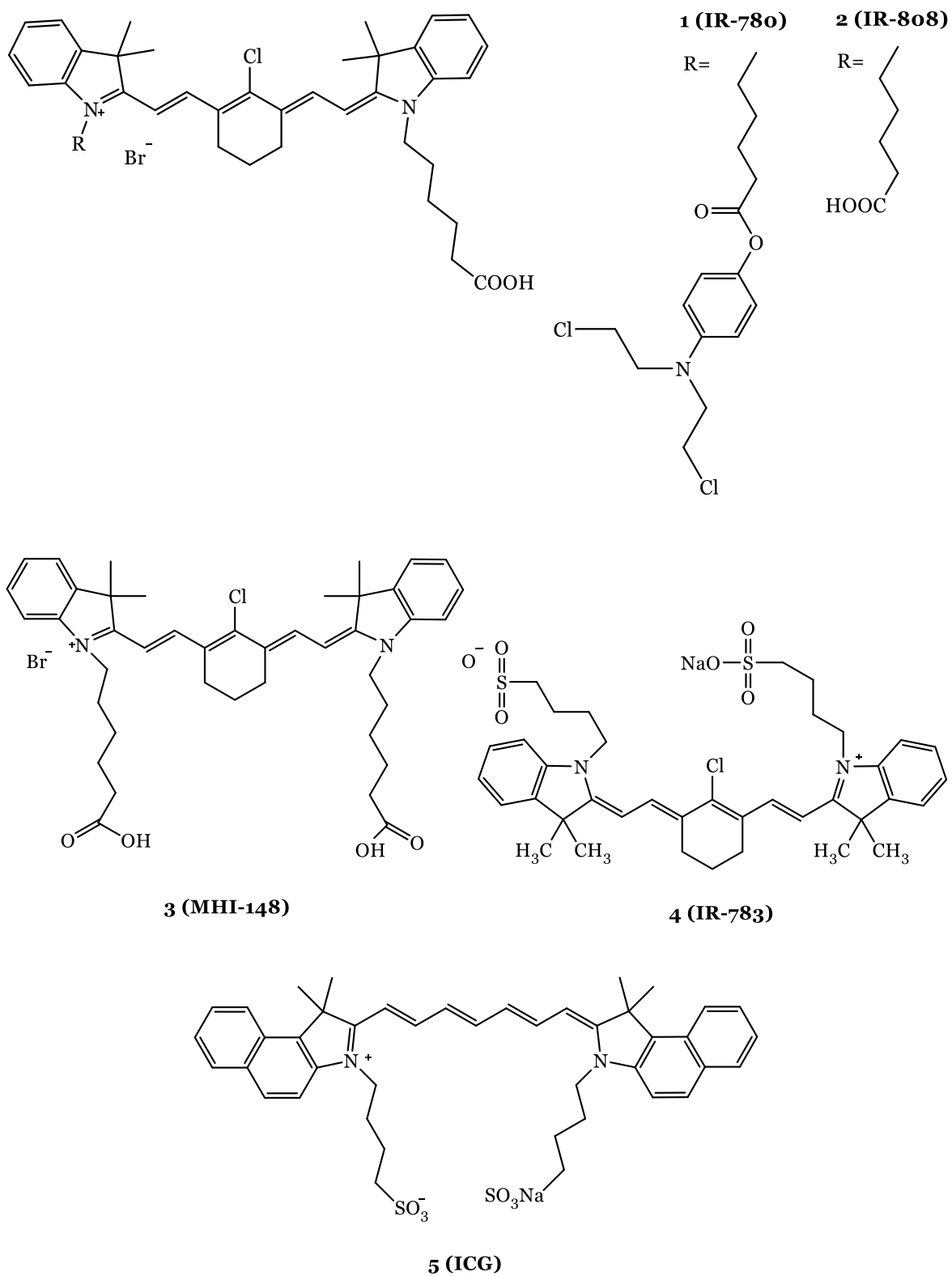


Figura 4. Estruturas das cianinas anticancerígenas **1-5** aplicadas na PDT [20].

Estes compostos funcionam como agentes fluorescentes no infravermelho próximo (NIRF - do inglês, *Near infrared fluorescence*) e acumulam-se no tumor, libertando ROS aquando da irradiação do local, como referido anteriormente. Estes radicais podem destruir o tumor

de forma direta ou indiretamente. Neste último caso, começam por inibir o crescimento do tumor através da destruição da neovascularização, para além de que podem, também, criar um ambiente inflamatório que leva à morte das células cancerígenas [20].

Estes corantes entram nas células através de um sistema de transporte ativo, isto é, dependente de ATP, pelo que as células que não são viáveis, não conseguem produzir ATP e, conseqüentemente, perdem a capacidade de internalizar os compostos. Deste modo, é possível avaliar-se a viabilidade celular a partir da aptidão destas para absorverem os corantes. De um modo mais específico, quem conduz os corantes NIRF até ao interior das células cancerígenas são os polipéptidos orgânicos transportadores de aniões (OATPs - do inglês, *Organic anion-transporting polypeptides*). Existem vários tipos e subtipos de OATPs, no entanto, as células cancerígenas apresentam uma maior expressão de determinada família deste transportador, o que faz com que haja uma captação preferencial destes corantes em relação às células saudáveis [20].

Um dos locais preferenciais de acumulação das heptametincianinas nas células tumorais é nas mitocôndrias, sendo que alguns compostos apresentam mesmo seletividade para este organelo celular, como é o caso da IR-780 (Figura 4). Ao acumular-se nas mitocôndrias aumenta a produção de ROS e leva à despolarização do potencial da membrana mitocondrial, o que induz a toxicidade mitocondrial e, conseqüentemente, a apoptose destas mesmas células [20]. Quanto mais elevada for a lipofilicidade do composto, maiores são os efeitos provocados, segundo *Luo et al* [21].

A ICG (Figura 4) foi a primeira cianina que viu aprovada a sua utilização, em 1958, pela FDA (do inglês, *Food and drug administration*) e, desde então, tem vindo a ser largamente investigada para várias aplicações clínicas [17]. Pode ser administrada através de uma injeção intravenosa e após chegar à corrente sanguínea liga-se a proteínas plasmáticas e é excretada maioritariamente pelo fígado, podendo aparecer na bÍlis na forma não conjugada [18]. A ICG é considerada um dos corantes NIR convencionais, uma vez que o seu máximo de emissão se encontra aos 800 nm [17], ocorrendo inibição da proliferação celular tumoral aquando da irradiação por luz NIR [20]. Existem ainda estudos que evidenciam que a ICG está intrinsecamente associada a estados de hipoxia tumoral. Contudo, esta cianina possui várias limitações na sua utilização, uma vez que apresenta pouca estabilidade e rápida decomposição em soluções polares [20].

A cianina IR-780 (Figura 4) possui uma estrutura semelhante à ICG, no entanto, apresenta algumas vantagens em relação a esta, designadamente uma intensidade de fluorescência mais elevada e uma maior fotoestabilidade, devido à presença do anel rígido de

clorociclohexanilo na cadeia heptametínica [17]. Esta cianina possui também algumas aplicações clínicas, como a marcação de tumores localizados em tecidos bastante profundos, devido à sua elevada sensibilidade e à acumulação preferencial em mitocôndrias de células cancerígenas. Tanto este corante, como IR-783, IR-808 e MHI-148 (Figura 4) são heptametinocianinas heterocíclicas com propriedades ótimas para a aplicação em estudos de imagem e de localização dos tumores.

Já no estudo apresentado por *Dichiara et al.* foram testadas diferentes cianinas, incluindo carbocianinas (KF570 e HM118) e merocianinas (FBF-749) utilizando PDT e avaliando a citotoxicidade na ausência de luz em diferentes linhas celulares (Figura 5) [18]. Os resultados obtidos na citotoxicidade na ausência de luz demonstraram que nenhum dos compostos testados apresenta toxicidade. Enquanto, nos ensaios da PDT a cianina HM118 (7) exibiu um efeito fototóxico elevado, quando comparada com as restantes. [18].

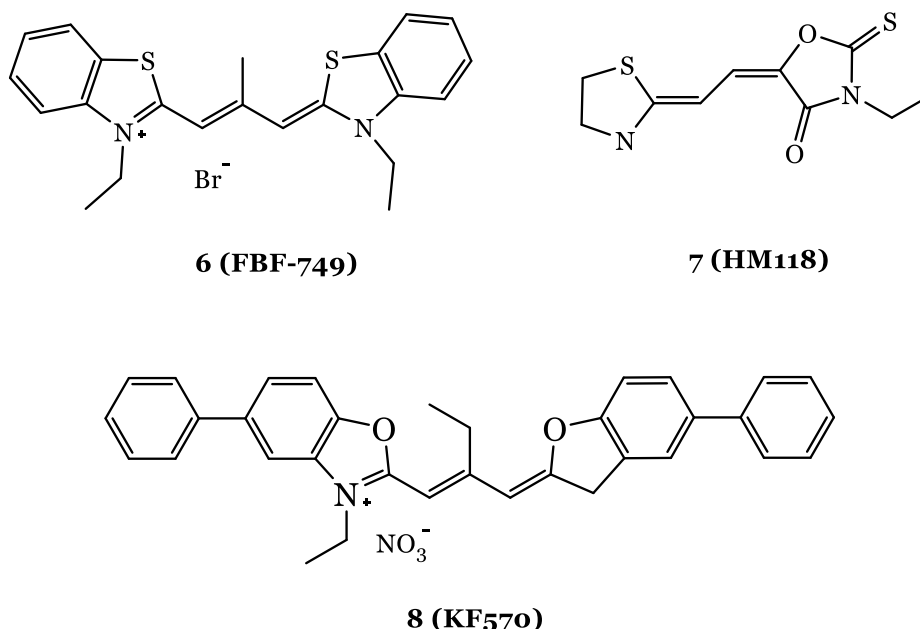


Figura 5. Estruturas das cianinas anticancerígenas **6-8** aplicadas em PDT [18].

As cianinas esquarílicas são outro tipo de cianinas cuja utilização está muito associada à PDT. Estas possuem características tais como, capacidade de absorção intensa nas regiões visível e NIR, elevado rendimento quântico de fluorescência exibido pelas mesmas, excelente aptidão para a formação de ROS e, ainda, elevada fotoestabilidade. Um exemplo representativo da utilização desta classe de corantes na PDT é o estudo apresentado por Lucinda V. Reis e colaboradores [6].

Neste estudo foram sintetizadas diversas cianinas esquarílicas, com anéis de indolenina, contendo ou não átomos de enxofre no anel esquarílico (Figura 6), as quais foram testadas na ausência e na presença de radiação fotodinâmica aos 0,7 e 14 min e calculados os respectivos valores de metade da concentração inibitória máxima ( $IC_{50}$  – do inglês, *Half-maximal inhibitory concentration*) [6]. Dentro do grupo de cianinas estudadas foi interessante observar que as cianinas **9** e **10** (Figura 6) apresentaram baixo potencial citotóxico ( $IC_{50} > 5 \mu M$ ) na ausência de luz, nas duas linhas celulares testadas (Caco-2 e HepG2). Todavia, quando irradiadas, o efeito fototerapêutico das mesmas aumenta significativamente, reduzindo a viabilidade celular consideravelmente. Com a cianina **10** observou-se, ainda, que quanto maior for o tempo de exposição à radiação, maior será o efeito citotóxico exibido. No caso dos compostos **11** e **12**, os resultados obtidos não demonstraram efeitos fotodinâmicos eficientes em nenhum dos compostos. Já com os corantes **13** e **14** verificaram-se efeitos bastante promissores em ambas as linhas celulares utilizadas. Ao final de 24h, na linha celular Caco-2, a cianina **13** demonstra um  $IC_{50}$  de 0,075  $\mu M$ , enquanto a cianina **14** apresentou um  $IC_{50}$  de 0,048  $\mu M$ ; já na linha celular HepG2, a cianina **13** exibiu um  $IC_{50}$  de 0,105  $\mu M$  e a cianina **14** um  $IC_{50}$  de 0,084  $\mu M$ . Na ausência de radiação, o efeito antiproliferativo de mesmas demonstrou ser bastante baixo, exceto em concentrações muito elevadas. Como na presença de luz, a diminuição da viabilidade celular em ambas as linhas celulares foi estatisticamente significativa, estes compostos podem vir a ser utilizados posteriormente como PS eficientes, mesmo a baixas concentrações, sendo que, entre todos os compostos testados, a cianina **14** foi a que se apresentou mais proeminente [6].

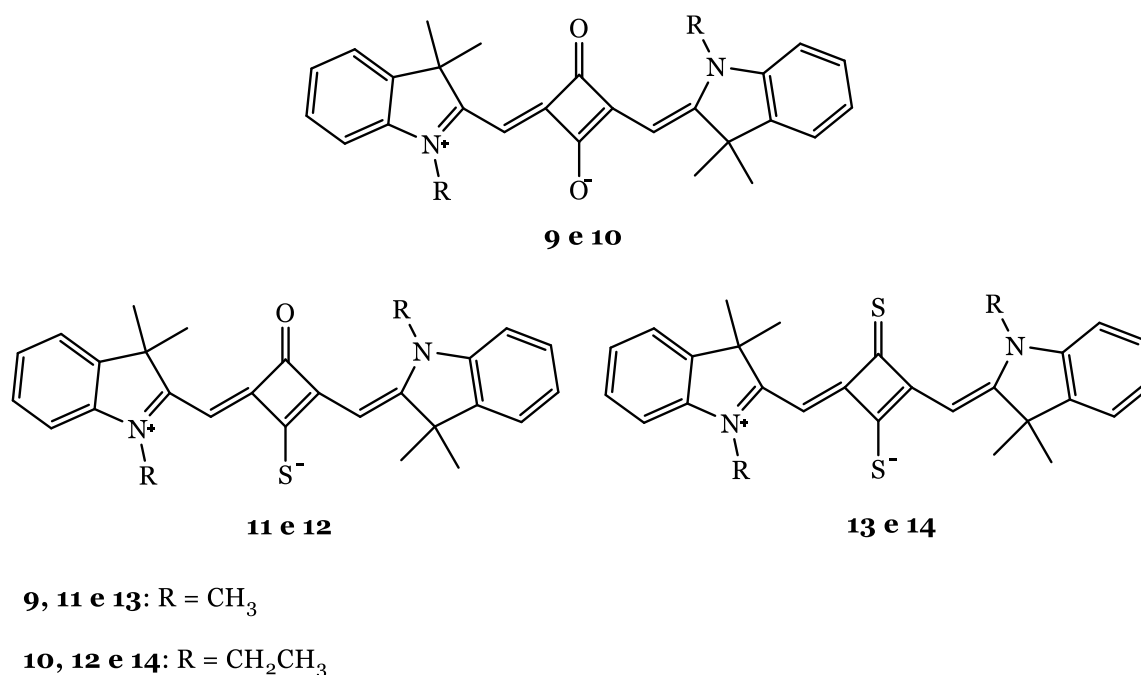


Figura 6. Estruturas das cianinas esquarílicas **9-14** [6].

Apesar de ser um tópico não muito explorado, existem alguns estudos que evidenciam a capacidade das cianinas serem utilizadas como agentes anticancerígenos ou agentes teranósticos [17, 18, 20, 22]. Dentro destes estudos, foi avaliado o potencial anticancerígeno destes corantes através da citotoxicidade apresentada em estudos na presença e na ausência de luz.

Algumas cianinas também já foram utilizadas como agentes anticancerígenos em estudos com nanopartículas ou nanosondas, isto é, as cianinas são incorporadas nestas partículas com o objetivo de atingir o tecido alvo mais rapidamente e de forma mais eficiente, acumulando-se no mesmo. Posteriormente, quando se faz incidir um laser de luz NIR sob o local onde as nanopartículas se acumularam, as cianinas até agora contidas no seu interior são libertadas e inicia-se o tratamento. Exemplos deste tipo de estudos são os de *Bhattarai & Dai*, 2017, *Gao et al.*, 2016 e *Yi et al.*, 2014 em que são aplicadas cianinas como a IR820 e a IR825 [17, 23, 24].

O potencial citotóxico das cianinas pode ser avaliado através de vários métodos como a citometria de fluxo, a microscopia de fluorescência e o método de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT - do inglês, *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*). Apesar de pouco explorado existem já alguns estudos nesse âmbito, apresentando-se de seguida alguns exemplos representativos.

*Ning* e colaboradores sintetizaram uma nova cianina, a heptametincianina trifenílfosfônio (Cy-TPP - do inglês, Cyanine triphenylphosphonium) (Figura 7), através da junção de um análogo da IR-780 com uma porção de pirofosfato de tiamina (TPP - do inglês, *Thiamine pyrophosphate*)[22].

De seguida, foram estudadas as suas características bioquímicas e biofísicas, assim como, a sua atividade anticancerígena e a sua localização a nível celular. Utilizaram um análogo da cianina IR-780, e não a própria cianina, uma vez que esta já foi submetida a estudos anteriores onde se conclui que possui uma atividade anticancerígena bastante baixa. Depois de testada, a nova cianina sintetizada Cy-TPP mostrou ter um potencial citotóxico bastante elevado. Realizaram-se teste de viabilidade celular numa linha celular cancerígena, em que o IC<sub>50</sub> apresentado foi de 3,04 µM, o que indica que o composto em estudo inibe significativamente a proliferação das células cancerígenas. Mostrou ainda que pode funcionar como um agente multifuncional para a obtenção de imagens de mitocôndrias, uma vez que se acumula preferencialmente neste organelo e sua captação é facilitada pela presença de cargas positivas na sua estrutura. Para além disto, tem vindo a ser alvo de

estudos no sentido de reverter a resistência a múltiplos fármacos (MDR - do inglês, *Multiple drugs resistance*), muito comum em tratamentos de cancro [22].

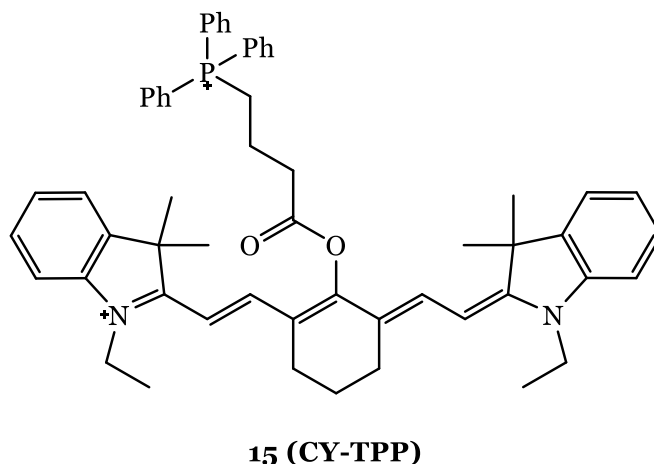


Figura 7. Estrutura da cianina **15** (CY-TPP) estudada em ensaios de citotoxicidade na ausência de luz [22].

Outro estudo que inclui a avaliação de heptametincianinas foi o realizado por *Tang* e colaboradores, em que foi estudado o potencial da cianina IR-783 (Figura 4). Este corante demonstrou possuir diversas vantagens, incluindo a capacidade de obtenção de imagens utilizadas para o tratamento cancerígeno, uma vez que possui elevada seletividade para as células tumorais. Além disso, em estudos por citometria de fluxo, foi verificado que reduz substancialmente a viabilidade celular das mesmas e induz a apoptose após 24h de incubação. Outros ensaios realizados indicam que esta cianina se acumula, de forma preferencial, em mitocôndrias de células cancerígenas, o que permite reconhecer alguns dos OATPs maioritariamente expressos nestas. No entanto, o mecanismo de ação molecular deste composto não foi explicitado [25].

*Crnolatac et al.* sintetizaram seis monometincianinas diferentes (Figura 8), por forma a testarem o seu potencial citotóxico na ausência de luz. Depois de testadas em diferentes linhas celulares, as cianinas **16** e **17** não demonstraram potencial citotóxico em nenhuma das linhas tumorais. Posto isto, foram consideradas não citotóxicas, pelo que podem ser estudadas futuramente para outras aplicações biológicas, nomeadamente como biomarcadores. Apesar de já apresentarem uma forte fluorescência esta aumenta quando ligadas a macromoléculas biológicas, desta forma, podem ser aplicadas, por exemplo, na motorização de processos celulares. Para além disto, estudos de microscopia confocal de fluorescência também demonstraram que se acumulam exclusivamente em mitocôndrias. Já as cianinas **18-21** apresentam efeitos antiproliferativos relevantes. No entanto, as cianinas **20** e **21** exibem um potencial citotóxico mais elevado e uma boa seletividade dependendo da linha celular utilizada e da natureza da cadeia fosfónica. De uma forma

generalizada, todos os compostos (**16-21**) provocaram alterações morfológicas a nível celular, sendo que a dimensão das células diminuiu e o número absoluto destas também diminuiu quando comparado com as células não tratadas. Todos os resultados e conclusões apresentadas nestes estudos foram obtidos através de ensaios de MTT na ausência de luz e de microscopia confocal de fluorescência [26].

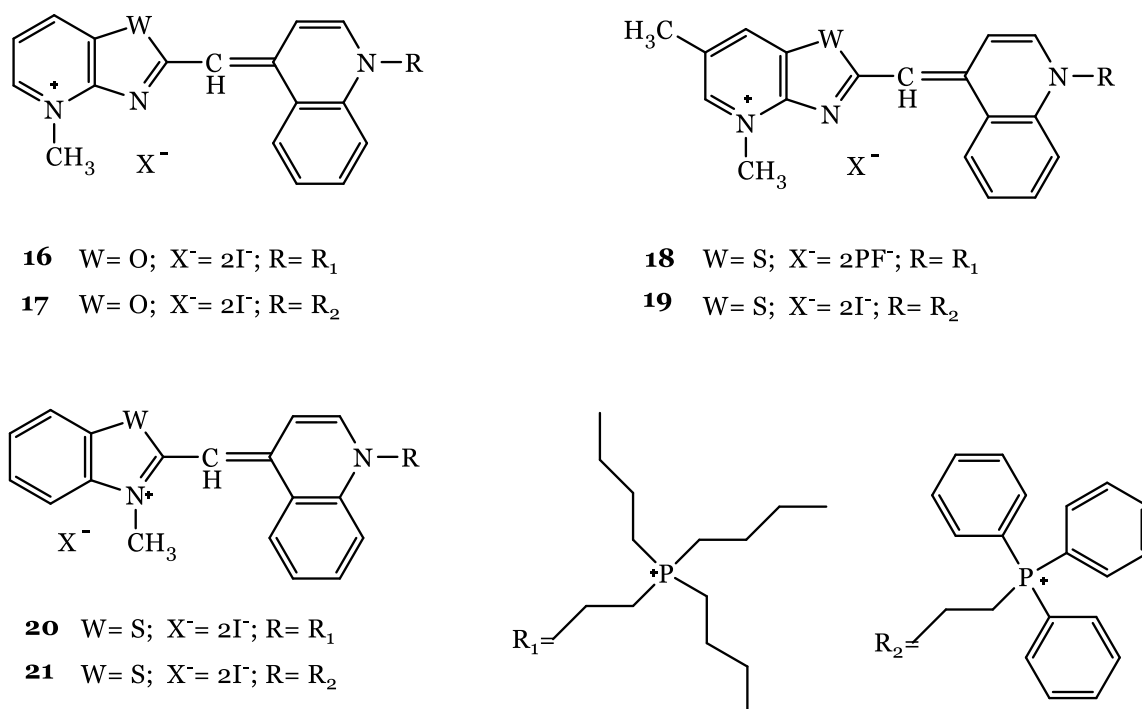


Figura 8. Estrutura das monometinocianinas **16-21** estudadas em ensaios de citotoxicidade na ausência de luz [26].

Outro estudo envolvendo monometinocianinas é o de *Glavaš-Obrovac et al.* em que foram testados oito compostos diferentes, **22-29** (Figura 9). Todos os corantes apresentaram efeitos citotóxicos, no entanto, estes efeitos dependem de vários fatores, como a linha celular em questão (tumoral ou não), da concentração do composto a ser testado e da estrutura do mesmo. A atividade antiproliferativa foi definida a partir da IC<sub>50</sub> obtidos em todos os compostos. As cianinas **22-25** exibiram os melhores potenciais antiproliferativos e todas apresentaram seletividade para as células cancerígenas, sendo que o composto **25** apresentou um efeito citotóxico fortemente dependente do tipo celular em questão, possuindo uma seletividade mais elevada para as células tumorais em relação às células não tumorais. Os compostos de **26-29** apesar de apresentarem citotoxicidade bastante baixa podem ser aplicados, por exemplo, como sondas celulares fluorescentes. Os estudos de microscopia de fluorescência indicaram que estes compostos se interagem com o ácido desoxirribonucleico (DNA – do inglês, *deoxyribonucleic acid*) mitocondrial, ácidos

ribonucleicos (RNAs – do inglês, *ribonucleic acid*) e com outras macromoléculas do citoplasma, no entanto, mais estudos são requeridos [27].

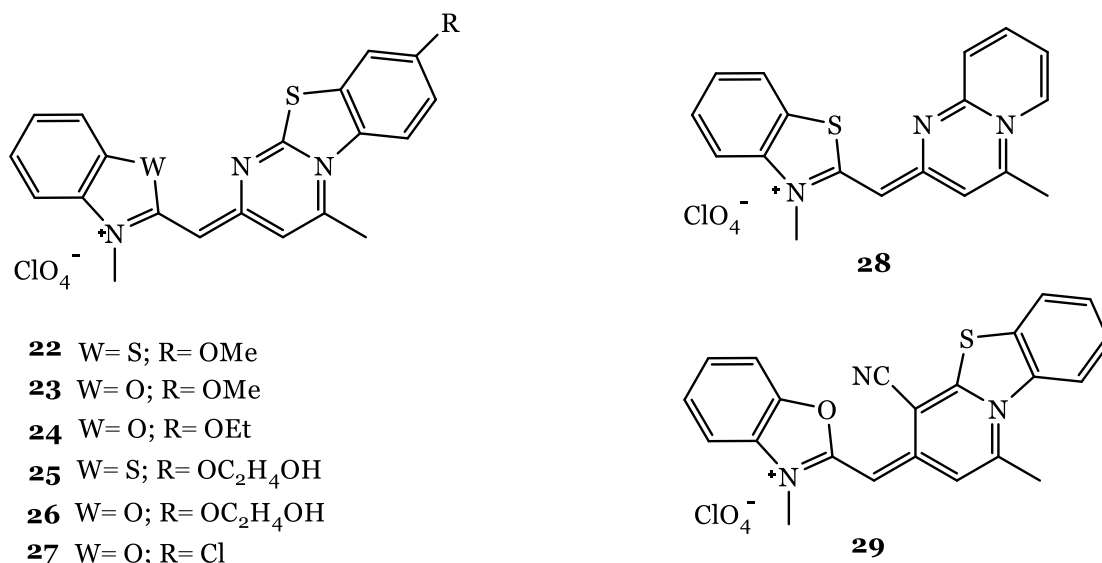


Figura 9. Estruturas das monometinocianinas **22-29** estudadas em ensaios de citotoxicidade na ausência de luz [27].

No caso do estudo realizado por *Kurutos et al.* foram testadas cianinas dicatiônicas assimétricas. Estes corantes são duplamente carregados, o que pode criar alguns problemas na entrada do composto para o ambiente celular. Assim, mediante estudos de microscopia confocal de fluorescência e citometria de fluxo, tentaram determinar o modo de entrada. Os resultados demonstraram que, para além de conseguirem entrar na célula, acumulavam-se nas suas mitocôndrias. Apesar de a captação para o interior da célula não ser um problema, nenhum dos corantes apresentou efeitos significativos na proliferação celular, pelo que estas cianinas podem vir também a ser utilizadas como sondas fluorescentes, mas não como agentes antiproliferativos [28].

#### 1.2.3.2.2. Outras Aplicações Biológicas

A evolução do espectro de sensibilização destes corantes permitiu a sua utilização na indústria de material fotossensível, sendo que uma das aplicações mais importantes é a PDT. Têm, também, sido importantes para a criação de novas técnicas de imagem molecular, sendo utilizados como marcadores fluorescentes, nomeadamente na deteção de ácidos nucleicos e proteínas ou na obtenção de imagens de diversos organelos celulares [5, 8, 9]. Podem funcionar como corantes histológicos ou corantes para polímeros, tal como têm a capacidade de afetar hormonalmente o crescimento de plantas. Para além disto, podem ser utilizados como agentes bactericidas e fungicidas [5, 8]. Existe, ainda, um

pequeno grupo de cianinas lipofílicas que tem vindo a ser imprescindíveis para estudos na área da biofísica, mais especificamente em estudos relacionados com membranas celulares. Estes corantes específicos conseguem marcar tanto as bicamadas lipídicas como as bolsas hidrofóbicas de lipoproteínas [29].

Outra aplicação que tem vindo ser bastante explorada nos últimos anos é o potencial antibacteriano das cianinas. Nos dias que correm, o uso excessivo de antibióticos tem levado a que muitas bactérias infecciosas se tornem resistentes aos antibacterianos de uso clínico [30]. Posto isto, torna-se imperativo o desenvolvimento de novas estratégias no combate a infeções causadas por bactérias. Assim, a criação de novos fármacos antibacterianos e antimicrobiais mais potentes e seletivos, levou à investigação de novos compostos nesta área, nomeadamente as cianinas. Já existem alguns estudos neste contexto, seguindo-se alguns exemplos representativos.

No estudo apresentado por *Fadda, Rasha e El-Mekawy*, 2013, foi testado o potencial anticancerígeno e antibacteriano de metinocianinas (**30-36**) sintetizadas a partir de uma nova classe de sais de amónio quaternário (Figura 10). Para avaliar o potencial antibacteriano destes compostos foi realizado um screening em três microrganismos diferentes (Gram negativos e positivos). As cianinas **30**, **31** e **32** foram os que demonstraram melhores resultados, com uma atividade antimicrobiana elevada [31].

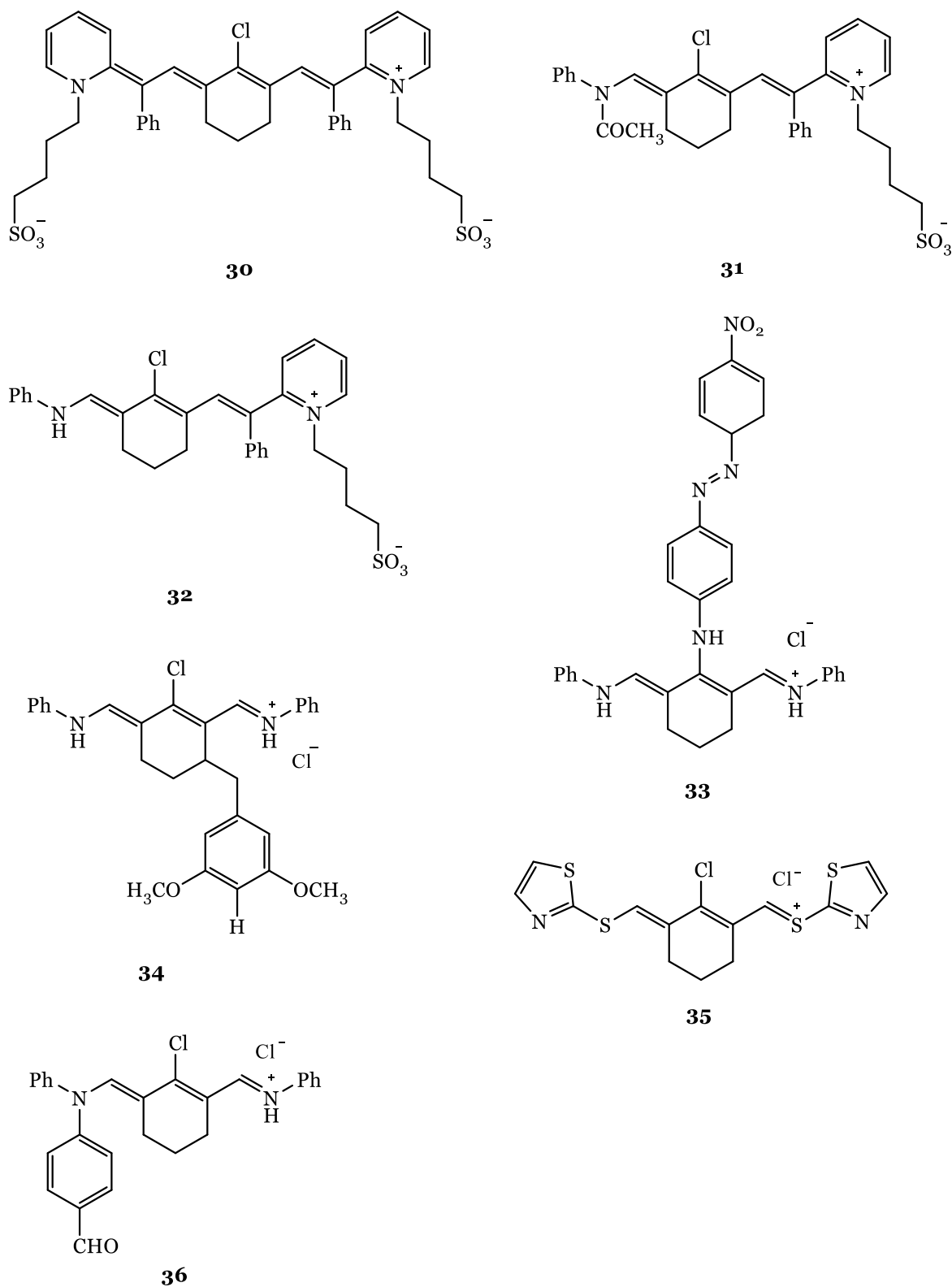


Figura 10. Estruturas das metinocianinas **30-36** estudadas como potenciais antibacterianos [31].

Outro estudo feito a cerca dos potenciais antiproliferativos das cianinas foi o realizado por *Eissa et al.*, em que foi sintetizado um novo anel heterocíclico precursor de monometinocianinas (**37a-c**) e trimetinocianinas (**38a-d**, **39a-c**) (Figura 11). Depois de sintetizadas as novas cianinas foram testadas como potenciais agentes antibacterianos.

Todas as cianinas exibiram um elevado potencial antibacteriano contra as estirpes bacterianas em estudo, sendo, por isso, fortes candidatos a estudos adicionais, incluindo farmacocinéticos. As trimetinocianinas foram as que demonstraram os melhores resultados, possivelmente devido ao comprimento da cadeia metínica. Quanto maior for a cadeia, maior será a transferência de cargas eletrônicas, o que facilita a interação com os organismos, aumentando assim a atividade antibacteriana [32].

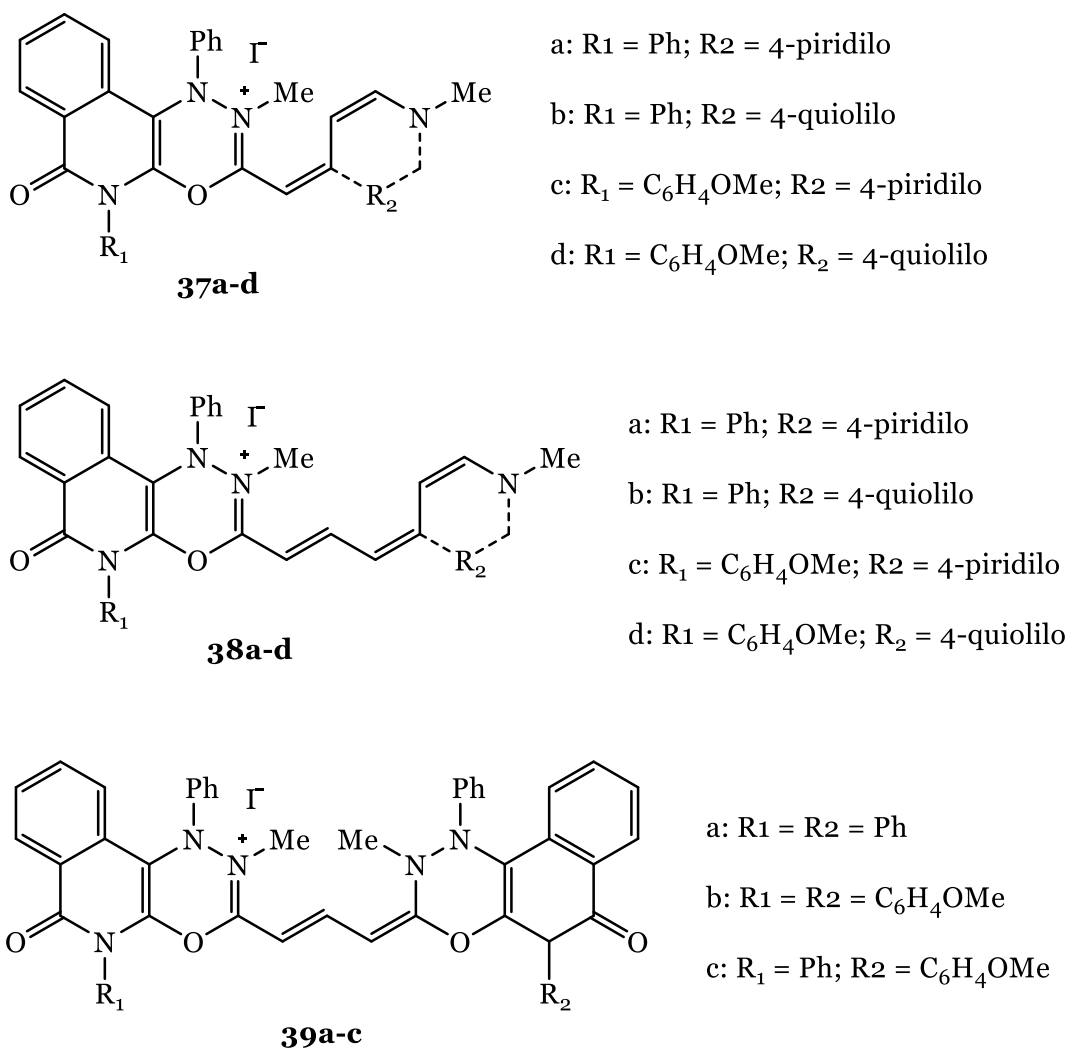


Figura 11. Estruturas das cianinas **37a-d**, **38a-d** e **39a-c** estudadas como potenciais antibacterianos [32].

#### 1.2.4. Cianinas como Sondas Fluorescentes – enfoque na citometria de fluxo e microscopia de fluorescência

Atualmente, o uso de corantes fluorescentes em estudos biológicos tem se tornado num campo amplamente investigado. Para a realização destes estudos recorrem-se, normalmente, a métodos analíticos de quantificação e métodos de detecção de constituintes em amostras biológicas, nomeadamente a citometria de fluxo e a microscopia de fluorescência [33].

De um modo mais específico, a citometria de fluxo e a microscopia confocal de fluorescência permitem uma monitorização em grande escala de subpopulações celulares e, possibilitam, também, estudar as diferentes funcionalidades celulares. Para além disto, são métodos bastante seguros, sem radiação, não necessitam de uma grande concentração de agentes de marcação, possuem uma boa seletividade e repetibilidade, o que permite uma elevada velocidade de deteção das moléculas alvo [34].

Como já foi descrito anteriormente, as cianinas conseguem emitir luz através de um processo de fluorescência, possuindo espectros de absorção e emissão em comprimentos de onda que vão desde o visível até aos 850 nm (infravermelho), o que permite a aplicação destes compostos em métodos analíticos como os referidos [33]. Para além de funcionarem como sondas fluorescentes, também possuem elevada afinidade para determinadas estruturas celulares, estabilidade fotoquímica e capacidade de formar agregados ou precipitar juntamente com as proteínas marcadas, propriedades interessantes para a aplicação destes corantes em estudos biológicos [33, 35]. No entanto, uma questão bastante importante no uso de novos compostos neste tipo de métodos é a sua capacidade de penetração nas células. De um modo geral, quantas mais cargas positivas apresentarem na sua estrutura, menor é a sua capacidade de permearem, por difusão passiva ou por transporte ativo, as membranas plasmáticas de células vivas, ou seja, de células com a membrana celular íntegra. Assim, coram apenas as células mortas ou apoptóticas, uma vez que estas exibem mudanças morfológicas que levam à perda da integridade das suas membranas plasmáticas. Por outro lado, corantes com um só carga positiva na sua estrutura, como é o caso da maioria das cianinas, têm a capacidade de penetrar facilmente a membrana plasmática de células vivas [34].

#### 1.2.4.1. Citometria de Fluxo

A citometria de fluxo é um método bastante útil para a distinção dos diferentes tipos celulares, respetivas estruturas, análises bioquímicas, entre outros processos [36, 37]. Uma das suas primeiras aplicações foi na quantificação de DNA através da ligação de diferentes corantes a este material genético, de forma a identificar e definir o ciclo celular. Os corantes que se ligam ao DNA são denominados por agentes de ligação, entre os quais são exemplo o iodeto de propídio (PI - do inglês, *propidium iodide*), a 7-actinomicina D (7-AAD - do inglês, *7-actinomycin D*), o *Hoechst 33342*, o TO-PRO-3 e o 4060-diamidino-2-fenilindole (DAPI - do inglês, *4060-diamidino-2-phenylindole*). Estes ligam-se de forma proporcional ao DNA existente nas células, marcando-o, o que permite a distinção das diferentes fases que constituem o ciclo celular, S, G1 e G2. No caso da fase G2, as células possuem o seu

material genético duplicado, pelo que emitem o dobro da fluorescência quando comparadas com a fase G1 [34].

Para além da identificação das diferentes fases do ciclo celular, a citometria de fluxo pode ser ainda aplicada na deteção da apoptose celular. Neste caso, os marcadores utilizados conseguem corar o DNA mais facilmente, uma vez que estas células sofrem mudanças morfológicas, como a diminuição da integridade da membrana plasmática. A nível comercial, existem já vários kits para a deteção da apoptose que são baseados no princípio da interação entre a anexina V e a fosfatidilserina expressa na superfície celular, que no caso das células apoptóticas se encontra exposta. [34].

Diversas aplicações da citometria de fluxo têm vindo a ser estudadas, tanto a nível investigacional, como a nível prático, por exemplo, para monitorização de células tumorais circulantes (CTCs - do inglês, *Circulating tumor cells*) em doentes oncológicos. Nesta técnica as células de interesse são identificadas com marcadores fluorescentes que ao serem expostos a um laser, emitem fluorescência, a qual será detetada e analisada posteriormente, obtendo-se assim, informações químicas e físicas acerca das células de interesse. [37].

Com a evolução, tanto das pesquisas, como das técnicas necessárias para as mesmas, surge cada vez mais a necessidade de desenvolver novos fluoróforos, por forma a ver melhoradas as suas propriedades. Neste âmbito, as cianinas parecem ser uma boa aposta, uma vez que apresentam fluorescência que varia, desde do verde ao vermelho, dependendo do seu  $\lambda_{\text{máx}}$  de emissão. Este tipo de corante baseado em cianinas pode ser utilizado como um tipo de sonda fluorescente não covalentes na deteção de ácidos nucleicos, o que possui elevada aplicabilidade tanto em pesquisas, como em análises clínicas. Posto isto, foram sintetizadas novas cianinas de forma a aprimorar a sua seletividade para os ácidos nucleicos, aumentando a sua utilidade na análise do ciclo celular. A sua síntese teve como principal objetivo aumentar a sua penetração nas membranas celulares, bem como a sua interação não covalente com o DNA. Ao serem produzidas cianinas com estas novas características, foi possível aperfeiçoar o sinal emitido, obtendo-se resultados quantitativos diretos de DNA mais fiáveis [34].

Têm surgido vários estudos nesta área, por exemplo, o de *Nikolova et al.* em que foram sintetizadas cianinas análogas de tiazole laranja com uma porção de quinazolina, (Figura 12). Estas monometinocianinas foram testadas para serem utilizadas tanto no estudo do ciclo celular como da apoptose. Quanto à sua utilização na deteção das diferentes fases do ciclo celular, ambos os corantes experimentais **40-41** apresentaram um ótimo potencial

para a avaliação da quantidade de células presentes nas diferentes fases, S, G1 e G2, quando comparados com o PI, que é comumente utilizado para este procedimento. No entanto, apenas apresentaram bons resultados quando aplicados em células previamente fixas, o que indica que apenas penetram células mortas. A distinção entre células vivas e mortas pelo uso destes corantes é facilmente demonstrada pela coloração brilhante apresentada pelas células mortas, em relação às células vivas não coradas. Na detecção da apoptose os corantes **40-41** demonstraram elevada especificidade para o DNA, uma vez que a uma concentração menor ( $2 \times 10^{-9}$  M), estes apresentavam resultados similares aos obtidos com um kit comercial, que envolvia o uso de PI a uma concentração de  $3,75 \times 10^{-6}$  M. Assim, estas cianinas exibem bons resultados a concentração molar menor, em cerca de duas a três vezes, em relação à concentração recomendada para o PI, utilizado como padrão.

Uma boa seletividade para as moléculas alvo pode ser inferida pelas baixas concentrações de saturação determinadas. Quanto ao corante **42**, este também marca células mortas mesmo em concentrações mais baixas que os anteriores ( $1 \times 10^{-13}$  M) o que pode ser explicado por possíveis ligações inespecíficas ao DNA, não sendo, portanto, uma boa aposta para este tipo de método [34].

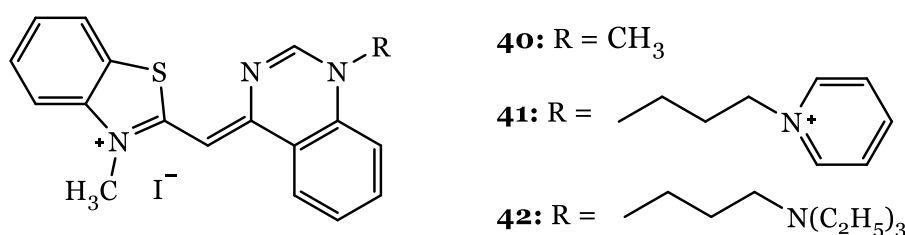


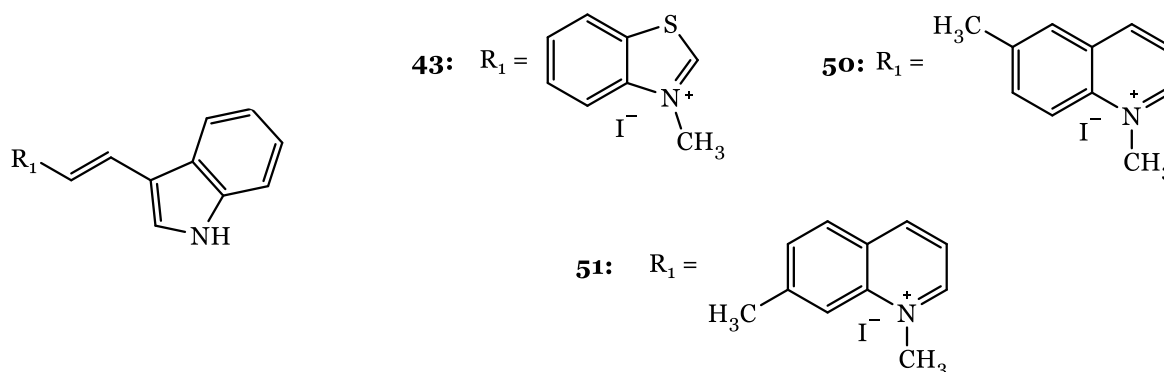
Figura 12. Estruturas das cianinas **40-42** avaliadas em ensaios de citometria de fluxo para estudos do ciclo celular e apoptose [34].

Num outro estudo, *Zhang et al.*, testou as cianinas **43-58** (Figura 13) como possíveis sondas fluorescentes em citometria de fluxo. Neste estudo, apenas os compostos **43**, **50** e **51** apresentaram uma intensidade forte de fluorescência e, portanto, maior potencial para serem posteriormente aplicadas em citometria. Compararam-se resultados destes três corantes com os resultados obtidos com o PI e com o corante comercial *SYBR Green I*, todos expostos às mesmas condições experimentais. As células foram marcadas com os corantes **43**, **50** e **51**, respectivamente, e de seguida contrastadas com o PI. Neste ensaio, as cianinas sintetizadas demonstraram muito pouca fluorescência (quase inexistente), apenas foi possível visualizar a fluorescência emitida pela marcação do PI. O mesmo não aconteceu quando marcaram as células com o corante comercial *SYBR Green I*, que mesmo depois de contrastadas com o PI continuavam a emitir a sua fluorescência. No entanto, quando se

recorreram a ensaios com células vivas, estes três corantes apresentaram resultados muito mais precisos da taxa de sobrevivência celular, que nos restantes ensaios. Posto isto, os investigadores deste estudo propõem a junção dos compostos com o PI, para se realizarem testes de viabilidade celular recorrendo à citometria de fluxo [36].

Figura 13. Estruturas das monometinocianinas **43**, **50** e **51** com possível utilização em citometria de fluxo [36].

#### 1.2.4.2. Microscopia de Fluorescência



A microscopia de fluorescência pode ter diversas aplicabilidades em vários campos da ciência, incluindo o rastreamento de compostos, dinâmica de diferentes moléculas, proliferação e diferenciação celulares, permite ainda ter acesso a processos que envolvam ácidos nucleicos e proteínas, uma vez que os fluoróforos conseguem incorporar-se no núcleo das células [39].

Neste método é necessária a utilização de compostos que emitam fluorescência quando expostos a radiação, denominados por fluoróforos. Assim, ao fazer incidir um feixe de luz, num determinado comprimento de onda, identificam-se as diferentes estruturas celulares [39].

Algumas cianinas foram sintetizadas e testadas de forma a avaliar o seu potencial como fluoróforos para, posteriormente, poderem ser aplicadas em microscopia confocal de fluorescência. Alguns estudos já foram realizados nesta área, como é o caso do efetuado por *Saha et al.*, em que foram sintetizadas as pentametincianinas, **59-61** (Figura 14). Para iniciarem o estudo realizaram uma curta incubação (10 minutos) com o composto **50** a uma concentração de  $0,7 \mu\text{M}$  numa linha celular cancerígena (A549) fixada, tendo confirmado a rápida internalização dos corantes e uma fluorescência NIR bastante intensa. A cianina **61** foi utilizada como controlo. Tanto a cianina **59** como a **60** apresentaram boa fotoestabilidade e não exibiram fotobranqueamento significativo aquando de a uma utilização prolongada para a obtenção de uma imagem confocal [38].

Neste estudo, foi ainda testada a seletividade destes corantes e, de forma a confirmar que o principal alvo destes seria a mitocôndria, foram realizados diferentes experiências [38]. Primeiramente, incubaram as cianinas em células fixadas, juntamente com uma sonda comercial de rastreamento específica de mitocôndrias (*MitoTracker Red*). Com ambos os corantes em estudo obtiveram-se imagens com níveis de colocação com a sonda comercial utilizada, o que comprova a seletividade destes para o referido organelo. Para se verificar a sua seletividade para as mitocôndrias em relação à possível seletividade para os lisossomas os autores recorreram a outra sonda comercial, desta vez específica para lisossomas (*LysoTracker Green*). Os resultados obtidos indicam uma sobreposição menos intensa de fluorescência, o que confirma a seletividade acima referida. Assim, ambos os corantes 59 e 60 podem constituir estratégias eficientes para marcar e localizar seletivamente as mitocôndrias [38].

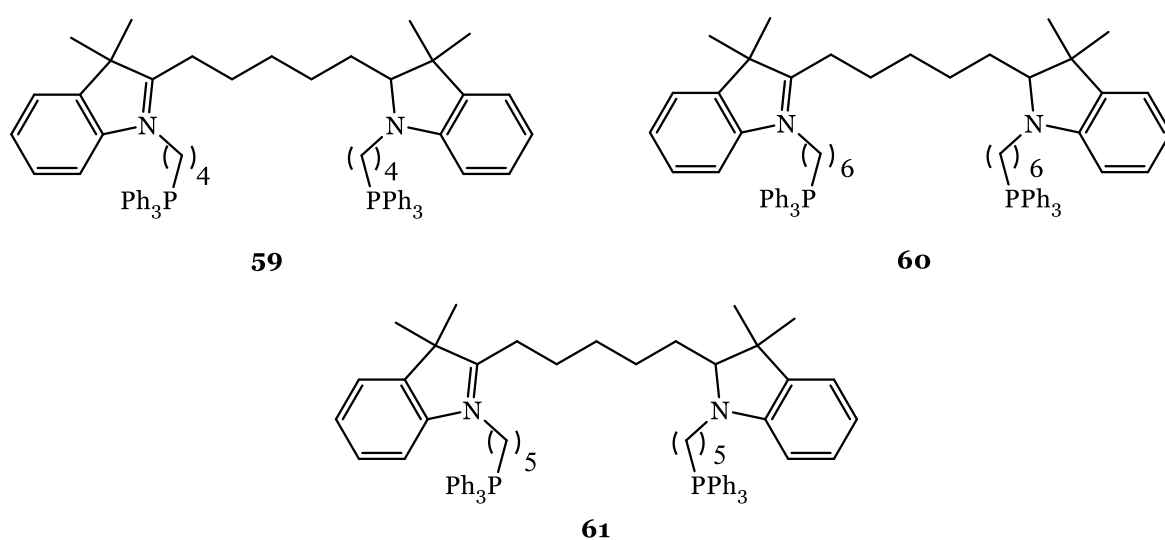


Figura 14. Estrutura das pentametincianinas **59-61** com possível aplicabilidade como fluoróforos em microscopia de fluorescência [38].

Outro estudo realizado neste campo foi o de *Lou et al.*, em que se sintetizaram e testaram sondas fluorescentes baseadas em heptametincianinas, mais especificamente uma série de compostos baseados no composto 62 com diferentes substituições de amina secundária na posição central (Figura 15). As células foram incubadas com estes corantes a uma concentração de 10  $\mu\text{M}$  durante 5 minutos em células vivas tumorais (HeLa). Obtiveram-se imagens em diferentes comprimentos de onda (545-645 nm e 700-800 nm) usando microscopia confocal de fluorescência. Num dos ensaios efetuados recorreram à comarcação com uma sonda comercial, o *Hoechst 33342*, sendo a fluorescência emitida pelos diversos corantes sobrepõe-se à sonda comercial aplicada, ou seja, no citoplasma celular, o que revela que este corante marca o citoplasma das células vivas. Segundo os resultados obtidos, concluiu-se que estas cianinas podem ser aplicadas como sondas

fluorescentes, uma vez que demonstraram ser seletivas e podem ser aplicadas em células vivas [21].

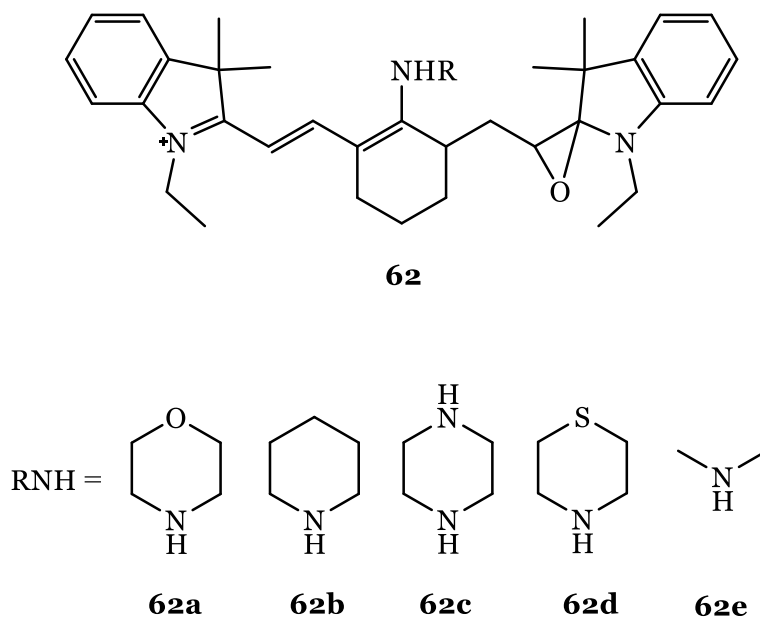


Figura 15. Estruturas das heptametincianinas **62a-e** com possível utilização em microscopia confocal de fluorescência [21].

### 1.3. Objetivos

Foram objetivos deste trabalho de dissertação:

- Síntese e caracterização espectroscópica de novas monometincianinas com potencial anticancerígeno;
- Avaliação biológica de cianinas, com especial foco em monometincianinas, nomeadamente determinação do seu potencial antiproliferativo em diversas linhas celulares cancerígenas e não cancerígenas, assim como estudos complementares de microscopia ótica comum e microscopia de fluorescência;
- Complementar os ensaios biológicos com estudos computacionais de simulação das propriedades farmacocinéticas, toxicidade e *druglikeness*, sempre que possível.



## **Capítulo 2**

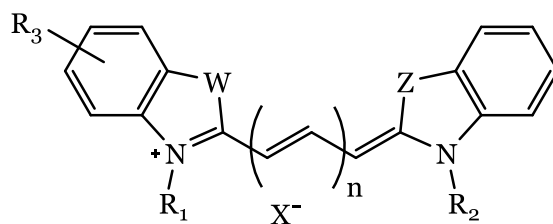


## **2. Materiais e Métodos**

### **2.1. Síntese de Monometinocianinas**

Este capítulo encontra-se subdividido em duas principais partes, uma relativa à síntese de cianinas e outra direcionada para a sua avaliação biológica. Desta forma, foram sintetizadas as cianinas **9-13** (Tabela 1), enquanto as cianinas **1-9** e **14-31** (Tabela 1 e Figura 16) representam as restantes cianinas estudadas nesta dissertação, as quais já tinham sido preparadas anteriormente e estavam disponíveis dentro do grupo de investigação. As estruturas de todos os compostos estão indicadas na Tabela resumo 1. A pureza e a estrutura de todas as cianinas utilizadas foram comprovadas através da verificação dos seus pontos de fusão (p.f.) e por Ressonância Magnética Nuclear de Protão e Carbono-13 (RMN  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$ ).

Tabela 1. Tabela resumo representativa das estruturas das cianinas **1-18** e **21-31** em estudo.



| Composto  | W                                | Z     | R1  | R2  | R3                     | X <sup>-</sup>                | n |
|-----------|----------------------------------|-------|---|---|------------------------|-------------------------------|---|
| <b>1</b>  | S                                | S     | —   | H   | —                      | —                             | 0 |
| <b>2</b>  | S                                | S     | CH <sub>3</sub>                                 | CH <sub>3</sub>                                 | —                      | Cl <sup>-</sup>               | 0 |
| <b>3</b>  | S                                | S     | CH <sub>3</sub>                                 | CH <sub>3</sub>                                 | —                      | Br <sup>-</sup>               | 0 |
| <b>4</b>  | S                                | S     | CH <sub>3</sub>                                 | CH <sub>3</sub>                                 | —                      | I <sup>-</sup>                | 0 |
| <b>5</b>  | S                                | S     | CH <sub>3</sub>                                 | CH <sub>3</sub>                                 | —                      | Tos <sup>-</sup>              | 0 |
| <b>6</b>  | S                                | S     | (CH <sub>2</sub> )CH <sub>3</sub>               | (CH <sub>2</sub> )CH <sub>3</sub>               | —                      | Tos <sup>-</sup>              | 0 |
| <b>7</b>  | S                                | S     | (CH <sub>2</sub> )CH <sub>3</sub>               | (CH <sub>2</sub> )CH <sub>3</sub>               | —                      | ClO <sub>4</sub> <sup>-</sup> | 0 |
| <b>8</b>  | S                                | S     | (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> Ph              | (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> Ph              | —                      | I <sup>-</sup>                | 0 |
| <b>9</b>  | S                                | S     | CH <sub>2</sub> COOCH <sub>3</sub>              | CH <sub>2</sub> COOCH <sub>3</sub>              | —                      | Br <sup>-</sup>               | 0 |
| <b>10</b> | S                                | S     | (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> CH <sub>3</sub> | (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> CH <sub>3</sub> | —                      | I <sup>-</sup>                | 0 |
| <b>11</b> | S                                | S     | (CH <sub>2</sub> ) <sub>9</sub> CH <sub>3</sub> | (CH <sub>2</sub> ) <sub>9</sub> CH <sub>3</sub> | —                      | I <sup>-</sup>                | 0 |
| <b>12</b> | S                                | S     | (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> CH <sub>3</sub> | CH <sub>3</sub>                                 | —                      | I <sup>-</sup>                | 0 |
| <b>13</b> | S                                | S     | (CH <sub>2</sub> ) <sub>9</sub> CH <sub>3</sub> | CH <sub>3</sub>                                 | —                      | I <sup>-</sup>                | 0 |
| <b>14</b> | O                                | O     | CH <sub>3</sub>                                 | CH <sub>3</sub>                                 | —                      | Tos <sup>-</sup>              | 0 |
| <b>15</b> | S                                | O     | CH <sub>3</sub>                                 | CH <sub>3</sub>                                 | —                      | Tos <sup>-</sup>              | 0 |
| <b>16</b> | O                                | CH=CH | CH <sub>3</sub>                                 | CH <sub>3</sub>                                 | —                      | Tos <sup>-</sup>              | 0 |
| <b>17</b> | S                                | CH=CH | CH <sub>3</sub>                                 | CH <sub>3</sub>                                 | —                      | Tos <sup>-</sup>              | 0 |
| <b>18</b> | CH=CH                            | CH=CH | CH <sub>3</sub>                                 | CH <sub>3</sub>                                 | —                      | Tos <sup>-</sup>              | 0 |
| <b>21</b> | NCH <sub>3</sub>                 | S     | CH <sub>3</sub>                                 | CH <sub>3</sub>                                 | —                      | I <sup>-</sup>                | 0 |
| <b>22</b> | N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> | S     | (CH <sub>2</sub> )CH <sub>3</sub>               | (CH <sub>2</sub> )CH <sub>3</sub>               | 5-NO <sub>2</sub>      | I <sup>-</sup>                | 0 |
| <b>23</b> | S                                | S     | (CH <sub>2</sub> )CH <sub>3</sub>               | (CH <sub>2</sub> )CH <sub>3</sub>               | 5-NH <sub>2</sub>      | I <sup>-</sup>                | 0 |
| <b>24</b> | S                                | S     | (CH <sub>2</sub> )CH <sub>3</sub>               | (CH <sub>2</sub> )CH <sub>3</sub>               | 5-H <sub>3</sub> CCONH | Tos <sup>-</sup>              | 0 |
| <b>25</b> | S                                | S     | (CH <sub>2</sub> )CH <sub>3</sub>               | (CH <sub>2</sub> )CH <sub>3</sub>               | 6-NH <sub>2</sub>      | I <sup>-</sup>                | 0 |
| <b>26</b> | S                                | S     | (CH <sub>2</sub> )CH <sub>3</sub>               | (CH <sub>2</sub> )CH <sub>3</sub>               | 6-NO <sub>2</sub>      | Tos <sup>-</sup>              | 0 |
| <b>27</b> | O                                | O     | (CH <sub>2</sub> )CH <sub>3</sub>               | (CH <sub>2</sub> )CH <sub>3</sub>               | —                      | I <sup>-</sup>                | 1 |
| <b>28</b> | Se                               | Se    | (CH <sub>2</sub> )CH <sub>3</sub>               | (CH <sub>2</sub> )CH <sub>3</sub>               | —                      | I <sup>-</sup>                | 1 |
| <b>29</b> | S                                | S     | (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> CH <sub>3</sub> | (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> CH <sub>3</sub> | —                      | I <sup>-</sup>                | 3 |

|           |                                  |                                  |   |   |   |                |   |
|-----------|----------------------------------|----------------------------------|---|---|---|----------------|---|
| <b>30</b> | Se                               | Se                               | (CH <sub>2</sub> ) <sub>9</sub> CH <sub>3</sub> | (CH <sub>2</sub> ) <sub>9</sub> CH <sub>3</sub> | — | I <sup>-</sup> | 3 |
| <b>31</b> | C(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> | C(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> | —   | —   | — | I <sup>-</sup> | 3 |

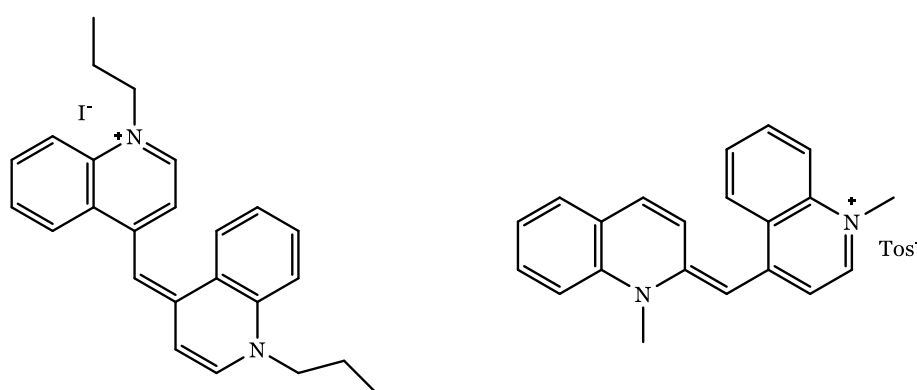


Figura 16. Estrutura das cianinas testadas **19** e **20**.

As reações de síntese realizadas nesta dissertação foram acompanhadas por cromatografia em camada fina (c.c.f.), utilizando-se placas de alumínio revestidas por sílica gel (*Macherey-Nagel 60 G/UV254*) com 0,2 mm de espessura. Foi utilizado um eluente misto de dois solventes, diclorometano e metanol, numa proporção volumétrica de 95:5. Após a eluição das placas, estas foram visualizadas à luz UV ao comprimento de onda de 254 nm e/ou 365 nm e calcularam-se os respectivos rendimentos reacionais ( $\eta$ ).

A determinação dos p.f. foi realizada em tubos capilares abertos, através de um aparelho de medição de pontos de fusão *Büchi B-540*.

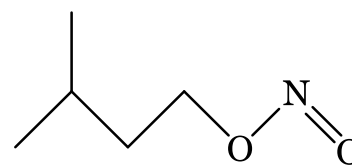
Os comprimentos de onda máximos de absorção ( $\lambda_{\text{máx.}}$ ) dos espectros de ultravioleta-visível (UV-VIS) foram determinados num espectrofotômetro *Thermo Scientific Evolution 160*, sendo utilizado como solvente o etanol e com os respectivos meios de cada linha celular *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI 1640 - do inglês, *Roswell Park Memorial Institute*) e *Dulbeco's Modified Eagle Medium* (DMEM- do inglês, *Dulbeco's Modified Eagle Medium*) e células de 1 cm de espessura.

Para a obtenção dos espectros de infravermelho por transformada de *Fourier* (FTIR, do inglês *Fourier transform infrared spectroscopy*) foi utilizado um espectrofotômetro *Thermo Fisher Scientific Nicolet iS10: smart iTR*. As amostras foram colocadas sob a forma de pastilhas de KBr (5% m/m de amostra), no respectivo suporte de pastilhas, registrando-se o espectro. Como referência foi utilizada uma pastilha apenas com KBr, funcionando como branco, à temperatura ambiente. Estes espectros foram adquiridos entre 4000 e 600  $\text{cm}^{-1}$  por refletância total atenuada (ATR - do inglês, *Attenued Total Reflectance*), um *background* com 32 *scans*, amostra com 32 *scans* e uma resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$  e através do *software Omnic 8.2*. Os dados obtidos relativos a cada composto analisado foram apresentados na respectiva descrição dos mesmos, indicando-se a frequência máxima da banda de absorção ( $\nu_{\text{máx}}$  em  $\text{cm}^{-1}$ ).

Os espectros de RMN  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$  foram adquiridos num espectrofotômetro *Brüker Avance III 400 MHz* operando a 9,4 t (400,13 e 100,62 MHz) e devidamente tratados no *software MestReNova v.14.1.1 free trial*. Para a realização destes mesmos espectros utilizaram-se o dimetilsulfóxido hexadeuterado (DMSO- $d_6$  - do inglês, *Hexadeuterodimethyl sulfoxide*) ou clorofórmio deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ) que funcionaram como solventes e como padrões internos (DMSO- $d_6$ ,  $\delta = 2,50$  ppm e 39,52 ppm ou  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta = 7,26$  ppm e 77,16 ppm em RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , respectivamente). Os dados obtidos relativos a cada composto analisado foram apresentados na respectiva descrição dos mesmos, no caso do RMN  $^1\text{H}$ , pela seguinte ordem: solvente; desvio químico ( $\delta$ ) em partes por milhão (ppm); multiplicidade do sinal [singleto (s), duplete (d), tripleto (t), quinteto (quint.), sexteto (sext.) ou multiplete (m)]; constante de acoplamento ( $J$  em *HZ*); atribuição do próton na molécula. Já no caso do RMN  $^{13}\text{C}$ , seguiu-se a seguinte ordem: solvente; desvio químico ( $\delta$ ) em ppm.

### 2.1.1. Síntese do nitrito de isoamilo

De acordo com *Sevil Özkınah* [39], à solução de nitrito de sódio (2,4 g, 0,03 mol) em água (9,4 mL), em banho de gelo e sob agitação contante, foi adicionada gota a gota a mistura de álcool isoamílico (2,75 mL, 2,24 g, 0,025 mol) em água



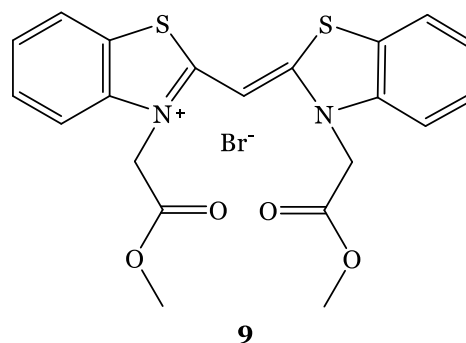
(0,6 mL) e ácido sulfúrico concentrado (0,8 mL). Após a adição, a mistura foi colocada em agitação constante à temperatura ambiente durante 1 hora e 30 minutos. O sólido precipitado foi filtrado e lavado com éter etílico seco (2 x 6 mL). O filtrado foi lavado com uma solução aquosa (12,5 mL) contendo hidrogeno carbonato de sódio (0,25 g) e cloreto de sódio (3 g), seco sob sulfato de sódio anidro e evaporado à secura. O nitrito de amilo foi obtido sob a forma de óleo amarelado (1,9 g; 64%). RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 4,72 (t,  $J = 7,2$  Hz, 2H), 1,86 – 1,66 (m, 1H), 1,62 (q,  $J = 6,8$  Hz, 2H), 0,94 (d,  $J = 6,5$  Hz, 6H).

### 2.1.2. Síntese das monometinocianinas simétricas 9-11

De acordo com *N. I. Fisher and F. M. Hamer*, adicionou-se o sal quaternário correspondente a uma solução de anidrido acético em ebulição (2,5 equivalentes) [14]. À referida solução, foi adicionado o nitrito de amilo (1,4 equivalentes), sob agitação constante e à temperatura ambiente. Após a adição, e com a dissolução do sal quaternário, foi observada a formação violenta de uma espuma, mudando a cor da mistura para castanho-escuro. O sólido formado foi filtrado sob vácuo, lavado primeiramente com água (3 mL) e éter etílico (3 × 3 mL). O sólido obtido foi seco e recristalizado de etanol, lavado repetidamente com éter etílico (3 × 3 mL) e seco, obtendo-se as seguintes cianinas simétricas.

#### 2.1.2.1. Brometo de (*Z*)-3-(2-metoxi-2-oxoetil)-2-((3-(2-metoxi-2-oxoetil)benzo[*d*]tiazol-2(3*H*)-ilideno)metil)benzo[*d*]tiazol-3-io (9)

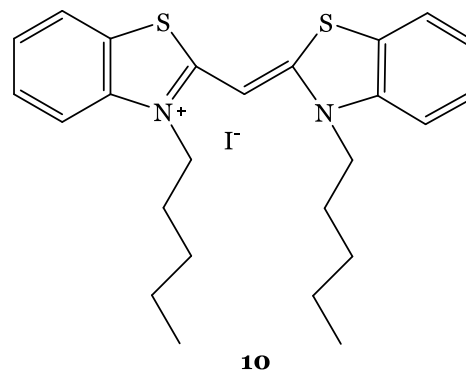
Obtido a partir do brometo de 3-(2-metoxi-2-oxoetil)-2-metilbenzo[*d*]tiazol-3-io (300 mg; 0,99 mmol), anidrido acético (2,48 mL) e nitrito de amilo (139 µL). Sólido amarelado (85 mg; 28%). P.f. 226-227 °C. Vis:  $\lambda_{\text{máx}}$  (EtOH) 427 nm. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  (ppm) 8,26 (d, *J* = 8,0 Hz, 2H), 7,82 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H), 7,68 (t, *J* = 7,9 Hz, 2H), 7,54



(t, *J* = 7,6 Hz, 2H), 6,75 (s, 1H), 5,72 (s, 4H), 3,76 (s, 6H). RMN <sup>13</sup>C (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  (ppm) 166,89, 163,38, 140,23, 128,90, 125,52, 124,56, 123,82, 113,79, 83,45, 52,99. FTIR ( $\nu_{\text{máx}}$  cm<sup>-1</sup>; KBr) 3075, 2990, 2953, 2918, 2851, 1737, 1525, 1512, 1501, 1461, 1433, 1360, 1343, 1290, 1254, 1208, 1009, 994, 844, 759.

#### 2.1.2.2. Iodeto de (*Z*)-3-pentil-2-((3-pentilbenzo[*d*]tiazol-2(3*H*)-ilideno)metil)benzo[*d*]tiazol-3-io (10)

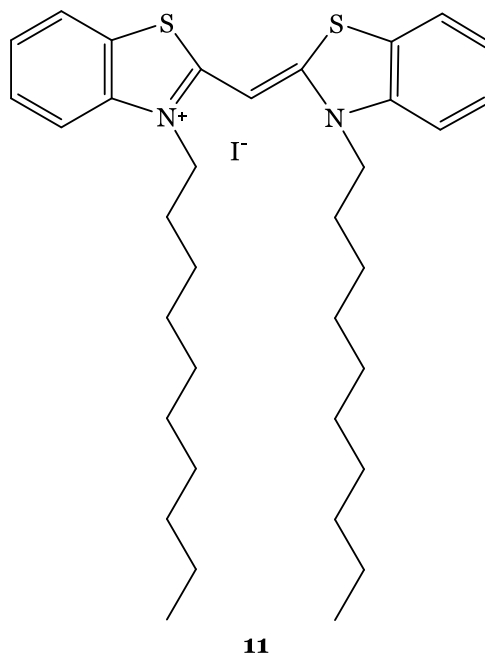
Obtido a partir do iodeto de 2-metil-3-pentilbenzo[*d*]tiazol-3-io (300 mg; 0,86 mmol), anidrido acético (2,1 mL), nitrito de amilo (121 µL). Sólido amarelado (225 mg; 75%). P.f. 164-166 °C. Vis:  $\lambda_{\text{máx}}$  (EtOH) 426 nm. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  (ppm) 8,22 (d, *J* = 7,9 Hz, 2H), 7,91 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H), 7,69 (t, *J* = 7,8 Hz, 2H), 7,51 (t, *J* = 7,6 Hz, 2H), 6,68 (s, 1H), 4,65 (t, *J* = 7,5 Hz, 4H), 1,79



(quint.,  $J = 7,6$  Hz, 4H), 1,44 (quint.,  $J = 7,0$  Hz, 4H), 1,35 (sext.,  $J = 7$ , Hz, 4H), 0,88 (t,  $J = 7,1$  Hz, 6H). RMN  $^{13}\text{C}$  (101 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm) 161,59, 140,19, 128,64, 124,99, 124,96, 123,59, 113,86, 82,55, 46,18, 28,21, 26,76, 22,02, 13,81. FTIR ( $\nu_{\text{máx}}$   $\text{cm}^{-1}$ ; KBr) 2950, 2923, 2858, 1519, 1504, 1462, 1371, 1344, 1314, 1264, 1192, 1158, 1138, 1070, 1044, 871, 836, 824.

### 2.1.2.3. Iodeto de (Z)-3-decil-2-((3-decilbenzo[d]tiazol-2(3H)-ilideno)metil)benzo[d]tiazol-3-io (**11**)

Obtido a partir do iodeto de 3-decil-2-metilbenzo[d]tiazol-3-io (300 mg; 0,72 mmol), anidrido acético (1,8 mL), nitrito de amilo (121  $\mu\text{L}$ ). Sólido amarelado (145 mg; 48%). P.f. 232-233  $^{\circ}\text{C}$ . Vis:  $\lambda_{\text{máx}}$  (EtOH) 427 nm. RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm) 8,22 (d,  $J = 8,0$  Hz, 2H), 7,91 (d,  $J = 8,4$  Hz, 2H), 7,69 (t,  $J = 7,5$  Hz, 2H), 7,51 (t,  $J = 7,7$  Hz, 2H), 6,68 (s, 1H), 4,65 (t,  $J = 7,4$  Hz, 4H), 1,77 (p,  $J = 7,3$  Hz, 4H), 1,44 (quint.,  $J = 8,0$  Hz, 4H), 1,30 (quint,  $J = 7,1$  Hz, 4H), 1,27 – 1,15 (m, 20H), 0,81 (t,  $J = 6,6$  Hz, 6H). RMN  $^{13}\text{C}$  (101 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm) 161,56, 140,19, 128,63, 124,99, 124,95, 123,59, 113,87, 82,62, 46,20, 31,28, 29,01, 28,97, 28,70, 27,07, 26,11, 22,06, 13,89. FTIR ( $\nu_{\text{máx}}$   $\text{cm}^{-1}$ ; KBr) 3070, 3002, 2920, 2851, 1514, 1504, 1465, 1366, 1337, 1314, 1263, 1136, 771.



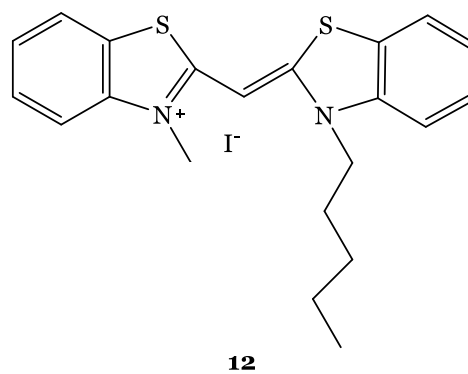
**11**

### 2.1.3. Síntese das monometinocianinas assimétricas **12** e **13**

De acordo com *Zanotti* e os seus colaboradores [40], aqueceu-se em refluxo uma mistura de dois sais de amônio quaternários, na presença de trietilamina (2,2 equivalentes) e etanol (2 mL). Após duas horas, a 80  $^{\circ}\text{C}$ , verificou-se que a reação estava completa. Após arrefecer a mistura reacional, o sólido formado foi filtrado sob vácuo e lavado três vezes com éter etílico (3 mL). O sólido obtido foi seco e recristalizado de etanol. Os sólidos obtidos foram isolados e lavados repetidamente com éter etílico (3  $\times$  3 mL) e secos, obtendo-se as seguintes cianinas simétricas:

#### 2.1.3.1. Iodeto de (Z)-3-etil-2-((3-pentilbenzo[d]tiazol-2(3H)-ilideno)metil)benzo[d]tiazol-3-io (**12**)

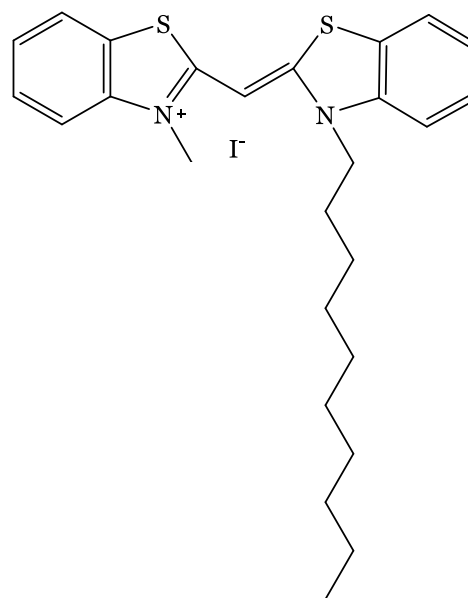
Obtido a partir do iodeto de 3-metil-2-(metiltio)benzo[d]tiazol-3-íon (100mg; 0,31 mmol) e do iodeto de 2-metil-3-pentilbenzo[d]tiazol-3-íon (107 mg; 0,31 mmol). Sólido amarelado (149 mg; 72%). P.f. 254-258 °C. Vis:  $\lambda_{\text{máx}}$  (EtOH) 425 nm. RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm) 8,21 (d,  $J = 8,0$  Hz, 2H), 7,88 (d,  $J = 8,4$  Hz, 2H), 7,68 (t,  $J = 7,8$  Hz, 2H), 7,50 (t,  $J = 7,6$  Hz, 2H), 6,70 (s, 1H), 4,62 (t,  $J = 7,5$  Hz, 2H), 4,03 (s, 3H), 1,81 (p,  $J = 7,7$  Hz, 2H), 1,54 – 1,28 (m, 4H), 0,88 (t,  $J = 7,0$  Hz, 3H). RMN  $^{13}\text{C}$  (101 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm) 162,04, 161,35, 140,63, 140,12, 128,52, 128,44, 124,87, 124,81, 124,77, 124,71, 123,51, 123,38, 113,79, 82,62, 46,18, 34,25, 28,10, 26,51, 21,87, 13,84. FTIR ( $\nu_{\text{máx}}$   $\text{cm}^{-1}$ ; KBr) 922, 2852, 1529, 1467, 1353, 1314, 1275, 1161, 1139, 1046, 840.



**12**

### 2.1.3.2. Iodeto de (*Z*)-2-((3-decilbenzo[d]tiazol-2(3*H*)-ilideno)metil)-3-etilbenzo[d]tiazol-3-íon (**13**)

Obtido a partir do iodeto de 3-metil-2-(metiltio)benzo[d]tiazol-3-íon (100mg; 0,31 mmol) e do iodeto de 3-decil-2-metilbenzo[d]tiazol-3-íon (129 mg; 0,31 mmol). Sólido amarelado (155 mg; 68%). P.f. 217-218 °C. Vis:  $\lambda_{\text{máx}}$  (EtOH) 425 nm. RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm) 8,22 (d,  $J = 8,1$  Hz, 2H), 7,89 (d,  $J = 8,3$  Hz, 2H), 7,69 (t,  $J = 7,7$  Hz, 1H), 7,68 (t,  $J = 7,7$  Hz, 1H), 7,50 (t,  $J = 7,6$  Hz, 2H), 6,70 (s, 1H), 4,63 (t,  $J = 7,4$  Hz, 2H), 4,02 (s, 3H), 1,80 (quint.,  $J = 7,8$  Hz, 2H), 1,43 (quint.,  $J = 7,0$  Hz, 2H), 1,32 (quint.,  $J = 6,3$  Hz, 2H), 1,36 – 1,15 (m, 10H), 0,82 (t,  $J = 6,8$  Hz, 3H). RMN  $^{13}\text{C}$  (101 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm) 162,05, 161,39, 140,64, 140,13, 128,51, 128,44, 124,88, 124,83, 124,77, 124,71, 123,51, 123,39, 113,81, 82,66, 46,21, 34,24, 31,22, 28,87, 28,84, 28,68, 28,62, 26,75, 25,91, 22,02, 13,90. FTIR ( $\nu_{\text{máx}}$   $\text{cm}^{-1}$ ; KBr) 3061, 3006, 2953, 2929, 2863, 1525, 1513, 1502, 1465, 1352, 1313, 1268, 1188, 1162, 1137, 1061, 1041, 837.



**13**

## 2.2. Avaliação Biológica

Para avaliar a atividade biológica dos compostos em estudo as culturas celulares foram mantidas em incubadoras *LEEC Culture Safe Precision CO<sub>2</sub> Incubators* e manipuladas em câmaras de fluxo laminar *Class II A2 Biological Safety Cabinet*. Os meios de cultura utilizados para estas linhas celulares RPMI e DMEM foram adquiridos à *Sigma-Aldrich* (MO, USA), assim como todos os reagentes e suplementos e as soluções aquecidas no banho com *Termotronic II – J.P. Selecta*. As caixas de culturas, as linhas celulares, assim como todo o material utilizado para a manipulação das mesmas foram compradas à *American Type Culture Collection* (ATCC; Manassas, VA, USA). Para se realizar a tripsinização e a contagem celular utilizou-se o microscópio ótico *Motic Microscópio AE2000 inverse binocular microscope* e a uma câmara de *Neubauer*. Para a preparação de soluções todo o material e reagentes utilizados foi adquirido à *Sigma-Aldrich* (MO, USA). No ensaio de viabilidade celular as absorvâncias foram lidas num espectrofotómetro de microplacas *Bio-Rad xMark™*. Para a microscopia de visível recorreu-se ao microscópio invertido *Olympus CKX41 SF*. Já para a microscopia de fluorescência utilizou-se o microscópio *AxioImager Z2* com o software *ZEN 2.6 PRO* e a objetiva *Plan-Apochromat 40x/1.3 Oil DIC M27* acoplado a duas câmaras *axiocam 506mono* e *axiocam 503color*.

### **2.2.1. Avaliação da Proliferação Celular**

A avaliação da citotoxicidade dos compostos em estudo foi realizada em diferentes linhas celulares, concretamente: fibroblastos normais da derme humana (NHDF - do inglês, *Normal human dermal fibroblasts*) nas passagens 5-11; células oriundas de carcinoma do cólon humano (Caco-2) nas passagens 32-34 e 38-45; células epiteliais humanas de cancro da mama (MCF-7) nas passagens 40-42; linha PC-3 de células humanas de cancro da próstata (PC-3 - do inglês, *PC-3 human prostate cancer cells*) nas passagens 30-34. Cada experiência foi realizada em quadruplicado e em três ensaios independentes. Devido à sua ampla utilização como agente quimioterapêutico [41, 42], o 5-fluorouracilo (5-Fu) foi utilizado como controlo positivo.

#### **2.2.1.1. Culturas Celulares**

Neste trabalho todas as linhas celulares utilizadas foram mantidas em frascos de cultura de 75 cm<sup>2</sup> a 37 °C numa atmosfera humidificada com 5% de CO<sub>2</sub> e a cada dois ou três dias procedeu-se à substituição do meio de cultura.

A linha celular NHDF são células normais aderentes provenientes da derme de adultos [43]. Esta linha celular foi mantida em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal de bovino (FBS - do inglês, *Fetal bovine serum*), 2 mM de *L*-glutamina, 10 mM de ácido 2-[4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil]-etanosulfónico (HEPES - do inglês, *4-(2-hydroxyethyl)-1-*

*piperazoneethanesulfonic acid*)), 1 mM de piruvato de sódio, e 1% de antibiótico/antimicótico AB (10,000 unidades/mL de penicilina, 100 mg/mL de estreptomicina e 25 µg/mL de anfotericina B) [19].

As células Caco-2 são oriundas de linhas de células humanas de adenocarcinoma colorretal e possuem como característica a aderência a superfícies. Esta linha celular foi mantida em meio DMEM suplementado com 20% de FBS, 1% de antibiótico/antimicótico SP (10,000 unidades/mL de penicilina G e 100 mg/mL de estreptomicina) [19].

A linha celular MCF-7 foi isolada pela primeira vez de uma efusão pleural de uma mulher caucasiana de 69 anos diagnosticada com adenocarcinoma mamário metastático em 1970. Esta linha celular cresce em monocamada e possui elevada aderência às superfícies [44]. Estas células foram mantidas em meio DMEM suplementado com 10% de FBS, 1% de antibiótico/antimicótico AB (10,000 unidades/ml de penicilina G, 100 mg/mL de estreptomicina e 25 µg/mL de anfotericina B) [19].

As células PC-3 são células humanas de cancro da próstata aderentes e foram mantidas em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de FBS e 1% de antibiótico/antimicótico SP (10,000 unidades/mL de penicilina G e 100 mg/mL de estreptomicina) [19].

#### 2.2.1.2. Passagem e Contagem de Células

A passagem celular realiza-se para que seja possível dar continuidade ao crescimento celular. Ao ser atingida uma confluência celular de cerca de 80-90% inicia-se o processo. Tendo em conta que as linhas celulares utilizadas são aderentes utiliza-se um método enzimático, neste caso recorreu-se à tripsina, para que seja possível que as células desadiram do frasco de cultura. Para isso, inicialmente aspirou-se o meio de cultura e lavaram-se as células com tampão fosfato-salino (PBS - do inglês, *Phosphate-buffered saline*), de modo a assegurar que já não há vestígios de meio no frasco de cultura. Retirou-se o PBS e de seguida colocaram-se 3 mL de tripsina-EDTA 0,025% deixando esta atuar a 37 °C. O tempo de atuação da tripsina varia consoante a linha celular em estudo, mas não ultrapassa os cinco minutos. Após se verificar que as células se encontram em suspensão adicionou-se 7 mL de meio de cultura completo fresco, uma vez que este para a ação da tripsina, perfazendo-se assim 10 mL. Antes de se recolher a suspensão do frasco de cultura para um *falcon*, o qual se colocou depois a centrifugar durante cinco minutos a 500 rpm e a 25 °C. Descartou-se o sobrenadante, colocou-se meio de cultura completo e procedeu-se então à ressuspensão do *pellet* obtido.

Posteriormente à tripsinização recorre-se à contagem celular através de uma câmara de *Neubauer*. Para tal retiram-se 20 µL da suspensão celular para um *ependorf*, onde se adicionaram de seguida 20 µL de corante azul tripano 0,25%. Transferiu-se 20 µL desta solução para a câmara de *Neubauer* e observou-se ao microscópio ótico. Procedeu-se à contagem das células viáveis nos quatro quadrantes. Para se calcular o número de células presentes utilizaram-se as seguintes fórmulas:

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

$$\text{N}^\circ \text{ total de células} = \text{N}^\circ \text{ células/mL} \times \text{Volume total de ressuspensão}$$

### 2.2.1.3. Preparação de Soluções

Primeiramente preparou-se uma solução mãe para cada composto em estudo. Para isso, dissolveram-se os compostos em DMSO a uma concentração de 1 mM e armazenaram-se a 4 °C. As diferentes soluções dos compostos foram preparadas posteriormente através de diluições adequadas em meio de cultura completo (com FBS e antibiótico/antimicótico adequado para cada linha celular). Todas as soluções foram produzidas antes de cada experiência, de forma a garantir que cada poço das placas *multi-wells* contenha as concentrações pretendidas dos compostos em estudo. Em cada ensaio, a concentração de DMSO foi inferior a 1% (V/V), a qual não exibe um efeito significativo na viabilidade celular, de acordo com dados anteriores obtidos no grupo de investigação.

### 2.2.1.4. Ensaio de Viabilidade Celular pelo método de MTT

Para se avaliar a viabilidade celular quantificou-se a extensão da redução do MTT. Este método foi realizado consoante o previamente descrito [41]: após a tripsinização e a contagem as células foram semeadas em placas de cultura de 96 poços. Em cada poço adicionou-se 100 µL de suspensão celular, cuja densidade de células por poço depende da linha celular em estudo. Para a linha celular NHDF utilizou-se uma densidade de  $2 \times 10^{-4}$  células/mL, enquanto para as células Caco-2 e PC-3 utilizou-se uma densidade por poço de  $4 \times 10^{-4}$  células/mL e, por fim, para a linha celular MCF-7 uma densidade de  $8 \times 10^{-4}$  células/mL por poço. De seguida, colocaram-se as placas numa incubadora *LEEC Culture Safe Precision CO<sub>2</sub> Incubators*, a 37 °C numa atmosfera humidificada com 5% de CO<sub>2</sub>. Após 48h, as células já se encontram aderidas, pelo que se procede então à substituição do meio pelas soluções de compostos preparadas anteriormente, exceto nos poços correspondentes ao controlo (células tratadas apenas com meio completo). Como controlo negativo utilizaram-se as células não tratadas e como controlo positivo utilizou-se o 5-FU. Ao fim de 72h de incubação, igualmente a 37 °C numa atmosfera humidificada com 5% de CO<sub>2</sub>, aspirou-se o meio e lavaram-se os poços com PBS 1%, de seguida adicionou-se meio de

cultura incompleto (sem FBS e antibiótico/antimicótico) contendo a solução de MTT (5 mg/mL em PBS) e incubou-se novamente a 37 °C durante 4h. No final, removeu-se o sobrenadante e dissolveram-se os cristais de formazano em DMSO. Posteriormente, leram-se e registaram-se os valores de absorvância a 570 nm num espectrofotómetro de microplacas *Bio-Rad xMarkTM*. A viabilidade celular foi expressa em percentagem em relação às células utilizadas como controlo negativo.

Para o ensaio realizado na presença e ausência de luz o procedimento foi semelhante, sendo que se utilizou como controlo positivo uma cianina já testada por Lima *et al.* (Figura 17) [19].

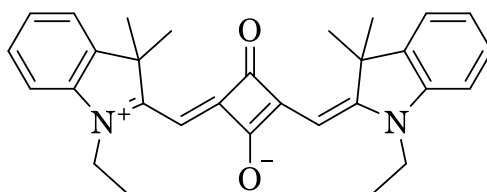


Figura 17. Estrutura da cianina utilizada como controlo positivo no ensaio na presença e ausência de radiação [19].

Ao final de 48h de incubação com os compostos, a 37 °C numa atmosfera humidificada com 5% de CO<sub>2</sub>, irradiaram-se as células com um foco de luz LED, com maior intensidade na gama dos azuis (pico nos 450 nm) e com menor intensidade na gama dos verdes (pico entre 500-550 nm) e dos vermelhos (pico entre os 600 e 700 nm). A irradiação das células seguiu duas condições: 0 min (sem luz, mantidos 30 min) e 30 min de exposição à radiação. Vinte e quatro horas após a irradiação, removeu-se o meio de cultura e lavaram-se as células com PBS 1% e adicionou-se meio de cultura incompleto (sem FBS e antibiótico/antimicótico) contendo a solução de MTT (5 mg/mL em PBS) e incubou-se novamente a 37 °C durante 4h. No final, removeu-se o sobrenadante e dissolveram-se os cristais de formazano em DMSO. Posteriormente, leram-se e registaram-se os valores de absorvância a 570 nm num espectrofotómetro de microplacas *Bio-Rad xMarkTM*. A viabilidade celular foi expressa em percentagem em relação às células utilizadas como controlo negativo.

### 2.2.2. Microscopia de Ótica Comum

Para se realizar o ensaio de microscopia em células vivas semearam-se as células em placas de 6 poços e incubaram-se durante 48h a 37 °C. Posto isto, colocaram-se os compostos em estudo na linha celular Caco-2 e incubaram-se novamente as células por 48h a 37°C. Procedeu-se à observação dos respetivos poços num microscópio invertido *Olympus CKX41 SF*. Antes de fotografar retirou-se o meio do respetivo poço a ser analisado, para permitir a correta focagem do plano de células.

### **2.2.3. Microscopia de Fluorescência**

A microscopia de fluorescência utilizou-se com o objetivo de confirmar se os compostos em estudo atravessam a membrana e para compreender onde se localizam na célula (no núcleo e/ou mitocôndria das células). Para tal, utilizou-se o procedimento descrito previamente em Lima *et al.* [19], sendo que como marcador específico, se utilizou o *Hoescht 33342*. Semearam-se células em placas de cultura de 24 poços que continham lamelas circulares estéreis de 15 mm de diâmetro. Ao final de 48h as células já se encontravam aderidas, iniciou-se então a incubação com os compostos durante 20h. Acabando este período de incubação as células foram lavadas três vezes com PBS e procedeu-se ao processo de fixação. Para isso, removeu-se o conteúdo dos poços e adicionou-se uma solução de formalina a 4% até cobrir os poços e foi deixado a incubar à temperatura ambiente durante 15 min. De seguida, voltou-se a repetir o processo de lavagem, três vezes com PBS, e incubaram-se as células com uma solução de *Hoescht 33342* (1:500) durante 10 min, no escuro e à temperatura ambiente. Posteriormente, os poços foram novamente lavados com PBS e as lâminas foram montadas com um meio de montagem permanente (Dako) e deixadas a secar em local fresco e seco durante 24h. Observaram-se as células utilizando o microscópio *Axiomager Z2* com o *software ZEN 2.6 PRO* e a objetiva *Plan-Apochromat 40x/1.3 Oil DIC M27* acoplado a duas câmaras *axiocam 506mono* e *axiocam 503color* e recorreu-se especificamente ao *Filter Set 38HE*.

### **2.2.4. Análises Estatísticas**

Todos os resultados obtidos neste trabalho apresentam-se expressos como média  $\pm$  desvio padrão (SD - do inglês, *Standard deviation*) e são representativos, de pelo menos, dois ensaios independentes. Os diferentes grupos foram considerados como tendo diferenças estatisticamente significativas quando  $p < 0,05$  (*t-Student*). Tanto o tratamento de resultados como os estudos estatísticos foram efetuados com o *software Microsoft Excel 365*. Os valores de  $IC_{50}$  foram calculados através de curvas sigmoidais dose-resposta com nível de confiança de 95% e com um *constrain* superior a zero, através do *software GraphPad Prism 8.3.0*.

## **2.3. Estudos *in-silico***

Neste trabalho efetuaram-se previsões das propriedades farmacocinéticas para todos os compostos em estudo através dos softwares *pkSCM* e *SwissADME* ambos *on-line*, de forma a prever as propriedades de absorção, distribuição, metabolismo e eliminação (perfil ADME) das moléculas em estudo. Este estudo foi realizado segundo a especificação

simplificada do sistema de entrada molecular (SMILES - do inglês, *Simplified molecular input line entry specification*) de cada composto, obtidas através do software ACD/ChemSketch (*Freeware*) 2020.1.1.

## **Capítulo 3**



### 3. Resultados e Discussão

Numa primeira parte deste capítulo serão apresentadas e discutidas as diferentes sínteses realizadas neste trabalho, tanto do precursor nitrito de amilo, bem como das monometinocianinas **9-13**. Deste modo, apresentar-se-ão os respetivos  $\eta$ , p.f., caracterização espectroscópica por RMN  $^1\text{H}$ , RMN  $^{13}\text{C}$  de cada corante sintetizado.

Numa segunda parte, serão exibidos e discutidos os resultados obtidos nos estudos de avaliação biológica, mais concretamente, ensaios de proliferação e viabilidade celular nas linhas celulares NHDF, MCF-7, Caco-2 e PC-3, assim como ensaios de localização intracelular das cianinas nas células Caco-2.

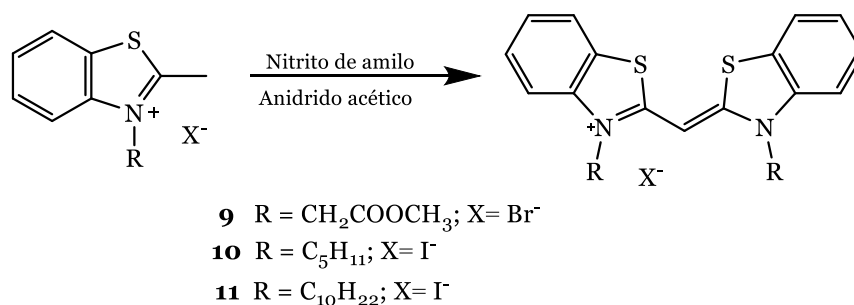
#### 3.1. Síntese das monometinocianinas

##### 3.1.1. Síntese do nitrito de isoamilo

A síntese do nitrito de amilo teve como objetivo a sua utilização como precursor na síntese das monometinocianinas simétricas **9-11**. Este foi preparado segundo o método descrito em *Sevil Özkınalı* [39]. Este método permite a obtenção do produto de forma rápida e fácil, em que se recorre apenas a uma filtração e a uma extração líquido-líquido, e não sendo necessária purificação adicional.

##### 3.1.2. Síntese das monometinocianinas simétricas **9-11**

A síntese das monometinocianinas simétricas **9-11**, foi realizada segundo o método descrito por *N. I. Fisher e F. M. Hamer* [14]. Resumidamente, faz-se reagir o sal quaternário correspondente, em anidrido acético em ebulição com o nitrito de isoamilo (Esquema 7). O processo geral encontra-se anteriormente descrito nesta dissertação no ponto 2.1.2.



Esquema 7. Método da síntese das monometinocianinas **9-11** [14].

O rendimento, p.f. e os respectivos  $\lambda_{\text{máx.}}$  de absorção UV-VIS das cianinas **9-11** encontram-se apresentados na Tabela 2. Este método permitiu a obtenção do composto **10** com um elevado rendimento (75%), seguida do composto **11** (48%), sendo que para o composto **9** apenas de obteve um rendimento de 28%. Quanto aos p.f., os três compostos apresentam intervalos muito pequenos, o que evidencia a elevada pureza dos mesmos. O  $\lambda_{\text{máx.}}$  de absorção de cada composto nos espectros de UV-VIS encontra-se na zona dos 426-427 nm, o que pode justificar a coloração amarelada destes corantes.

Os sinais representativos de RMN  $^1\text{H}$  encontram-se apresentados na Tabela 3. Os sinais aqui apresentados comprovam a formação das monometinocianinas **9-11** pretendidas. Por um lado, é notório o desaparecimento do singlete a 3,29 [45] 3,23 [46] ou 3,24 ppm [46], correspondentes aos grupos metilo ligados a C2 dos sais precursores de **9**, **10** e **11**, respetivamente. Por outro, é visível o aparecimento do singlete correspondente ao protão metínico da cianina correspondente, a 6,75 ou 6,68 ppm.

Tabela 2. Ponto de fusão, rendimento e  $\lambda_{\text{máx}}$  absorção UV-VIS para as cianinas **9-11**.

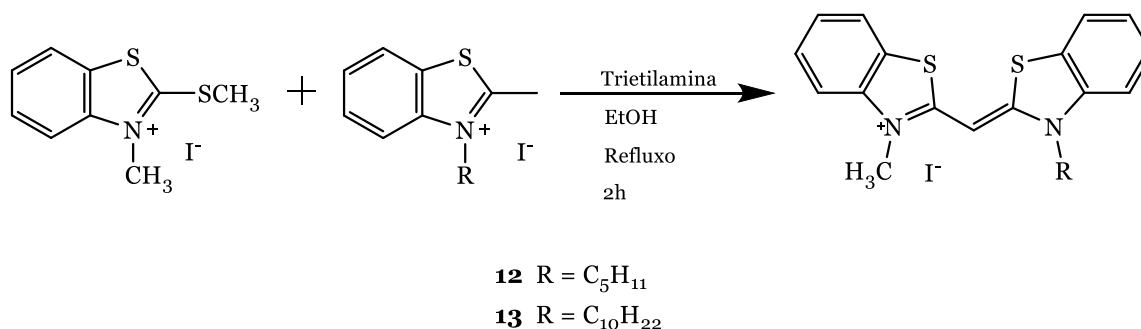
| Cianinas  | $\eta$ (%) | P.f. (°C) | $\lambda_{\text{máx.}}$ Absorção UV-VIS (nm) |
|-----------|------------|-----------|--|
| <b>9</b>  | 28         | 226-227   | 427  |
| <b>10</b> | 75         | 164-166   | 426  |
| <b>11</b> | 48         | 232-233   | 427  |

Tabela 3. Sinais representativos de RMN  $^1\text{H}$  das cianinas **9-11** e do respetivo sal precursor.

| Composto                     | 2-CCH <sub>3</sub> | 2-CCH        |
|------------------------------|--------------------|--------------|
| Sal precursor <b>9</b> [45]  | 3,29 (s, 3H)       | —            |
| <b>9</b>                     | —                  | 6,75 (s, 1H) |
| Sal precursor <b>10</b> [46] | 3,23 (s, 3H)       | —            |
| <b>10</b>                    | —                  | 6,68 (s, 1H) |
| Sal precursor <b>11</b> [46] | 3,24 (s, 3H)       | —            |
| <b>11</b>                    | —                  | 6,68 (s, 1H) |

### 3.1.3. Síntese das monometinocianinas assimétricas **12** e **13**

A síntese das monometinocianinas assimétricas **12** e **13** foi realizada segundo o método descrito por *Zanotti* e colaboradores [40], fazendo-se reagir dois sais de amónio quaternário com trietilamina em etanol a refluxo, durante duas horas (Esquema 9). O processo geral encontra-se anteriormente descrito nesta dissertação no ponto 3.1.2.



Esquema 8. Método da síntese das monometinocianinas **12** e **13** [40].

Os rendimentos, p.f. e os respetivos  $\lambda_{\text{máx.}}$  de absorção UV-VIS das cianinas **12** e **13** encontram-se apresentados na Tabela 4. O método utilizado para a formação destes compostos permitiu a obtenção de ambos com bons rendimentos (72% e 68%, respetivamente). Quanto aos p.f., os dois compostos apresentam intervalos muito pequenos, o que mostra a elevada pureza dos mesmos. O  $\lambda_{\text{máx.}}$  de absorção de cada composto nos espectros de UV-VIS é o mesmo para ambos (425 nm), o que pode justificar a coloração amarelada destes corantes.

Tabela 4. Rendimento, ponto de fusão e o  $\lambda_{\text{máx.}}$  de absorção do espectro UV-VIS das cianinas **12** e **13**.

| Cianinas  | $\eta$ (%) | P.f. (°C) | $\lambda_{\text{máx.}}$ Absorção UV-VIS (nm) |
|-----------|------------|-----------|--|
| <b>12</b> | 72         | 254-258   | 425  |
| <b>13</b> | 68         | 217-218   | 425  |

Os sinais representativos de RMN <sup>1</sup>H para as cianinas **12** e **13** e os respetivos sais precursores, encontram-se apresentados na Tabela 5. Os sinais aqui apresentados comprovam, mais uma vez a formação das monometinocianinas pretendidas. É notório o desaparecimento do singleto a 3,13 [47], 3,23 [46] ou 3,24 ppm [46], correspondentes aos grupos metilo ligados a C2 dos sais precursores de **12** e **13**, respetivamente. É visível também o aparecimento do singleto correspondente ao protão metínico da cianina correspondente, a 6,70 ppm.

Tabela 5. Sinais representativos de RMN <sup>1</sup>H das cianinas **12** e **13** e do respectivo sal precursor.

| Composto                                 | 2-CSC <u>H</u> <sub>3</sub> | 2-CCH <u>H</u> <sub>3</sub> | 2-CCH        |
|--|-----------------------------|-----------------------------|--------------|
| Sal precursor <b>12</b> e <b>13</b> [47] | 3,13 (s, 3H)                | —                           | —            |
| Sal precursor <b>12</b> [46]             | —                           | 3,23 (s, 3H)                | —            |
| <b>12</b>                                | —                           | —                           | 6,70 (s, 1H) |
| Sal precursor <b>13</b> [46]             | —                           | 3,24 (s, 3H)                | —            |
| <b>13</b>                                | —                           | —                           | 6,70 (s, 1H) |

## 3.2. Avaliação Biológica

Este subcapítulo tem como objetivo a apresentação e discussão dos resultados obtidos na determinação da atividade proliferativa das cianinas, na sua internalização celular e, respectivo, mecanismo de atuação. Utilizaram-se quatro linhas celulares, três delas tumorais (Caco-2, PC-3 e MCF-7) e uma não-tumoral (NHDF), de modo a realizar uma análise comparativa dos efeitos de cada corante em ambos os casos.

### 3.2.1. Avaliação da Proliferação Celular

A avaliação dos efeitos das cianinas em estudo na proliferação celular e a respectiva relação estrutura atividade teve como base estudos apresentados na literatura para algumas das cianinas em estudo.

Para cada cianina estudaram-se diferentes concentrações, de forma a avaliar a sua citotoxicidade. Primeiramente, fez-se a análise de um *screening* inicial, seguido da determinação dos valores obtidos de IC<sub>50</sub> após aquisição dos dados pelo método de MTT. Uma vez que estes compostos são corantes procedeu-se à lavagem dos poços com PBS (1%), após a incubação das células com os compostos em estudo, para garantir que, após a dissolução dos cristais de formazano, não haja a possibilidade da ocorrência de interferências nas respetivas leituras espectrofotométricas, levando à obtenção de valores de absorvância falseados.

Após se otimizarem as condições experimentais, realizou-se um primeiro *screening* a uma única concentração de 10 μM, o que possibilitou a restrição do número de testes a realizar, uma vez que permitiu uma seleção prévia dos compostos em estudo com maior potencial. Posteriormente, testaram-se seis concentrações de dois compostos selecionados em simultâneo numa placa *multi-wells* de 96 poços. No decorrer dos ensaios, mediante observações com o microscópio ótico teve-se em atenção a possibilidade de precipitação dos

compostos e, a conseqüente alteração da concentração desejada por poço, verificando-se que tal não ocorreu em nenhum dos ensaios.

### 3.2.1.1. Ensaio da Viabilidade Celular (MTT)

O MTT é um corante amarelo solúvel em água que atravessa facilmente as membranas de células viáveis e é reduzido por desidrogenases mitocondriais. O produto desta redução são cristais de formazano azul-arroxeados insolúveis em água [48, 49]. Considera-se que a redução do MTT a formazano é proporcional ao número de células vivas, assim como à concentração de MTT presente [49]. Como esta conversão ocorre nas mitocôndrias, a viabilidade é estimada a partir da atividade mitocondrial de células metabolicamente ativas [49, 50]. Para se proceder às medições colorimétricas dos cristais produzidos é necessária a dissolução dos mesmos em solventes orgânicos, como em dimetilsulfóxido (DMSO - do inglês, *Dimethyl sulfoxide*) [49, 50]. Considera-se que esta absorvância é proporcional à quantidade de células vivas presentes por poço, o que permite avaliar e quantificar a viabilidade celular e, conseqüentemente, o potencial antiproliferativo de cada composto [48].

Este tipo de ensaio é maioritariamente utilizado para avaliar efeitos citotóxicos *in vitro* de compostos em estudo, testados em linhas celulares ou em culturas de células primárias de animais ou de humanos [50].

#### 3.2.1.1.1. *Screening* inicial

Numa fase inicial deste trabalho, realizou-se um *screening* de todas as cianinas a uma concentração de 10  $\mu$ M nas quatro linhas celulares utilizadas, cujos resultados estão representados no gráfico 1. Com este primeiro ensaio, selecionaram-se as cianinas com maior potencial. A seleção foi efetuada com base em parâmetros estabelecidos previamente. Apenas foram selecionados os compostos que apresentaram uma percentagem de proliferação nas células NHDF superior a 15% e uma seletividade células cancerígenas *versus* células não cancerígenas superior a 1,5. Esta seleção pretendeu reduzir os custos e o tempo despendido com este estudo. No entanto, esta seleção pode levar à eliminação de compostos que poderiam vir a demonstrar efeitos promissores, sendo este um risco.

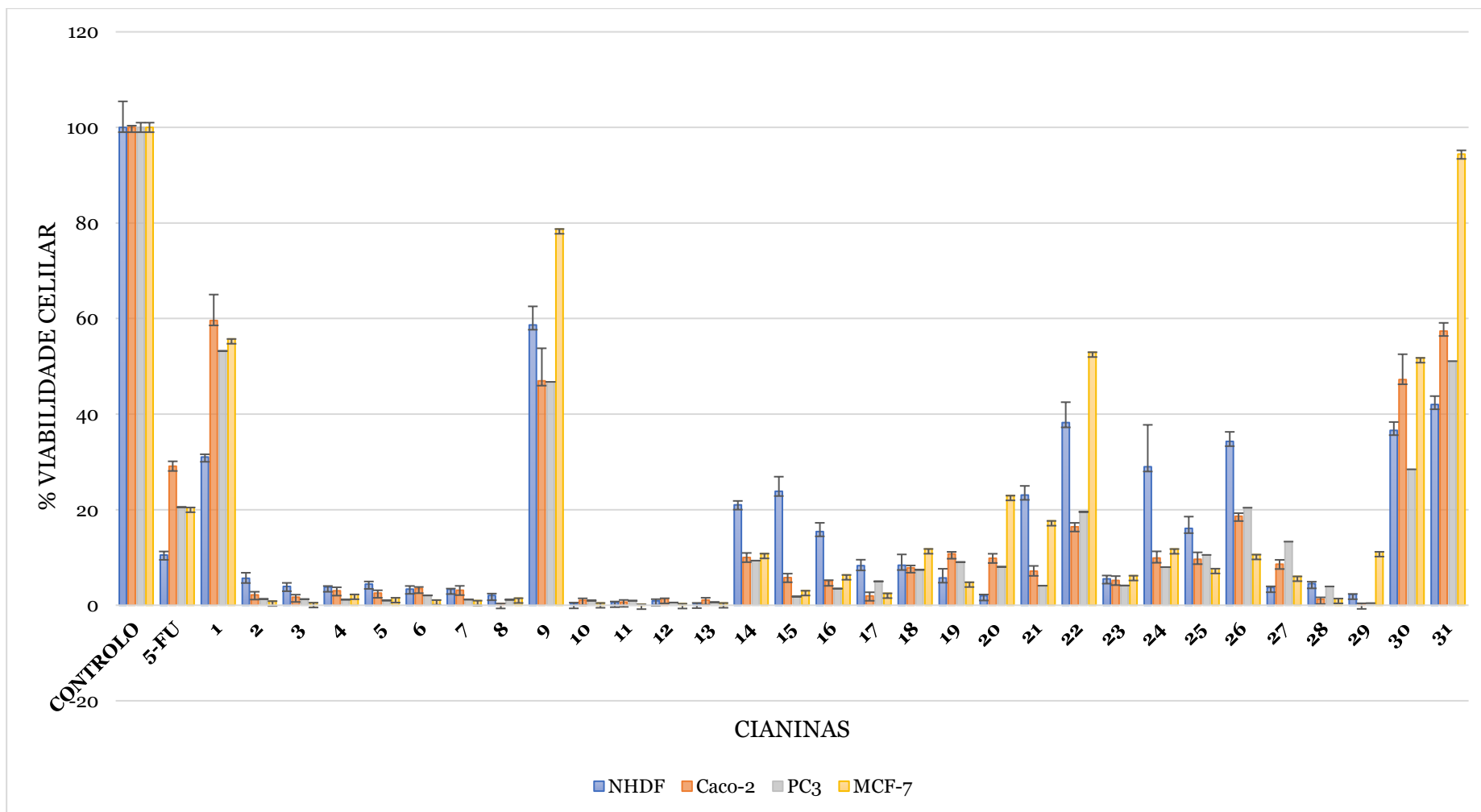


Gráfico 1. *Screening* inicial de todos os compostos em estudo a uma concentração de 10  $\mu$ M, após uma exposição durante 72h. Os dados apresentados possuem os respectivos desvios padrão representativos de três experiências independentes realizadas. \*\*\*  $p < 0,001$  em relação ao controle (Teste *t* de Student) obtida em todos os ensaios

Neste trabalho são apresentados vários compostos com diversas variações, concretamente, o comprimento da cadeia metínica, a natureza dos anéis heterocíclicos e a possível simetria ou não destes ( $W=Z$  ou  $W\neq Z$ ), os grupos substituintes presentes nos anéis ou na cadeia metínica e o grupo alquilo (também denominado por grupo R), as quais promovem comportamentos e interações distintas em cada corante específico [5, 7]. Estas variações podem estar intrinsecamente associadas aos diferentes potenciais citotóxicos e à seletividade observada nos efeitos nos diferentes tipos celulares. Deste modo, analisou-se, de uma forma mais aprofundada, estas relações estrutura-atividade (REA) das cianinas testadas em cada linha celular.

O composto **1** em estudo é constituído por dois anéis de benzotiazole, sem a presença de qualquer carga, e conseqüentemente, sem a estrutura de ressonância associada às cianinas. Para além disto, também não apresenta nenhum grupo substituinte ou um grupo alquilo. Este composto foi testado de forma a ser possível realizar uma análise comparativa com os restantes corantes, verificando-se que a presença da carga positiva, assim com a presença do grupo alquilo parecem influenciar a citotoxicidade e a seletividade dos compostos. A análise dos resultados, demonstra uma redução da viabilidade para cerca de 30% na linha celular não-tumoral e para cima de 50% nas linhas cancerígenas.

Todos os compostos **2 -26** incluem-se na classe das monometinocianinas, as cianinas **27** e **28** pertencem ao grupo das trimetinocianinas, e os compostos **29**, **30** e **31** pertencem às heptametinocianinas. O composto **1** é um precursor de monometinocianinas. Dentro das monometinocianinas e, de forma, a avaliar a influência do contra ião presente testaram-se as cianinas **2-5**, onde a estrutura do composto em si é conservada e apenas se modificaram os contraíões ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{I}^-$ ,  $\text{Tos}^-$ , respetivamente). Para além destes, testou-se ainda o efeito do ião perclorato ( $\text{ClO}_4^-$ ) como contra ião no composto **7**. No entanto, este último corante possui um grupo R diferente dos anteriores. Todas estas cianinas aparentam apresentar um potencial citotóxico bastante elevado, expresso por uma percentagem máxima de viabilidade de aproximadamente 5% nas células NHDF, no caso do composto **2**. Posto isto, através do ensaio de *screening* foi possível verificar que, na concentração testada, a natureza do contra ião não parece diminuir o potencial antiproliferativo do composto, nem aparenta influenciar a seletividade celular dos mesmos.

Estudou-se, ainda, a influência do grupo R nos compostos **5** e **8-13**. Ao comparar as cianinas **5** e **8**, **10** e **11**, as quais possuem grupos alquilo simétricos, isto é,  $R_1$  é igual ao  $R_2$ , foi possível observar que a modificação do grupo R não parece influenciar nem a citotoxicidade, nem na seletividade exibidas pelas mesmas. As cianinas **5**, **6**, **10** e **11** possuem como grupo

R uma cadeia alquílica, constituída por um grupo metilo, etilo, pentilo e decilo, respetivamente. O corante **8** contém uma estrutura mais rígida na sua constituição, um grupo fenilo, que também aparenta não influir na atividade do mesmo. O composto **9**, apesar de possuir os dois grupos R iguais, estes são um éster carboxilato, concretamente, o acetado de metilo. Contudo, este composto aparenta apresentar um comportamento diferente dos restantes, uma vez que a percentagem de viabilidade celular exibida ultrapassa os 40% nas linhas celulares Caco-2, PC-3 e NHDF, e atinge quase os 80% nas MCF-7, o que indica que o seu potencial citotóxico parece ser muito menor. Esta diferença de comportamento em relação aos restantes compostos pode ser atribuída à presença do grupo acetato de metilo. No caso do composto **12** e **13** os grupos  $R_1$  e  $R_2$  são diferentes, pelo que são considerados compostos assimétricos. Todas aparentam apresentar uma elevada diminuição da proliferação celular, todavia não parecem demonstrar seletividade entre a células cancerígenas e as células normais.

De modo a estudar a influência da natureza dos anéis heterocíclicos e, da respetiva simetria dos mesmos ( $W=Z$  ou  $W\neq Z$ ) no comportamento das monometinocianinas utilizaram-se diferentes tipos de anéis: benzotiazóis, benzoxazóis, quinolinas e benzimidazóis. No caso das trimetinocianinas utilizaram-se benzoxazóis e benzoselenazóis, enquanto nas heptametinocianinas, para além dos referidos anteriormente, ainda se estudou a presença do anel 3,3-dimetilindole. Nos corantes **15**, **16**, **17** e **21**,  $W\neq Z$ , sendo que nos restantes  $W=Z$ . Consoante os resultados obtidos, em ambos os casos, existem compostos que aparentam exibir seletividade para as células tumorais e que têm potenciais antiproliferativos bastantes elevados. Posto isto, analisou-se a inibição do crescimento celular de acordo com a natureza dos anéis envolvidos nas estruturas. A cianina **14** possui dois anéis de benzoxazole na sua estrutura que parecem ser dos que mais influenciam a seletividade. Nos casos em que os dois anéis são diferentes, concretamente quando o benzotiazole está conjugado, tanto com o benzoxazole (cianina **15**), como com o benzimidazole (cianina **21**), também parece existir seletividade células tumorais *versus* células não tumorais. Tanto o benzoxazole, como o benzotiazole têm sido aplicados em diversos estudos anticancerígenos e ambos os anéis heterocíclicos surgem em compostos com resultados promissores neste campo. Os resultados obtidos neste trabalho corroboram com alguns estudos já publicados, como é o caso de *Belal A. and Abdelgawad M.*, em que os compostos que continham na sua estrutura estes dois anéis exibiram um elevado potencial antiproliferativo na linha celular A549 e uma seletividade de efeito [51]. Quanto ao benzotiazole, estudos como o de *Pathak N. et al.*, demonstram que a atividade citotóxica deste tipo de anel heterocíclico é suscetível a mudanças estruturais, nomeadamente substituições na posição 2 ou substituições nos carbonos 5, 6 e 7 (no anel benzeno) [52].

No caso do benzimidazole, a literatura também mostra que compostos que são constituídos por este anel apresentaram uma inibição do crescimento celular em várias linhas celulares cancerígenas, sendo o seu efeito mais acentuado nas células HeLa [53].

Quando ambos os anéis são iguais, concretamente o 3,3-dimetilindole (cianina **31**) e, a quinolina (cianina **18**), parece não haver seletividade em relação às células não tumorais. No entanto, com a quinolina conjugada com outro tipo de anel, como o benzoxazole (cianina **16**) já se observa seletividade para as células cancerígenas em relação às não tumorais. Quando se conjugou a quinolina com o benzotiazole (cianina **17**) a seletividade reduziu-se.

A presença de um átomo de selênio no anel heterocíclico, como é o caso dos benzoselenazóis, não aparenta influenciar marcadamente a seletividade dos compostos (cianinas **28** e **30**), já que a diminuição do crescimento celular é semelhante em todas as linhas. Contudo, a cianina **30** não parece apresentar um elevado potencial antiproliferativo, ao contrário do que aparenta acontecer com a cianina **29**.

Para além da natureza dos anéis verificou-se, ainda, se a posição em que se encontra a cadeia metínica no anel diferencia tanto a seletividade, como o efeito antiproliferativo. Para isso, estudaram-se os corantes **18**, **19** e **20**. Todos possuem nas suas estruturas dois anéis de quinolina, sendo que na cianina **18** ambos os anéis estão ligados à cadeia metínica na posição dois, ou seja, segundo o padrão de substituição dos compostos aromáticos ambos os anéis possuem uma substituição (1,2). Na cianina **19** a ponte metínica está ligada a um anel na posição dois e a outro na posição quatro, isto é, uma substituição (1,2) e uma substituição (1,4), respetivamente. Já no caso do composto **20** ambos os anéis estão ligados à cadeia metínica na posição 4 e, por isso, ambos com uma substituição (1,4). Em nenhuma das situações referidas parece verificar-se seletividade entre linhas celulares e o potencial antiproliferativo exibido por todas aparenta ser elevado e semelhante para os três corantes.

Outro parâmetro que pode promover ou não a seletividade e a citotoxicidade das cianinas é a presença de grupos substituintes nos anéis heterocíclicos. Assim, para se estudar esta situação, testaram-se os compostos **22-26**. A cianina **22** tem um grupo nitro (NO<sub>2</sub>) na posição 5, enquanto a **26** tem o mesmo substituinte, mas na posição 6. As cianinas **23** e **25** têm um grupo amina (NH<sub>2</sub>) na posição 5 e 6, respetivamente. Avaliou-se, ainda, a presença de outro grupo substituinte, um grupo amida na posição 5 dos anéis aromáticos da cianina **24**. Posto isto, ao comparar-se o composto **23** com o **25** é possível observar que a posição em que o grupo substituinte se encontra ligado ao anel de benzeno pode influenciar a

seletividade do mesmo, uma vez que a cianina **25** aparenta ser mais seletiva para as linhas cancerígenas quando comparada com a cianina **23**. Esta última leva a uma elevada diminuição do crescimento celular em todas as linhas celulares. Já quando se comparam os corantes **25** e **26**, em que ambos estão substituídos na mesma posição, com diferentes grupos substituintes, NO<sub>2</sub> e NH<sub>2</sub>, respetivamente. A presença do grupo nitro parece estar associada a um potencial antiproliferativo elevado e a amina está associada a uma maior seletividade. Uma situação similar ocorre com as cianinas **23** e **24**, ambas substituídas na mesma posição do anel benzeno, no entanto, verifica-se que o grupo amida parece influenciar mais a seletividade, visto que o corante **24** aparenta inibir a proliferação celular de um modo mais eficaz nas linhas tumorais.

O comprimento da cadeia metínica das cianinas pode ser uma característica estrutural que interfere na atividade biológica das mesmas. Para ser possível avaliar a interferência do comprimento desta cadeia compararam-se as monometinocianinas **2-26**, as trimetinocianinas **27** e **28** e as heptametinocianinas **29-31**. Os resultados obtidos indicam que tanto as trimetinocianinas, como as heptametinocianinas não aparentam promover a seletividade entre células cancerígenas e não tumorais. Além disso, os compostos **30** e **31** não diminuem significativamente a proliferação celular em nenhuma das linhas celulares e nas condições experimentais em causa. O mesmo acontece quando o 3,3-dimetilindole está presente como anel heterocíclico nas cianinas (cianina **31**).

Para além disto, os resultados mostram que certas cianinas expressam diferentes efeitos consoante a linha celular cancerígena em que se encontravam a ser testadas, como é o caso das cianinas **14**, **22**, **24** e **26**. Deste modo, algumas cianinas não parecem apresentar somente seletividade entre células cancerígenas e normais, mas também ser mais eficazes em determinadas linhas celulares tumorais específicas.

Tendo em conta os parâmetros utilizados escolheram-se diferentes cianinas para cada linha celular em análise, uma vez que o *screening* inicial demonstrou alguns resultados diferentes para o mesmo composto dependendo da linha celular. Assim, no caso das células Caco-2 e das PC-3 prosseguiram-se os ensaios de IC<sub>50</sub> com as cianinas **14**, **15**, **16**, **22**, **24**, **25** e **26**, enquanto nas MCF-7 apenas se selecionaram as cianinas **14**, **15**, **16**, **24**, **25** e **26**. De forma a comparar os efeitos obtidos nas linhas tumorais com os obtidos em células normais, efetuou-se o IC<sub>50</sub> de todas as cianinas selecionadas para as linhas tumorais nas células NHDF, ou seja, as cianinas **14**, **15**, **16**, **22**, **24**, **25** e **26**.

#### 3.2.1.1.2. Ensaios de IC<sub>50</sub> e Avaliação de Seletividade

Para a realização dos estudos de  $IC_{50}$ , selecionaram-se os compostos que exibiram resultados mais interessantes no ensaio de *screening* inicialmente realizado, ou seja, os que cumpriram os critérios apresentados anteriormente. Assim sendo, testaram-se os corantes **14**, **15**, **16**, **22**, **24**, **25** e **26**, os quais são todos monometinocianinas. Os resultados obtidos estão expostos na Tabela 6. Como controlo positivo foi utilizado o 5-FU, como referido anteriormente. Para cada cianina utilizaram-se as concentrações mais adequadas para a determinação do  $IC_{50}$ , sendo que todas as concentrações utilizadas neste estudo se encontram dentro do seguinte intervalo: 0,001 e 50  $\mu$ M.

Tabela 6. Valores de  $IC_{50}$  em  $\mu$ M das cianinas em estudo nas linhas celulares NHDF, Caco-2, MCF-7 e PC-3.

Ao analisar os resultados obtidos através dos ensaios de  $IC_{50}$  é possível observar que todas as cianinas, tal como seria de esperar, diminuem drasticamente a percentagem de viabilidade celular nas linhas celulares cancerígenas. Uma das explicações para a sua atividade citotóxica ser elevada é o facto de se tratar de compostos catiónicos e de

| Composto    | NHDF  | r <sup>2</sup> | Caco-2 | r <sup>2</sup> | MCF-7 | r <sup>2</sup> | PC-3  | r <sup>2</sup> |
|-------------|-------|----------------|--------|----------------|-------|----------------|-------|----------------|
| <b>5-FU</b> | 6,17  | 0,89           | 1,58   | 0,96           | 1,24  | 0,98           | 1,72  | 0,82           |
| <b>14</b>   | 13,95 | 0,93           | 0,67   | 0,95           | 4,57  | 0,91           | 4,53  | 0,91           |
| <b>15</b>   | 7,53  | 0,92           | 0,09   | 0,96           | 4,04  | 0,92           | 4,04  | 0,97           |
| <b>16</b>   | 2,80  | 0,95           | 0,01   | 0,95           | 3,84  | 0,92           | 1,4   | 0,98           |
| <b>22</b>   | 24,54 | 0,91           | 1,40   | 0,95           | —     | —              | 48,56 | 0,93           |
| <b>24</b>   | 11,63 | 0,94           | 0,14   | 0,99           | 0,39  | 0,82           | 3,56  | 0,92           |
| <b>25</b>   | 3,00  | 0,95           | 0,18   | 0,98           | 0,33  | 0,93           | 2,10  | 0,95           |
| <b>26</b>   | 22,38 | 0,94           | 0,15   | 0,94           | 13,30 | 0,93           | 5,94  | 0,92           |

apresentarem uma estrutura lipofílica com uma carga deslocalizada entre os seus átomos de nitrogénio, o que lhes permite permeabilizarem as bicamadas lipídicas [54]. Para além disto, estes compostos têm a sua citotoxicidade associada às mitocôndrias. Como as cianinas são compostos catiónicos e as mitocôndrias possuem potenciais membranares negativos, estas têm a capacidade de penetrar a membrana mitocondrial, podendo interferir com o potencial membranar. Ao provocarem uma desregulação do funcionamento deste organelo, podem levar à quebra de produção de energia, causando mesmo a morte celular. [55].

Quanto à seletividade associada a cada composto testado (Tabela 7), esta foi calculada através da razão entre o  $IC_{50}$  nas NHDF e o  $IC_{50}$  na linha celular tumoral em questão.

Tabela 7. Valores de seletividades dos compostos em estudo **14-16**, **22** e **24-26** nas linhas celulares Caco-2, MCF-7 e PC-3.

| Composto  | Caco-2 | MCF-7 | PC-3 |
|-----------|--------|-------|------|
| <b>14</b> | 21     | 3     | 3    |
| <b>15</b> | 84     | 2     | 2    |
| <b>16</b> | 280    | 1     | 2    |
| <b>22</b> | 18     | —     | 1    |
| <b>24</b> | 83     | 30    | 3    |
| <b>25</b> | 17     | 9     | 1    |
| <b>26</b> | 150    | 2     | 4    |

As diferentes seletividades apresentadas pelos compostos podem também estar associadas às diferenças de potenciais mitocondriais exibidos entre linhas celulares. Quanto mais negativo for o potencial, mais facilmente o corante consegue penetrar a membrana mitocondrial. As células cancerígenas possuem por definição potenciais mitocondriais mais negativos, o que pode justificar o maior efeito citotóxico nas linhas tumorais, em relação às não tumorais [55].

A cianina **14** possui um comportamento similar nas linhas celulares MCF-7 e PC-3, enquanto que nas Caco-2 a diminuição do crescimento celular é bastante mais elevada, pelo que a seletividade exibida nesta linha em questão em relação às células NHDF é, também, mais elevada, cerca de 21 vezes.

A cianina **15** apresenta valores de  $IC_{50}$  mais baixos nas células Caco-2, seguindo-se das PC-3 e MCF-7. Tal como a cianina **14**, o valor de seletividade é maior na linha celular Caco-2, onde exhibe um valor de aproximadamente 84.

O composto **16** é um dos que possui um valor de seletividade mais elevado, sendo 280, também em relação às células Caco-2. Em ambas as outras linhas testadas a atividade antiproliferativa foi menor, apesar de nas células PC-3 ser menor do que nas MCF-7.

Em relação ao comportamento do corante **22**, este apenas foi testado nas linhas celulares Caco-2 e PC-3, uma vez que não cumpriu todos os parâmetros estipulados anteriormente, no caso não exibiu uma seletividade superior a 1,5 nas células MCF-7. Nas restantes linhas

celulares em que foi testado apresentou valores baixos de IC<sub>50</sub>, sendo menor também nas Caco-2, e uma seletividade de 18.

Quanto aos compostos **24** e **25**, ambos exibem valores de IC<sub>50</sub> mais baixos nas células Caco-2, com cerca de 83 e 17 de seletividade, respetivamente, em relação a estas células. Porém, a percentagem de viabilidade celular é menor nas células MCF-7, comparativamente à linha celular PC-3, sendo o valor de seletividade do corante **24** nas células MCF-7 de 30.

A cianina **26** é também uma das que possui um valor de seletividade maior, aproximadamente 150, nas células Caco-2. Já nas restantes linhas em estudo a inibição da proliferação celular foi menor, sendo que na linha celular MCF-7 foi menor do que na linha PC-3.

As duas cianinas mais eficientes a nível de seletividade células cancerígenas *versus* células não tumorais são a **16** e a **26**, pelo que estas foram selecionadas para estudos posteriores, designadamente: ensaios na presença e ausência de radiação, de modo a continuar a avaliar se a sua utilização é segura; observação dos efeitos provocados na morfologia celular, através de ensaios de microscopia de ótica comum; e ainda um estudo acerca da sua internalização celular, a partir da microscopia de fluorescência.

#### 3.2.1.1.3. Ensaio na Presença e Ausência de luz

Os compostos **16** e **26** apresentaram resultados promissores nos ensaios realizados anteriormente, pelo que se achou necessário um estudo mais aprofundado dos efeitos dos mesmos. Deste modo, realizou-se um ensaio com ambos os corantes na presença e na ausência de luz, uma vez que as cianinas são habitualmente utilizadas em PDT, isto é, em alguns compostos a presença de radiação promove o potencial citotóxico (Tabela 8). As cianinas em estudo já exibem potenciais antiproliferativos bastante elevados na ausência de luz, tendo-se então avaliado se a sua citotoxicidade é ou não potenciada na presença de radiação, com os valores de IC<sub>50</sub> e as respetivas curvas (Figura 18).

Apesar destes dois corantes não apresentarem os critérios necessários para serem estudados em ensaios de PDT, podem ainda possuir a capacidade de formarem ROS quando expostos a radiação. Posto isto, e de modo a acautelar a sua possível utilização posterior mesmo na presença de luz, realizaram-se ensaios na presença e ausência de luz. Para este ensaio recorreu-se a um controlo positivo, já testado em ensaios de PDT por Lima *et al.*[19]. Utilizou-se este controlo para garantir a possibilidade de aplicação da fonte luminosa, uma vez que no ensaio realizado no artigo anteriormente referido, foi utilizada uma fonte

luminosa com os comprimentos de onda específicos, enquanto neste ensaio se utilizou uma que abrange vários comprimentos de onda. Para além disso, calculou-se ainda a seletividade correspondente a cada composto, segundo a mesma razão utilizada no ensaio descrito no ponto 3.2.1.1.2 (Tabela 9).

Tabela 8. Valores de IC<sub>50</sub> em µM da cianina **16** e do controlo positivo na ausência e na presença de luz nas linhas celulares NHDF e Caco-2.

| Composto        | Tempo de irradiação (min) | Ausência de luz |                |        |                | Presença de luz |                |        |                |
|-----------------|---------------------------|-----------------|----------------|--------|----------------|-----------------|----------------|--------|----------------|
|                 |                           | NHDF            | r <sup>2</sup> | Caco-2 | r <sup>2</sup> | NHDF            | r <sup>2</sup> | Caco-2 | r <sup>2</sup> |
| <b>Controlo</b> | 30                        | 19,87           | 0,70           | 8,08   | 0,56           | 6,25            | 0,71           | 3,97   | 0,79           |
| <b>16</b>       | 30                        | 11,06           | 0,95           | 0,06   | 0,91           | 5,37            | 0,93           | 0,04   | 0,96           |

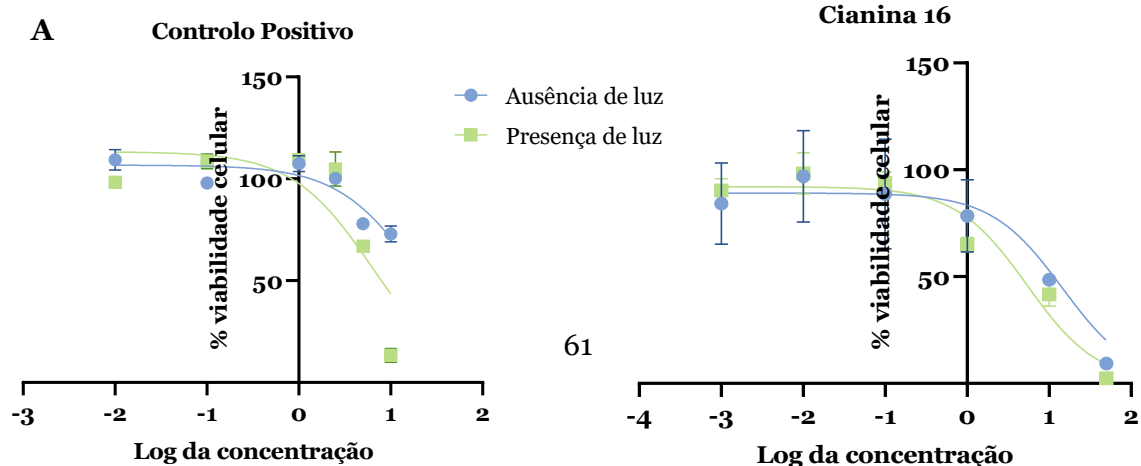


Figura 18. a) Curvas de IC<sub>50</sub> do controlo positivo e da cianina **16** na linha celular NHDF na ausência e presença de luz. b) Curvas de IC<sub>50</sub> do controlo positivo e da cianina **16** na linha celular Caco-2 na ausência e presença de luz.

Tabela 9. Valores de seletividades dos compostos em estudo **16** e **26** na linha celular Caco-2.

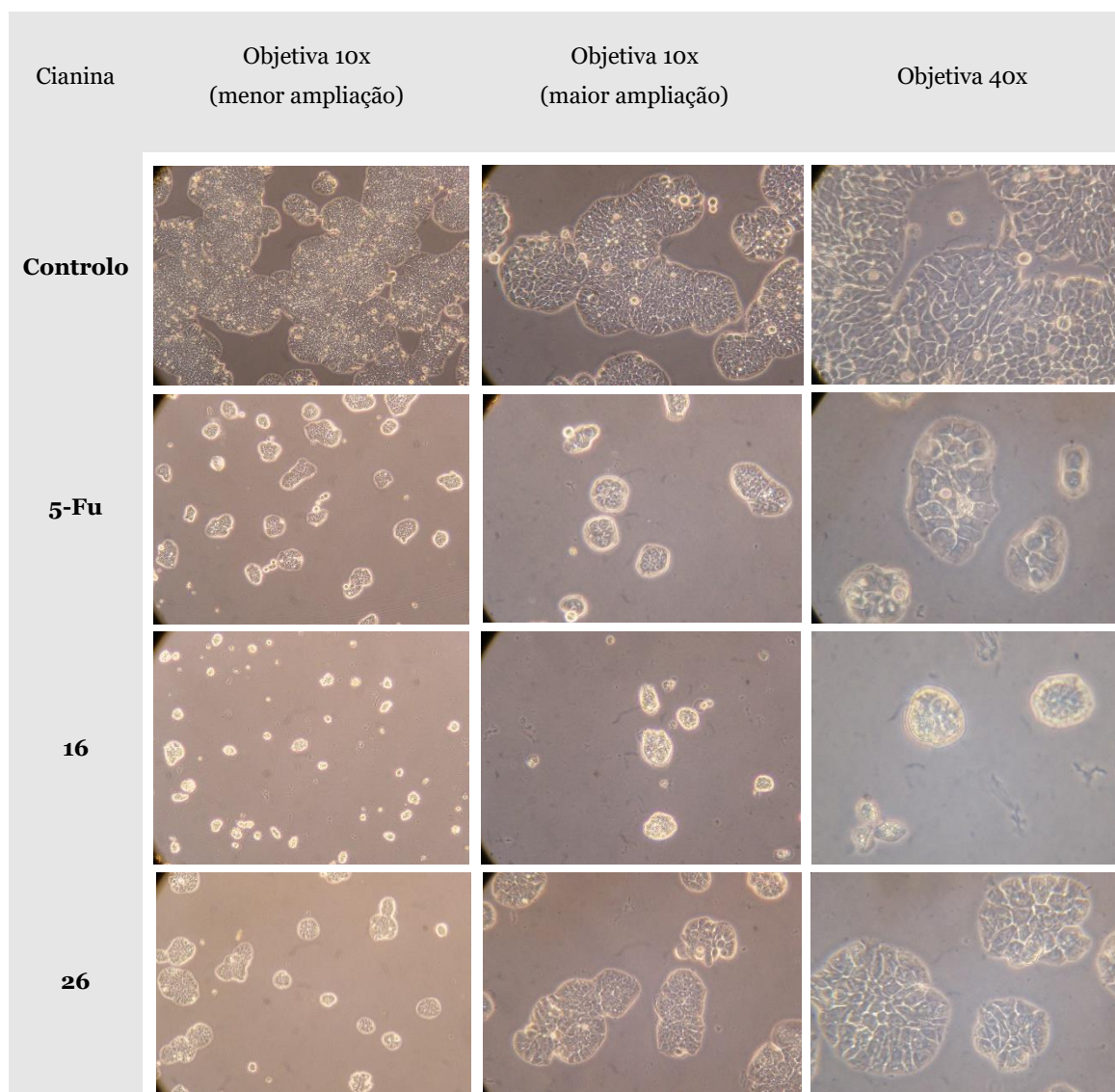
| Composto  | Caco-2          |                 |
|-----------|-----------------|-----------------|
|           | Ausência de luz | Presença de luz |
| Controlo  | 3               | 2               |
| <b>16</b> | 184             | 134             |

Ao analisar os resultados é possível verificar que, na presença de radiação, não há aumento significativo de IC<sub>50</sub> da cianina **16**. Deste modo, é possível afirmar que o potencial citotóxico deste composto não é aumentado aquando exposto a luz. Quanto aos resultados obtidos por parte da cianina utilizada como controlo positivo, as divergências de valores obtidos neste trabalho com os obtidos em Lima *et al.* podem ser justificadas pelo facto da fonte luminosa utilizada neste ensaio ter uma menor intensidade no comprimento de onda correspondente ao máximo de absorção (640 nm) [19].

### 3.2.2. Microscopia Ótica Comum

A microscopia ótica comum foi realizada para se observar os efeitos dos compostos em estudo, neste caso dos corantes **16** e **26**, nas características morfológicas e confluência da linha celular cancerígena Caco-2. A observação destes efeitos foi executada em duas objetivas distintas (10x e 40x) (Tabela 10). Antes de cada observação retirou-se o meio do respetivo poço a ser analisado. Tal como nos restantes ensaios utilizou-se o 5-Fu como controlo positivo e células não tratadas como controlo negativo.

Tabela 10. Observação dos efeitos provocados pelos compostos **16** e **26** na linha celular Caco-2, na objetiva de 10x e na objetiva de 40x.



Ao observar as imagens obtidas a partir da objetiva de 10x em ambas ampliações e a objetiva de 40x, na presença do controlo positivo 5-Fu, observam-se células maiores que poderão ser consequência de paragem proliferativa na fase S. Para além disso, os agregados celulares presentes são de menores dimensões (menor número de células), quando comparados com o controlo negativo.

As células tratadas com a cianina **16** exibem um aspeto bastante diferente em comparação com ambos os controlos, uma vez que o número de células por poço é menor que em ambos. As células presentes apresentam uma morfologia com dimensões muito menores, o que pode indicar que são células apoptóticas, muitas delas sobrenadantes. As células contidas em agregados exibem uma coloração brilhante e não se conseguem diferenciar, como acontecia no controlo positivo.

As células tratadas com a cianina **26** apresentam aspeto semelhante ao controlo positivo, no entanto, parece ser um menor número de células por poço, de dimensões idênticas a mais pequenas quando comparadas com o controlo e com agregados diferenciados, mas menores. Também não se observam células refringentes em mitose, o que poderá sugerir paragem do ciclo em G1 ou G0.

### **3.2.3. Microscopia de Fluorescência**

Na microscopia de fluorescência são utilizados corantes que emitem fluorescência quando estimulados por um feixe de luz, denominados de fluoróforos. Dependendo do objetivo da imagem que se tenciona obter adicionam-se diferentes fluoróforos à amostra, nomeadamente, no caso de se pretender observar diferentes organelos, uma vez que cada fluoróforo identifica e marca especificamente a estrutura subcelular para a qual possui maior afinidade. Ao fazer-se incidir o laser que emite a luz de excitação a diferentes comprimentos de onda, em diferentes partes do tecido ou célula, distinguem-se as diferentes estruturas. Estes corantes adquirem melhor sensibilidade e especificidade quando mais elevada for a relação sinal-ruído, permitindo assim uma deteção mais nítida [56].

No entanto, uma das limitações desta técnica é o fenómeno designado por foto branqueamento, em que os fluoróforos utilizados nos procedimentos tendem a desaparecer irreversivelmente ou a reagir quando expostos à luz de excitação [57]. Em contrapartida, possui inúmeras vantagens, sendo uma das principais o facto de fornecer um corte ótico que permite a reconstituição 3D da amostra, a partir das múltiplas imagens de alta resolução obtidas [56, 58].

A microscopia de fluorescência foi realizada com o objetivo de confirmar se as cianinas em estudo, **16** e **26**, atravessam as membranas celulares e, de modo, a saber qual seria a sua possível localização intracelular nas células Caco-2 (Figura 19). As células foram incubadas com os compostos durante 20h, realizando-se depois a fixação e incubação com o marcador *Hoescht* 33342. Posteriormente, procedeu-se à visualização das lâminas preparadas ao microscópio.

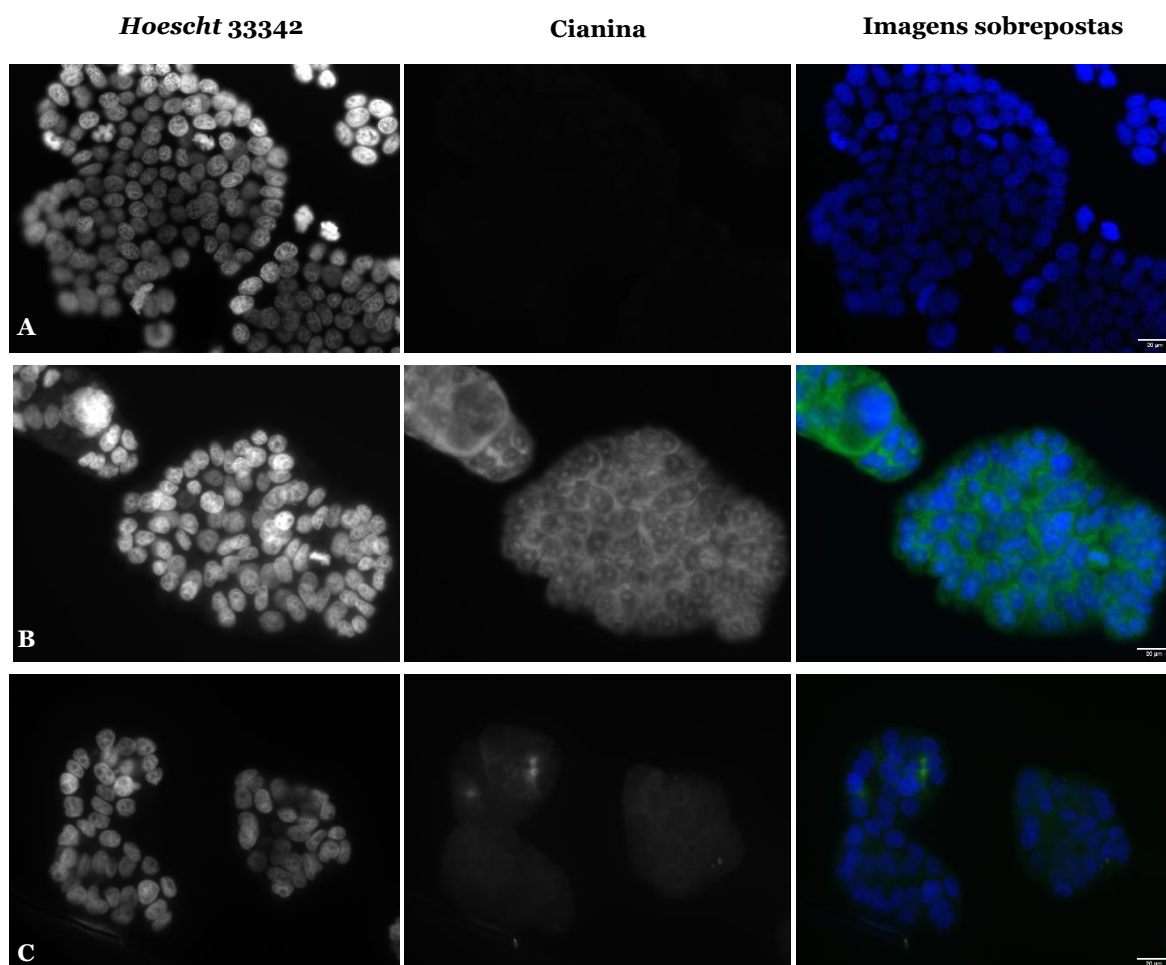


Figura 19. Imagens de microscopia de fluorescência representativas da linha celular Caco-2 incubadas com a cianina **16** (b) e com a cianina **26** (c) numa concentração de 1  $\mu$ M durante 24h (ambas apresentam sinal no canal verde). O controlo (a) foi marcado apenas com *Hoescht 33342* (canal azul).

Os resultados obtidos demonstraram que ambas as cianinas testadas possuem fluorescência e a capacidade de atravessar a membrana celular. Em relação à localização intracelular, estes corantes marcam tanto o citoplasma (de forma difusa e em maior intensidade), como o núcleo. No núcleo, a cianina **16** parece marcar algum organelo celular no seu interior ou nucleoplasma, não parecendo localizar-se no DNA. Quanto à intensidade de fluorescência, mais especificamente, a cianina **26** possui uma intensidade bastante menor que a **16**. A fluorescência do composto 26 decresce com o passar do tempo, sendo notória uma perda de intensidade.

Quanto à marcação com o *Hoescht 33342*, esta permitiu observar a morfologia nuclear, sendo que os resultados obtidos neste ensaio corroboram com a análise realizada no ensaio anterior de microscopia de visível. Ambas as cianinas apresentam núcleos com aspeto semelhante ao controlo, no entanto, foi difícil encontrar células em mitose (visíveis pelo

DNA), tal como no ensaio anteriormente apresentado. Para além disso, ambas apresentam um menor número de células por lamela em comparação com o controlo, sendo a cianina **26** a que originou menor concentração celular. Assim, apenas se pode afirmar, de modo qualitativo, que ambas as cianinas diminuem o número de células presente por lamela, interferindo hipoteticamente na proliferação celular. No entanto, não foi possível determinar com rigor os seus mecanismos de ação e não se pode excluir alguma percentagem de morte celular, uma vez que as células mortas poderão ter sido removidas nas etapas de lavagem.

### **3.3. Estudos *in silico***

Os estudos *in silico* são métodos computacionais baseados em técnicas de simulação molecular que, através da predição da estrutura molecular do composto em estudo, simulam as suas propriedades físico químicas, as possíveis interações que o mesmo pode realizar e toxicidade associada, entre outras [59]. Nos dias de hoje existem já alguns métodos *in silico*, no entanto, um dos principais objetivos é a previsão do perfil farmacocinético do composto, avaliando as propriedades de absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME) e também a toxicidade avaliando-se, globalmente, o perfil ADMET [60, 61]. Estas propriedades são fundamentais para garantir que o composto alcança o seu alvo terapêutico e se alcança em quantidades suficientes capazes de produzir o efeito fisiológico desejado e com a devida segurança [62]. O trabalho de *Lipinski et al.* incidiu nesta mesma área, analisando se os compostos continham propriedades físico químicas ideais para serem utilizados como fármacos oralmente ativos. Deste modo, criou a chamada “regra dos cinco”, a qual delimita uma relação entre os parâmetros farmacocinéticos e as propriedades físico químicas do possível fármaco [60, 63]. A criação desta regra foi bastante importante para avaliação da utilização de possíveis fármacos, uma vez que as interações entre a farmacocinética, toxicidade e potência associadas ao composto são determinantes para que este possa ser eficaz [63].

Posto isto, avaliaram-se vários parâmetros associados a este perfil ADMET. Dentro da absorção previu-se a absorção a nível do trato gastrointestinal (TGI) humano e a solubilidade aquosa dos corantes. A primeira é predita através do modelo *BOILED-EGG*, enquanto a segunda foi avaliada através do modelo baseado na estimativa da solubilidade aquosa diretamente da estrutura molecular (ESOL - do inglês, *estimating aqueous solubility directly from molecular structure*) que utiliza um algoritmo decimal de solubilidade molar (Log S) [60]. O peso molecular dos compostos também pode ser um fator decisivo para a absorção dos mesmos e, por isso, está incluído nas propriedades moleculares gerais de cada composto [62].

No âmbito da farmacocinética avaliaram-se as interações com a glicoproteína-P (P-gp - do inglês, *P-glycoprotein*) e as principais isoenzimas da superfamília do citocromo P450 (CYP450 - do inglês, *cytochrome P450*). A P-gp possui um papel de elevada relevância entre os transportadores de ATP, sendo considerada o membro mais importante desta família. A capacidade de um fármaco ser ou não substrato para esta glicoproteína é crucial para estimar o efluxo ativo do mesmo entre as membranas biológicas. A P-gp está altamente expressa em determinadas células tumorais, o que pode levar à existência de cancros multirresistentes [60], no caso em que os fármacos utilizados são substratos para esta. Quanto à inibição da família de isoenzimas do CYP450, esta pode afetar o metabolismo normal dos fármacos, pelo que a avaliação da inibição destas enzimas é significativamente importante para a previsão das interações medicamentosas. Dentro desta família encontram-se o CYP 1A2, CYP 2C19, CYP 2C9, CYP 2D6 e o CYP 3A4 [59]. Estas são as isoformas de CYPs mais envolvidas no processo de biotransformação de fármacos, pelo que a sua inibição pode levar a toxicidade e/ou efeitos indesejados devido à baixa depuração e, conseqüente, acumulação do fármaco e eventuais metabolitos no organismo [60].

Quanto à excreção dos compostos, a depuração (*clearance*) é um processo que consiste na passagem de um composto do sangue para os respetivos órgãos de excreção, que são usualmente os rins e o fígado [64]. Este mecanismo pode englobar o transporte ativo ou passivo dos compostos, ou para a urina ou para a bÍlis, consoante o respetivo órgão de excreção. Existem diferentes tipos de transportadores neste sistema, sendo que duas das maiores classes de transportadores são os transportadores orgânicos catiónicos (OCTs - do inglês, *organic cation transporters*) e os transportadores orgânicos aniônicos (OATs - do inglês, *organic anion transporters*) [61]. O valor de depuração do composto é um importante parâmetro no seu perfil farmacocinético, uma vez que se considera que este está intimamente relacionado com a biodisponibilidade do composto, assim como com a sua eliminação. Por este motivo, torna-se um critério bastante útil no processo de quantificação da taxa de dosagem indicada, tal como da concentração no estado estacionário ideal do possível fármaco [64].

A toxicidade foi avaliada através da hepatotoxicidade e da toxicidade de Ames, sendo que esta última estima a mutagenicidade dos compostos em estudo [62]. Para além destas, ainda se avaliou a sensibilização da pele, uma vez que existem compostos que podem apresentar diversos efeitos adversos quando em contacto com a pele, nomeadamente a irritação da mesma. A sensibilização inicia-se por um processo chamado de haptização, que consiste na formação de conjugados entre proteínas e compostos de baixo peso molecular. Esta

haptização pode dar origem a um tipo de hipersensibilidade retardada, denominada por dermatite alérgica de contacto [65].

A previsão de possíveis alertas de compostos de interferência *Pan-Assay* (PAINS - do inglês, *Pan-assay interference compounds*) é um parâmetro bastante importante, uma vez que dizem respeito a moléculas que contêm subestruturas que proporcionam respostas potentes em ensaios biológicos, independentemente do seu alvo. Estes fragmentos pertencentes às suas estruturas levam a que haja resultados falseados, concretamente, falsos positivos [60].

Resumidamente, a *druglikeness* avalia, de forma qualitativa, a biodisponibilidade de um fármaco, principalmente a possibilidade de ser oralmente ativo, através da previsão de diversas propriedades, como o peso molecular, a solubilidade e lipofilicidade, e a capacidade de se ligar a alvos biológicos, de modo a reduzir a existência de ligações não específicas [60]. A previsão destes parâmetros foi realizada através da medição da sua biodisponibilidade e da “regra dos cinco” de *Lipinski*, referida anteriormente [59]. Qualquer violação aos parâmetros que compõem a regra, leva à exclusão das moléculas, uma vez que possuem propriedades incompatíveis com um perfil farmacocinético aceitável [60]. A biodisponibilidade estudada *in silico* prevê a probabilidade de um composto possuir, pelo menos, 10% de biodisponibilidade oral em ratos ou uma permeabilidade mensurável na linha celular Caco-2 [60].

Assim sendo, realizaram-se os estudos *in silico* correspondentes a cada corante em estudo, apresentados nas tabelas 2 e 3, de forma a prever os seus comportamentos e, por conseguinte, seleccionar os compostos com potenciais mais interessantes.

Tabela 11. Resumo dos resultados dos estudos computacionais das diferentes absorções, características farmacocinéticas e excreções para os compostos **1-31**.

| Compostos | Absorção               |         |                     | Farmacocinética |                   |                   |                  |                  |                  | Excreção                        |                  |
|-----------|------------------------|---------|---------------------|-----------------|-------------------|-------------------|------------------|------------------|------------------|---------------------------------|------------------|
|           | Peso molecular (g/mol) | TGI     | Solubilidade aquosa | Substrato P-gp  | Inibidor CYP P1A2 | Inibidor CPY 2C19 | Inibidor CYP 2C9 | Inibidor CYP 2D6 | Inibidor CYP 3A4 | Depuração total (log ml/min/kg) | Subs. OCT2 renal |
| <b>1</b>  | 282,38                 | Elevada | Moderada            | Sim             | Sim               | Sim               | Sim              | Não              | Sim              | 0,442                           | Não              |
| <b>2</b>  | 311,44                 | Elevada | Moderada            | Sim             | Não               | Sim               | Sim              | Não              | Não              | 0,943                           | Sim              |
| <b>3</b>  | 391,35                 | Elevada | Moderada            | Sim             | Não               | Sim               | Sim              | Não              | Não              | 0,934                           | Sim              |
| <b>4</b>  | 438,35                 | Elevada | Moderada            | Sim             | Não               | Sim               | Sim              | Não              | Não              | 0,921                           | Sim              |
| <b>5</b>  | 311,44                 | Elevada | Moderada            | Sim             | Não               | Sim               | Sim              | Não              | Não              | 0,588                           | Sim              |
| <b>6</b>  | 339,50                 | Elevada | Moderada            | Sim             | Sim               | Sim               | Sim              | Não              | Sim              | 0,681                           | Sim              |
| <b>7</b>  | 438,95                 | Elevada | Moderada            | Sim             | Sim               | Sim               | Sim              | Não              | Sim              | 0,126                           | Sim              |
| <b>8</b>  | 590,54                 | Elevada | Baixa               | Sim             | Não               | Sim               | Não              | Não              | Sim              | 0,966                           | Não              |
| <b>9</b>  | 554,42                 | Elevada | Baixa               | Não             | Não               | Sim               | Sim              | Não              | Não              | 1,028                           | Sim              |
| <b>10</b> | 550,56                 | Elevada | Baixa               | Sim             | Não               | Não               | Sim              | Não              | Não              | 1,385                           | Sim              |
| <b>11</b> | 690,83                 | Baixa   | Insolúvel           | Sim             | Não               | Não               | Não              | Não              | Não              | 1,774                           | Não              |
| <b>12</b> | 494,46                 | Elevada | Baixa               | Não             | Não               | Sim               | Sim              | Não              | Não              | 1,053                           | Sim              |
| <b>13</b> | 564,59                 | Elevada | Baixa               | Sim             | Não               | Não               | Não              | Não              | Não              | 1,248                           | Não              |
| <b>14</b> | 279,31                 | Elevada | Moderada            | Sim             | Sim               | Não               | Não              | Não              | Não              | 0,790                           | Sim              |
| <b>15</b> | 295,38                 | Elevada | Moderada            | Sim             | Não               | Sim               | Não              | Não              | Não              | 0,744                           | Sim              |
| <b>16</b> | 289,35                 | Elevada | Moderada            | Sim             | Não               | Não               | Não              | Sim              | Não              | 0,841                           | Sim              |
| <b>17</b> | 305,42                 | Elevada | Moderada            | Sim             | Não               | Sim               | Não              | Não              | Não              | 0,659                           | Sim              |
| <b>18</b> | 426,29                 | Elevada | Moderada            | Sim             | Não               | Não               | Não              | Sim              | Não              | 1,183                           | Sim              |
| <b>19</b> | 299,39                 | Elevada | Moderada            | Sim             | Não               | Não               | Não              | Sim              | Não              | 0,856                           | Não              |
| <b>20</b> | 482,40                 | Elevada | Baixa               | Sim             | Sim               | Sim               | Não              | Sim              | Sim              | 1,480                           | Sim              |
| <b>21</b> | 435,33                 | Elevada | Moderada            | Sim             | Não               | Sim               | Sim              | Não              | Não              | 1,086                           | Sim              |
| <b>22</b> | 522,40                 | Elevada | Moderada            | Sim             | Não               | Sim               | Não              | Não              | Sim              | 1,150                           | Sim              |
| <b>23</b> | 481,42                 | Elevada | Moderada            | Sim             | Sim               | Sim               | Sim              | Não              | Sim              | 1,111                           | Sim              |
| <b>24</b> | 396,55                 | Elevada | Moderada            | Sim             | Não               | Sim               | Sim              | Não              | Sim              | 0,687                           | Sim              |
| <b>25</b> | 481,42                 | Elevada | Moderada            | Sim             | Sim               | Sim               | Sim              | Não              | Sim              | 1,085                           | Sim              |
| <b>26</b> | 384,50                 | Elevada | Moderada            | Sim             | Não               | Sim               | Não              | Não              | Não              | 0,389                           | Sim              |
| <b>27</b> | 460,31                 | Baixa   | Moderada            | Sim             | Não               | Não               | Não              | Sim              | Sim              | 1,332                           | Sim              |
| <b>28</b> | 586,23                 | Baixa   | Moderada            | Sim             | Não               | Não               | Não              | Sim              | Sim              | 1,944                           | Sim              |
| <b>29</b> | 703,18                 | Baixa   | Baixa               | Sim             | Não               | Não               | Não              | Não              | Não              | 1,223                           | Sim              |
| <b>30</b> | 937,24                 | Baixa   | Insolúvel           | Sim             | Não               | Não               | Não              | Não              | Não              | 4,396                           | Não              |
| <b>31</b> | 855,28                 | Baixa   | Baixa               | Sim             | Não               | Não               | Não              | Não              | Não              | 0,756                           | Não              |

Tabela 12. Resumo dos resultados dos estudos computacionais da toxicidade, alerta *pains* e *druglikeness* para os compostos **1-31**.

| Compostos | Toxicidade             |                  |            | Alerta Pains | <i>Druglikeness</i> (nr. de violações) |         |                    |
|-----------|------------------------|------------------|------------|--------------|--|---------|--------------------|
|           | Sensibilização da pele | Hepatotoxicidade | T. de Ames |              | Lipinski                               | Veber   | Biodisponibilidade |
| <b>1</b>  | Não                    | Sim              | Sim        | 0            | Sim (0)                                | Sim     | 0,55               |
| <b>2</b>  | Não                    | Sim              | Não        | 0            | Sim (0)                                | Sim     | 0,55               |
| <b>3</b>  | Não                    | Sim              | Não        | 0            | Sim (0)                                | Sim     | 0,55               |
| <b>4</b>  | Não                    | Sim              | Não        | 0            | Sim (0)                                | Sim     | 0,55               |
| <b>5</b>  | Não                    | Sim              | Não        | 0            | Sim (0)                                | Sim     | 0,55               |
| <b>6</b>  | Não                    | Não              | Não        | 0            | Sim (0)                                | Sim     | 0,55               |
| <b>7</b>  | Não                    | Não              | Não        | 0            | Sim (0)                                | Sim     | 0,55               |
| <b>8</b>  | Não                    | Não              | Não        | 0            | Sim (1)                                | Sim     | 0,55               |
| <b>9</b>  | Não                    | Sim              | Não        | 0            | Sim (1)                                | Não (1) | 0,55               |
| <b>10</b> | Não                    | Não              | Não        | 0            | Não (2)                                | Não (2) | 0,17               |
| <b>11</b> | Não                    | Não              | Não        | 0            | Não (2)                                | Não (4) | 0,17               |
| <b>12</b> | Não                    | Não              | Não        | 0            | Sim (1)                                | Não (1) | 0,55               |
| <b>13</b> | Não                    | Não              | Não        | 0            | Não (2)                                | Não (2) | 0,17               |
| <b>14</b> | Não                    | Sim              | Não        | 0            | Sim (0)                                | Sim     | 0,55               |
| <b>15</b> | Não                    | Sim              | Não        | 0            | Sim (0)                                | Sim     | 0,55               |
| <b>16</b> | Não                    | Não              | Não        | 0            | Sim (0)                                | Sim     | 0,55               |
| <b>17</b> | Não                    | Sim              | Não        | 0            | Sim (0)                                | Sim     | 0,55               |
| <b>18</b> | Não                    | Sim              | Sim        | 1            | Sim (0)                                | Sim     | 0,55               |
| <b>19</b> | Não                    | Não              | Sim        | 1            | Sim (0)                                | Sim     | 0,55               |
| <b>20</b> | Não                    | Não              | Sim        | 0            | Sim (1)                                | Sim     | 0,55               |
| <b>21</b> | Não                    | Não              | Sim        | 0            | Sim (0)                                | Sim     | 0,55               |
| <b>22</b> | Não                    | Não              | Sim        | 0            | Sim (0)                                | Sim     | 0,55               |
| <b>23</b> | Não                    | Sim              | Sim        | 0            | Sim (0)                                | Sim     | 0,55               |
| <b>24</b> | Não                    | Sim              | Não        | 0            | Sim (0)                                | Sim     | 0,55               |
| <b>25</b> | Não                    | Não              | Sim        | 0            | Sim (0)                                | Sim     | 0,55               |
| <b>26</b> | Não                    | Não              | Sim        | 0            | Sim (0)                                | Sim     | 0,55               |
| <b>27</b> | Não                    | Não              | Não        | 0            | Sim (0)                                | Sim     | 0,55               |
| <b>28</b> | Não                    | Não              | Não        | 0            | Sim (0)                                | Sim     | 0,55               |
| <b>29</b> | Não                    | Não              | Não        | 0            | Não (2)                                | Não (1) | 0,17               |
| <b>30</b> | Não                    | Não              | Não        | 0            | Não (2)                                | Não (1) | 0,17               |
| <b>31</b> | Não                    | Não              | Não        | 0            | Não (2)                                | Não (1) | 0,56               |

Para que um composto químico possa ser submetido a testes clínicos e o seu uso como fármaco seja aprovado pela FDA é necessário cumprir determinados requisitos, tal como foi referido anteriormente. Desta forma, os ensaios *in silico* constituem uma grande ajuda nesse âmbito, uma vez que, entre outros benefícios, facilitam a descoberta de compostos com perfis ADMET indesejáveis, assim como, a existência de possíveis efeitos adversos [66].

Segundo *Daina* e os seus colaboradores, o peso molecular de um composto deve pertencer ao intervalo 150-500 g/mol [60]. No caso da regra de *Lipinski* umas das violações a esta regra passa por o peso molecular (PM) do composto ser superior a 500 g/mol. Assim sendo, os compostos **8-11**, **13**, **22**, **28-31** infringem este critério da regra de *Lipinski* (PM>500 g/mol). Por outro lado, o parâmetro de *Veber* está intimamente associado ao número de ligações rotativas que cada composto possui na sua estrutura, pelo que os compostos **9-13** e **29-31** falham neste parâmetro, exatamente pelo elevado número de ligações rotativas que possuem. Para além disto, os corantes **10**, **11**, **13**, **29** e **30** também não possuem uma boa razão de biodisponibilidade, no entanto, os restantes aparentam apresentar uma razão de biodisponibilidade igual ou superior a 0,55.

O peso molecular também está intrinsecamente ligado à solubilidade aquosa do composto, sendo que os corantes **11** e **30** são completamente insolúveis, enquanto os corantes **8-10**, **12**, **13**, **20**, **29** e **31** possuem uma solubilidade baixa e os restantes possuem uma solubilidade considerada moderada. Relativamente à absorção a nível do TGI humano todos os compostos, com a exceção dos **11** e **27-32**, apresentam elevada capacidade de absorção.

Em relação aos parâmetros farmacocinéticos, apenas os compostos **9** e **12** é que não são considerados substratos para a P-gp, o que significa que os restantes corantes podem ser transportados para o exterior celular através desta glicoproteína. No que se refere à inibição dos CYPs da superfamília do CYP450 apenas os corantes **11**, **29-31** não inibem nenhum dos destes CYPs. Já em relação à excreção, os compostos **9-13**, **18**, **20-23**, **25**, **27-30** apresentam todos valores de depuração superiores a um, sendo que o corante **30** é o que apresenta maior valor. A grande maioria demonstra ser substrato para os OCT2.

Um dos principais parâmetros associados ao perfil ADMET é o potencial tóxico que cada composto pode apresentar. Esta toxicidade foi avaliada por três critérios, a sensibilização da pele, hepatotoxicidade e a toxicidade de Ames. No que se refere ao primeiro ponto, nenhum composto apresenta a possibilidade de sensibilizar a pele. No entanto, no que diz respeito à hepatotoxicidade, os compostos **1-5**, **9**, **14**, **15**, **17**, **18**, **23** e o **24** demonstram ser tóxicos.

Os corantes **1**, **18-23**, **25** e **26** possuem potencial mutagénico, isto é, toxicidade de Ames. Já em relação a alertas PAINS apenas os compostos **18** e **19** apresentam um alerta.

Tendo em conta os ensaios de avaliação biológica dos corantes, mais especificamente os ensaios de MTT, em que as cianinas que apresentaram melhores valores de seletividade foram a **16** e **26** e, tendo em conta os estudos *in silico* aqui representados é exequível fazer um balanço sobre a possibilidade de se selecionar uma destas cianinas para ser utilizada como fármaco no futuro. Assim, entre as duas cianinas acima referidas, a **26** deverá possuir elevada absorção oral, apenas inibe o CYP2C19, não viola nenhuma das regras de *Lipinski* e apresenta boa biodisponibilidade. Em contrapartida, apesar de não apresentar hepatotoxicidade, demonstra ter potencial genotóxico. Por outro lado, a cianina **16** também deverá ter uma elevada absorção a nível do TGI, inibe somente o CYP2D6, não possui nenhum dos potenciais de toxicidade estudados, nem contém nenhuma violação à regra de *Lipinski*, para além de apresentar boa disponibilidade oral. Assim sendo, a cianina **16** aparenta ter maior potencial para avançar para estudos futuros neste contexto.





## **Capítulo 4**



## 4. Conclusões e Perspetivas Futuras

Perante os objetivos inicialmente definidos e, após a análise e discussão de resultados referente à prática laboratorial, são possíveis obter algumas conclusões.

A síntese das cinco novas monometinocianinas propostas neste trabalho, foi de procedimento relativamente rápido, o que facilitou a obtenção de bons rendimentos reacionais. Todas as estruturas destes compostos foram comprovadas com RMN  $^1\text{H}$ , RMN  $^{13}\text{C}$  e IV.

Nos ensaios relativos à avaliação biológica de todos os compostos em estudo verifica-se que a cianina **16** demonstra uma elevada atividade antiproliferativa nas linhas celulares cancerígenas, apresentando uma maior seletividade para as células Caco-2 (cerca de 280 vezes em relação às células tumorais), e um valor de  $\text{IC}_{50}$  de  $0,01 \mu\text{M}$ . Para além disso, através dos estudos complementares de microscopia de fluorescência é possível confirmar que o composto atravessa as membranas celulares. Contudo, o seu mecanismo de ação não está ainda bem definido, pelo que são necessários mais estudos neste âmbito. Os estudos computacionais permitiram apontar a cianina **16** como tendo potencial para avançar para estudos futuros, uma vez que esta não demonstra potencial de toxicidade, para além de não violar as regras de *Lipinski* e, potencialmente, apresentar boa disponibilidade oral.

Todas as cianinas aqui estudadas devem ingressar em mais estudos biológicos, de modo a comprovar os seus potenciais anticancerígenos, uma vez que neste trabalho se realizou uma abordagem preliminar da ação dos mesmos. Em relação à cianina **16**, esta deve ser integrada em estudos futuros de citometria de fluxo, de modo a esclarecer o seu mecanismo de ação. Deve, ainda, integrar novos ensaios, de forma a especificar a sua localização intracelular.



## **Bibliografia**



## Bibliografia

1. Swamy P.C.A., Sivaraman G., Priyanka R. N., Raja S.O., Ponnuvel K., Shanmugpriya J., Gulyani A. (2020). Near Infrared (NIR) absorbing dyes as promising photosensitizer for photo dynamic therapy. *Coordination Chemistry Reviews*, 411, 213-233.
2. Bray F., Ferlay J., Soerjomataram I., Siegel R. L., Torre L. A., Jemal A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68 (6), 394-424.
3. Severino P., Hollanda L. M., Santini A., Reis L. V., Souto S. B., Souto B. E., Silva A. M. (2016). Advances in nanobiomaterials for oncology nanomedicine in *Nanobiomaterials in Cancer Therapy*. William Andrew Publishing, 91-115.
4. Wang W., Zheng T., Zhang M., Zhang Q., Wu F., Liu Y.,... & Sun Y. (2020). Tumor-targeting multi-shelled hollow nanospheres as drug loading platforms for imaging-guided combinational cancer therapy. *Biomaterials science*, 8(6), 1748-1758.
5. Shindy H.A. (2016). Characterization, mechanisms and applications in the chemistry of cyanine dyes: A review. *European Journal of Molecular Biotechnology*, (4), 158-170.
6. Fernandes T. C., Lima E., Boto R. E., Ferreira D., Fernandes J. R., Almeida, P., ... & Reis L. V. (2020). In vitro phototherapeutic effects of indolenine-based mono-and dithiosquaraine cyanine dyes against Caco-2 and HepG2 human cancer cell lines. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 31, 1-13.
7. Almeida P. (1999). Cianinas, a Cor não Visível da Fotografia. *Química - Boletim da SPQ*, 73, 9-12.
8. Shindy H.A. (2017). Fundamentals in the chemistry of cyanine dyes: A review. *Dyes and Pigments*, 145, 505-513.

9. Shindy H. A., El-Maghraby M., Goma M. M., Harb N. A. (2020). Heptamethine and nonamethine cyanine dyes: novel synthetic strategy, electronic transitions, solvatochromic and halochromic evaluation. *Chemistry International*, 4(6), 187-199.
10. Behera G. B., Behere P. K., Mishra B. K. (2007). Cyanine dyes: self aggregation and behaviour in surfactants a review. *Journal of Surface Science and Technology*, 23(1/2), 1-31.
11. Soleiman H. A. (2010). Synthesis and studies absorption spectra behaviour on some selected monomethine cyanine dye-, apocyanine dye-, and aza cyanine dye derivatives. *Canadian Journal on Chemical Engineering & Technology*, 1(4), 33-42.
12. Shah S. S., Ahmad R., Shah S. W. H., Asif K.M., Naeem K. (1998). Synthesis of cationic hemicyanine dyes and their interactions with ionic surfactants. *Physicochemical and Engineering Aspects*, 137(1-3), 301-305.
13. Kulinich A.V. and Ishchenko A. A. (2009). Merocyanine dyes: synthesis, structure, properties and applications. *Russian Chemical Reviews*, 78(2), 141-164.
14. Fisher N. I. and Hamer F. M. (1930). A general method for the preparation of thiocyanine dyes. Some simple thiocarbocyanines. *Journal of the Chemical Society (Resumed)*, 2502-2510.
15. Shindy H.A. (2020). Synthesis of different classes of five/six membered heterocyclic cyanine dyes: A review. *Chemistry International*, 6(2), 56-74.
16. Ramos S. S., Santos P. F., Reis L. V., Almeida P. (2002). Some new symmetric rigidified triheterocyclic heptamethinecyanine dyes absorbing in the near infrared. *Dyes and pigments*, 53(2), 143-152.
17. Bhattarai P. and Dai Z. (2017) Cyanine based nanoprobe for cancer theranostics. *Advanced Healthcare Materials*, 6(14), 1-23.
18. Dichiaro M., Prezzavento O., Marrazzo A., Pittalà V., Salerno L., Rescifina A., Amata E. (2017). Recent advances in drug discovery of phototherapeutic non-porphyrinic anticancer agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 142, 459-485.

19. Lima E., Ferreira O., Silva J. F., Santos A. O., Boto R. E., Fernandes J. R., ... & Reis L. V. (2020). Photodynamic activity of indolenine-based aminosquaraine cyanine dyes: Synthesis and In Vitro photobiological evaluation. *Dyes and Pigments*, 174, 1-11.
20. Shi C., Wu J. B., Pan D. (2016). Review on near-infrared heptamethine cyanine dyes as theranostic agents for tumor imaging, targeting, and photodynamic therapy. *Journal of Biomedical Optics*, 21(5), 1-11.
21. Lou Z., Li P., SONG P., Han K. (2013). Ratiometric fluorescence imaging of cellular hypochlorous acid based on heptamethine cyanine dyes. *The Royal Society of Chemistry*, 138(21), 6291-6295.
22. Ning J., Huang B., Wei Z., Li W., Zheng H., Ma L.,... & Huang W. (2017). Mitochondria targeting and near-infrared fluorescence imaging of a novel heptamethine cyanine anticancer agent. *Molecular medicine reports*, 15(6), 3761-3766.
23. Yi X., Wang F., Qin W., Yang X., Yuan J. (2014). Near-infrared fluorescent probes in cancer imaging and therapy: an emerging field. *International Journal of Nanomedicine*, 9, 1347-1365.
24. Gao F., Bai L., Feng X., Tham H. P., Zhang R., Zhang Y., ... & Zhao Y. (2016), Remarkable in vivo nonlinear photoacoustic imaging based on near-infrared organic dyes. *Small*, 12(38), 5239-5244.
25. Tang Q., Liu W., Zhang Q., Huang J., Hu C., Liu Y., ... & Li, G. (2018). Dynamin-related protein 1-mediated mitochondrial fission contributes to IR-783-induced apoptosis in human breast cancer cells. *Journal of cellular and molecular medicine*, 22(9), 4474-4485.
26. Crnolatac I., Tumir L. M., Lesev N. Y., Vasilev A. A., Deligeorgiev, T. G., Mišković, K., ... & Piantanida I. (2013). Probing the structural properties of DNA/RNA grooves with sterically restricted phosphonium dyes: screening of dye cytotoxicity and uptake. *ChemMedChem*, 8(7), 1093-1103.

27. Glavaš-Obrovac L., Piantanida I., Marczl S., Mašić L., Timcheva I. I., Deligeorgiev T. G. (2009). Minor structural differences of monomethine cyanine derivatives yield strong variation in their interactions with DNA, RNA as well as on their in vitro antiproliferative activity. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 17(13), 4747-4755.
28. Kurutos A., Orehovec I., Paić A. T., Crnolatac I., Horvat L., Gadjev N., ... & Deligeorgiev T. (2018). New series of non-toxic DNA intercalators, mitochondria targeting fluorescent dyes. *Dyes and Pigments*, 148, 452-459.
29. Shindy H. A. (2015). Synthesis of different classes of benz (naphth)/five membered heterocyclic cyanine dyes. *Revue Roumaine de Chimie*, 60(1), 5-13.
30. Wang J., Zhao P., Li X., Fu H., Yang X., Wang G., ... & Liao W. (2020). Evaluating the Photodynamic Biocidal Activity and Investigating the Mechanism of Thiazolium Cyanine Dyes. *ACS Applied Bio Materials*, 3(3), 1580-1588.
31. Fadda A. A., El-Mekawy R. (2013). Utility of quaternary ammonium salts in synthesis of some novel cyanine dyes as potential antibacterial and antitumor agents. *Dyes and Pigments*, 99(2), 512-519.
32. Eissa F.M. and Abdelghany A. R. (2016). New 1, 3, 4-Oxadiazinoisoquinoline Methine Cyanine Dyes: Synthesis, Photosensitivity and Antibacterial Activity. *Journal of Heterocyclic Chemistry*, 53(2), 429-436.
33. Della Ciana L. (2019). New Trends in Fluorescent Reporters in Biology in *Fluorescence in Industry*, Springer, Cham, p. 321-339.
34. Nikolova K., Kaloyanova S., Mihaylova N., Stoitsova S., Chausheva S., Vasilev A., ... & Tchorbanov A. (2013). New fluorogenic dyes for analysis of cellular processes by flow cytometry and confocal microscopy. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 129, 125-134.
35. Murakami L. S., Ferreira L. P., Santos J. S., Da Silva R. S., Nomizo A., Kuz'min V. A., Borissevitch I. E. (2015) Photocytotoxicity of a cyanine dye with two chromophores toward melanoma and normal cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1850 (6), 1150-1157.

36. Zhang X. H., Liu Q., Shi H. J., Wang L. Y., Fu Y. L., Wei X. C., Yang, L. F. (2014). Synthesis, spectral properties of cell-permeant dimethine cyanine dyes and their application as fluorescent probes in living cell imaging and flow cytometry. *Dyes and Pigments*, *100*, 232-240.
37. Pang K., Gu B., Liu F., Dong M., Zhu L., Wei X. (2019). Recent advances in fluorescence-based in vivo flow cytometry. *Journal of Innovative Optical Health Sciences*, *12*(6) 1-10.
38. Saha P.C., Chatterjee T., Pattanayak R., Das R. S., Mukherjee A., Bhattacharyya M., Guha S. (2019). Targeting and Imaging of Mitochondria Using Near-Infrared Cyanine Dye and Its Application to Multicolor Imaging. *ACS omega*, *4* (11), 14579-14588.
39. Özkınalı S. (2014). Spectroscopic and thermal properties of newly mixed azocalix [4] arene ester derivatives. *Dyes and Pigments*, *107*, 81-89.
40. Zanotti K.J., Silva, G. L. Creeger, Y., Robertson K. L., Waggoner A. S., Berget P. B., Armitage B. A. (2011). Blue fluorescent dye-protein complexes based on fluorogenic cyanine dyes and single chain antibody fragments. *Organic & biomolecular chemistry*, *9*(4), 1012-1020.
41. Figueiredo J., Serrano J. L., Soares M., Ferreira S., Domingues F. C., Almeida P., Silvestre S. (2019). 5-Hydrazinylethylidenepyrimidines effective against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: Synthesis and in vitro biological evaluation of antibacterial, radical scavenging and cytotoxic activities. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, *137*, 1-9.
42. Matias M., Campos G., Santos A. O., Falcão A., Silvestre S., Alves G. (2019). Synthesis, in vitro evaluation and QSAR modelling of potential antitumoral 3, 4-dihydropyrimidin-2-(1H)-thiones. *Arabian Journal of Chemistry*, *12*(8), 5086-5102.
43. Boraldi F., Bini L., Liberatori S., Armini A., Pallini V., Tiozzo R., ... & Quaglino D. (2003). Normal human dermal fibroblasts: proteomic analysis of cell layer and culture medium. *Electrophoresis*, *24*(7/8), 1292-1310.

44. Levenson A.S. and Jordan V. C. (1997). MCF-7: the first hormone-responsive breast cancer cell line. *Perspectives in Cancer Research*, 57 (15), 3071-3078.
45. Jiao G. S., Loudet A., Lee H. B., Kalini S., Johansson L. B. Å., Burgess K. (2003). Syntheses and spectroscopic properties of energy transfer systems based on squaraines. *Tetrahedron*, 59(17), 3109-3116.
46. Pardal A.C., Ramos S. S., Santos P. F., Reis L. V., Almeida P. (2002). Synthesis and spectroscopic characterisation of N-alkyl quaternary ammonium salts typical precursors of cyanines. *Molecules*, 7(3), 320-330.
47. Shank N.I., Pham H. H., Waggoner A. S., Armitage B. A. (2013). Twisted cyanines: a non-planar fluorogenic dye with superior photostability and its use in a protein-based fluoromodule. *Journal of the American Chemical Society*, 135(1), 242-251.
48. Gautam V., Sharma A., Arora S., Bhardwaj R., Ahmad A., Ahamad B., Ahmad P. (2020). In-vitro antioxidant, antimutagenic and cancer cell growth inhibition activities of *Rhododendron arboreum* leaves and flowers. *Saudi Journal of Biological Sciences*.
49. Morgan D.M. (1998). Tetrazolium (MTT) assay for cellular viability and activity, in *Polyamine protocols*, Humana Press, 179-184.
50. Meerloo J. V., Kaspers G. J., Cloos J. (2011). Cell sensitivity assays: the MTT assay, in *Cancer cell culture*, Humana Press, 237-245.
51. Belal A. and Abdelgawad M. A. (2017). New benzothiazole/benzoxazole-pyrazole hybrids with potential as COX inhibitors: design, synthesis and anticancer activity evaluation. *Research on Chemical Intermediates*, 43(7), 3859-3872.
52. Pathak N., Rathi E., Kumar N., Kini S. G., Rao C. M. (2020). A review on anticancer potentials of benzothiazole derivatives. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 20(1), 12-23.
53. Varshney H., Ahmad A., Rauf A., Sherwani A., Owais M. (2015). Multistep synthesis of 1-[(5-alkenyl/hydroxyalkenylsubstituted)-1, 3, 4-oxadiazol-2-yl]-methyl]-2-methyl-1H-benzimidazole series and in vitro anticancer screening, SAR studies. *Medicinal Chemistry Research*, 24(3), 944-953.

54. Mahmoud A.M., Morrow J. P., Pizzi D., Azizah A. M., Davis T. P., Tabor R. F., Kempe K. (2020). Tuning Cellular Interactions of Carboxylic Acid Side Chain Containing Polyacrylates: The Role of Cyanine Dye Label and Side Chain Type. *Biomacromolecules*, 21(8), 3007-3016.
55. Nödling A.R., Mills E. M., Li X., Cardella D., Sayers E. J., Wu S. H., ... Tsai Y. H. (2020). Cyanine dye mediated mitochondrial targeting enhances the anti-cancer activity of small-molecule cargoes. *Chemical Communications*, 56(34), 4672-4675. Elliott D. A. (2020). Confocal Microscopy: Principles and Modern Practices. *Current Protocols in Cytometry*, 92(1), 1-11.
57. Nwaneshiudu A., Kuschal C., Sakamoto F. H., Anderson R. R., Schwarzenberger K., Young, R. C. (2012). Introduction to confocal microscopy. *Journal of Investigative Dermatology*, 132(12), 1-5.
58. Ma G., Hu C., Li S., Gao X., Li H., Hu X. (2019). Simultaneous, hybrid single-molecule method by optical tweezers and fluorescence. *Nanotechnology and Precision Engineering*, 2(4), 145-156.
59. Nabati M., Bodaghi-Namileh V. (2018). Physicochemical properties analysis and dopamine D2 receptor (D2R) docking of zotepine as an atypical antipsychotic antagonist. *Journal of Physical and Theoretical Chemistry of Islaminc Azad University of Iran*, 15(3/4), 149-157.
60. Daina A., Michielin O., Zoete V. (2017). SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Scientific reports*, 7, 1-13.
61. Lin J., Sahakian D. C., De Morais S. M., Xu J. J., Polzer R. J., Winter S. M. (2003). The role of absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity in drug discovery. *Current topics in medicinal chemistry*, 3(10), 1125-1154.
62. Pires D.E., Blundell T. L., Ascher D. B. (2015). pkCSM: predicting small-molecule pharmacokinetic and toxicity properties using graph-based signatures. *Journal of medicinal chemistry*, 58(9), 4066-4072.

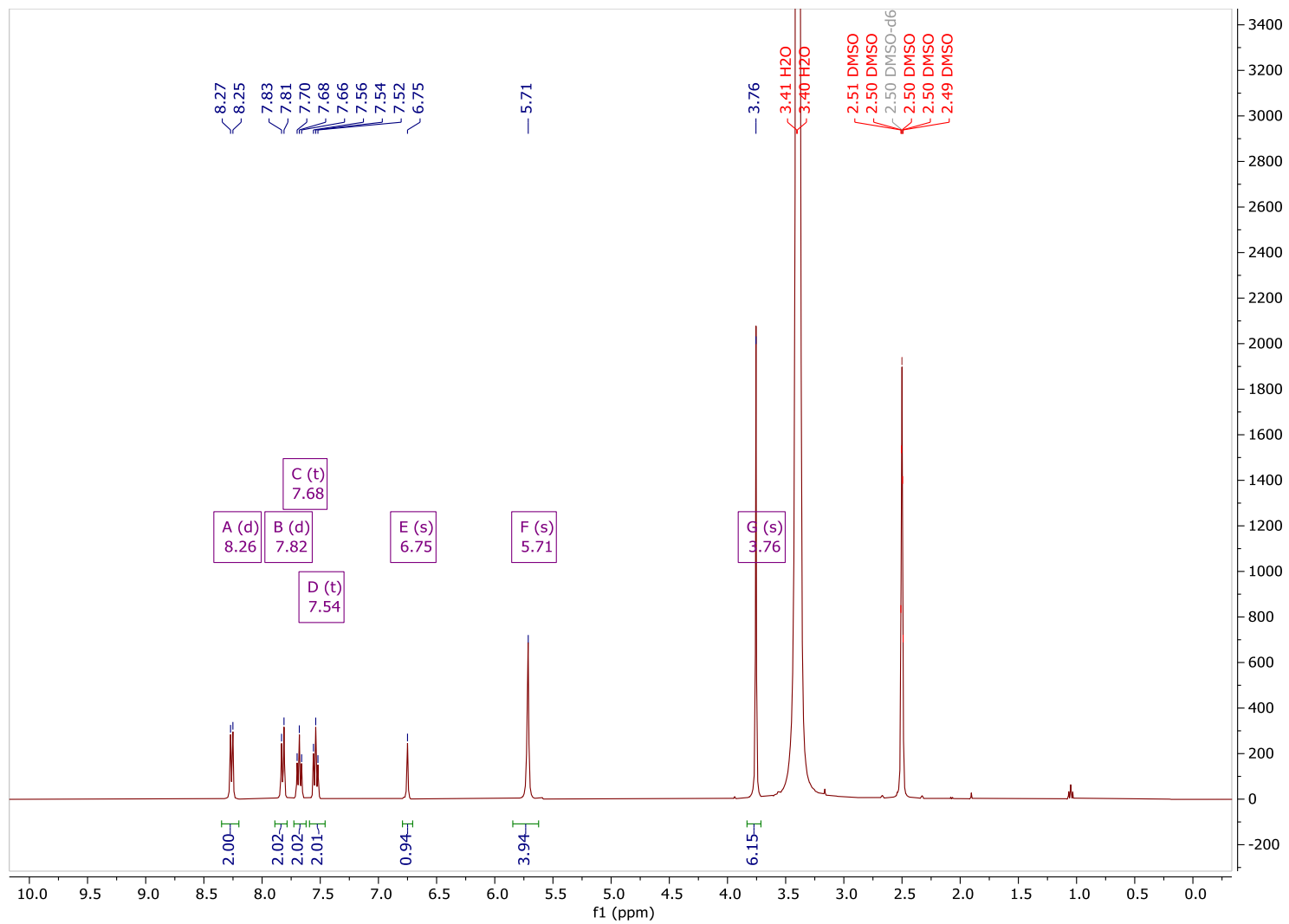
63. Lipinski C.A., Lombardo F., Dominy B. W., Feeney P. J. (1997). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced drug delivery reviews*, 23(1/3), 3-25.
64. Yap C., Li Z. R., Chen Y. Z. (2006). Quantitative structure–pharmacokinetic relationships for drug clearance by using statistical learning methods. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 24(5), 383-395.
65. Alves V.M., Muratov E., Fourches D., Strickland J., Kleinstreuer N., Andrade C. H., Tropsha A. (2015). Predicting chemically-induced skin reactions. Part I: QSAR models of skin sensitization and their application to identify potentially hazardous compounds. *Toxicology and applied pharmacology*, 284(2), 262-272.
66. Jia C.-Y., Li J-Y., Hao G-F., Yang G-F. (2020). A drug-likeness toolbox facilitates ADMET study in drug discovery. *Drug Discovery Today*, 25(1), 248-258.



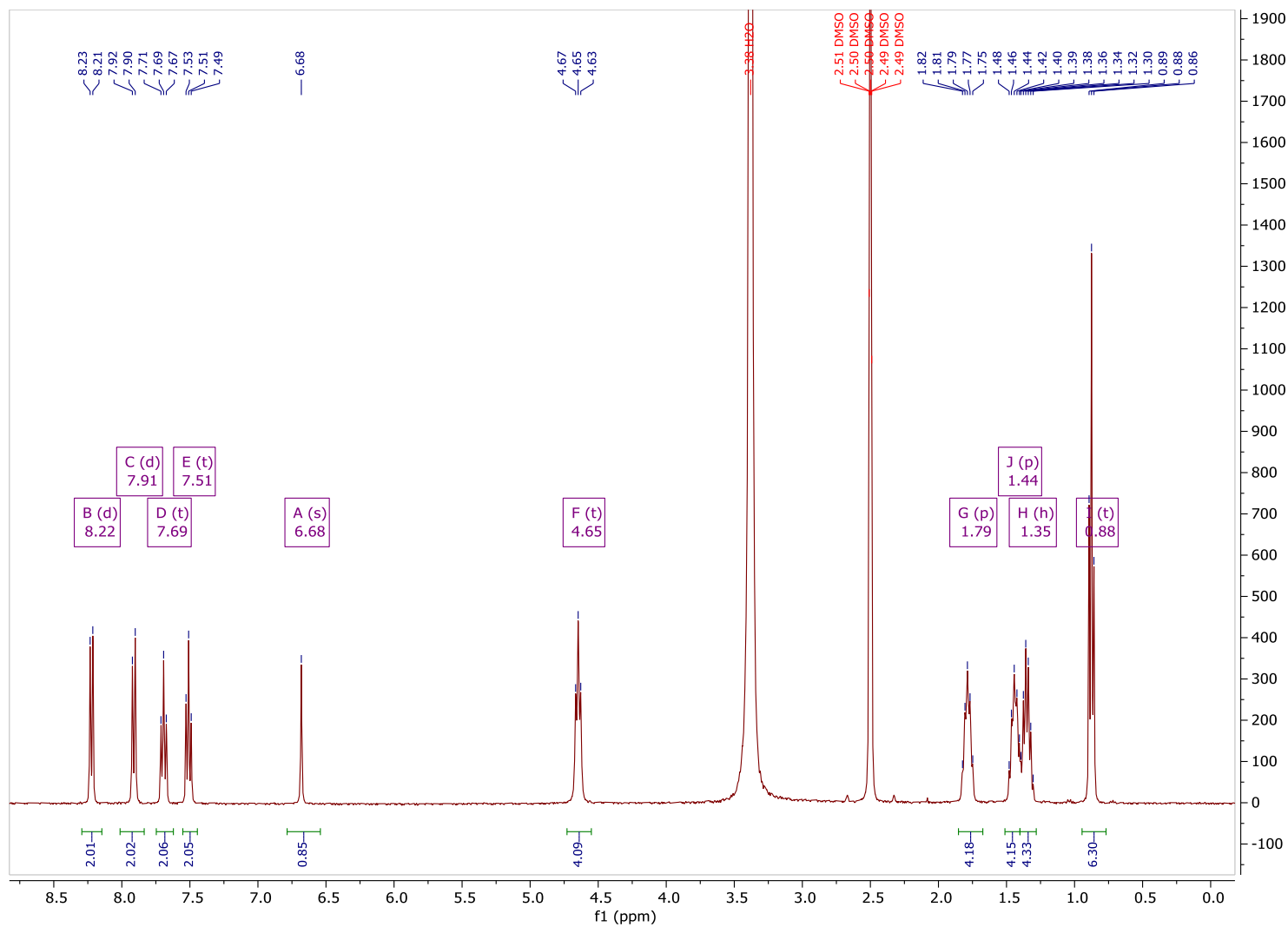
## **Anexos**



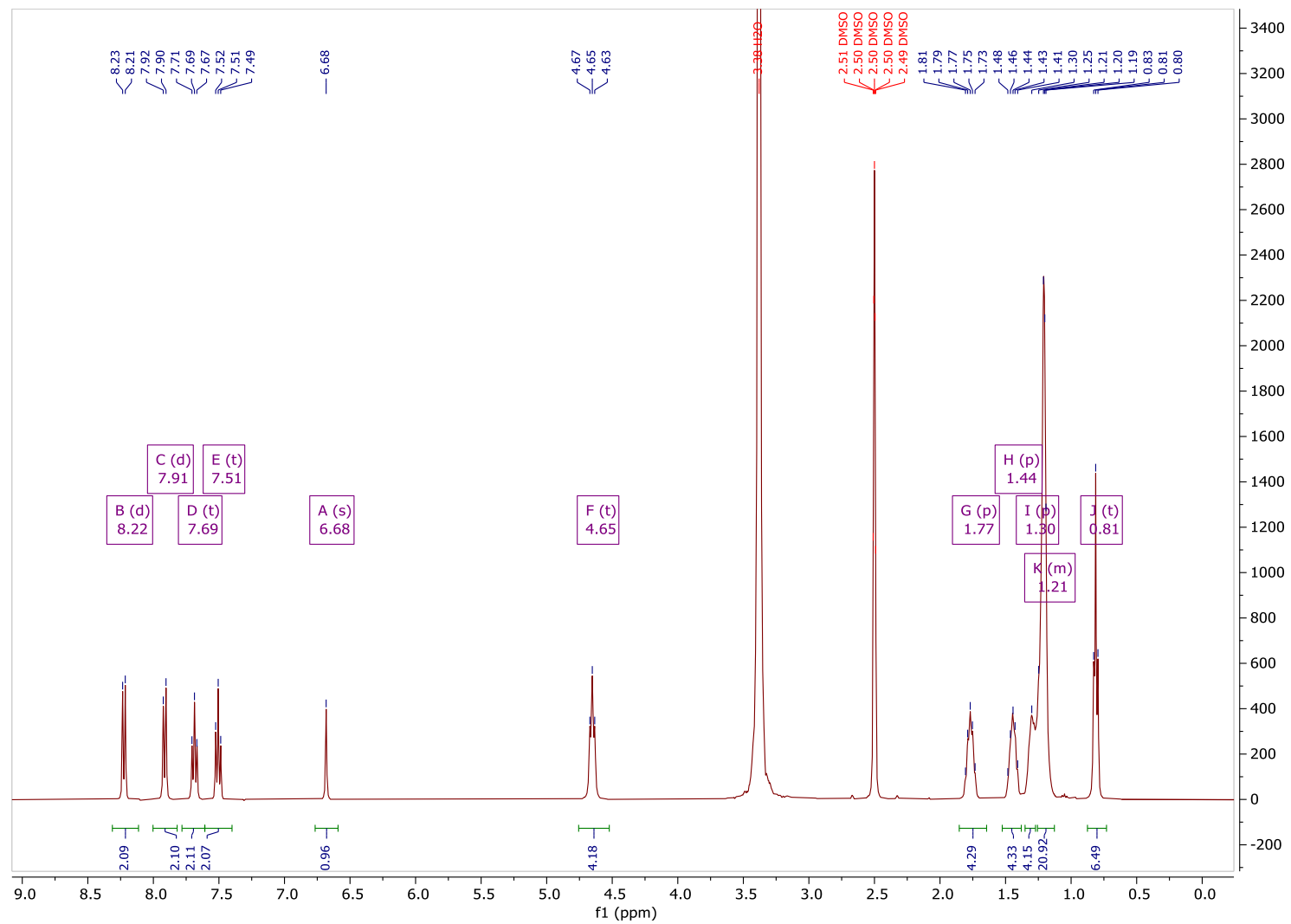
Anexo I – Espectro de RMN <sup>1</sup>H correspondente à cianina 9



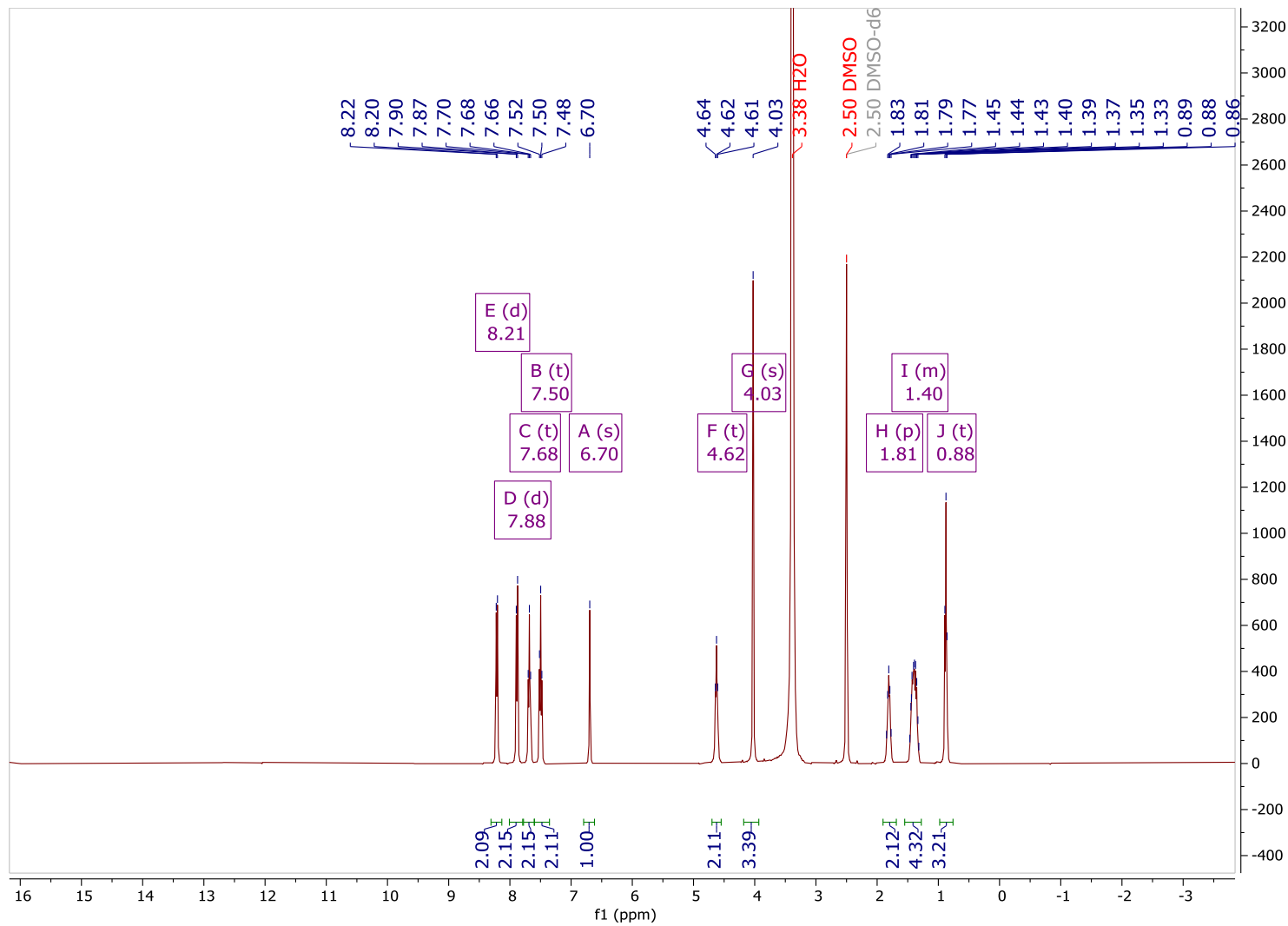
Anexo II – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  correspondente à cianina **10**



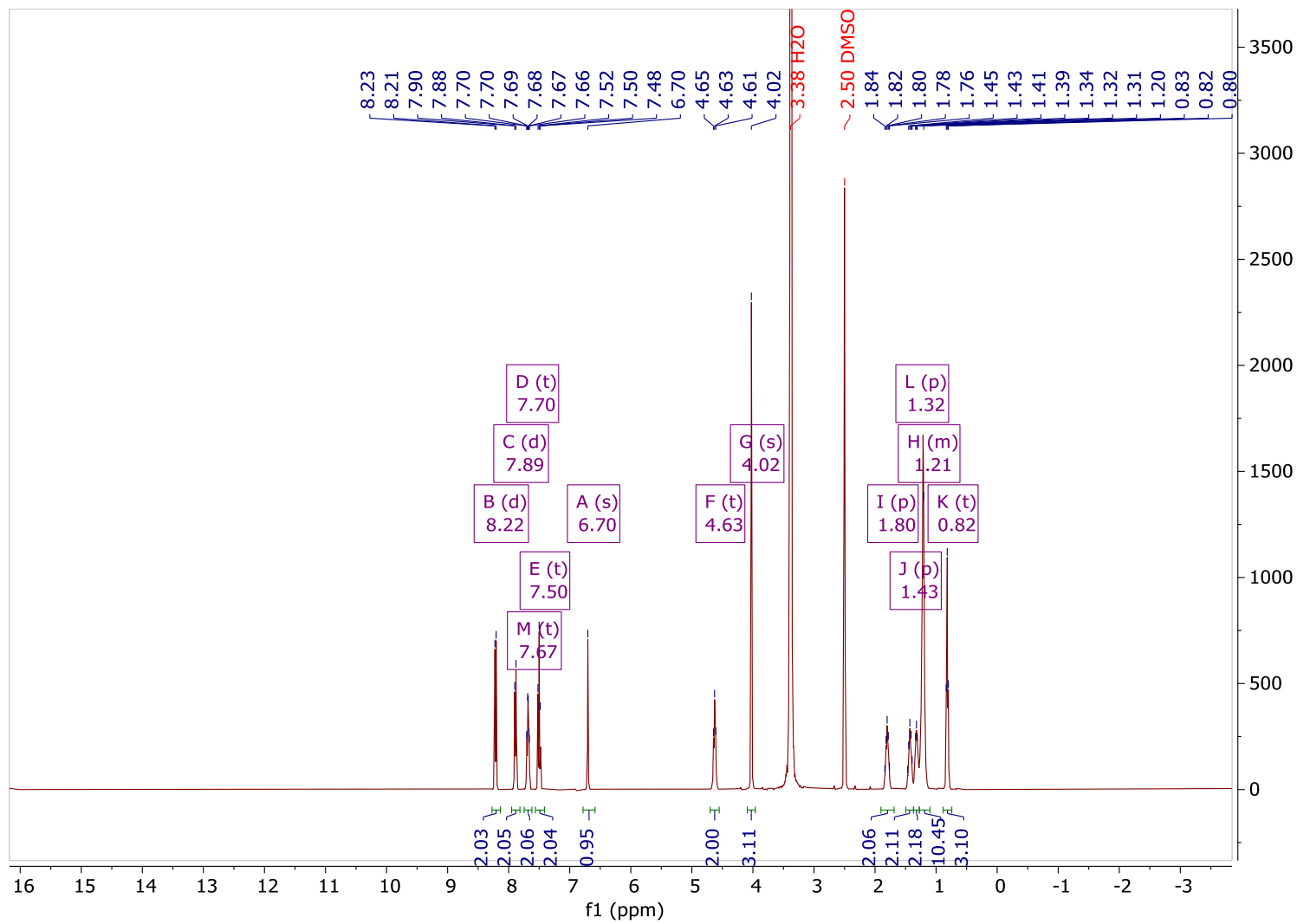
Anexo III – Espectro de RMN <sup>1</sup>H correspondente à cianina 11



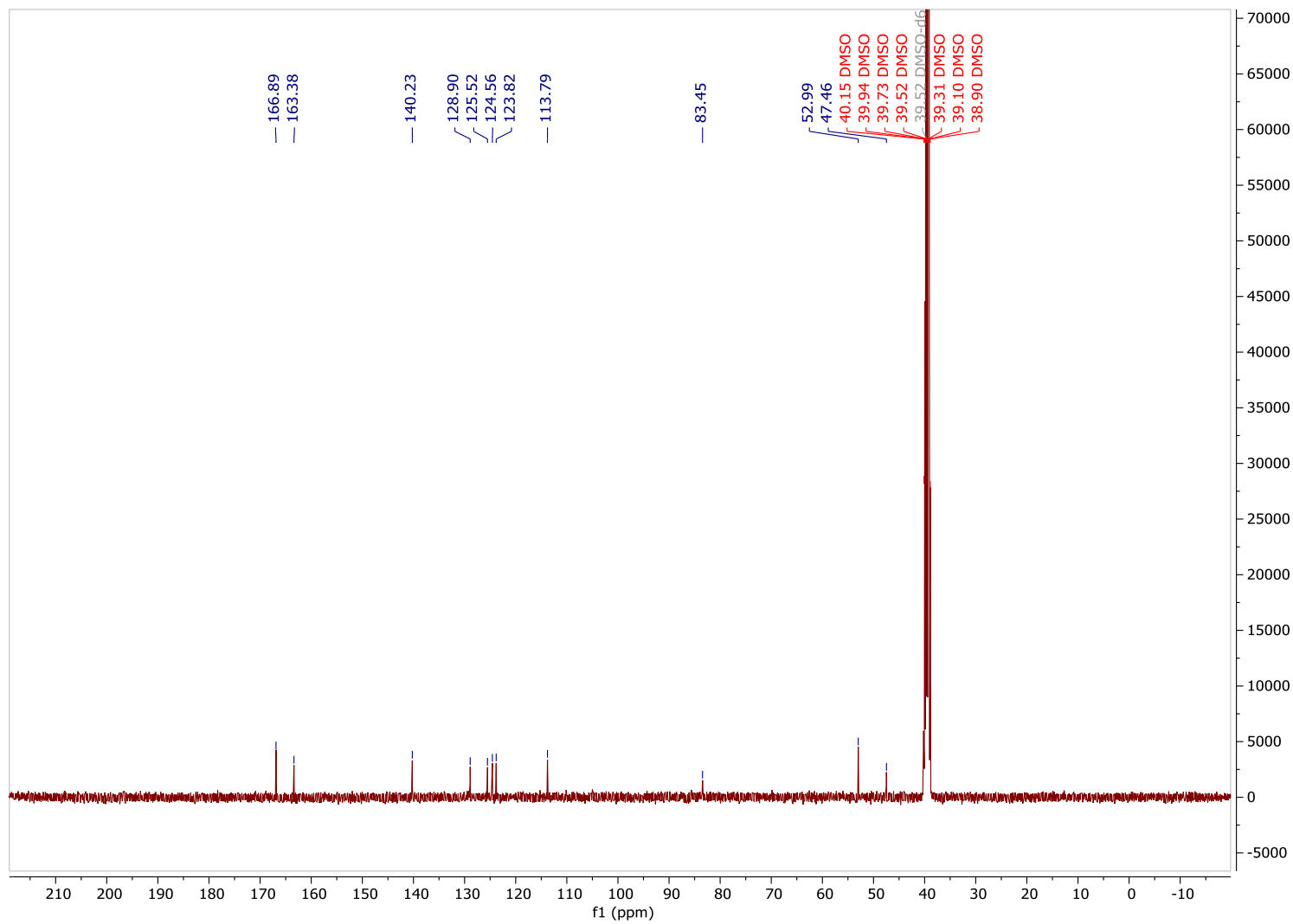
Anexo IV – Espectro de RMN <sup>1</sup>H correspondente à cianina 12



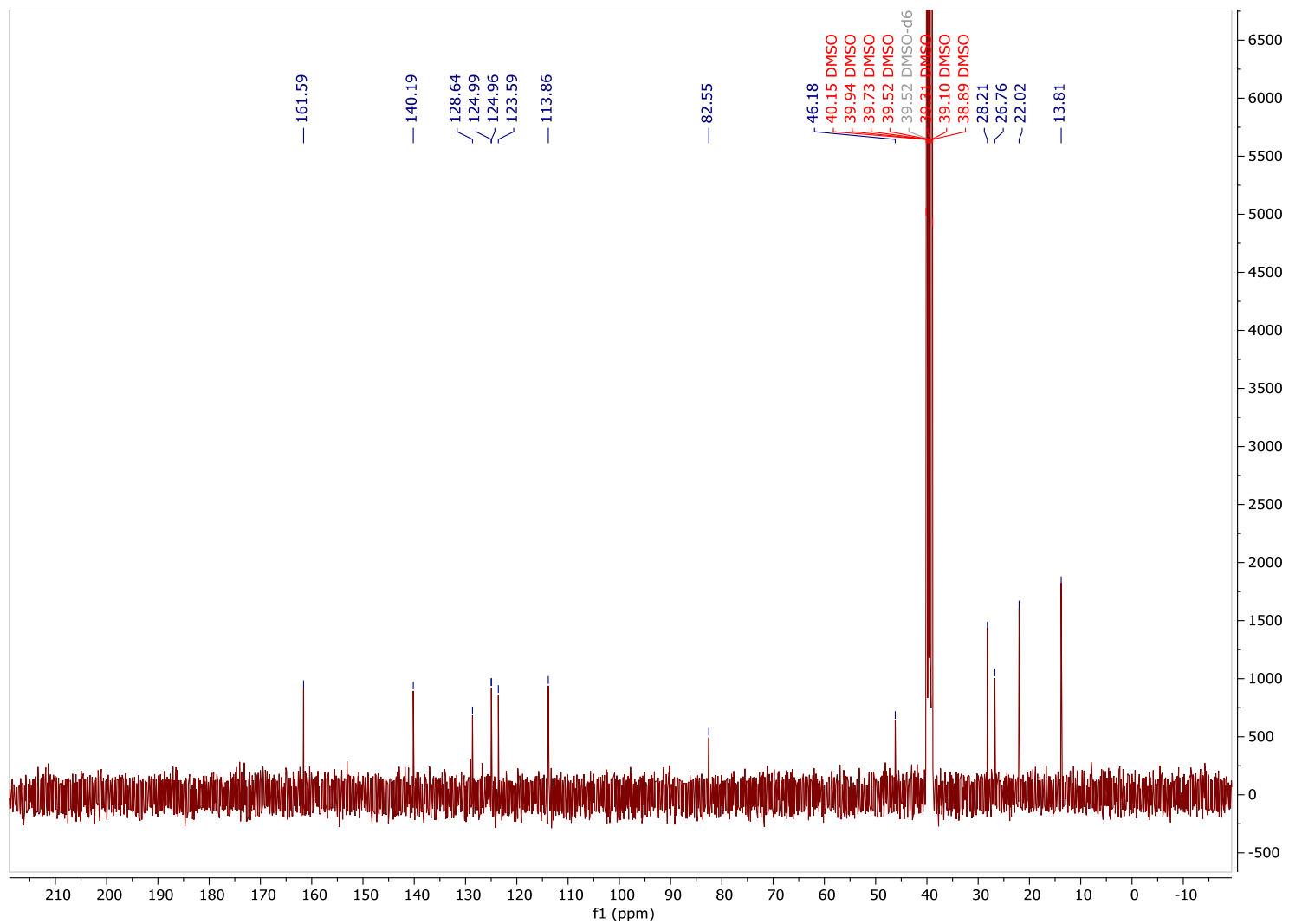
Anexo V – Espectro de RMN <sup>1</sup>H correspondente à cianina 13



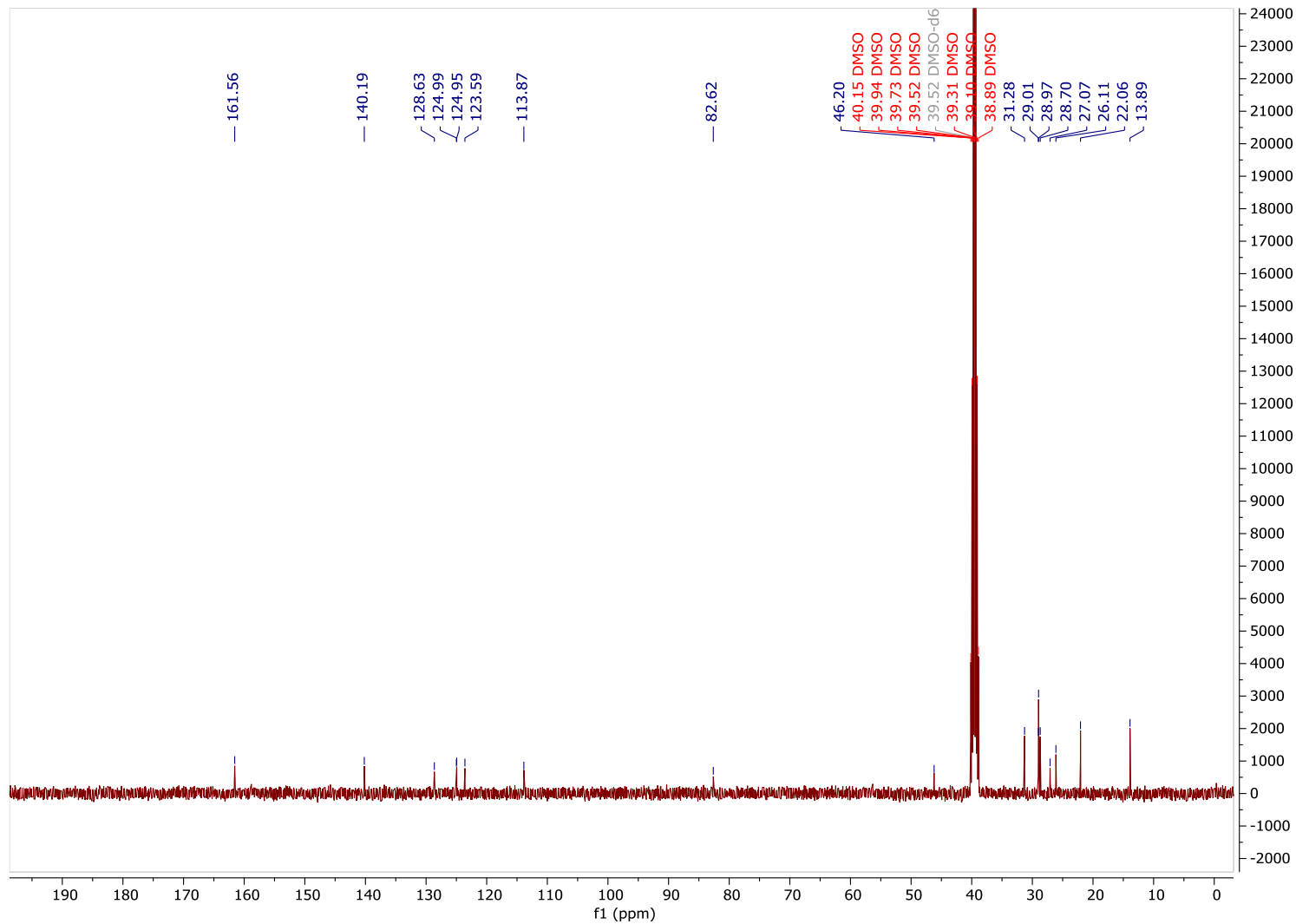
Anexo VI – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  correspondente à cianina 9



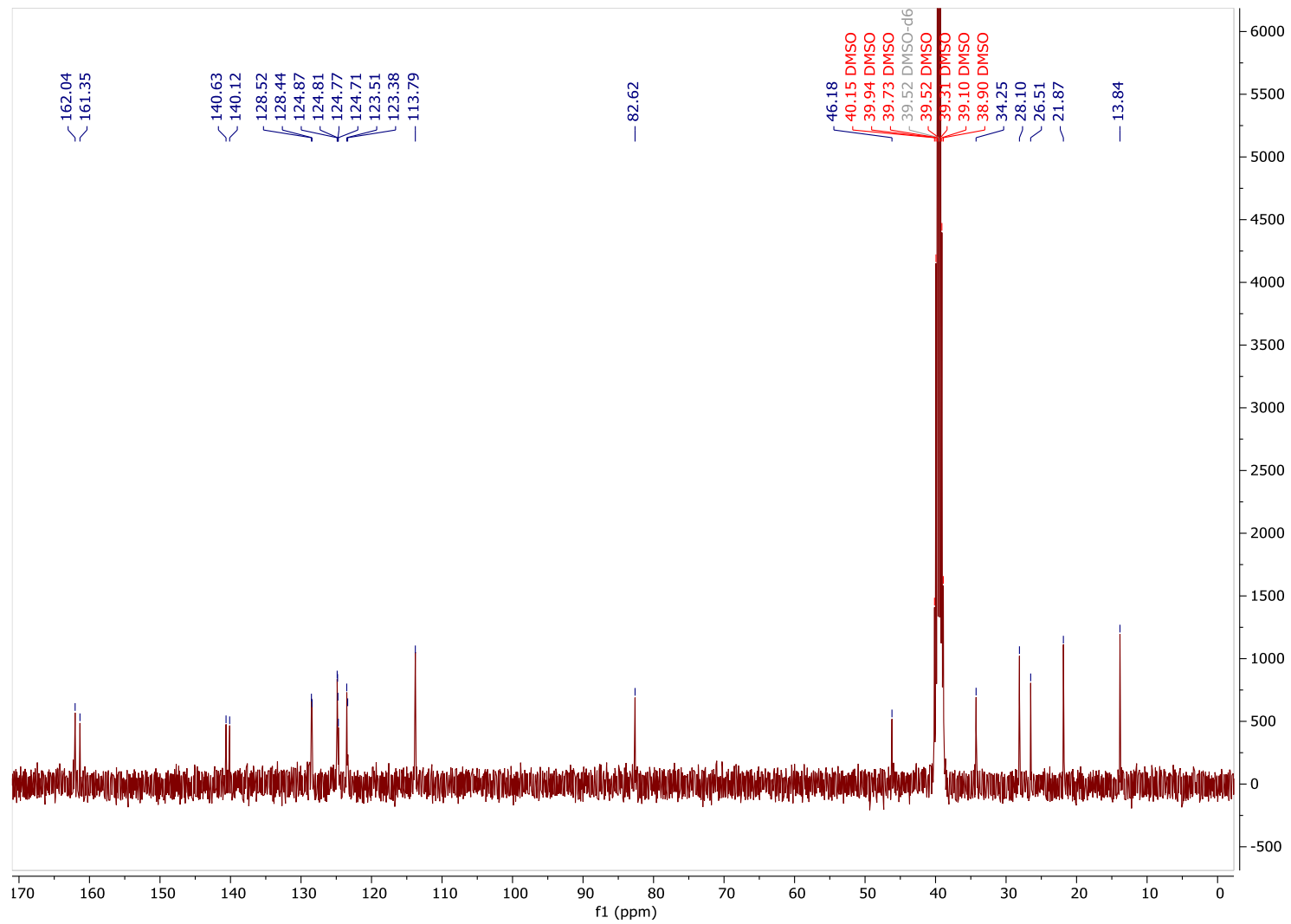
Anexo VII – Espectro de RMN <sup>13</sup>C correspondente à cianina 10



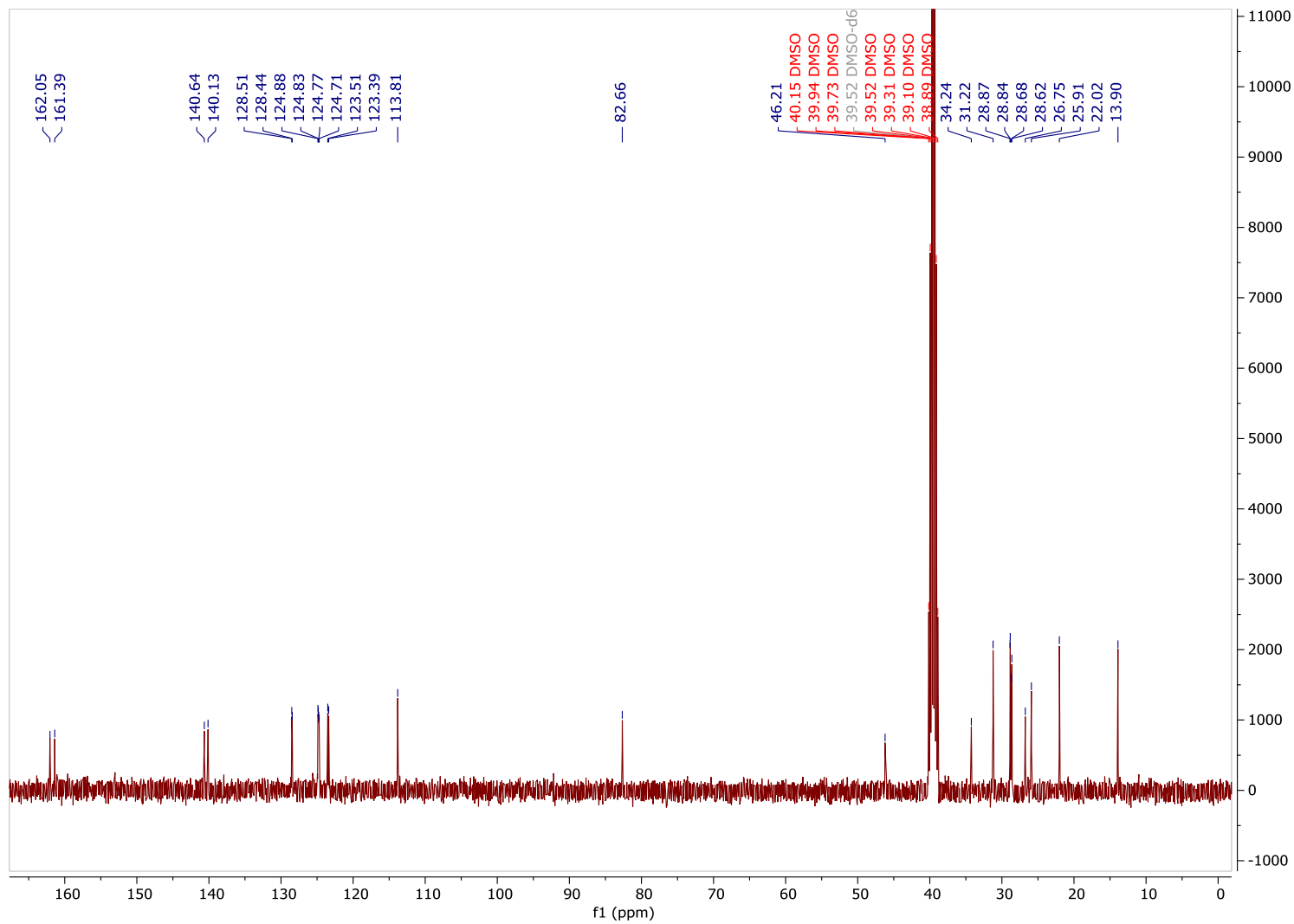
Anexo VIII – Espectro de RMN <sup>13</sup>C correspondente à cianina 11



Anexo IX – Espectro de RMN <sup>13</sup>C correspondente à cianina 12



# Anexo X – Espectro de RMN <sup>13</sup>C correspondente à cianina 13



## Anexo XI – Caracterização da Fonte Luminosa

