



Nuno Gonçalo Alves Morais
Licenciado em Química Aplicada

**Derivados de Cianina, Violeta de Cresilo
e Azul do Nilo: síntese e interação com
iões metálicos e agentes oxidantes
(ROS)**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Bioquímica

Orientador: Doutora Elisabete Oliveira
Co-orientador: Professor Doutor Carlos Lodeiro Espiño
(FCT/UNL)

Júri:

Presidente: Prof. Doutor José Ricardo Ramos Franco Tavares
Arguente: Prof. Doutor César António Tonicha Laia
Vogal: Prof. Doutor Carlos Lodeiro Espiño



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Março 2018

Nuno Gonçalo Alves Morais

Licenciado em Química Aplicada

**Derivados de Cianina, Violeta de Cresilo
e Azul do Nilo: síntese e interação com
iões metálicos e agentes oxidantes
(ROS)**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Bioquímica

Orientador: Doutora Elisabete Oliveira
Co-orientador: Professor Doutor Carlos Lodeiro Espiño
(FCT/UNL)

Júri:

Presidente: Prof. Doutor José Ricardo Ramos Franco Tavares
Arguente: Prof. Doutor César António Tonicha Laia
Vogal: Prof. Doutor Carlos Lodeiro Espiño



Março 2018

Derivados de Cianina, Violeta de Cresilo e Azul do Nilo: síntese e interação com iões metálicos e agentes oxidantes (ROS)

Copyright © Nuno Gonçalo Alves Morais, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Eu gostaria de expressar o meu sincero agradecimento aos meus orientadores Dr. Elisabete Oliveira e ao Professor Carlos Lodeiro pelo apoio que me deram ao longo desta tese de mestrado. À Dr. Elisabete Oliveira pela sua persistência, motivação, entusiasmo e honestidade. A sua supervisão e perceção ao longo deste trabalho foram cruciais. Ao Professor Carlos Lodeiro pela oportunidade que me deu de trabalhar neste grupo de investigação, que é o BIOSCOPE. Um muito obrigado pela forma como sempre me mostrou o caminho certo a seguir, e pela maneira que me fez evoluir.

Ao Professor José Luís Capelo, pelo seu entusiasmo e pelas palavras de apreço que sempre me transmitiu e que me motivaram a para fazer um trabalho cada vez melhor. Queria agradecer a todo o grupo BIOSCOPE, pelos conselhos que me deram e pelos incontáveis ensinamentos que me transmitiram.

Por último, mas num lugar não menos importante, gostaria de agradecer aos meus pais, Jorge Morais e Ângela Morais e à minha irmã, Sara Morais, pois eles são a base de todo o meu percurso académico, porque sem eles seria tudo impossível. Esta tese de mestrado, queria dedicá-la em especial à minha mãe, que me demonstrou que mesmo quando tudo parece desmoronar e impossível, que há sempre uma forma de superar e de vencer todas as batalhas. Não há palavras que possam demonstrar o quão orgulhoso eu me sinto por ti. Obrigado mãe.

Resumo

Os derivados de cianinas devido às suas excelentes propriedades óticas, como absorção e emissão no visível e infravermelho próximo são amplamente utilizados em terapia fotodinâmica, em aplicações toxicológicas e em imagem de fluorescência na marcação de tecidos tumorais e células cancerígenas. Baseados nestas propriedades e aplicações, a presente dissertação teve como principal objetivo a síntese de um derivado de cianina cy5 (**L1**) ($\eta=74\%$) e respetiva caracterização estrutural através de análises espectroscópicas de ressonância magnética nuclear, infravermelho, análise elementar e espectrometria de massa. Foram também realizados estudos fotofísicos do composto **L1**, onde foi estudada a caracterização, o comportamento solvatocrômico e a capacidade sensorial para vários analitos, nomeadamente, iões metálicos, aniões, espécies ROS e agentes oxidantes e redutores. O composto **L1** apresenta bandas de absorção e emissão na região do infravermelho próximo, com máximos centrados a 680 nm e 774 nm, respetivamente.

Relativamente à interação do composto **L1** com os iões metálicos observou-se uma seletividade para o ião metálico Cu^{2+} , através de um efeito CHEQ. No que diz respeito aos outros analitos estudados concluiu-se que **L1** é reativo a NaOCl e a Na_2S . Para aumentar o leque de aplicações de **L1**, procedeu-se à sua funcionalização na superfície de nanopartículas metálicas, nomeadamente AgNPs e AuNPs e consequente caracterização por absorção UV-Visível, Dispersão de luz dinâmica (DLS) e Microscopia de Transmissão Eletrónica (TEM). A funcionalização de **L1** na superfície das nanopartículas conduziu a desvios para o vermelho da banda plasmónica seguida de uma alteração da cor do sistema. Através do potencial zeta e imagens TEM foi possível verificar uma desestabilização e agregação do sistema nanopartícula@**L1**.

Dois compostos derivados do Violeta de cresilo (**L2**) e do Azul do Nilo (**L3**) foram também estudados na presença aniões, espécies ROS e agentes oxidantes e redutores, apresentando elevada reatividade e seletividade para os analitos NaOH, NaOCl e Na_2S .

Palavras-chave: Derivado de Cianina, nanopartículas metálicas, iões metálicos, ROS, Violeta de Cresilo, Azul do Nilo.

Abstract

Cyanine derivatives due to their excellent optical properties, such as absorption and emission in visible and near-infrared region are widely used in photodynamic therapy, toxicological applications and fluorescence imaging for tumor tissues and cancer cells targeting. Based on these properties and applications, this dissertation aims the synthesis of a cyanine derivative cy5 (**L1**) ($\eta = 74\%$) and its structural characterization through nuclear magnetic resonance spectroscopy, infrared, elemental analysis and mass spectrometry. Photophysical studies of compound **L1** were also developed, where characterization, solvatochromic behaviour and sensorial ability for various analytes, as metal ions, anions, ROS species and oxidizing and reducing agents were studied. Compound **L1** shows absorption and emission bands in the near infrared region, with maximums centered at 680 nm and 774 nm, respectively.

Regarding the interaction of the compound **L1** with the metal ions, a selectivity towards Cu^{2+} metal ion was observed, through a CHEQ effect. Concerning other analytes studied, it was concluded that **L1** is reactive to NaOCl and Na_2S . To increase the range of applications, **L1** was functionalized on the surface of metal nanoparticles, namely, AgNPs and AuNPs, and further characterized by UV-Visible absorption, Dynamic Light Scattering (DLS) and Transmission Electron Microscopy (TEM). Functionalization of **L1** on the surface of the nanoparticles led to red shifts of the plasmon band followed by a change in the color of the system. Through zeta potential and TEM images it was possible to verify a destabilization and aggregation of the system nanoparticle@**L1**.

Two compounds derivatives from Cresyl Violet (**L2**) and Nile Blue (**L3**) were also studied in the presence of anions, ROS species and oxidizing and reducing agents, showing high reactivity and selectivity for NaOH, NaOCl and Na_2S analytes.

Keywords: Cyanine derivative, metal nanoparticles, metal ions, ROS, Cresyl Violet, Nile blue.

Comunicações Científicas em Congressos Internacionais

1.- Nuno Morais^{1,2,3} Elisabete Oliveira^{1,2,3} Carlos Lodeiro^{1,2,3} José Luís Capelo^{1,2,3} Hugo M Santos^{1,2,3} Javier Fernández Lodeiro^{1,2,3} Adrián Fernández Lodeiro^{1,2,3} Eduardo Araújo^{1,2,3} Susana Jorge^{1,2,3} Jamila Djafari^{1,2,3}

“Near-infrared fluorescent Cyanine 5-based derivative for selective detection of Cu²⁺ metal ion”

2nd International Caparica Conference on Pollutant Toxic Ions and Molecules (PTIM); Costa de Caparica, Portugal – 6-9 Novembro 2017

Tipo de comunicação: Comunicação em poster - <http://www.ptim2017.com>

Prémio de melhor comunicação em poster no congresso PTIM

2.- Nuno Morais^{1,2,3} Elisabete Oliveira^{1,2,3} Carlos Lodeiro^{1,2,3} José Luís Capelo^{1,2,3} Hugo M Santos^{1,2,3} Javier Fernández Lodeiro^{1,2,3} Adrián Fernández Lodeiro^{1,2,3} Eduardo Araújo^{1,2,3} Susana Jorge^{1,2,3} Jamila Djafari^{1,2,3}

“Near-infrared fluorescent Cyanine 5-based derivative for selective detection of reactive oxygen species”

2nd International Caparica Christmas Congress on Translational Chemistry (IC3TC); Costa de Caparica, Portugal – 4-7 Dezembro 2017

Tipo de comunicação: Comunicação em Poster e *Shot-gun* - <http://www.ic3tc2017.com/>

Prémio de melhor apresentação *Shot-gun* no congresso IC3TC

3.- Nuno Morais^{1,2,3} Elisabete Oliveira^{1,2,3} Carlos Lodeiro^{1,2,3} José Luís Capelo^{1,2,3} Hugo M Santos^{1,2,3} Javier Fernández Lodeiro^{1,2,3} Adrián Fernández Lodeiro^{1,2,3} Eduardo Araújo^{1,2,3} Susana Jorge^{1,2,3} Jamila Djafari^{1,2,3}

“Near-infrared fluorescent Cyanine 5-based derivative and conjugated PEG nanoparticles: metal ions and ROS detection”

III International Symposium on Nanoparticles/Nanomaterials and Applications (ISN2A); Costa de Caparica, Portugal – 22 -25 Janeiro 2018

Tipo de comunicação: Comunicação em poster - <http://www.isn2a2018.com/>

Índice

1. Introdução	1
1.1. Cianinas clássicas	1
1.1.1. Síntese de derivados de Cianinas.....	2
1.1.2. Aplicações dos derivados das cianinas (Cy5).....	2
1.1.2.1. Aplicação em células cancerígenas	3
1.1.2.2. Aplicação através de imagens de fluorescência do infravermelho próximo (NIRF)	4
1.1.2.3. Aplicação em Terapia fotodinâmica (PDT)	4
1.1.3. Detecção de íons metálicos	5
1.1.4. Detecção de aniões.....	6
1.2. Importância da detecção de íons metálicos	8
1.3. Importância da detecção de espécies ROS.....	9
1.4. Funcionalização de nanopartículas metálicas	9
1.4.1. Nanopartículas de Ouro funcionalizadas com derivados de cianinas	10
1.5. Sensores químicos.....	11
1.5.1. Sensores químicos colorimétricos.....	12
1.5.2. Sensores químicos fluorescentes	13
1.5.3. Sensores químicos excitáveis no visível	14
1.5.3.1. Violeta de Cresilo e Azul do Nilo	14
1.6. Técnicas de caracterização.....	16
1.6.1. Espectroscopia de Ultravioleta-visível (Uv-Vis)	16
1.6.2. Espectroscopia de Fluorescência	16
1.6.3. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear ^1H / ^{13}C	17
1.6.4. Dispersão de luz dinâmica (DLS).....	17
1.6.5. Espectroscopia de infravermelho acoplada com transformada de Fourier (FT-IR)..	17
1.6.6. Microscopia de Transmissão Eletrônica (TEM)	18
1.6.7. Ionização por Electrospray (ESI-TOF-MS).....	18
1.7. Objetivos da Tese.....	19

2. Síntese e caracterização do derivado de cianina Cy5: interação com íons metálicos e espécies ROS/aniões/AOR	21
2.1. Secção Experimental.....	21
2.1.1. Reagentes e materiais de partida	21
2.1.2. Instrumentação.....	22
2.1.3. Síntese do composto derivado de cianina cy5 (L1)	22
2.1.3.1. Síntese de <i>1-allil-2-((1E,3E,5Z)-5-(1-allil-3,3-dimetilindolin-2-ilidene)penta-1,3-dien-1-il)-3,3-dimetil-3H-indol-1-ium</i> (L1)	22
2.1.4. Estudos espectrofotométricos e espectrofluorimétricos	24
2.2. Resultados e Discussão	24
2.2.1. Síntese e estudos fotofísicos do derivado de cianina L1	24
2.2.2. Estudos de solvatocromismo de L1	25
2.2.3. Estudos de interação do L1 com íons metálicos	28
2.2.4. Estudos de interação de L1 com ROS/aniões/AOR	30
2.2.5. Estudos de competição de L1 com íons metálicos e ROS/aniões/agentes oxidantes e redutores (AOR).....	32
2.3. Conclusões.....	33
3. Interação do composto L1 com nanopartículas de prata e de ouro	35
3.1. Secção Experimental.....	35
3.1.1. Reagentes e materiais de partida	35
3.1.2. Instrumentação.....	35
3.1.3. Síntese de nanopartículas de prata e de ouro	36
3.1.4. Estudos espectrofotométricos.....	36
3.2. Resultados e Discussão	36
3.3. Conclusões.....	39
4. Interação dos compostos L2 e L3 com espécies ROS/aniões/AOR	41
4.1. Secção experimental.....	41
4.1.1. Reagentes e materiais de partida	41
4.1.2. Instrumentação.....	41
4.1.3. Estudos espectrofotométricos e espectrofluorimétricos de L2 e L3	42
4.2. Resultados e Discussão	42
4.2.1. Estudos fotofísicos do composto L2.....	42

4.2.2. Estudos fotofísicos do composto L3.....	44
4.3. Conclusões.....	46
5. Conclusões gerais & perspectivas futuras.....	47
Referências	49

Índice de Figuras

Figura 1.1 Ilustração esquemática da estrutura química da cianina clássica (1).....	1
Figura 1.2 Ilustração esquemática da estrutura química da cianina (2). Adaptado de [8].....	2
Figura 1.3 Ilustração esquemática da estrutura química da cianina (3). Adaptado de [9].....	2
Figura 1.4 Ilustração esquemática da estrutura química da cianina (4). Adaptado de [10].....	3
Figura 1.5 Ilustração esquemática da identificação celular tumoral através de uma cianina pentametina (A) e de uma cianina heptametina (B). Adaptado de [11].....	3
Figura 1.6 Imagens de fluorescência do infravermelho próximo da cianina para detecção do cancro. Adaptado de [7].	4
Figura 1.7 Ilustração da estrutura química da cianina (5). Adaptado de [20].	5
Figura 1.8 (A) Ilustração da estrutura química da cianina (6). (B) Titulação espectrofotométrica da cianina na presença do ião metálico Fe ³⁺ . Adaptado de [21].	6
Figura 1.9 Ilustração da estrutura química da cianina (7). Adaptado de [22].	6
Figura 1.10 (a) Titulações espectrofotométricas da cianina (7) com radical hidroxilo (a), peroxinitrito (b), hipoclorito (c), radical de oxigênio (d). Adaptado de [22].....	7
Figura 1.11 (A) Ilustração da estrutura química da cianina (7). (B) Titulação espectrofotométrica da cianina com o anião CN ⁻ . Adaptado de [23].....	7
Figura 1.12 Ilustração esquemática de interações electrostáticas e π - π da cianina com nanopartículas de ouro. Adaptado de [39].	10
Figura 1.13 Imagem de emissão de fluorescência da cianina (A) e da cianina funcionalizada com as nanopartículas de ouro em forma de bastonetes (B). Adaptado de [37].	11
Figura 1.14 Ilustração esquemática da ligação do sensor químico ao catião. Adaptado de [48].	12
Figura 1.15 O efeito no espectro de absorção no sistema π . (A) Transferência de carga do complexo metal-ligando (MLCT). (B) Transferência de carga do complexo ligando-metal (LMCT). Adaptado de [48].	13
Figura 1.16 Representação esquemática das diferentes abordagens entre o sensor químico e o analito. (A) – sondas fluorescentes intrínsecas. (B) – Sistema Fluoróforo-espaçador-recetor (conjugado). (C) – Formação de excíplexos ou excímeros. Adaptado de [50].....	13
Figura 1.17 Ilustração das estruturas químicas de (A) 2H-1,4-oxazina, (B) 10H-fenoxazina e (C) 12H-benzofenoxazina. Adaptado de [52].	15
Figura 1.18 Ilustração esquemática da estrutura química do violeta de cresilo, vitamina B ₆ e azul do nilo. Adaptado de [54].	15
Figura 1.19 Ilustração esquemática da estrutura química L1.	19
Figura 1.20 Ilustração esquemática das estruturas químicas L2 (A) e L3 (B). Adaptado de [54].	19
Figura 2.1 Síntese e estrutura química do composto L1.	23

Figura 2.2 Espectros de absorção e emissão do L1 em acetonitrilo (A), $\lambda_{exc}=680$ nm, $\lambda_{em} = 774$ nm. Espectros de absorção e emissão do L1 em diclorometano (B), $\lambda_{exc}=690$ nm, $\lambda_{em} = 788$ nm. [L1]= 1.0×10^{-5} M, T=298 K.....	25
Figura 2.3 Espectros de absorção (A) e emissão (B) de L1 em acetonitrilo, diclorometano, etanol e DMSO. [L1] = 1.0×10^{-5} M, T=298 K. L1 em acetonitrilo, $\lambda_{exc}=680$ nm, $\lambda_{em} = 774$ nm. L1 em diclorometano, $\lambda_{exc}=690$ nm, $\lambda_{em} = 786$ nm. L1 em etanol, $\lambda_{exc}=680$ nm, $\lambda_{em} = 778$ nm. L1 em DMSO, $\lambda_{exc}=680$ nm, $\lambda_{em} = 787$ nm.	25
Figura 2.4 Regressão linear (v_{exp} versus v_{calc}) dos dados de emissão.	27
Figura 2.5 Absorção (A) e emissão (B) do composto L1 (em acetonitrilo) normalizada a 743 nm e 770 nm, respetivamente, após adição de 6 equivalentes de iões metálicos. Titulações espectrofotométricas (C) e espectralfluorimétricas (D) do composto L1 com o ião metálico Cu^{2+} em acetonitrilo. Inset: Absorção a 743 nm e emissão a 770 nm com a função $[Cu^{2+}]/[L1]$. (T = 298 K, [L1] 1.0×10^{-5} M, $\lambda_{exc} = 680$ nm).	28
Figura 2.6 Absorção (A) e emissão (B) do composto L1 (em acetonitrilo) normalizada a 743 nm e 770 nm, respetivamente, após adição de 10 equivalentes de ROS/aniões em água mili-Q. Titulações espectrofotométricas (C) e espectralfluorimétricas (D) do composto L1 em acetonitrilo com adição de NaOCl em água mili-Q. Inset: Absorção a 743 nm e emissão a 770 nm com a função $[NaOCl]/[L1]$. Titulações espectrofotométricas (E) e espectralfluorimétricas (F) do composto L1 em acetonitrilo com adição de Na_2S em água mili-Q. Inset: Absorção a 743 nm e emissão a 770 nm com a função $[Na_2S]/[L1]$. (T = 298 K, [L1] = 1.0×10^{-5} M, $\lambda_{exc} = 680$ nm).....	31
Figura 3.1 Espectro de absorção das AgNPs com a adição do composto L1 para formar AgNPs@ L1	36
Figura 3.2 Tamanho e potencial zeta das nanopartículas de prata e de ouro com L1 e NaOCl e Na_2S numa solução aquosa. (A) AgNPs triangulares. (B) AgNPs@ L1 . (C) AgNPs@ L1 e NaOCl. (D) AgNPs@ L1 e Na_2S . (E) AuNPs esféricas. (F) AuNPs@ L1 . (G) AuNPs@ L1 e NaOCl. (H) AuNPs@ L1 e Na_2S	37
Figura 3.3 (A) Espectro de absorção das AuNPs com a adição de L1 para formar AuNPs@ L1 . (B) Imagem TEM e cor das AuNPs. (C) Diagrama de distribuição de tamanhos de AuNPs. (D) Agregação do sistema AuNPs@ L1	38
Figura 4.1 (A) Espectros de absorção e emissão de L2 em acetonitrilo, $\lambda_{exc}=585$ nm, $\lambda_{em} = 616$ nm, T=298 K, [L2] = 1.0×10^{-5} M. (B) Ilustração esquemática da estrutura química do composto L2	42
Figura 4.2 Absorção (A) e emissão (B) normalizadas a 585 nm e 616 nm, respetivamente do composto L2 em acetonitrilo, após adição de 10 equivalentes de ROS em água mili-Q. Titulação espectrofotométrica (C) e espectralfluorimétrica (D) de L2 em acetonitrilo com a adição de NaOH em água mili-Q. Inset: Absorção a 585 nm e 465 nm com a função de $[NaOH]/[L2]$. Inset: Emissão a 616 nm com a função de $[NaOH]/[L2]$ (D), (T = 298 K, [L2] = 1.0×10^{-5} M, $\lambda_{exc} = 585$ nm)....	43

Figura 4.3 | (A) Espectros de absorção e emissão de **L3** em acetonitrilo, $\lambda_{exc}=632$ nm, $\lambda_{em} = 662$ nm, $T=298$ K, $[L3] = 1.0 \times 10^{-5}$ M. **(B)** Ilustração esquemática da estrutura química do composto **L3**. 44

Figura 4.4 | Absorção **(A)** e emissão **(B)** normalizadas a 632 nm e 662 nm, respectivamente do composto **L3** em acetonitrilo, após adição de 10 equivalentes de ROS em água mili-Q. Titulação espectrofotométrica **(C)** e espectralfluorimétrica **(D)** de **L3** em acetonitrilo com a adição de NaOH em água mili-Q. Inset: Absorção a 632 nm e 505 nm com a função de $[NaOH]/[L3]$. Inset: Emissão a 662 nm com a função de $[NaOH]/[L3]$. ($T = 298$ K, $[L3] = 1.0 \times 10^{-5}$ M, $\lambda_{exc} = 632$ nm). 45

Índice de tabelas

Tabela 1.1 Vantagens e desvantagens de técnicas de sensores químicos colorimétricos e fluorescentes [48].	14
Tabela 2.1 Propriedades fotofísicas de L1 , momento dipolar e constante dielétrica de vários solventes.	26
Tabela 2.2 Parâmetros α , β , π^* e n para os solventes utilizados [10] [59] [60].	26
Tabela 2.3 ν_0 , a , b e valor- p , em cm^{-1} , declive e coeficientes de correlação obtidos do ajuste multiparamétrico de Kamlet-Taft dos dados de emissão.	27
Tabela 3.1 Tamanho e potencial zeta das nanopartículas de prata e de ouro com L1 e ROS.	37

Lista de abreviaturas

NIR	<i>Near-Infrared</i>
NIRF	<i>Near-Infrared Fluorescence</i>
PDT	<i>Photodynamic Therapy</i>
CHEQ	<i>Chelation Enhancement of Quenching Effect</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
PET	<i>Photo-Induced Electron Transfer</i>
CHEF	<i>Chelation Enhancement of the Fluorescence emission</i>
MLCT	<i>Metal-Ligand Charge Transfer</i>
LMCT	<i>Ligand-Metal Charge Transfer</i>
ICT	<i>Intramolecular Charge Transfer</i>
ESIPT	<i>Excited State Intramolecular Proton Transfer</i>
FRET	<i>Fluorescence Resonance Energy Transfer</i>
UV-VIS	Ultravioleta-visível
RMN	Ressonância magnética nuclear
DLS	Dispersão de luz dinâmica
FT-IR	<i>Fourier Transformed-Infrared</i>
TEM	<i>Transmission Electron Microscopy</i>
ESI-TOF-MS	<i>Electrospray Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry</i>
AOR	Agentes oxidantes e redutores
DMSO	Dimetilsulfóxido
AgNPs	Nanopartículas de Prata
PDI	<i>Polydispersity index</i>
AuNPs	Nanopartículas de Ouro

"I have missed more than 9000 shots in my career. I have lost almost 300 games. 26 times, I have been trusted to take the game winning shot and I have missed. I have failed over and over again in my life. And that is why I succeed."

Michael Jordan

INTRODUÇÃO

1.1. Cianinas clássicas

As cianinas clássicas (ver figura 1.1) são moléculas catiónicas que possuem um azoto terminal nas subunidades heterocíclicas que estão ligadas por uma ponte denominada polimetina.

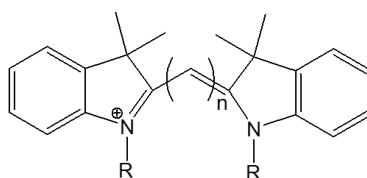


Figura 1.1 | Ilustração esquemática da estrutura química da cianina clássica (1).

A ponte de polimetina tem na sua estrutura vários carbonos com ligações duplas, em que o n pode ser $n = 1$, $n = 3$, $n = 5$ e $n = 7$ as quais se referem a cianinas denominadas, monometina (Cy1)[1], trimetina (Cy3)[2], pentametina (Cy5)[3] e heptametina (Cy7)[4], respetivamente. Estes tipos de compostos têm átomos de azoto no final das subunidades, os quais podem ser idênticos ou diferentes. As cianinas Cy1 e Cy3 geralmente apresentam transições eletrónicas que absorvem na região do visível. A extensão da ponte de polimetina conduz a desvios batocrómicos das bandas de absorção, onde os derivados da pentamina podem apresentar máximos de absorção na região do infravermelho próximo (NIR) (>700 nm), podendo ir além dos 1000 nm, no caso das heptaminas, dependendo ambos da natureza dos substituintes [5].

Na sua grande maioria as cianinas possuem bandas de absorção estreitas e altos coeficientes de extinção molar, geralmente de $200\,000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$. Estes compostos possuem um elevado rendimento quântico de fluorescência, que pode diminuir com um aumento do comprimento da ponte de polimetina. Por exemplo, a adição de ácidos nucleicos e proteínas ao fluoróforo confere rigidez à molécula permitindo um aumento da intensidade de fluorescência [6].

Relativamente às suas propriedades, estes compostos são propícios a aplicações biológicas e bioquímicas. Por outro lado, a sua baixa solubilidade em água permite que exista uma desvantagem na utilização em ambientes aquosos [7].

1.1.1. Síntese de derivados de Cianinas

Mujumbar e seus colaboradores sintetizaram várias cianinas clássicas. Uma das sínteses obtidas nesse trabalho foi a da estrutura **2** (ver figura 1.2). Esta cianina pentametina (Cy5) devido ao tamanho da sua ponte de polimetina absorve na região do infravermelho próximo [8].

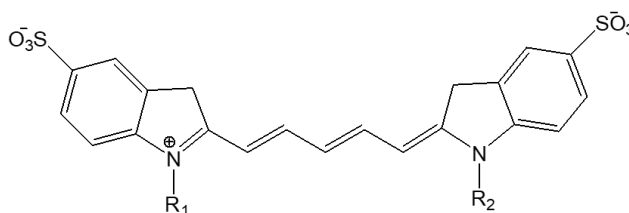


Figura 1.2 | Ilustração esquemática da estrutura química da cianina (**2**). Adaptado de [8].

Tendo como objetivo a aplicação de derivados de cianina em meios biológicos, Huihui Li e seus colaboradores reportaram a síntese da cianina heptametina (**3**), assim como os estudos citotóxicos e imagens de fluorescência em células cancerígenas (ver figura 1.3) [9].

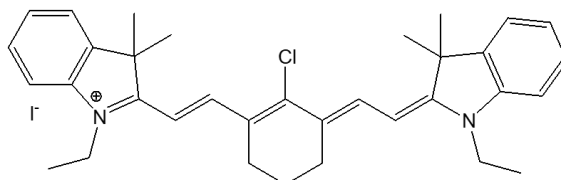


Figura 1.3 | Ilustração esquemática da estrutura química da cianina (**3**). Adaptado de [9].

1.1.2. Aplicações dos derivados das cianinas (Cy5)

Os derivados das cianinas apresentam um diverso leque de aplicações, desde estudos em células cancerígenas, em imagens de fluorescência do infravermelho próximo (NIRF) e em terapia fotodinâmica (PDT).

1.1.2.1. Aplicação em células cancerígenas

Os derivados de cianinas, devido às suas excelentes propriedades óticas, nomeadamente conterem fluoróforos excitáveis no infravermelho próximo, têm sido amplamente aplicados como sondas de monitorização em técnicas sensíveis, como a regeneração de tecidos ou mesmo localização e marcação de células cancerígenas.

Baseados nessas propriedades, Owens e colaboradores sintetizaram uma série de derivados de cianinas pentametina, excitáveis na região do infravermelho (NIR), conjugados com um derivado de gelatina biodegradável. Esta conjugação permitiu a criação de um método viável e não invasivo de monitorização através da fluorescência da degradação de dispositivos implantados cirurgicamente em transplantes de tecidos [10].

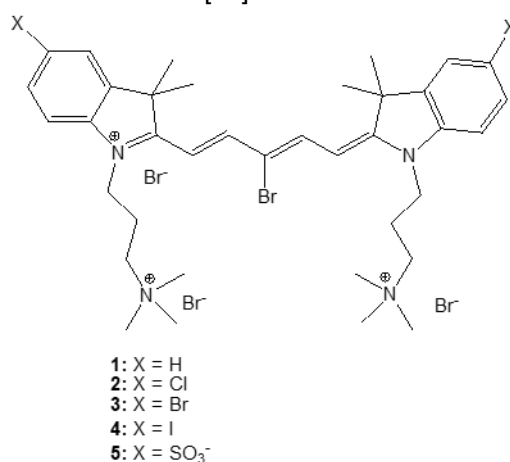


Figura 1.4 | Ilustração esquemática da estrutura química da cianina (4). Adaptado de [10].

Em 2015, Bangwen e seus colaboradores iniciaram estudos *in vitro* em células com o auxílio de cianinas pentametina e heptametina (Figura 1.5 (A) e (B)), que absorvem na região do infravermelho próximo, de modo a detetar as células cancerígenas precocemente. O principal objetivo passou por monitorizar a eficácia terapêutica em tumores [11].

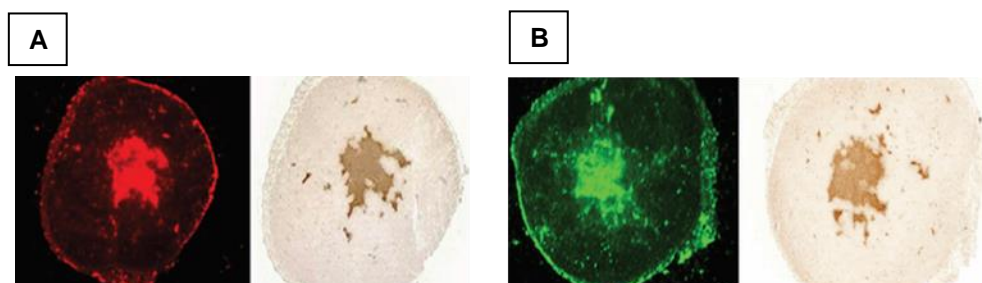


Figura 1.5 | Ilustração esquemática da identificação celular tumoral através de uma cianina pentametina (A) e de uma cianina heptametina (B). Adaptado de [11].

1.1.2.2. Aplicação através de imagens de fluorescência do infravermelho próximo (NIRF)

A imagem de fluorescência do infravermelho próximo (NIRF) é uma aplicação destinada à detecção de cancro e para obtenção de informações fisiopatológicas. Esta tecnologia de imagem requer sondas NIRF com um comprimento de onda de emissão na região do infravermelho próximo (> 700nm). As sondas mais apropriadas para esta aplicação, necessitam de ter excelentes propriedades óticas, biocompatibilidade adequada e uma alta capacidade de direcionamento para o cancro [12].

Cianinas do tipo Cy5 [13] ou Cy7 [14] devido à sua emissão na região infravermelho próximo permitem a detecção de células cancerígenas com maior facilidade, sendo por isso consideradas excelentes sondas para a obtenção de imagens de fluorescência nessa mesma região (ver figura 1.6).

A produção de sondas excitáveis no NIRF são altamente requisitadas, uma vez que nesta região espectral, estas sondas possuem uma alta sensibilidade e capacidade de detecção múltipla, uma diminuição da autofluorescência permitindo um aumento da profundidade de penetração no tecido [7]. Baseados nestes fatos, Jianlin Yuan e seus colaboradores, publicaram uma série de derivados de cianinas heptaminas e sua respetiva aplicação em cancro de próstata. Através de imagens NIRF e da particularidade das cianinas heptametinas se acumularem preferencialmente em tecidos cancerígenos, foi possível a sua localização e monitorização em células do cancro da próstata.[12].

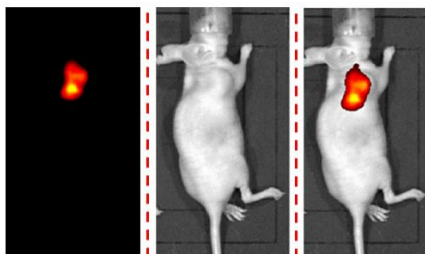


Figura 1.6 | Imagens de fluorescência do infravermelho próximo da cianina para detecção do cancro. Adaptado de [7].

1.1.2.3. Aplicação em Terapia fotodinâmica (PDT)

A terapia fotodinâmica (PDT) é considerada um tratamento direto e pouco invasivo, permitindo a destruição de células patológicas através de reações fotocitotóxicas. Este tratamento é baseado na atividade de um agente sensível à luz, denominado fotosensibilizador. Este fotosensibilizador, que pode ser um fluoróforo como as cianinas clássicas, é administrado e acumulado em tecidos tumorais. Após irradiação com luz, a um determinado comprimento de onda correspondente com o máximo de absorção do fotosensibilizador, este é excitado e interage com substratos biológicos ou oxigénio molecular, gerando espécies reativas de oxigénio, causando assim lesões no tecido

tumoral e conseqüentemente morte celular [15]. Em PDT, um fotosensibilizador tem de possuir as propriedades desejadas para ser efetivo, tais como: (i) elevada seletividade para o tecido cancerígeno, (ii) fototoxicidade, (iii) máximo de absorção da janela fototerapêutica (600-1000 nm) e (iv) um perfil farmacocinético adequado [16].

A fotofrina foi o primeiro fotossensibilizador aplicado no PDT para o tratamento de tumores da bexiga. Contudo a fotofrina têm algumas limitações como fotosensibilizador como a pouca especificidade para o tumor e a baixa penetração no tecido, por isso é importante desenvolver novos sensibilizadores como as cianinas [17].

As cianinas heptametinas e pentametinas demonstraram excelentes propriedades fotofísicas com mudanças significativas entre absorção e bandas de emissão, que poderiam ser potencialmente aplicadas em terapia fotodinâmica [18]. Estas cianinas que absorvem no NIR seletivamente, agregam-se no local do tumor e após irradiados com luz produzem radicais livres citotóxicos resultando na apoptose de células tumorais ou inibição do crescimento tumoral [19].

1.1.3. Detecção de iões metálicos

A capacidade de interação, e respetivas propriedades de uma cianina heptametina (**5**) (ver figura 1.7), na presença dos iões metálicos, Na⁺, K⁺, Be²⁺, Cd²⁺, Co²⁺, Fe²⁺, Ni²⁺, Mg²⁺, Zn²⁺ e Al³⁺ foram exploradas e estudadas por Leila Tarazi e seus colaboradores. Os estudos de interação com os iões metálicos acima referidos foram efetuados por titulação do ligando com quantidades crescentes dos respetivos iões e monitorizados por espectroscopia de absorção e de emissão de fluorescência. Após as titulações com os iões metálicos referidos, constataram que a cianina (**5**) interagiu apenas com os iões metálicos Al³⁺ e Be²⁺, onde a intensidade de emissão de fluorescência foi afetada, em ambos os casos com uma diminuição da intensidade de emissão de fluorescência. Esta diminuição de intensidade de emissão de fluorescência acontece porque os iões metálicos são conhecidos por produzir o efeito CHEQ nos fluoróforos através de um processo que envolve a transferência de eletrões do fluoróforo para o ião metálico para formar um complexo de transferência de carga. Esta transferência de carga perturba a estrutura do cromóforo, resultando na diminuição de fluorescência [20].

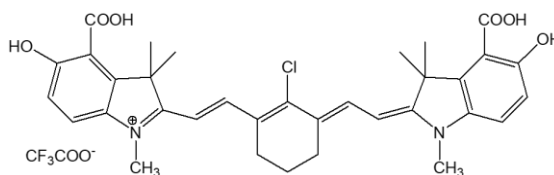


Figura 1.7 | Ilustração da estrutura química da cianina (**5**). Adaptado de [20].

Dentro da mesma área de trabalho, Mingming Zhu e seus colaboradores sintetizaram um composto derivado da cianina Cy7 (**6**), bem como os seus estudos de interação com os iões metálicos Fe^{3+} , Na^+ , Hg^{2+} , Cd^{2+} , Mn^{2+} , Pb^{2+} , Mg^{2+} , Ag^+ , Ni^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Cr^{3+} , Cu^{2+} , Ca^{2+} , Sn^{2+} , Fe^{2+} e K^+ . Como resultado apenas o ião metálico Fe^{3+} demonstrou uma diminuição da absorção e a alteração da cor da solução inicial de verde para azul (ver figura 1.8) [21].

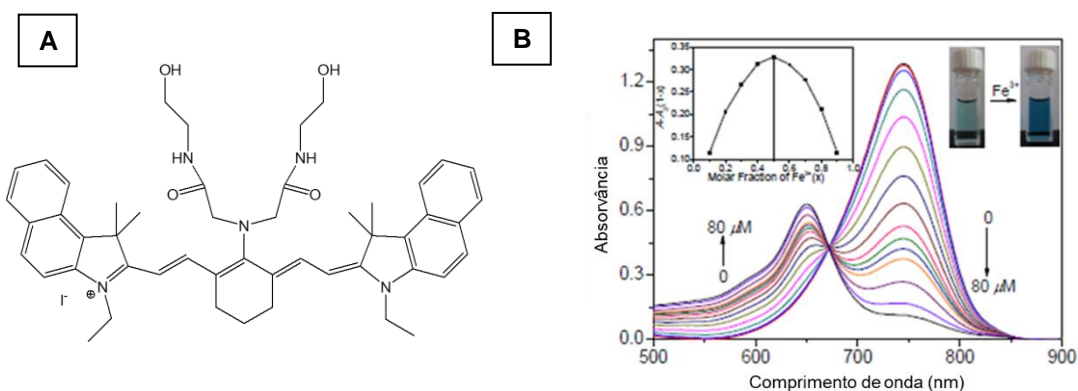


Figura 1.8 | (A) Ilustração da estrutura química da cianina (**6**). (B) Titulação espectrofotométrica da cianina na presença do ião metálico Fe^{3+} . Adaptado de [21].

1.1.4. Detecção de aniões

Relativamente à deteção de aniões, Daihi e seus colaboradores desenvolveram a cianina clássica Cy5 (**7**) (ver figura 1.9) e testaram este composto com várias espécies reativas de oxigénio (ROS).

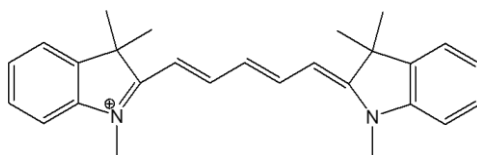


Figura 1.9 | Ilustração da estrutura química da cianina (**7**). Adaptado de [22].

Nesta investigação usaram nomeadamente o radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), peroxinitrito ($\text{ONOO}\cdot$), hipoclorito ($\cdot\text{OCl}$) e radical de oxigénio ($\text{O}_2\cdot^-$) com uma solução de Cy5. Depois da adição das espécies ROS verificaram a diminuição da absorvância a 640 nm. Na figura 1.10 (a) é possível verificar que com a adição de 400 μM de radical hidroxilo a absorvância diminui de 2.5 para perto de 0. O mesmo comportamento observou-se no caso do peroxinitrito (ver figura 1.10 (b)), no entanto com menos quantidade de anião. No caso do hipoclorito (ver figura 1.10 (c)) a diminuição da absorvância é de aproximadamente de 2.5 para 1.4. Na titulação da cianina (Cy5) com o radical de oxigénio observou-se que a absorvância não diminuiu, o que prova que o radical de oxigénio é um fraco oxidante para esta cianina [22].

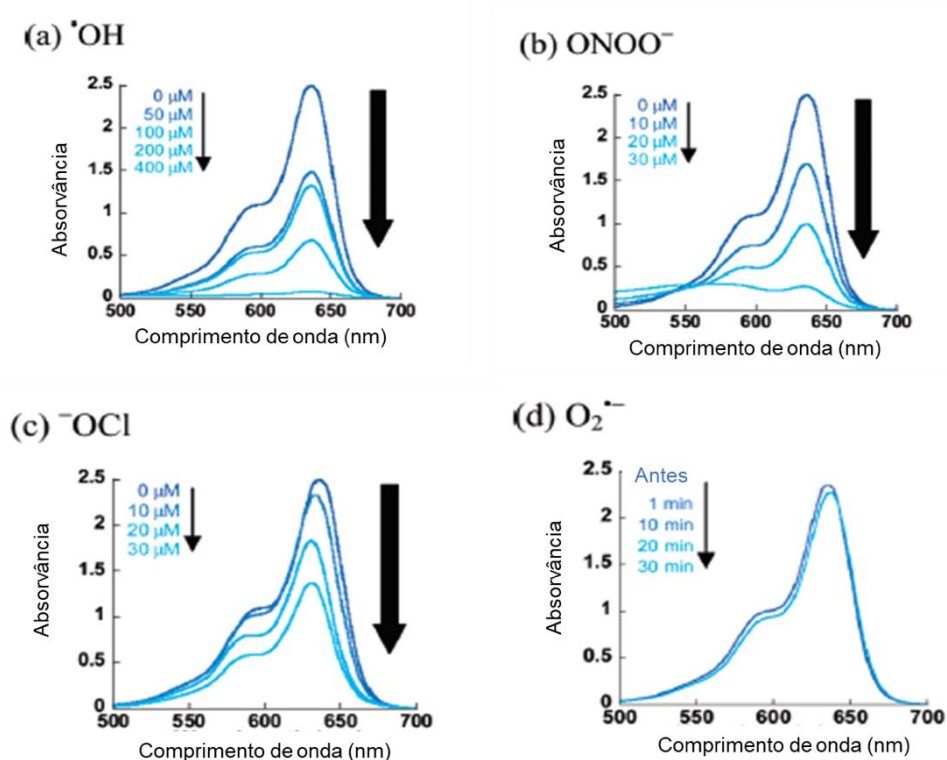


Figura 1.10 | (a) Titulações espectrofotométricas da cianina (7) com radical hidróxilo (a), peroxinitrito (b), hipoclorito (c), radical de oxigénio (d). Adaptado de [22].

Yu Wang e seus colaboradores, reportaram em 2012, a síntese da cianina heptametina (7) (ver figura 1.11 (A)) tendo como objetivo o estudo na presença dos aniões, CN^- , F^- , H_2PO_4^- , NO_3^- , HSO_4^- , ClO_4^- , Br^- e Cl^- . Os investigadores concluíram que a cianina (7) na presença do anião CN^- (ver figura 1.11 (B)), a banda de absorção diminuía a 751 nm e ao mesmo tempo surgia o aparecimento de uma nova banda a 413 nm, com um ponto isobéstico a 500 nm. Portanto, este efeito permitiu-lhes concluir que o aparecimento do ponto isobéstico indica que aos 500 nm existem duas espécies com a mesma absorvidade molar em solução. As alterações no espectro são devidas às interações do anião CN^- com a cianina heptametina (7) e à consequente perturbação do sistema π - π^* [23].

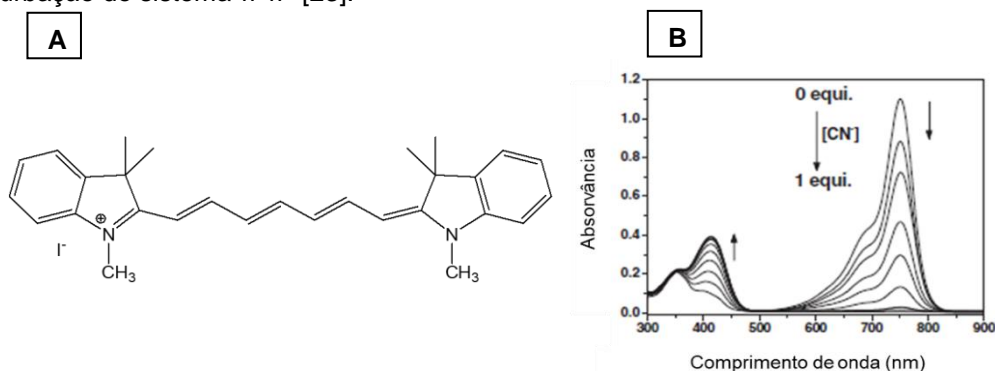


Figura 1.11 | (A) Ilustração da estrutura química da cianina (7). (B) Titulação espectrofotométrica da cianina com o anião CN^- . Adaptado de [23].

1.2. Importância da detecção de íons metálicos

Os íons metálicos desempenham funções cruciais nos processos essenciais à vida. Estes podem ser agrupados, dependendo das suas propriedades. Os íons metálicos Na^+ , K^+ , Cu^{2+} , Mg^{2+} e Zn^{2+} estão presentes no corpo humano, no entanto os metais de transição Pb^{2+} e os metais de pós-transição Cd^{2+} e Hg^{2+} podem ou não estar presentes no corpo humano [24] [25].

De modo a compreender a importância da detecção de íons metálicos, é necessário entender que um composto que contenha átomos de oxigénio é considerado duro, e um composto que contenha azoto é considerado intermediário, porque consegue ligar íons metálicos duros e moles. Através da teoria de Pearson, alguns dos compostos que são considerados bases duras são, o NH_3 , N_2H_4 , H_2O , e ClO_4^- ; bases intermediárias: NO_2 , Br^- , N_2 ; bases moles: CN^- , SCN^- e CO . Os íons metálicos como, Li^+ , Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Sr^{2+} , Be^{2+} são considerados ácidos duros. Os íons metálicos Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} são considerados ácidos intermediários. Os íons metálicos Cd^{2+} , Ag^+ , Hg^{2+} , Pd^{2+} e Pt^{2+} são considerados ácidos moles. Por estes factos, a teoria de Pearson diz que ácidos duros preferem ligar-se a bases duras e que ácidos moles preferem bases moles [26].

Os íons metálicos assumem um papel importante na estabilização e na reatividade de proteínas, contudo, para os humanos, estes devem existir nas quantidades adequadas a cada ser humano. Por outro lado pode levar a desordens metabólicas, sendo facilmente absorvidos e acumulados através do ambiente causando toxicidade e doenças [24].

O íon metálico cobre (II) é tóxico para algumas bactérias e vírus, o que pode causar danos no fígado. Em alguns processos fisiológicos (formação de glóbulos vermelhos e preservação de tecidos do cérebro) o íon cobre (II) é muito importante. A deficiência ou toxicidade deste íon no ambiente celular pode causar doenças como o Alzheimer, anemia e Parkinson [27] [28]. O íon cobre (II) normalmente produz aumento do efeito CHEQ, pois a camada d não está completa, promovendo a transferência de um eletrão do metal para o ligando ou do ligando para o metal.

O íon metálico zinco (II) está presente no corpo humano, nomeadamente nos ossos, fígado e próstata e em praticamente todas as células, para além disso é um importante cofator catalítico e estrutural de várias proteínas [29].

Os íons metálicos Cd^{2+} , Pb^{2+} e Hg^{2+} são considerados tóxicos e poluentes; O íon metálico mercúrio (II) é carcinogénico. O sistema nervoso central humano pode ser destruído se existir uma alta exposição ao mercúrio (II), para além de sérios problemas de saúde como a anemia [30] [31].

Os sensores químicos com mecanismo PET são mais propícios à interação com os íons metálicos, Zn^{2+} , Cd^{2+} e Hg^{2+} porque têm a camada d completa, sendo este um processo de transferência de eletrões do estado excitado, no qual o eletrão é transferido a partir do doador para o aceitador. A interação entre sensores químicos e os íons metálicos d^{10} (Zn^{2+} e o Cd^{2+})

normalmente produz um efeito chamado CHEF (consiste no aumento da intensidade da emissão de fluorescência), exceto o Hg^{2+} , que geralmente produz um efeito CHEQ (consiste na diminuição da intensidade da emissão de fluorescência) [32].

Por estas várias razões, a detecção e a quantificação dos íons metálicos é muito importante, por isso este tema tem sido investigado ao longo dos anos.

1.3. Importância da detecção de espécies ROS

As espécies reativas de oxigênio (ROS) são moléculas com mecanismos e condições fisiológicas distintas, em que estas espécies quando sobre expressão relacionam-se com o aparecimento de várias doenças. Algumas das espécies reativas de oxigênio são H_2O_2 (peróxido de hidrogênio), NO (óxido nítrico), O_2^- (ânion óxido), peroxinitrito (ONOO^-), ácido hipocloroso (HOCl), hidróxido (OH^-) e hipoclorito (OCl^-) [33].

No corpo humano, existe um papel vital na regulação de micróbios invasores, sendo neste caso onde o hipoclorito desempenha a sua função ao impedir a invasão destes micróbios, embora a sobreprodução de hipoclorito possa causar várias doenças [34].

As espécies ROS são formadas em situações patológicas como, patologias cardiovasculares, cancro, doenças infecciosas e doenças inflamatórias, contudo, as espécies ROS são produzidas durante situações fisiológicas como o metabolismo celular [35] [36]. A alta quantidade destas espécies leva a danos no DNA, RNA, oxidação de proteínas e à peroxidação de lípidos. De acordo com esta afirmação, as sondas fluorescentes são importantes na detecção de ROS [22].

1.4. Funcionalização de nanopartículas metálicas

A funcionalização das nanopartículas metálicas com as cianinas é fundamental para o aumento da eficácia das cianinas na detecção tumoral. As nanopartículas metálicas funcionalizadas com as cianinas podem ser utilizadas nas técnicas de terapia fotodinâmica bem como na produção de imagens de fluorescência do infravermelho próximo [37]. Para esta funcionalização é necessário compreender algumas propriedades das nanopartículas, para isso I. Khan e seus colaboradores reportaram que os tamanhos das nanopartículas variam entre 1 e 100 nm e são distinguidas em classes com base nas suas propriedades, tamanhos e formas. Dependendo do tamanho, algumas propriedades óticas são alteradas, tal como a cor devido à absorção na região do visível. Mediante as propriedades das nanopartículas, estas podem ser apropriadas para catálise, imagem, aplicações médicas e ambientais [38].

1.4.1. Nanopartículas de Ouro funcionalizadas com derivados de cianinas

Lim e seus colaboradores testaram cianinas lindoleninas na presença de nanopartículas de ouro. Os investigadores concluíram que o sistema da cianina com as nanopartículas de ouro envolve uma combinação de interações electrostáticas $\pi - \pi$ da cianina (Figura 1.12). Neste trabalho, a adsorção das cianinas lindoleninas às nanopartículas de ouro, foi verificada pela consequente diminuição da intensidade de emissão (efeito CHEQ), assim como pela alteração de cor da solução.

O efeito CHEQ é devido à transferência de energia, quando ocorre a adsorção das cianinas às nanopartículas de ouro. O efeito CHEQ ocorre dependendo da distância entre o ligando e a superfície da nanopartícula metálica ($< 5\text{nm}$). Analisando este caso, concluiu-se que a distância entre as nanopartículas de ouro e as cianinas é definida pela combinação de interações electrostáticas e $\pi - \pi$ entre o citrato de carga negativa com os grupos de carga positiva da cianina, sendo que a distância entre as nanopartículas e as cianinas neste trabalho é de aproximadamente 1.8 nm , ocorrendo assim o efeito CHEQ [39].

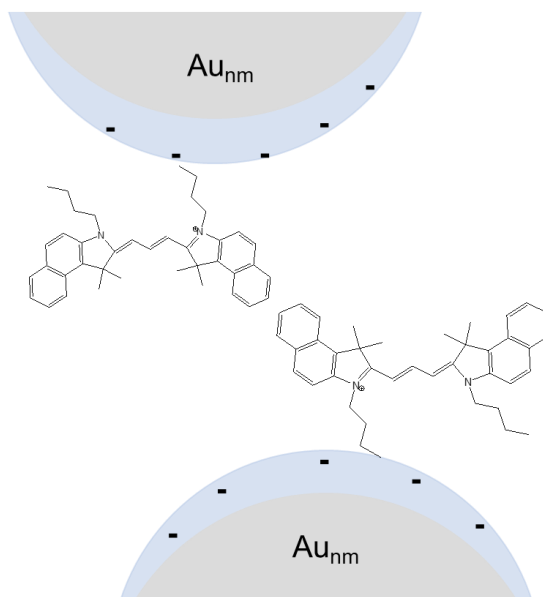


Figura 1.12 | Ilustração esquemática de interações electrostáticas e $\pi - \pi$ da cianina com nanopartículas de ouro. Adaptado de [39].

De modo a melhorar as imagens de emissão de fluorescência e consequente eficácia das cianinas na detecção tumoral, Mindan Lu e os seus colaboradores, funcionalizaram as nanopartículas de ouro em forma de bastonetes com uma cianina clássica (figura 1.13 (A) e (B)) onde se pode observar que as nanopartículas funcionalizadas com a cianina permitem uma melhor detecção das células tumorais [37].

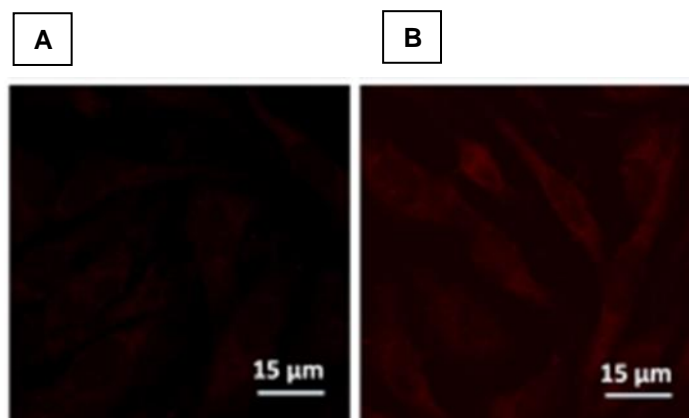


Figura 1.13 | Imagem de emissão de fluorescência da cianina (A) e da cianina funcionalizada com nanopartículas de ouro em forma de bastonetes (B). Adaptado de [37].

1.5. Sensores químicos

Um sensor químico é uma espécie química seletiva e reversível, que ao ligar-se a um analito leva à produção de um sinal analítico. O sinal resultante pode ser traduzido na mudança de cor, na fluorescência e no potencial redox. Certamente, que a escolha do cromóforo tem um grande impacto nessas propriedades. A.P. de Silva e seus colaboradores definiram que um sensor químico é constituído por três unidades principais (ver figura 1.14).

- (i) recetor (responsável pelo reconhecimento da molécula);
- (ii) fluoróforo (responsável pelo sinal);
- (iii) e espaçador (ponte entre o recetor e o fluoróforo que controla a separação e o arranjo geométrico) [40] [41].

Consequentemente, de acordo com a natureza do sinal emitido pela unidade sinalizadora, os sensores químicos são classificados em três categorias:

- (i) Sensores colorimétricos com base em propriedades de mudança eletrónica, tais como transições intramoleculares de transferência de carga (ICT) [42] [43], LMCT e MLCT;
- (ii) Sensores fluorescentes estão relacionados com transferência eletrónica fotoinduzida (PET) [42] [44], transferência de protão intramolecular no estado excitado (ESIPT) [45], transferência de energia de ressonância de fluorescência (FRET) [46] [47] e formação de excímeros- excíplexos;
- (iii) e sensores eletroquímicos relacionados com mudanças no potencial redox.

Nesta tese, apenas irão ser apresentados sensores químicos colorimétricos e fluorimétricos para detecção de íões.

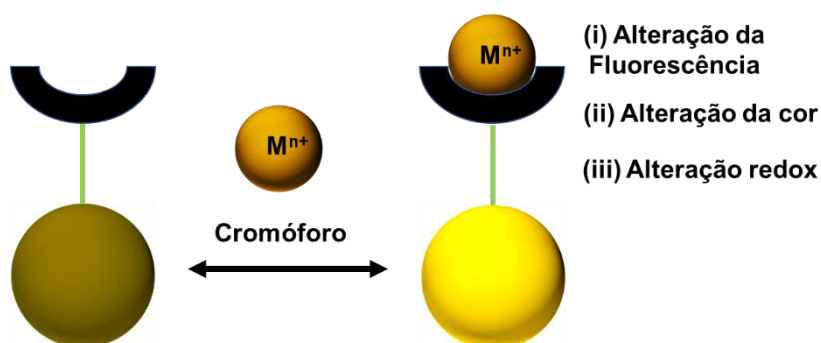


Figura 1.14 | Ilustração esquemática da ligação do sensor químico ao cátion. Adaptado de [48].

1.5.1. Sensores químicos colorimétricos

Os sensores químicos colorimétricos são moléculas usadas para detecção qualitativa e quantitativa de espécies. Nos últimos anos o reconhecimento das espécies tem sido muito importante em áreas como a medicina, o ambiente e a biologia. Alguns cromóforos como o pireno, rodamina, fluoresceína, cumarina são usadas para determinação colorimétrica de cátions.

Quando um ligando complexa com o íon metálico, no estado fundamental, são detetadas algumas mudanças no espectro de absorção. O desvio no espectro reflete a interação eletrostática entre os pares de elétrons do doador desemparelhados em conjugação com o sistema π do complexo (ver figura 1.15). Se o metal fornece carga ao aceitador, poderá haver um desvio batocrômico (para o vermelho), por outro lado se o metal recebe carga do doador, poderá haver um desvio hipsocrômico (para o azul)[48] [49].

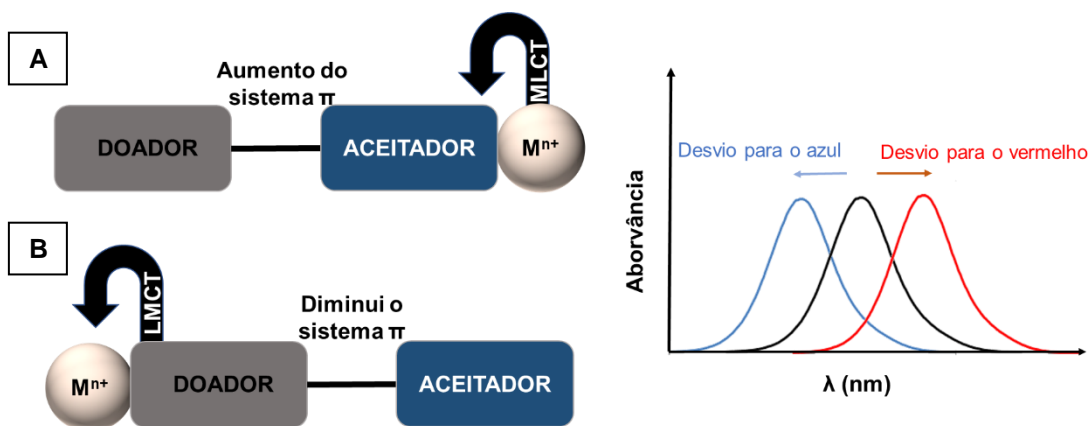


Figura 1.15 | O efeito no espectro de absorção no sistema π . **(A)** Transferência de carga do complexo metal-ligando (MLCT). **(B)** Transferência de carga do complexo ligando-metal (LMCT). Adaptado de [48].

1.5.2. Sensores químicos fluorescentes

Os sensores químicos fluorescentes através de uma reação fotoquímica no estado excitado (entre o íon e o sensor), interagem com íons metálicos passivamente. Quando os sensores interagem com o íon metálico no estado fundamental, estes formam um complexo (ver figura 1.16). Existem duas classes de estruturas de sensores químicos fluorescentes [49]:

- (i) intrínseca – o recetor e o fluoróforo estão ligados e interagem com o analito;
- (ii) conjugada – quando o fluoróforo e o recetor são separados pelo espaçador.

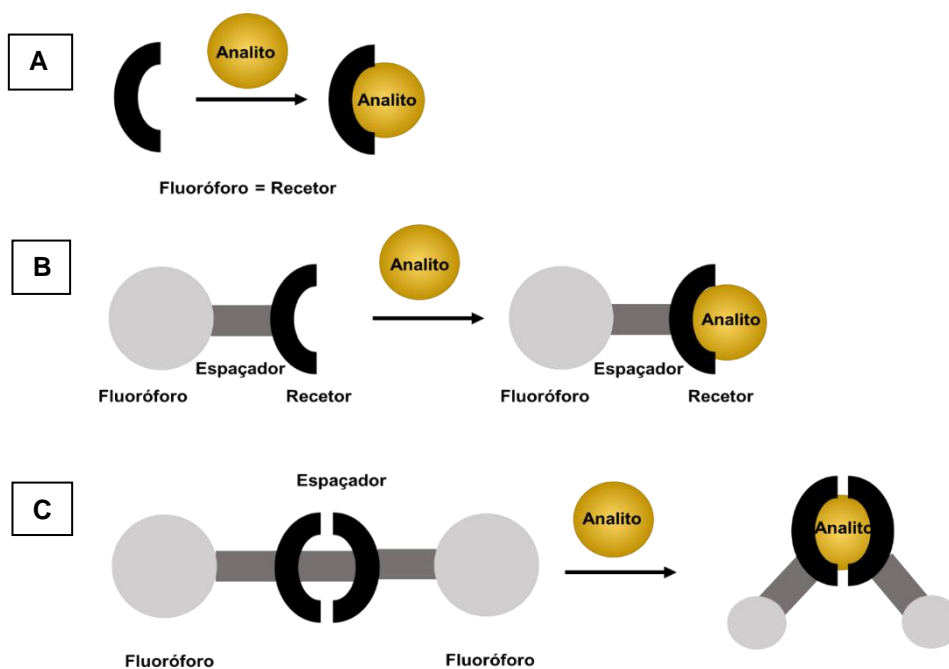


Figura 1.16 | Representação esquemática das diferentes abordagens entre o sensor químico e o analito. **(A)** – sondas fluorescentes intrínsecas. **(B)** – Sistema Fluoróforo-espaçador-recetor (conjugado). **(C)** – Formação de excímeros ou excímeros. Adaptado de [50].

Tabela 1.1 | Vantagens e desvantagens de técnicas de sensores químicos colorimétricos e fluorescentes [48].

	Técnica de sensores químicos colorimétricos	Técnica de sensores químicos fluorescentes
Vantagens	Tempo curto de deteção Alta seletividade Simplicidade	Barato Alta sensibilidade Fácil de usar
Desvantagens	Baixo limite de deteção	Nem todos os compostos fluorescem

1.5.3. Sensores químicos excitáveis no visível

Nos últimos anos tem-se estudado sondas com cromóforos excitáveis no visível e estes particularmente são usados em modelos biológicos, tal como em células e tecidos sendo que estes conseguem ser irradiados com luz sem causar danos nas células [24].

Para além da fluoresceína e da rodamina existem outros exemplos de moléculas usadas para desenvolver sondas biológicas, com excelentes propriedades como a alta fluorescência, alto coeficiente de extinção molar e elevado rendimento quântico de fluorescência. Por estes motivos, a bioquímica, a libertação de fármacos, a imagem de células, a biologia celular e os diagnósticos clínicos são algumas das áreas onde estas sondas são usadas [51].

1.5.3.1. Violeta de Cresilo e Azul do Nilo

A benzofenoxazina é uma molécula derivada da oxazina (ver figura 1.17). Na literatura, as benzofenoxazinas são conhecidas pela sua natureza lipofílica e pela sua cor. O violeta de cresilo e o azul do nilo são ambos constituídos por benzofenoxazinas [52].

O violeta de cresilo pode ser funcionalizado com outros grupos, sendo que é possível a alteração de um grupo funcional ou a reação com outras moléculas. Esta funcionalização consegue ser feita com moléculas biológicas, nomeadamente vitaminas e aminoácidos. Algumas características químicas e fotofísicas deste composto são propícias para esta funcionalização quando estas são usadas como agente de coloração. A interação ácido-base numa solução, as ligações de hidrogénio e electrostáticas conseguem alterar algumas das propriedades químicas e fotofísicas. O violeta de cresilo tem algumas características focadas nos elevados rendimentos quânticos, na fotoestabilidade e na rigidez da estrutura [53] [54].

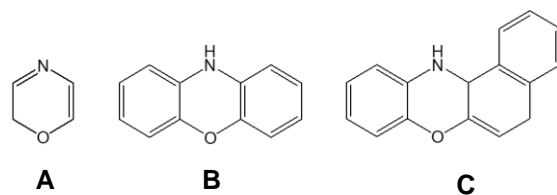


Figura 1.17 | Ilustração das estruturas químicas de **(A)** 2H-1,4-oxazina, **(B)** 10H-fenoxazina e **(C)** 12H-benzofenoxazina. Adaptado de [52].

Relativamente à molécula azul do nilo, esta também é formada a partir da fenoxazina que é uma sonda fluorescente, que por sua vez tem várias aplicações terapêuticas e em áreas científicas devido à sua alta estabilidade e intensidade.

Os derivados do azul do nilo são fotosensibilizadores de oxigênio, por isso estes compostos podem ser usados na terapia fotodinâmica devido à sua alta afinidade a células cancerígenas. A utilização do azul do nilo em algumas aplicações depende muito da polaridade do solvente. Este composto no estado excitado revela uma energia estável, uma vez que a sua polaridade faz com que a sua absorção e emissão desviem para a região do vermelho, no entanto a baixa solubilidade num ambiente aquoso pode ser umas das limitações.

E. Oliveira e seus colaboradores desenvolveram dois derivados da família da oxazina, o violeta de cresilo e o azul do nilo com a adição da estrutura bioativa da vitamina B₆ (ver figura 1.18). Neste trabalho foi realizada a caracterização fotofísica dos compostos violeta de cresilo e azul do nilo conjugados com a vitamina B₆. Quanto ao azul do nilo conjugado com a vitamina B₆ foi feito o estudo de solvatocromismo (que por sua vez é positivo) em diferentes solventes onde foi observado desvios espectrais (na absorção Uv-Vis e emissão de fluorescência) e a alteração da cor da solução (sobre a lâmpada de UV) desde a cor vermelha (em diclorometano) até ao azul (em água), consoante o solvente usado. Foi também realizado o estudo do rendimento quântico de fluorescência em diferentes solventes [53] [54].

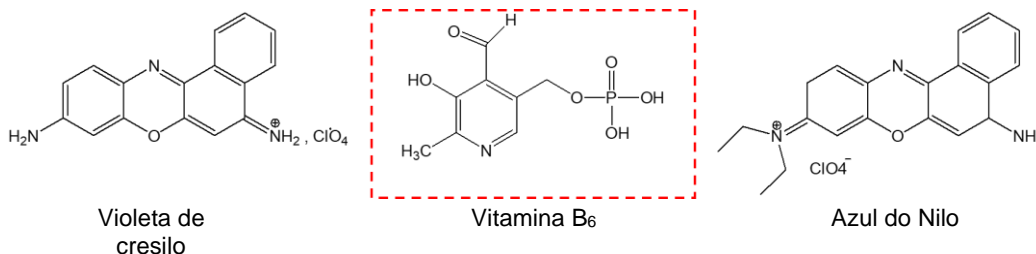


Figura 1.18 | Ilustração esquemática da estrutura química do violeta de cresilo, vitamina B₆ e azul do nilo. Adaptado de [54].

1.6. Técnicas de caracterização

A análise estrutural permite compreender determinadas características de um composto, sendo esta análise possível com um conjunto de técnicas analíticas. No caso aqui proposto, algumas técnicas como a absorção UV-Vis, a emissão de fluorescência, RMN, FT-IR, TEM, DLS (tamanho da partícula e potencial zeta) e ESI-TOF-MS, serão determinantes para a análise e estudo do composto e para determinar a estrutura do mesmo. Com estas técnicas é possível analisar e determinar algumas propriedades do composto ou do sistema.

1.6.1. Espectroscopia de Ultravioleta-visível (Uv-Vis)

A espectroscopia de ultravioleta-visível é uma técnica que consiste na interação da luz ultravioleta e do visível com as moléculas, tendo em conta as transições de elétrões do estado fundamental para o estado excitado.

A lei de Lambert-Beer é uma relação linear entre a absorvância e a concentração de moléculas. A concentração de uma determinada espécie molecular, em solução está correlacionada com lei de Lambert-Beer, podendo ser em absorvância (radiação inicial incidente) ou em transmitância (intensidade ou composição do espectro de saída). A lei de Lambert-Beer é escrita da seguinte forma:

$$Abs = \varepsilon \cdot b \cdot C$$

Equação 1 | Lei de Lambert-Beer.

Onde A é a absorvância medida, ε representa o coeficiente de extinção molar ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$), b é o caminho ótico percorrido (cm), e C é a concentração do analito (M) [55].

1.6.2. Espectroscopia de Fluorescência

A espectroscopia de fluorescência é uma técnica complementar à técnica de espectroscopia de absorção. A espectroscopia de fluorescência é uma técnica, onde a fluorescência é uma transição radiativa e consiste nas transições de elétrões do estado excitado para o fundamental. Tendo em conta o desvio de Stokes, a perda de energia é devido ao relaxamento vibracional no estado excitado.

1.6.3. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear ^1H / ^{13}C

A técnica de espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) é uma técnica química analítica que usa um campo magnético externo como fonte de energia. Esta técnica é usada no controlo de qualidade e na investigação da pureza da molécula bem como na estrutura molecular.

Além disto, esta técnica tem a capacidade de promover transições de energia entre níveis altos e baixos de energia. Os isótopos ^1H ou ^{13}C são tipicamente aplicados nesta técnica, contrariamente aos isótopos com núcleos pares como o ^{12}C . A técnica de RMN usa o tetrametilsilano como protão de referência [55].

1.6.4. Dispersão de luz dinâmica (DLS)

A dispersão de luz dinâmica é uma técnica que mede o tamanho das partículas tipicamente na região dos nanómetros. O DLS mede o movimento browniano e relaciona o mesmo com o tamanho das partículas. O movimento browniano é um movimento aleatório das partículas devido ao solvente que rodeia as moléculas.

$$d(H) = \frac{kT}{3\pi\eta D}$$

*Equação 2 |
Stokes-Einstein*

Onde, $d(H)$ é o diâmetro hidrodinâmico, D é o coeficiente de difusão translacional, k é a constante de Boltzman, T a temperatura absoluta e η é a viscosidade [56].

1.6.5. Espectroscopia de infravermelho acoplada com transformada de Fourier (FT-IR)

A técnica espectroscopia de infravermelho acoplada com transformada de Fourier (FT-IR) pode ser usada em amostras líquidas, sólidas e gasosas. Esta técnica relaciona-se com a vibração das ligações covalentes, de forma a obter o espectro de absorção do infravermelho. A técnica de FT-IR pode ser aplicada para identificar compostos ou para o estudo da composição da amostra [55].

1.6.6. Microscopia de Transmissão Eletrónica (TEM)

A microscopia de transmissão eletrónica (TEM) é uma técnica de alta resolução a qual utiliza um feixe de eletrões de modo a fornecer excelentes imagens do material. Esta técnica consegue obter imagens a partir de uma escala de micrómetros para angströms. As imagens são adquiridas através da interação do feixe de eletrões com a amostra, sendo que depois disto é fornecido um fluxo de eletrões transferidos a partir da amostra que mais tarde são colhidas e convertidas numa imagem [57].

1.6.7. Ionização por Electrospray (ESI-TOF-MS)

A técnica ESI-TOF-MS, é uma espetrometria de massa que consiste na ionização da amostra (geralmente num solvente orgânico) através de um capilar aquecido num campo elétrico a fim de produzir gotículas carregadas e onde os iões da amostra com diferentes massas são acelerados para a mesma energia cinética. Por sua vez é medido o tempo que cada ião leva a atingir o detetor. Este tempo depende da relação massa-carga do ião [58].

1.7. Objetivos da Tese

1. Síntese e caracterização de um novo derivado de cianina pentametina.

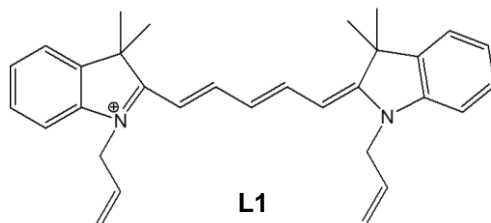


Figura 1.19 | Ilustração esquemática da estrutura química L1.

2. Interação do derivado de cianina L1 com os íons metálicos (Cu^{2+} , Hg^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Li^+ , Co^{2+} , Ca^{2+} , K^+ , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ag^+ , Na^+ e Fe^{3+}), espécies ROS, aniões e agentes oxidantes e redutores (AOR), (NaNO_3 , NaOCl , NaOH , Na_2SO_3 , H_2O_2 , Na_2S , Na_2SO_4 , KNO_2 , e $\text{C}_{16}\text{H}_{36}\text{ClNO}_4$).
3. Síntese de nanopartículas de ouro e prata e funcionalização da sua superfície com a cianina L1.
4. Por último, explorar a interação de espécies ROS, aniões e AOR com os derivados do violeta de cresilo e o azul do Nilo conjugados com a vitamina B₆.

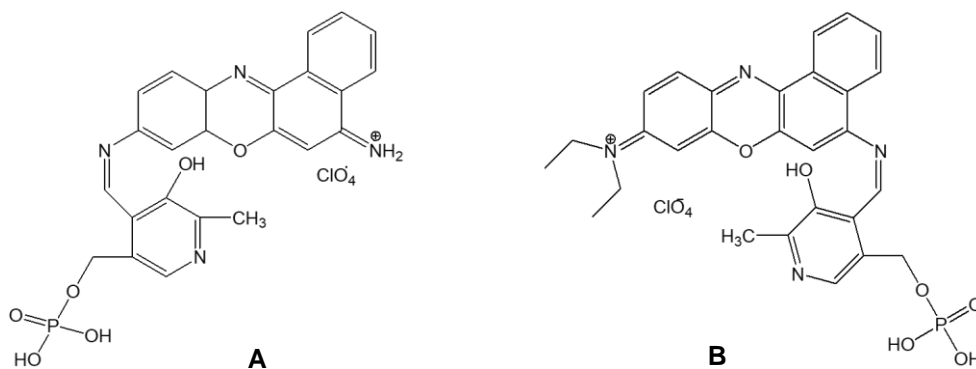


Figura 1.20 | Ilustração esquemática das estruturas químicas L2 (A) e L3 (B). Adaptado de [54].

SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DO DERIVADO DE CIANINA CY5: INTERAÇÃO COM IÕES METÁLICOS E ESPÉCIES ROS/ANIÕES/AOR

Um composto derivado de cianina Cy5 (**L1**) foi sintetizado e caracterizado por técnicas de RMN de ^1H e ^{13}C , análise elementar, FT-IR, ESI-TOF-MS, espectroscopia de Uv-Vis e espectroscopia de emissão de fluorescência. O composto L1 apresenta absorção e emissão na região do infravermelho próximo, com máximos centrados a 680 nm e 774 nm em acetonitrilo, respetivamente. Estudos de solvatocromismo em diferentes solventes, assim como interação do composto **L1** na presença de iões metálicos, espécies ROS/aniões/agentes oxidantes e redutores foram realizados. Através da análise dos resultados obtidos, a interação de **L1** foi seletiva para Cu^{2+} , NaOCl e Na_2S .

Palavras-chave: Derivados de cianinas, iões metálicos, ROS, aniões.

2.1. Secção Experimental

2.1.1. Reagentes e materiais de partida

Fenil-hidrazina (97%), 3-metil-2-butanona (99%), Bicarbonato de sódio (99.5%), Sulfato de Magnésio (99.5%), Iodeto de alilo (99.8%), N-5-(fenilamino)-2,4-pendienildieno anilina (98%), Anidrido acético (99%), foram adquiridos da Sigma-Aldrich e usados sem qualquer purificação. Ácido acético glacial (99.7%) foi fornecido pela Panreac e o acetato de sódio (99%) pela Carlo Erba.

$\text{Cu}(\text{OTf})_2$, $\text{Zn}(\text{OTf})_2$, $\text{Cd}(\text{OTf})_2$, $\text{Hg}(\text{OTf})_2$, $\text{Pb}(\text{OTf})_2$, $\text{Mg}(\text{OTf})_2$, $\text{Co}(\text{OTf})_2$, $\text{Li}(\text{OTf})$, $\text{Ag}(\text{OTf})$, $\text{Ni}(\text{OTf})_2$, $\text{Ca}(\text{BF}_4)_2$, $\text{K}(\text{BF}_4)$, $\text{Na}(\text{BF}_4)$, $\text{Mn}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ foram comprados na Strem Chemicals, Sigma-Aldrich e Solchemar. Na_2S , NaOCl, NaNO_3 , NaOH, Na_2SO_3 , H_2O_2 , Na_2SO_4 , KNO_3 ,

C₁₆H₃₆ClNO₄ foram comprados na Fluka, Sigma-Aldrich, Alfa Aesar, Panreac, Riedel-de-Häen. Todos estes químicos foram usados como fornecidos. Os solventes foram obtidos da Panreac e da Riedel-de-Häen e foram usados como recebidos.

2.1.2. Instrumentação

A análise elementar foi realizada com o *Thermo Finnigan-CE Instruments Flash EA 112 CHNS series*; os espectros de RMN de ¹H e ¹³C foram adquiridos com o *Bruker Avance III 400* na FCT-Universidade Nova de Lisboa, Portugal. Os espectrómetros de RMN são suportados pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia (RECI/BBB-BQB/0230/2012).

Os espectros de absorção UV-vis foram adquiridos nos espectrofotômetros *JASCO V-650* e *V-630* e os espectros de emissão de fluorescência foram no espectrofluorímetro *HORIBA-JOBIN-YVON Fluoromax-4*.

As análises de espectrometria de massa foram realizadas no laboratório de espectrometria de massa – Isabel Moura (*PROTEOMASS SCIENTIFIC SOCIETY Facility*), usando ESI-QqTOF (Bruker-Daltonics). As condições de *Electrospray* incluem as seguintes configurações: (i) 3 ml/min taxa de fluxo, (ii) capilaridade 4500 V; (iii) *set end plate offset* -500 V; (iv) voltagem 2000 V, (v) nebulizador 0.3 bar N₂; (vi) secador 200°C; e (vii) gás seco 4.0 l/min. O espectrômetro de massa foi configurado para fazer o scan de espectros completos (50 – 1300 m/z) em polaridade positiva. Análise de dados foi realizada usando *Compass DataAnalysis V4.2* (Bruker-Daltonics).

2.1.3. Síntese do composto derivado de cianina cy5 (L1)

2.1.3.1. Síntese de 1-allil-2-((1E,3E,5Z)-5-(1-allil-3,3-dimetilindolin-2-iliidene)penta-1,3-dien-1-il)-3,3-dimetil-3H-indol-1-ium (L1)

Uma suspensão de fenilhidrazina (1,82 mL; 0,019 mol) em ácido acético glacial (75 mL) foi agitada, de seguida adicionou-se o 3-metil-2-butanona (5,94 mL; 0,055 mol) e deixou-se sobre refluxo durante 24h (ver figura 2.1). O solvente foi removido a pressão reduzida e obteve-se um produto que foi dissolvido em diclorometano (30 mL) e extraiu-se três vezes com uma solução aquosa de bicarbonato de sódio (3 x 50 mL). A fase orgânica foi seca com sulfato de magnésio e o solvente foi evaporado a pressão reduzida, levando ao intermediário II (figura 2.1.).

O intermediário II foi dissolvido em acetonitrilo (50 mL), e de seguida aqueceu-se e agitou-se durante 30 minutos sobre atmosfera de N₂. O agente alquilante iodeto de alilo (5 mL; 0,055 mol) foi adicionado à mistura e foi colocado a refluxo durante 4h sobre atmosfera N₂. De seguida, a mistura foi colocada a refluxo durante 72 h. No final foi adicionado éter dietílico, resultando na precipitação do intermediário III.

O *N*-5-(fenilamino)-2,4-pendienildiéno anilina (150 mg; 0,5 mmol) foi dissolvido num balão de fundo redondo com anidrido acético (8 mL). O intermediário III (316 mg; 1,58 mmol) foi adicionado

à mistura. O acetato de sódio (172 mg; 2,1 mmol) foi adicionado à reação e depois a mistura foi aquecida e agitada a 70 °C durante 4h. A mistura foi arrefecida e lavada várias vezes com éter dietílico. O produto foi recolhido num papel de filtro. O produto foi dissolvido em diclorometano (40 mL) e extraído três vezes com água mili-Q. A fase orgânica foi seca com sulfato de magnésio. O filtrado foi recolhido e o solvente foi removido sobre pressão reduzida resultando no composto **L1** [10].

O composto **L1** foi obtido em pó com uma cor roxa escura (MM = 435,6 g/ mol; 163 mg; 0,4 mmol; 74% rendimento da reação global). P.f. = 159,2-161,3 °C. MM = 634.2 g/mol Cálculo Analítico para C₃₁H₃₅N₂.l. 4H₂O: C, 58.6; H, 6.8; N, 4.4. Encontrou-se: C, 58.7; H, 4.8; N, 4.6 %.

ESI-TOF-MS: [C₃₁H₃₅N₂]⁺, 435.2795 m/z.

IV(cm⁻¹): ν, 3015 (C-H alongamento); 2970 (CH₃ alongamento); 2925 (CH₂ alongamento); 1449 (C-N alongamento).

¹H-RMN (DMSO, 400 MHz) ppm: δ_H = 1.66 (s, 6H, CH₃ a), 1.71 (s, 6H, CH₃ b), 4.65-4.66 (d, J=4 Hz 2H, H1'), 4.91-4.92 (d, J= 4Hz, 2H, H4'), 5.13-5.22 (t, 2H, H3'), 5.28-5.34 (t, 2H, H6'), 5.97-6.06 (m, 2H, H2'+H5'), 6.18-6.21 (d, J= 12Hz, 1H, H10), 7.17-7.19 (d, J= 8Hz, 1H, H14), 7.24-7.40 (m, 3H, H11, H12, H13), 7.50-7.63 (m, 8H, Bzn H aromático).

¹³C-RMN (DMSO, 400 MHz) ppm: δ_C = 26.5 (Cb), 27.7 (Cb), 46.1 (C4', C1'), 49.2 (C6', C3'), 55.4 (C2', C5'), 111.4, 117.8, 119.4, 122.9, 123.4 (C10-C15), 128.9, 129.1, 129.9, 130.3, 130.8, 131.0, 141.3, 142.5 (C3-C6, C18-C21).

UV-Vis em acetonitrilo (λ, nm): Bandas a 743 nm (ε = 5,0 x 10³ cm⁻¹.M⁻¹); 680 nm (ε = 1,6 x 10³ cm⁻¹.M⁻¹); 498 nm (ε = 1,2 x 10³ cm⁻¹.M⁻¹); Espectro de emissão em acetonitrilo (λ, nm): banda a 774 nm. Desvio de Stokes (nm): 31; 94; 276, respetivamente.

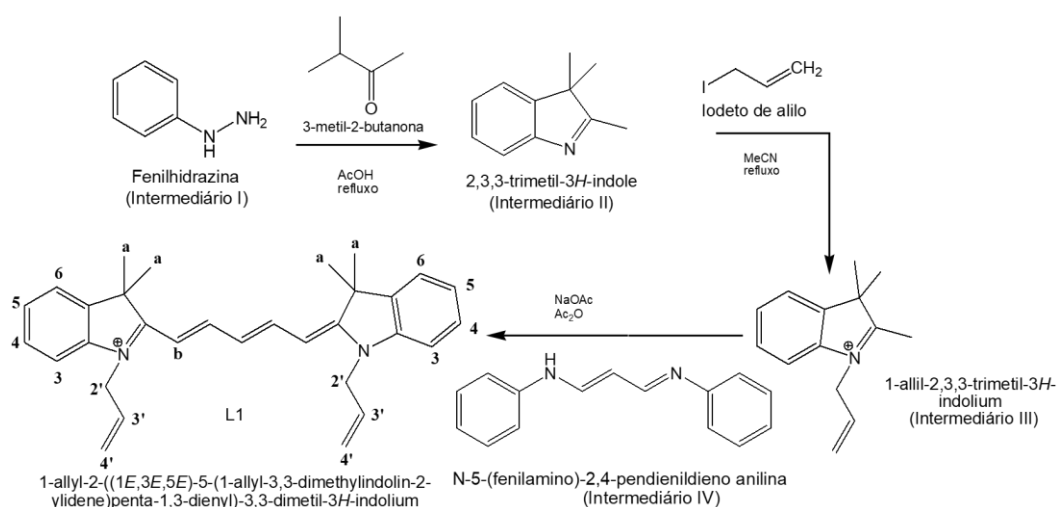


Figura 2.1 | Síntese e estrutura química do composto **L1**.

2.1.4. Estudos espectrofotométricos e espectralfluorimétricos

As caracterizações e titulações espectroscópicas foram realizadas da seguinte forma: a solução stock do composto **L1** (10^{-3} M) foi preparada no solvente apropriado (acetonitrilo) num frasco de 10 mL. A solução stock do composto foi diluída para uma concentração de 10^{-5} M, sendo esta a concentração utilizada nas titulações. As titulações do composto **L1** foram realizadas pela adição crescente em microlitros das soluções de íons metálicos (10^{-2} M) e ROS/aniões/agentes oxidantes e redutores (AOR) (10^{-2} M) preparadas em acetonitrilo e água mili-Q, respetivamente. A correção para a luz absorvida foi realizada quando necessária.

Íons metálicos: Cu^{2+} , Hg^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Li^{+} , Co^{2+} , Ca^{2+} , K^{+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ag^{+} , Na^{+} e Fe^{3+} .
ROS, aniões, agentes oxidantes e redutores (AOR): NaNO_3 , NaOH , $\text{C}_{16}\text{H}_{36}\text{ClNO}_4$, Na_2SO_4 , NaOCl , H_2O_2 , KNO_2 , e Na_2SO_3 , Na_2S .

2.2. Resultados e Discussão

2.2.1. Síntese e estudos fotofísicos do derivado de cianina **L1**

A cianina simétrica **L1** foi sintetizada através da condensação do composto heterocíclicocatiónico (intermediário III) (ver figura 2.1), com o *N*-5-(fenilamino)-2,4-pendienildieno anilina. O composto **L1** foi obtido em pó com a cor roxa escura e com um rendimento da reação global de 74%. O composto **L1** foi totalmente caracterizado por análise elementar, RMN ^1H e ^{13}C , espectroscopia de infravermelho (FTIR), espectrometria ESI-TOF-MS, espectroscopia de UV-vis e espectroscopia de emissão de fluorescência. Relativamente à análise elementar, o composto **L1** foi ajustado de acordo com a fórmula química postulada (ver secção experimental). Ambos os espectros de RMN ^1H e ^{13}C estão de acordo com a estrutura proposta de **L1** (ver secção experimental).

De acordo com espectro de FTIR, este demonstra alguns sinais fundamentais, como a banda a 3015 cm^{-1} C-H assimétrica de alongamento. As bandas a 2925 e a 2870 cm^{-1} foram atribuídas para CH_2 modos de alongamento assimétricos e simétricos da cadeia de hidrocarbonetos. A banda a 2970 cm^{-1} demonstra o modo de alongamento assimétrico dos grupos CH_3 . As atribuições vibracionais na região entre 1600 - 1380 cm^{-1} estão relacionadas com os modos de alongamento e deformação da cadeia central ressonante do composto **L1**.

O composto **L1** foi caracterizado por absorção e emissão de fluorescência em acetonitrilo e em diclorometano à temperatura ambiente (t.a.), de modo a comprovar se o espectro do composto **L1** é dependente ou não do solvente.

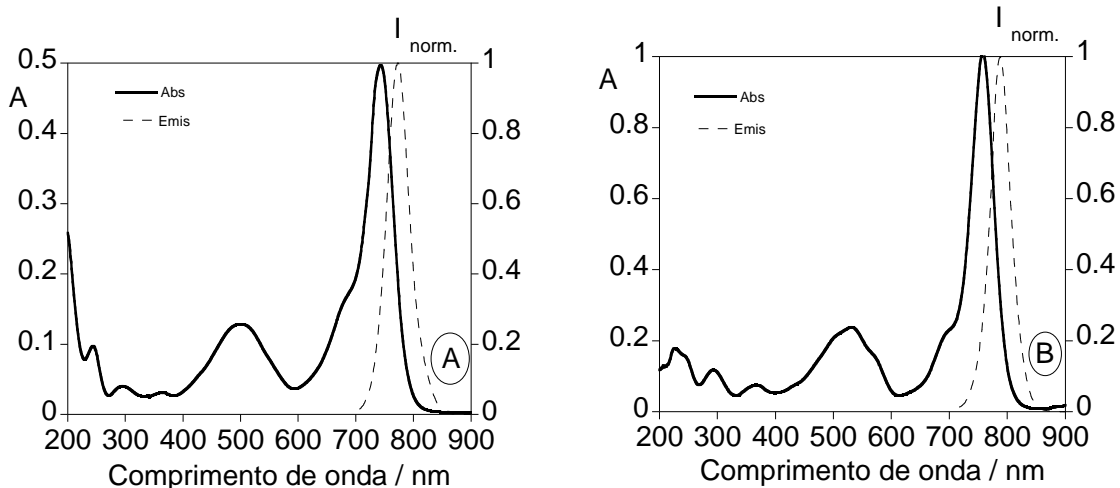


Figura 2.2 | Espectros de absorção e emissão do **L1** em acetonitrilo (**A**), $\lambda_{exc} = 680$ nm, $\lambda_{em} = 774$ nm. Espectros de absorção e emissão do **L1** em diclorometano (**B**), $\lambda_{exc} = 690$ nm, $\lambda_{em} = 788$ nm. $[L1] = 1.0 \times 10^{-5}$ M, $T = 298$ K.

Através da figura 2.2. (A), é possível verificar a presença de três bandas no espectro de absorção a 743 nm, 680 nm e 498 nm e uma banda a 774 nm no espectro de emissão em acetonitrilo. Em diclorometano observa-se um desvio para o vermelho tanto da banda de absorção de 680 nm para 690 nm, como da banda de emissão de 744 nm para 788 nm (figura 2.2. (B)). Deste modo, verifica-se que as propriedades fotofísicas do composto **L1** são dependentes do solvente.

2.2.2. Estudos de solvatocromismo de L1

O composto **L1** foi estudado por absorção UV-Vis e por emissão de fluorescência, em vários solventes, nomeadamente acetonitrilo, diclorometano, etanol e DMSO, a fim de averiguar o comportamento solvatocrômico do composto **L1**.

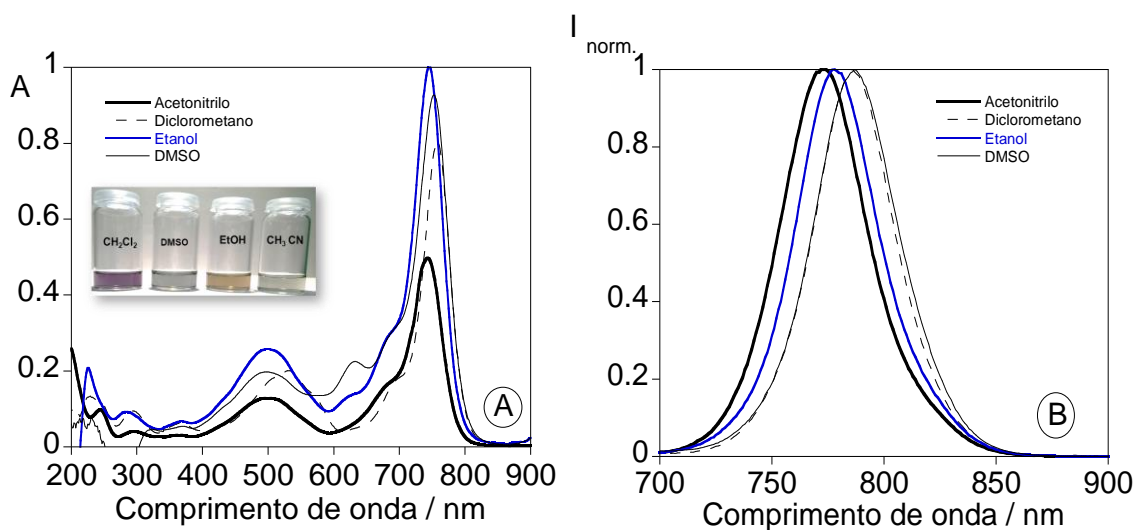


Figura 2.3 | Espectros de absorção (**A**) e emissão (**B**) de **L1** em acetonitrilo, diclorometano, etanol e DMSO. $[L1] = 1.0 \times 10^{-5}$ M, $T = 298$ K. **L1** em acetonitrilo, $\lambda_{exc} = 680$ nm, $\lambda_{em} = 774$ nm. **L1** em diclorometano, $\lambda_{exc} = 690$ nm, $\lambda_{em} = 786$ nm. **L1** em etanol, $\lambda_{exc} = 680$ nm, $\lambda_{em} = 778$ nm. **L1** em DMSO, $\lambda_{exc} = 680$ nm, $\lambda_{em} = 787$ nm.

Na tabela 2.1 apresentam-se os valores experimentais dos máximos de absorção e de emissão nos diferentes solventes estudados, bem como o momento dipolar e constante dielétrica de cada solvente.

Tabela 2.1 | Propriedades fotofísicas de **L1**, momento dipolar e constante dielétrica de vários solventes.

Solvente	λ_{abs} (nm)	ν_{abs} (cm ⁻¹)	λ_{emis} (nm)	ν_{emis} (cm ⁻¹)	Momento dipolar (D)	Constante Dielétrica (ϵ)
Acetonitrilo	680	14705	774	12919	3.92	36.6
Etanol	680	14705	778	12853	1.69	30.0
Diclorometano	690	14492	786	12722	1.60	8.93
DMSO	680	14705	787	12706	3.96	47.2

Analisando os espectros de absorção e de emissão (ver figura 2.3.) do composto **L1** é possível visualizar um desvio para o vermelho o que indica um aumento da polaridade, podendo se verificar nas bandas de emissão centradas a 774 nm (Acetonitrilo) < 778 nm (Etanol) < 786 nm (Diclorometano) < 787 nm (DMSO). A alteração das cores (ver figura 2.3) permite verificar que o composto **L1** tem um comportamento solvatocrômico na presença do acetonitrilo, etanol, diclorometano e DMSO. Portanto, o composto **L1** tem um solvatocromismo positivo. O solvatocromismo positivo observado, é pouco significativo, devido ao facto do desvio espectral ser mínimo.

Tabela 2.2 | Parâmetros α , β , π^* e n para os solventes utilizados [10] [59] [60].

Solvente	α	β	π^*	n
Acetonitrilo	0.19	0.31	0.75	1.34
Etanol	0.86	0.75	0.54	1.36
Diclorometano	1.17	0	0.82	1.42
DMSO	0	0.76	1	1.47

n : índice de refração, α : parâmetro solvatocrômico de acidez do solvente, β : parâmetro solvatocrômico de basicidade do solvente, π^* : parâmetro solvatocrômico de dipolaridade / polarizabilidade do solvente.

O ajuste multiparamétrico das energias de emissão observadas foi efetuado com base na equação de Kamlet-Taft, $\nu = \nu_0 + a\alpha + b\beta + p\pi^*$ [61], usando os parâmetros dos solventes das tabelas 2.1 e 2.2. Através do ajuste de uma regressão linear do ν_{exp} versus ν_{calc} determinou-se para o composto **L1**, os seguintes parâmetros, $\nu_0 = 14.115 \text{ cm}^{-1}$, $a = -616 \text{ cm}^{-1}$, $b = 84 \text{ cm}^{-1}$ e $p = -1473 \text{ cm}^{-1}$ com um fator de correlação de 1.

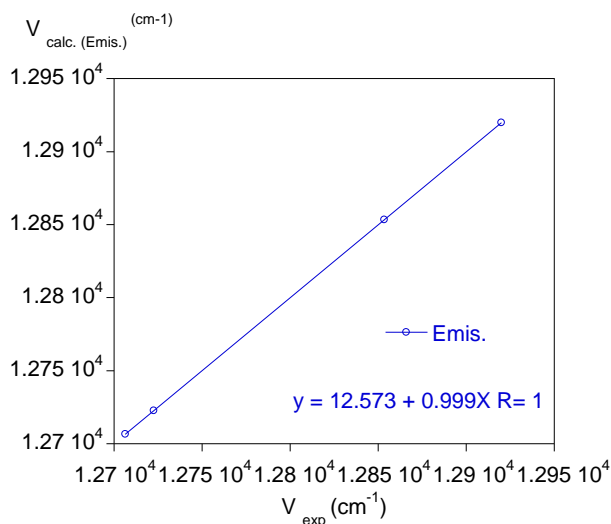


Figura 2.4 | Regressão linear (ν_{exp} versus ν_{calc}) dos dados de emissão.

O valor p (tabela 2.3) do composto **L1** demonstra que a contribuição da dipolaridade/polarizabilidade diminui a estabilização no estado excitado, devido ao facto do valor p ser um valor negativo. Para o composto ser estável no estado excitado o composto **L1** deveria ter um valor de a positivo, no entanto, o valor de a é negativo.

Tabela 2.3 | ν_0 , a , b e valor- p , em cm^{-1} , declive e coeficientes de correlação obtidos do ajuste multiparamétrico de Kamlet-Taft dos dados de emissão.

	Composto	$\nu_0(\text{cm}^{-1})$	$a(\text{cm}^{-1})$	$b(\text{cm}^{-1})$	$p(\text{cm}^{-1})$	Declive	r^2
Emissão	L1	14.115	-616	84	-1473	0.99	1

2.2.3. Estudos de interação do L1 com íons metálicos

O composto **L1** foi estudado em acetonitrilo na presença de pequenas quantidades de metais alcalinos, alcalino-terrosos, de transição e de pós-transição, tais como Cu^{2+} , Hg^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Li^+ , Co^{2+} , Ca^{2+} , K^+ , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ag^+ , Na^+ e Fe^{3+} (ver Figura 2.5).

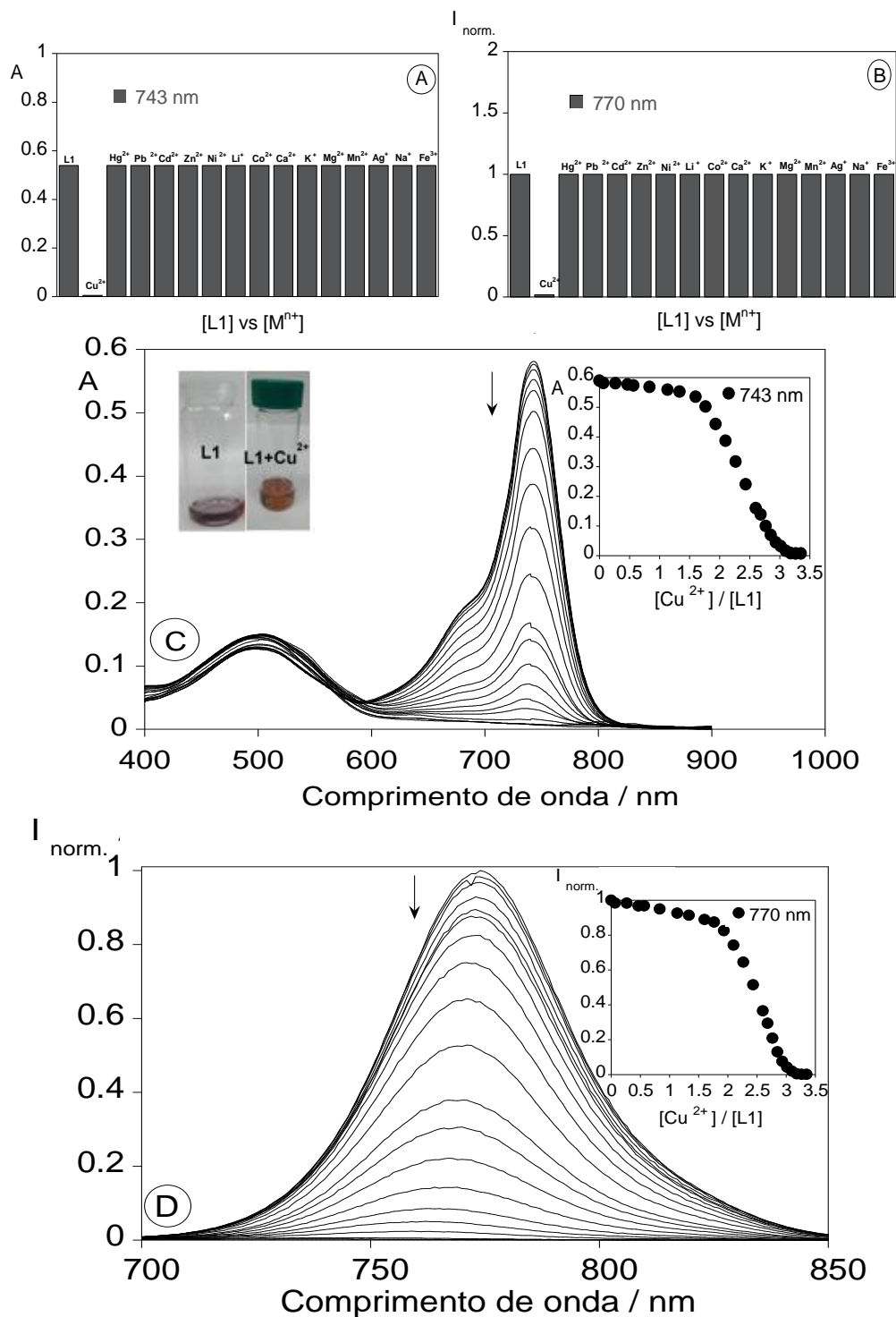
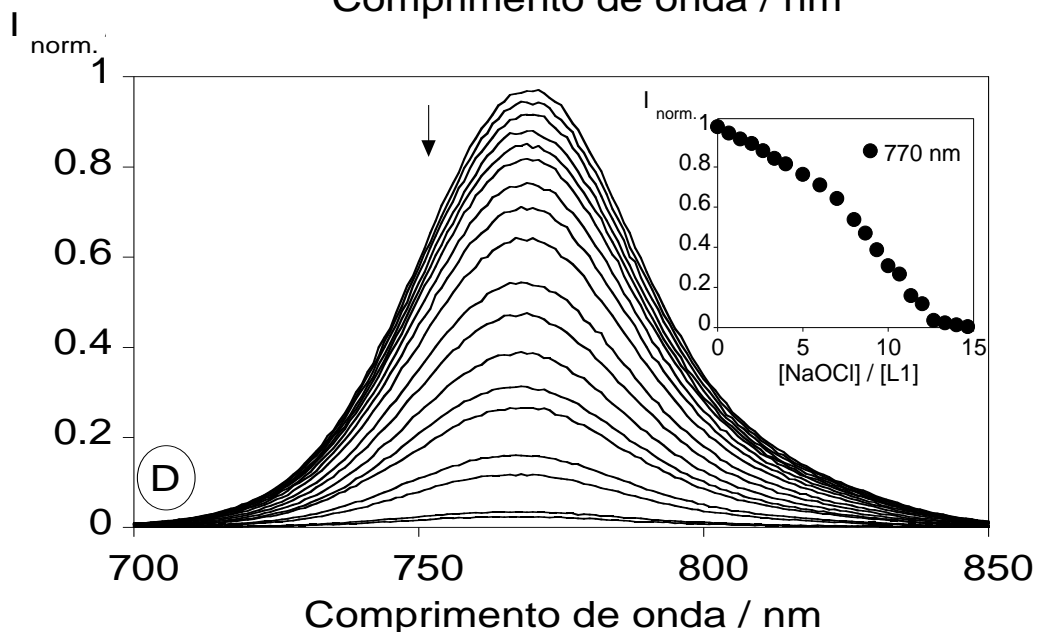
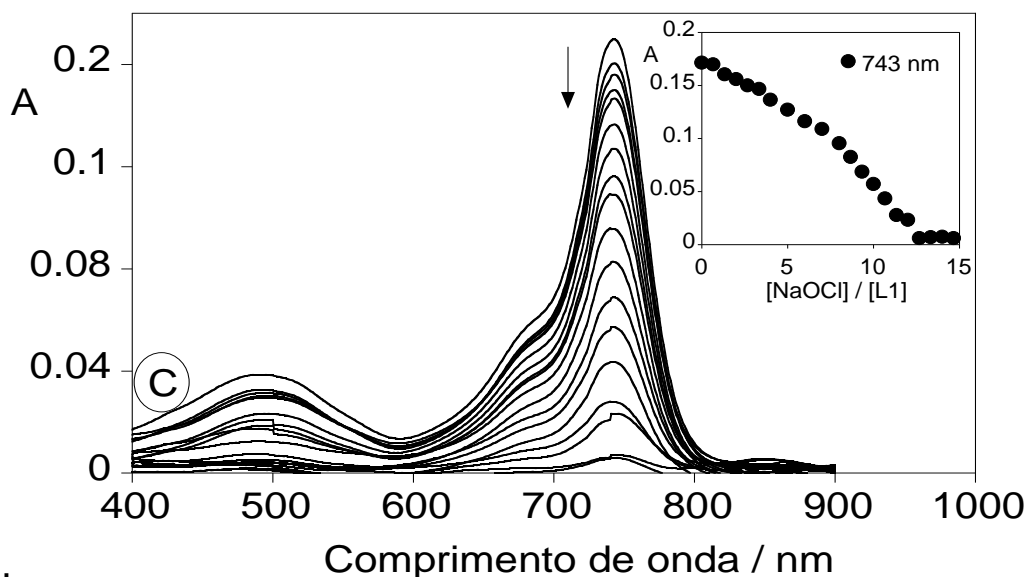
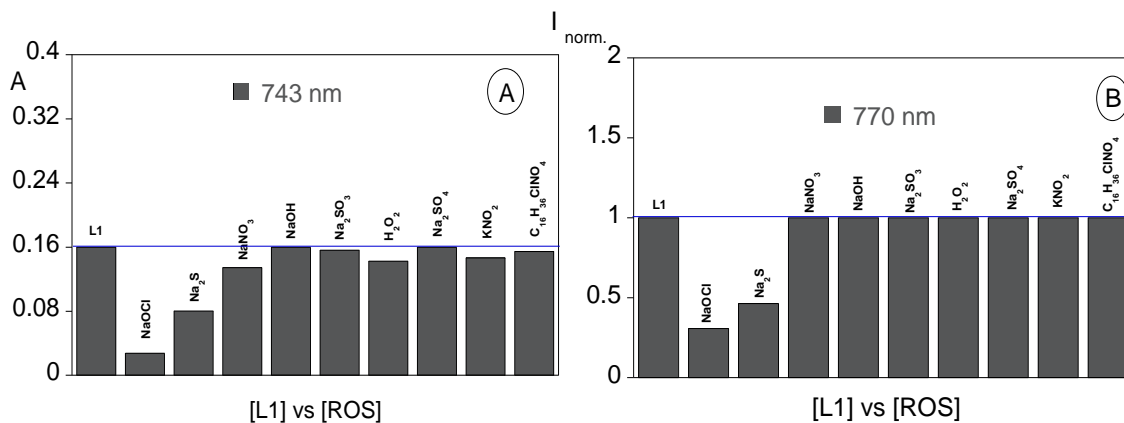


Figura 2.5 | Absorção (A) e emissão (B) do composto **L1** (em acetonitrilo) normalizada a 743 nm e 770 nm, respectivamente, após adição de 6 equivalentes de íons metálicos. Títulações espectrofotométricas (C) e espectrofluorimétricas (D) do composto **L1** com o íon metálico Cu^{2+} em acetonitrilo. Inset: Absorção a 743 nm e emissão a 770 nm com a função $[\text{Cu}^{2+}]/[\text{L1}]$. ($T = 298 \text{ K}$, $[\text{L1}] 1.0 \times 10^{-5} \text{ M}$, $\lambda_{\text{exc}} = 680 \text{ nm}$).

Os estudos de interação do composto **L1** com os íons metálicos foram monitorizados por absorção Uv-Vis e por emissão de fluorescência. As grandes alterações foram observadas no estado excitado (emissão), onde se pode observar o efeito CHEQ na presença do íon metálico Cu^{2+} (ver figura 2.5.). Nos estudos de interação do composto **L1** com os restantes íons metálicos, não se observou qualquer alteração, tanto nos espectros de absorvância como nos espectros de emissão de fluorescência. Nas titulações espectrofotométricas e espectrofluorimétricas do composto **L1** com a adição de vários metais, apenas o íon Cu^{2+} teve efeitos significativos tanto no estado fundamental como no estado excitado. No espectro de absorção verifica-se uma diminuição da absorvância a 743 nm. No espectro de emissão é possível observar o efeito CHEQ a 770 nm. Portanto, a diminuição da intensidade de emissão indica que existe interação entre o composto **L1** e o íon metálico Cu^{2+} . A interação entre o composto **L1** e o íon metálico Cu^{2+} terá acontecido através dos pares de eletrões dos azotos presentes na molécula. A cor roxa escura do composto **L1** após a titulação com o íon Cu^{2+} transformou-se em vermelha, sendo indicativo do envolvimento da molécula pelos pares eletrónicos dos azotos. Com este estudo de interação de íons metálicos com o composto **L1** observa-se que este é seletivo para o Cu^{2+} . Através das constantes de associação verifica-se a estequiometria de 2:1 ligando-metal, com o valor de $\log \beta = 8,29 \pm 0,01$. As constantes de interação foram calculadas através do programa *HypSpec* [62].

2.2.4. Estudos de interação de L1 com ROS/aniões/AOR

O composto **L1** foi estudado em acetonitrilo, com a adição de pequenas quantidades de ROS, aniões, agentes oxidantes e redutores (AOR) (10^{-2} M), tais como, NaNO_3 , NaOCl , NaOH , Na_2SO_3 , H_2O_2 , Na_2S , Na_2SO_4 , KNO_2 , e $\text{C}_{16}\text{H}_{36}\text{ClNO}_4$ em água mili-Q (ver Figura 2.6.).



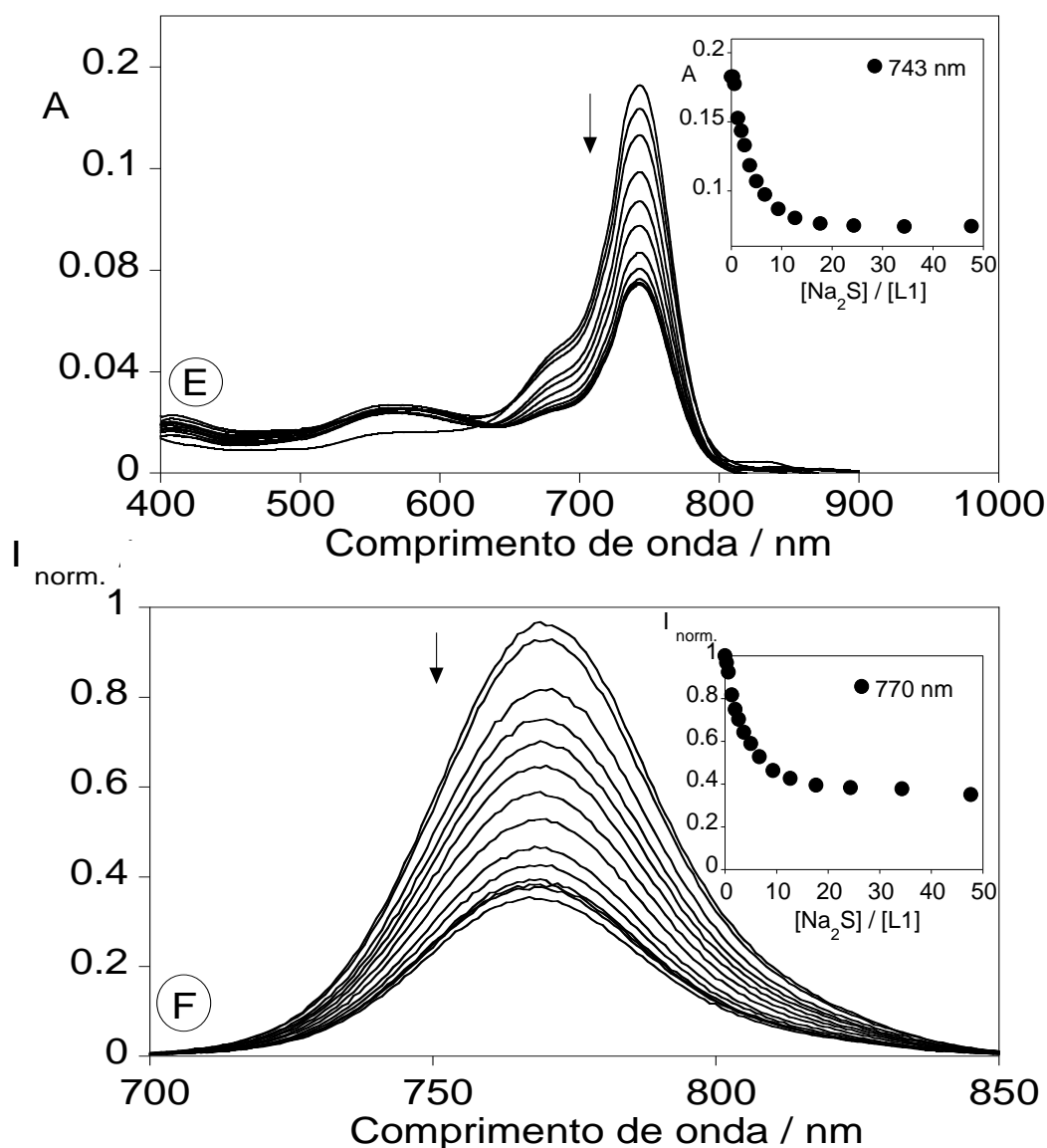


Figura 2.6 | Absorção (A) e emissão (B) do composto L1 (em acetonitrilo) normalizada a 743 nm e 770 nm, respectivamente, após adição de 10 equivalentes de ROS/aniões em água mili-Q. Titulações espectrofotométricas (C) e espectralfluorimétricas (D) do composto L1 em acetonitrilo com adição de NaOCl em água mili-Q. Inset: Absorção a 743 nm e emissão a 770 nm com a função $[NaOCl]/[L1]$. Titulações espectrofotométricas (E) e espectralfluorimétricas (F) do composto L1 em acetonitrilo com adição de Na_2S em água mili-Q. Inset: Absorção a 743 nm e emissão a 770 nm com a função $[Na_2S]/[L1]$. ($T = 298\text{ K}$, $[L1] = 1.0 \times 10^{-5}\text{ M}$, $\lambda_{exc} = 680\text{ nm}$).

Os estudos de interação do composto L1 com as espécies ROS/aniões/AOR, foram feitos por absorção Uv-Vis e por emissão de fluorescência. As grandes alterações foram observadas no estado excitado (emissão), onde se pode observar o efeito CHEQ na presença de NaOCl e Na_2S (ver figura 2.6.). No que diz respeito, aos estudos de interação do composto L1 com as restantes espécies, não se observou qualquer alteração, tanto nos espectros de absorvância como nos espectros de emissão de fluorescência. Nas titulações espectrofotométricas e espectralfluorimétricas do composto L1 com a adição de várias espécies, apenas o NaOCl e Na_2S tiveram efeitos

similares tanto no estado fundamental como no estado excitado. No espectro de absorção verifica-se uma diminuição da absorvância a 743 nm. No espectro de emissão é possível observar o efeito CHEQ a 770 nm. O efeito CHEQ é observado com maior notabilidade na titulação com NaOCl do que com Na₂S. A interação entre as espécies NaOCl e Na₂S com o composto **L1**, provoca a oxidação/redução do composto. Esta oxidação/redução poderá acontecer através dos átomos de azoto [63]. No entanto, para confirmar esta afirmação é necessário efetuar um estudo por RMN de modo a conferir em que local da molécula está a ocorrer a oxidação/redução. O estudo por MALDI-TOF também dará informação sobre a mudança do peso molecular do composto.

2.2.5. Estudos de competição de L1 com iões metálicos e ROS/aniões/agentes oxidantes e redutores (AOR).

Os estudos de competição do composto **L1** com os iões metálicos e com as espécies ROS/aniões/AOR, tiveram como objetivo testar e provar se existia alterações na interação do composto, quando no meio existia duas espécies de iões metálicos e/ou ROS/aniões/AOR.

Na primeira abordagem, foram medidos os espectros de absorção de Uv-Vis e de emissão de fluorescência de todos os iões metálicos e verificou-se que, o ião Cu²⁺ era o único metal que interagiu com o composto **L1**. Após a adição dos restantes metais (Hg²⁺, Pb²⁺, Cd²⁺, Zn²⁺, Ni²⁺, Li⁺, Co²⁺, Ca²⁺, K⁺, Mg²⁺, Mn²⁺, Ag⁺, Na⁺) observou-se que o composto **L1** era apenas seletivo para o Cu²⁺ (ver anexo II).

No segundo caso, as espécies ROS/aniões/ AOR quando tituladas com o composto **L1**, apenas as espécies NaOCl e Na₂S interagiram com o mesmo. Após a obtenção do sistema NaOCl@**L1**, foram tituladas as espécies ROS/aniões/AOR neste sistema e não se observou qualquer alteração. Quanto ao sistema Na₂S@**L1**, após serem adicionadas as espécies ROS/aniões/AOR também não se observou qualquer efeito considerável (ver anexo II).

Por último, foram feitos os estudos de competição entre o ião metálico Cu²⁺ e as espécies NaOCl e Na₂S com o composto **L1**. Aqui, pode-se concluir que em qualquer um dos sistemas não se observou nenhuma alteração considerável.

2.3. Conclusões

Neste capítulo, conclui-se que a síntese do composto **L1** foi realizada com sucesso. Após a obtenção do composto **L1**, foi estudada a caracterização fotofísica deste onde se pôde concluir que como era esperado absorve na região do infravermelho próximo (ca. > 700 nm). Realizou-se o estudo do comportamento solvatocrômico do composto **L1** e concluiu-se que este apresenta um solvatocromismo positivo, ainda que muito ténue.

Foram efetuadas várias titulações com iões metálicos tendo como ligando o composto **L1**, poder-se-á concluir que este composto interatua preferencialmente com o Cu^{2+} . O ião metálico Cu^{2+} quando interatua com o composto **L1** apresenta uma coloração vermelha, sendo considerado assim o composto **L1** seletivo e colorimétrico para o Cu^{2+} .

O ligando **L1** foi estudado através de várias titulações com ROS/aniões/AOR, sendo que neste estudo, poder-se-á concluir que este composto interatua apenas com NaOCl e Na_2S . Com estas titulações é possível concluir que o composto **L1** reage às espécies NaOCl e Na_2S .

Por fim, foram feitos estudos de competição entre vários iões metálicos e espécies reativas de oxigénio, aniões e agentes oxidantes e redutores, onde não se observou qualquer alteração. No caso do ião Cu^{2+} quando interage com o composto **L1**, e após adição de outros iões metálicos concluiu-se que o composto **L1** é seletivo para o ião metálico Cu^{2+} . No caso da interação das espécies ROS/aniões/AOR com o composto **L1**, concluiu-se que após interação com a molécula, a adição das restantes espécies não origina nenhum efeito, tanto de oxidação ou redução da molécula.

INTERAÇÃO DO COMPOSTO L1 COM NANOPARTÍCULAS DE PRATA E DE OURO

As nanopartículas de prata e de ouro foram sintetizadas, e caracterizadas por espectroscopia de absorção UV-vis, emissão de fluorescência, DLS (tamanho e potencial zeta) e TEM.

A adição do composto L1 sobre as nanopartículas teve como efeito a agregação do sistema, o que se pode ver pela alteração da cor. É possível também observar a agregação das partículas através das imagens TEM. Os estudos de interação dos analitos Na₂S e NaOCl com o sistema NPs@L1 foi efetuado sem qualquer alteração significativa.

Palavras-chave: Nanopartículas metálicas, síntese, tamanho, potencial zeta, TEM.

3.1. Secção Experimental

3.1.1. Reagentes e materiais de partida

Tetracloroaurato de hidrogénio (99,99%), borohidreto de sódio (99%), nitrato de prata (99%), citrato de sódio tribásico (99%) foram adquiridos da Sigma-Aldrich e Alfa Aesar e utilizados sem purificações adicionais.

Na₂S, NaOCl, foram adquiridos da Fluka e da Alfa Aesar. Todos os reagentes foram usados como adquiridos. Os solventes foram usados sem qualquer destilação ou secagem.

3.1.2. Instrumentação

Os espectros de absorção UV-vis foram adquiridos nos espectrofotómetros JASCO V-650 e V-630.

A distribuição do tamanho da partícula e o potencial zeta foram efetuados com o equipamento *Malvern Zetasizer Helix*, da Sociedade Científica PROTEOMASS, contendo um laser de He-Ne 633 nm (max. 100 mW).

3.1.3. Síntese de nanopartículas de prata e de ouro

A síntese de nanopartículas de ouro e de prata foram feitas seguindo o protocolo já descrito na literatura (anexo III).

3.1.4. Estudos espectrofotométricos

As nanopartículas de prata e de ouro foram preparadas em água e foram feitas as medidas por absorção UV-Vis. O composto **L1** [1.0×10^{-3} M] foi adicionado em pequenas quantidades às nanopartículas de prata e de ouro.

3.2. Resultados e Discussão

As nanopartículas triangulares de prata foram sintetizadas com base no método de Frank [64] e de seguida caracterizadas por espectroscopia de absorção Uv-Vis seguindo a banda plasmónica, e por DLS.

A cor azul e a forma triangular das AgNPs foram confirmadas pela banda plasmónica no espectro de absorção, a 630 nm (ver figura 3.1). O tamanho e o potencial zeta das partículas foram medidos por DLS. Os valores médios do diâmetro hidrodinâmico, PDI (índice de polidispersidade) e potencial zeta foram de 28.4 ± 0.3 nm, 0.49 ± 0.006 e -43.8 ± 2.8 mV, respetivamente (ver tabela 3.1). O valor do PDI indica que as nanopartículas possuem uma distribuição de tamanho muito similar entre elas, pois o valor do PDI encontra-se no intervalo de 0.08 – 0.7. Os valores do PDI e do potencial zeta permitem afirmar que as nanopartículas encontram-se estáveis.

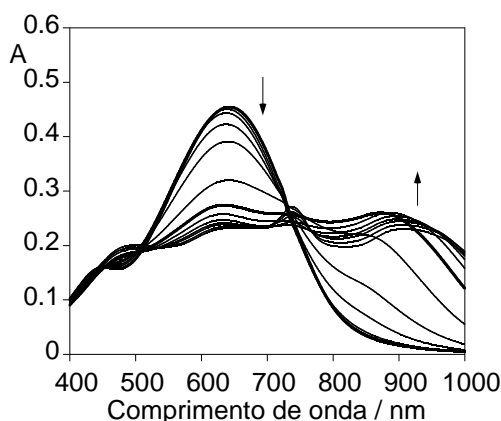


Figura 3.1 | Espectro de absorção das AgNPs com a adição do composto **L1** para formar AgNPs@L1.

A interação das AgNPs com **L1** leva à diminuição da banda plasmónica a 630 nm, e também ao desvio para comprimentos de onda mais altos (880–970 nm). Com o aumento da quantidade de **L1**, a primeira banda torna-se mais fraca, enquanto ocorre o aparecimento de uma nova banda a comprimentos de onda mais altos, porque o espaço entre partículas diminui.

Depois da adição de **L1**, foi verificada a desestabilização do sistema e agregação das AgNPs através da inversão do valor do potencial zeta $\zeta_0 \approx 2.8$ mV. Nas figuras 3.2 A e B observa-se a mudança de cor de azul para cinzento.

Depois da adição de Na_2S ao sistema AgNPs@L1, o valor do potencial zeta ($\zeta_0 \approx -39.8$ mV) inverteu novamente para valores negativos, o que confirma a estabilização do sistema. O Na_2S quando é adicionado, vai reduzir as nanopartículas triangulares de prata acabando por transformar as nanopartículas triangulares em nanopartículas esféricas [65] [66]. Tendo em conta que Javier e seus colaboradores reportaram que a banda plasmônica das nanopartículas de prata esféricas é de cerca de 400 nm e a cor é amarela, assim a cor amarela do sistema AgNPs@L1 com a adição de Na_2S confirma que as nanopartículas triangulares de prata se transformaram em esféricas [67]. Com adição de NaOCl ao sistema AgNPs@L1, não se verificaram alterações significativas, permanecendo a cor final igual à do sistema AgNPs@L1.

Tabela 3.1 | Tamanho e potencial zeta das nanopartículas de prata e de ouro com **L1** e ROS.

Composto	d (nm)	Z (mV)
AgNPs triangulares	28.4 ± 0.3	- 43.8 ± 2.8
AgNPs@L1	1024.7 ± 46.0	2.8 ± 0.1
AgNPs@L1 e NaOCl	973.6 ± 280.4	- 3.9 ± 0.2
AgNPs@L1 e Na₂S	788.4 ± 13.2	- 39.8 ± 1.6
AuNPs esféricas	27.3 ± 0.5	- 40.1 ± 4.5
AuNPs@L1	830.4 ± 281.5	5.7 ± 0.9
AuNPs@L1 e NaOCl	1029.2 ± 182.7	- 30.6 ± 0.5
AuNPs@L1 e Na₂S	960.9 ± 247.4	- 24.2 ± 5.4

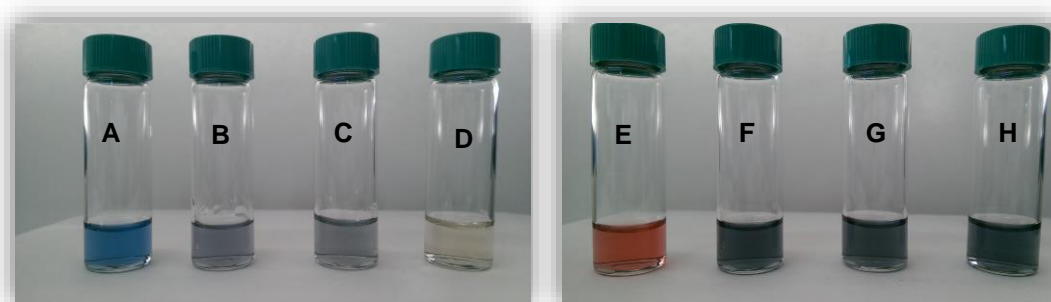


Figura 3.2 | Tamanho e potencial zeta das nanopartículas de prata e de ouro com **L1** e NaOCl e Na_2S numa solução aquosa. (A) AgNPs triangulares. (B) AgNPs@L1. (C) AgNPs@L1 e NaOCl. (D) AgNPs@L1 e Na_2S . (E) AuNPs esféricas. (F) AuNPs@L1. (G) AuNPs@L1 e NaOCl. (H) AuNPs@L1 e Na_2S .

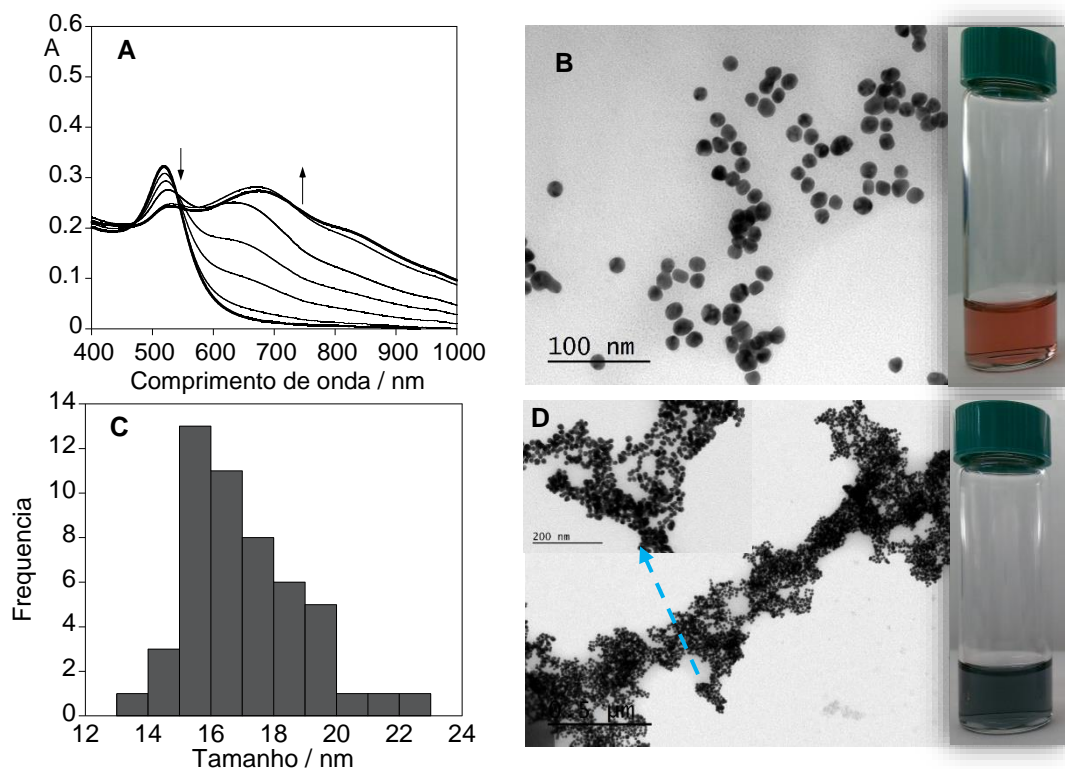


Figura 3.3 | (A) Espectro de absorção das AuNPs com a adição de **L1** para formar AuNPs@**L1**. (B) Imagem TEM e cor das AuNPs. (C) Diagrama de distribuição de tamanhos de AuNPs. (D) Agregação do sistema AuNPs@**L1**.

As nanopartículas de ouro funcionalizadas com citrato (AuNPs) foram sintetizadas pelo método de Turkevich [68] e de seguida caracterizadas por absorção UV-Vis e DLS. A forma esférica das nanopartículas de ouro e a cor vermelha foram confirmadas através do espectro de absorção, demonstrando a banda plasmónica a 520 nm, e também por microscopia de transmissão eletrónica (ver figura 3.3 (A) e (B)).

O tamanho e o potencial zeta das nanopartículas foram medidos por DLS. Os valores médios do diâmetro hidrodinâmico, PDI e do potencial zeta foram de 27.3 ± 0.5 nm, 0.30 ± 0.03 e -40.1 ± 4.5 mV, respetivamente (ver tabela 3.1). O valor do PDI indica que as nanopartículas possuem uma distribuição de tamanho muito similar entre elas, pois o valor do PDI encontra-se no intervalo de 0.08 – 0.7. Os valores do PDI e do potencial zeta permitem afirmar que as nanopartículas encontram-se estáveis.

A interação das AuNPs com **L1** leva à diminuição da banda plasmónica a 520 nm, e também ao desvio para comprimentos de onda mais altos (630–710 nm), o qual resulta no acoplamento plasmónico das nanopartículas agregadas. Com o aumento da quantidade de **L1**, a primeira banda torna-se mais fraca, enquanto ocorre o aparecimento de uma nova banda a comprimentos de onda mais altos, porque o espaço entre partículas diminui. A alteração espectral está associada à agregação progressiva das AuNPs que também é possível observar na imagem de TEM

(Figura 3.3. (B) e (D)). Consequentemente, o número de nanopartículas desagregadas diminuiu progressivamente, levando à diminuição da absorção da banda a 520 nm. As nanopartículas são eletrostaticamente estáveis, porque o potencial zeta das AuNPs é $\zeta_0 \approx -40.1$ mV, evitando assim a agregação devido às forças repulsivas entre os íons de citrato carregados negativamente [69]. Depois da adição de **L1**, foi verificada a desestabilização do sistema e agregação das AuNPs através da inversão do valor do potencial zeta $\zeta_0 \approx 5.7$ mV. Como resultado, verificou-se a agregação das nanopartículas de ouro com o composto **L1**. Na figura 3.2 (E) e (F) observa-se a mudança de cor de vermelho para cinzento escuro.

Depois da adição de NaOCl ao sistema AuNPs@**L1**, o valor do potencial zeta ($\zeta_0 \approx -30.6$ mV) inverteu novamente para valores negativos. A adição de Na₂S ao sistema AuNPs@**L1**, demonstrou o mesmo comportamento que com o NaOCl. A adição de Na₂S e NaOCl não produziu mudanças significativas no sistema.

3.3. Conclusões

Neste capítulo pode-se concluir que relativamente às nanopartículas de prata triangulares quando agregadas ao composto **L1** e após adição do agente redutor, Na₂S, as AgNPs@**L1** triangulares (cor cinzenta clara) transformam-se em esféricas (cor amarela) concluindo que esta mudança de cor deve-se à destruição das arestas dos triângulos das AgNPs.

No que diz respeito às nanopartículas esféricas de ouro, estas por sua vez quando tituladas com o composto **L1**, formam agregados, ficando o composto **L1** na superfície da nanopartícula. Já com a adição dos agentes oxidantes e redutores, não se verifica qualquer alteração no sistema AuNPs@**L1**.

INTERAÇÃO DOS COMPOSTOS L2 E L3 COM ESPÉCIES ROS/ANIÕES/AOR

Neste capítulo, foram utilizados dois compostos, um derivado de violeta de cresilo e outro do azul do nilo conjugados vitamina B₆, **L2** e **L3**. O método de síntese foi descrito anteriormente na literatura em [54].

Nesta secção, foi estudado a interação das espécies reativas de oxigénio/aniões/AOR com os compostos **L2** e **L3** por absorção Uv-Vis e emissão de fluorescência com o fim de explorar a sua capacidade sensorial.

Palavras-chave: Vitamina B₆, composto **L2**, composto **L3**, ROS, aniões, agentes oxidantes e redutores (AOR).

4.1. Secção experimental

4.1.1. Reagentes e materiais de partida

Os compostos **L2** e **L3** foram fornecidos pelo grupo de investigação Bioscope. Os reagentes e materiais de partida utilizados para a obtenção dos compostos **L2** e **L3** encontram-se referidos em [54].

Na₂S, NaOCl, NaNO₃, NaOH, Na₂SO₃, H₂O₂, Na₂SO₄, KNO₂ e C₁₆H₃₆ClNO₄ foram adquiridos da Fluka, Sigma-Aldrich, Alfa Aesar, Panreac e Riedel-de-Häen. Todos os reagentes foram usados como fornecidos. Os solventes foram obtidos da Panreac e da Riedel-de-Häen e foram utilizados como recebidos e sem qualquer destilação ou secagem.

4.1.2. Instrumentação

Os espectros de absorção Uv-Vis foram adquiridos nos espectrofotómetros *JASCO V-650* e *V-630* e os espectros de emissão de fluorescência foram no espectrofluorímetro *HORIBA-JOBIN-YVON Fluoromax-4*.

4.1.3. Estudos espectrofotométricos e espectrofluorimétricos de L2 e L3

As caracterizações e titulações espectroscópicas foram realizadas da seguinte forma: as soluções stock dos compostos **L2** e **L3** (10^{-3} M) foram preparadas em acetonitrilo em frascos de 10 mL. As soluções stock dos compostos foram diluídas para uma concentração de 10^{-5} M, sendo esta a concentração utilizada nas titulações. As titulações dos compostos **L2** e **L3** foram realizadas pela adição crescente em microlitros das soluções de ROS/aniões/AOR (10^{-2} M) em água mili-Q. A correção para a luz absorvida foi realizada quando necessária.

ROS, aniões, agentes oxidantes e redutores (AOR): NaNO_3 , NaOH , $\text{C}_{16}\text{H}_{36}\text{ClNO}_4$, Na_2SO_4 , NaOCl , H_2O_2 , KNO_2 , e Na_2SO_3 , Na_2S .

4.2. Resultados e Discussão

4.2.1. Estudos fotofísicos do composto L2

Neste capítulo foi realizada a caracterização fotofísica do composto **L2** por absorção UV-Vis e emissão de fluorescência, obtendo as bandas a 585 nm e 616 nm respectivamente (ver figura 4.1), o que está de acordo com o artigo publicado [54], o que nos indica que se está na presença do composto sintetizado.

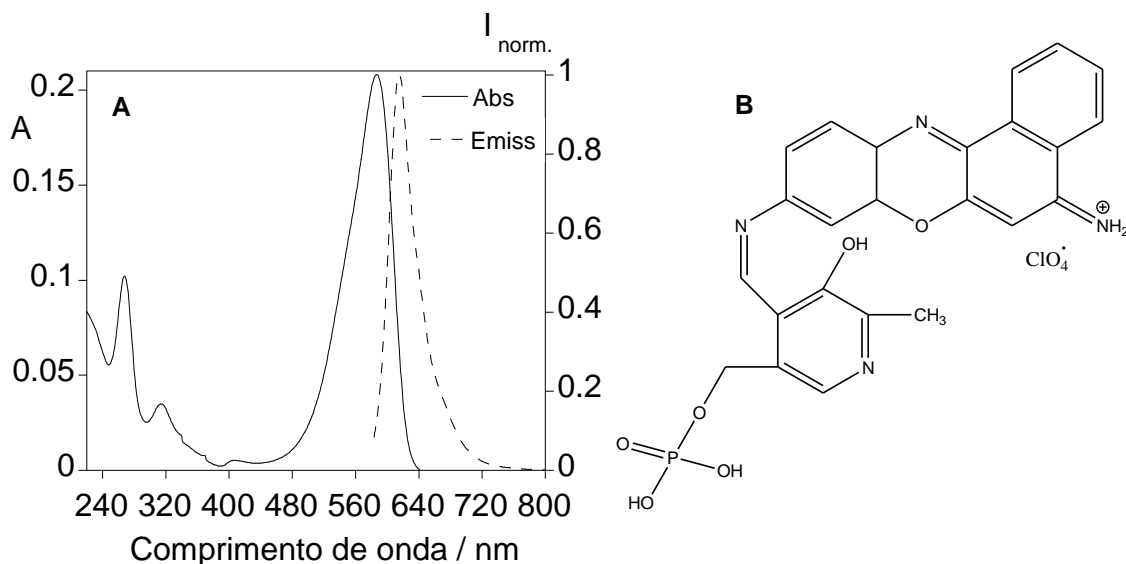


Figura 4.1 | (A) Espectros de absorção e emissão de **L2** em acetonitrilo, $\lambda_{\text{exc}}=585$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 616$ nm, $T=298$ K, $[\text{L2}] = 1.0 \times 10^{-5}$ M. (B) Ilustração esquemática da estrutura química do composto **L2**.

O composto **L2** foi estudado em acetonitrilo, na presença de pequenas quantidades de ROS/aniões/AOR (10^{-2} M), tais como, NaNO_3 , NaOCl , NaOH , Na_2SO_3 , H_2O_2 , Na_2S , Na_2SO_4 , KNO_2 , e $\text{C}_{16}\text{H}_{36}\text{ClNO}_4$ em água mili-Q (ver figura 4.2 (A) e (B)).

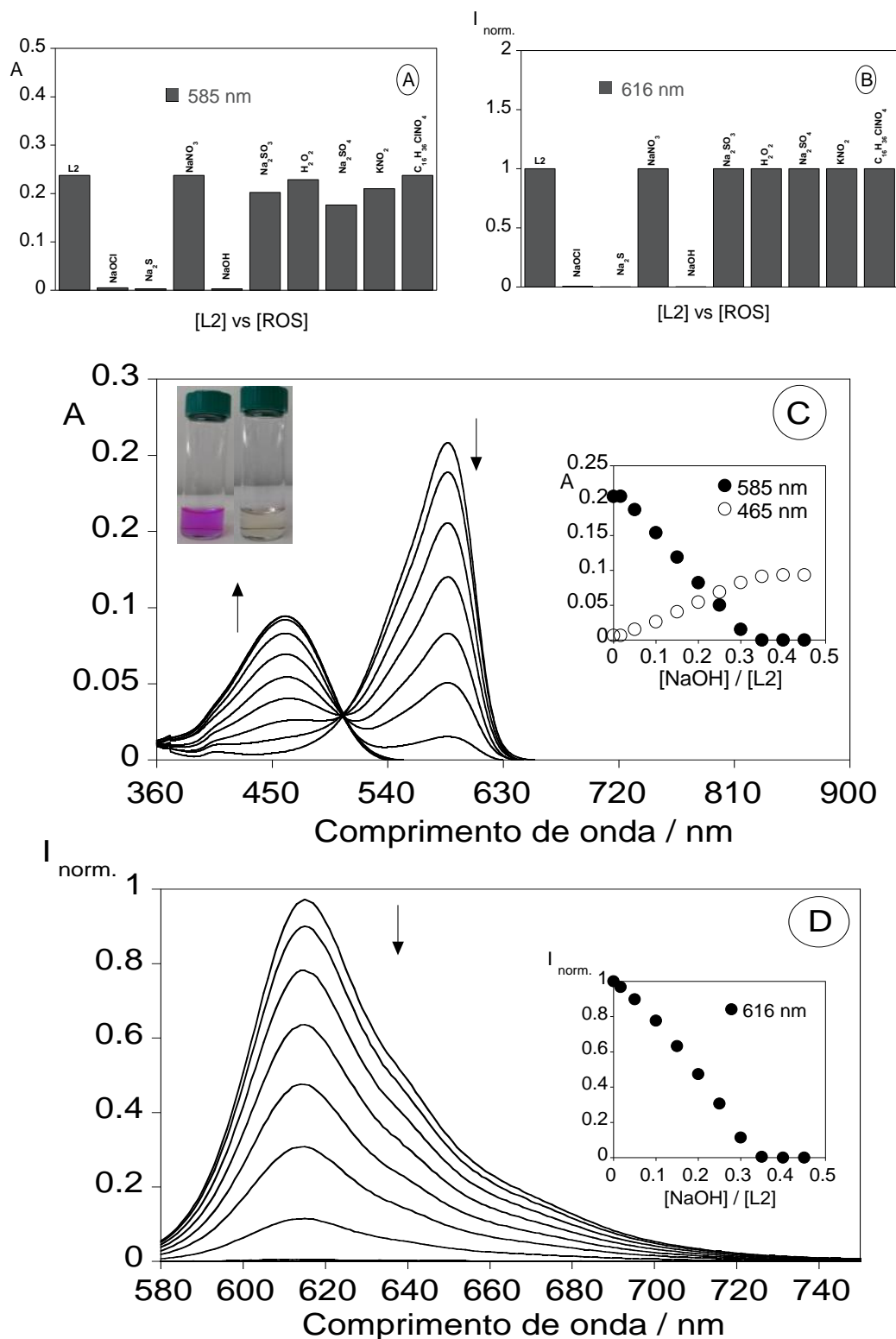


Figura 4.2 | Absorção (A) e emissão (B) normalizadas a 585 nm e 616 nm, respectivamente do composto **L2** em acetonitrilo, após adição de 10 equivalentes de ROS em água mili-Q. Titulação espectrofotométrica (C) e espectrofluorimétrica (D) de **L2** em acetonitrilo com a adição de NaOH em água mili-Q. Inset: Absorção a 585 nm e 465 nm com a função de $[\text{NaOH}]/[\text{L2}]$ (C), (T = 298 K, $[\text{L2}] = 1.0 \times 10^{-5}$ M, $\lambda_{\text{exc}} = 585$ nm).

Os estudos de interação foram feitos por absorção UV-Vis e por emissão de fluorescência. As grandes alterações foram observadas no estado excitado (emissão), onde é possível observar um efeito CHEQ, diminuição da intensidade de emissão, na presença de NaOH, NaOCl e Na₂S (ver figura 4.2. (B)).

Nas titulações espectrofotométricas e espectralfluorimétricas de **L2**, verificou-se que apenas o NaOH, NaOCl e Na₂S (as titulações com NaOCl e Na₂S encontram-se em anexo IV) produziram efeitos similares no estado excitado e no estado fundamental, com o aparecimento de uma nova banda a 465 nm e com a diminuição da banda a 585 nm na absorção (ver figura 4.2 (C)). No espectro de emissão observou-se um efeito CHEQ a 616 nm, portanto, a diminuição da intensidade de emissão indica que existe uma interação entre o composto **L2** e as espécies NaOH, NaOCl e Na₂S (ver figura 4.2 (D)). David Kreller e os seus colaboradores, estudaram a oxidação-redução do violeta de cresilo com uma amina, onde estes reproduziram espectros semelhantes ao do composto **L2** com as espécies aqui estudadas [70], podendo assim concluir-se que se está perante uma reação de oxidação-redução ou um equilíbrio ácido-base do composto **L2**. A cor do composto **L2** era violeta, no entanto, aquando da adição das espécies NaOH, NaOCl e Na₂S a cor da solução mudou para amarelo (ver figura 4.2 (C)).

4.2.2. Estudos fotofísicos do composto L3

Neste capítulo foi realizada a caracterização fotofísica do composto **L3** por absorção Uv-Vis e emissão de fluorescência, obtendo as bandas a 632 nm e 662 nm respetivamente (ver figura 4.3), que está de acordo com o artigo publicado [54], o que nos indica que se está na presença do composto sintetizado.

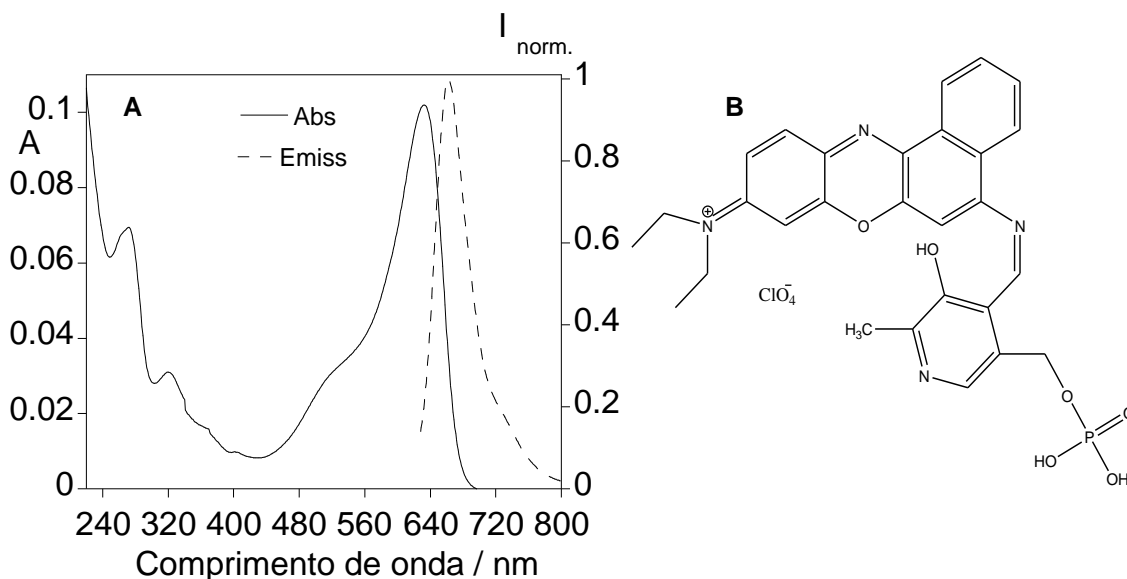


Figura 4.3 | (A) Espectros de absorção e emissão de **L3** em acetonitrilo, $\lambda_{exc}=632$ nm, $\lambda_{em} = 662$ nm, T=298 K, $[L3] = 1.0 \times 10^{-5}$ M. (B) Ilustração esquemática da estrutura química do composto **L3**.

O composto **L3** foi estudado em acetonitrilo, com a adição de pequenas quantidades de ROS/aniões/AOR (10^{-2} M), tais como, NaNO_3 , NaOCl , NaOH , Na_2SO_3 , H_2O_2 , Na_2S , Na_2SO_4 , KNO_2 , e $\text{C}_{16}\text{H}_{36}\text{ClNO}_4$ em água mili-Q (ver figura 4.4 (A) e (B)).

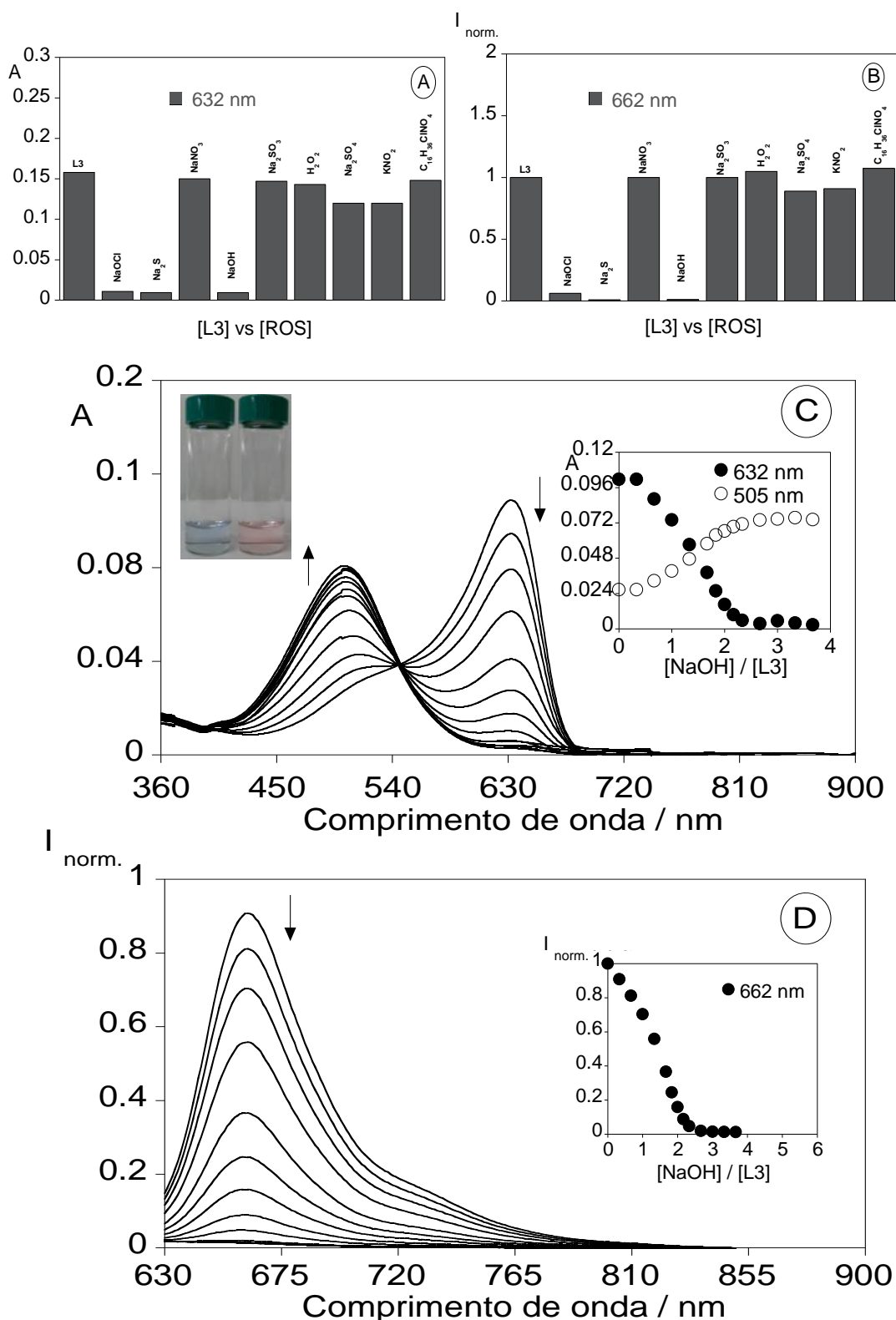


Figura 4.4 | Absorção (A) e emissão (B) normalizadas a 632 nm e 662 nm, respectivamente do composto **L3** em acetonitrilo, após adição de 10 equivalentes de ROS em água mili-Q. Titulação espectrofotométrica (C) e espectralfluorimétrica (D) de **L3** em acetonitrilo com a adição de NaOH em água mili-Q. Inset: Absorção a 632 nm e 505 nm com a função de $[\text{NaOH}]/[\text{L3}]$. Inset: Emissão a 662 nm com a função de $[\text{NaOH}]/[\text{L3}]$. ($T = 298$ K, $[\text{L3}] = 1.0 \times 10^{-5}$ M, $\lambda_{\text{exc}} = 632$ nm).

Os estudos de interação foram feitos por absorção UV-Vis e por emissão de fluorescência. As grandes alterações foram observadas no estado excitado (emissão), onde é possível observar um efeito CHEQ, diminuição da intensidade de emissão, na presença de NaOH, NaOCl e Na₂S (ver figura 4.4. (B)).

Nas titulações espectrofotométricas e espectralfluorimétricas de **L3**, verificou-se que apenas o NaOH, NaOCl e Na₂S (as titulações com NaOCl e Na₂S encontram-se em anexo IV) produziram efeitos similares no estado excitado e no estado fundamental, com o aparecimento de uma nova banda a 505 nm e com a diminuição da banda a 632 nm na absorção (ver figura 4.4 (C)). No espectro de emissão observou-se um efeito CHEQ a 662 nm, portanto, a diminuição da intensidade de emissão indica que existe uma interação entre o composto **L3** e as espécies NaOH, NaOCl e Na₂S (ver figura 4.4 (D)). David Kreller e os seus colaboradores, estudaram a oxidação-redução do violeta de cresilo com uma amina, no entanto, apesar do composto **L3** ser constituído pelo azul do nilo, este reproduziu espectros semelhantes ao do artigo publicado [70], o que pode indicar que se observa uma oxidação-redução ou um equilíbrio ácido-base do composto **L3**. A cor do composto **L3** era azul, no entanto, aquando da adição das espécies NaOH, NaOCl e Na₂S a cor da solução mudou para amarelo (ver figura 4.4 (C)).

4.3. Conclusões

Mediante as várias titulações com as espécies ROS/aniões/AOR para os compostos **L2** e **L3**, poder-se-á concluir que o sistema interatua preferencialmente com as espécies NaOH, NaOCl e Na₂S.

Relativamente ao composto **L2** que apresenta uma cor violeta, quando titulado com as espécies NaOH, NaOCl e Na₂S, a cor da solução torna-se amarela, comprovado pelo aparecimento de uma nova banda no espectro de absorção. A diminuição da intensidade de emissão ajuda também a concluir que o composto **L2** interatua preferencialmente com as espécies NaOH, NaOCl e Na₂S. O composto **L3**, obteve o mesmo comportamento que o composto **L2**, pelo facto de interatuar apenas com as espécies NaOH, NaOCl e Na₂S. Analogamente, os espectros de absorção UV-Vis e emissão de fluorescência do composto **L3** comportaram-se de forma igual que com o composto **L2**, para além da cor do composto **L3** ter mudado de azul para amarelo, quando interatou com as espécies NaOH, NaOCl e Na₂S.

As interações existentes entre as espécies NaOH, NaOCl e Na₂S com os compostos **L2** e **L3** permitem concluir que as alterações espectrais se devem a uma reação de oxidação-redução ou um equilíbrio ácido-base. Deste modo é necessário perceber em qual local da estrutura química dos compostos **L2** e **L3** ocorrem estas interações

CONCLUSÕES GERAIS & PERSPETIVAS FUTURAS

Em suma, a síntese do composto derivado da cyanina Cy5, **L1**, foi realizada com sucesso, onde se obteve um rendimento da reação de 74%. Relativamente ao composto **L1**, após ter sido caracterizado, observou-se que este absorve na região do infravermelho próximo, como era esperado. Foram realizados estudos de solvatocromismo deste composto e concluiu-se que este apresenta um solvatocromismo positivo. Os estudos do composto **L1** com os iões metálicos, permitiu concluir que o este é seletivamente colorimétrico com o ião Cu^{2+} . O baixo número de equivalentes necessários de ião metálico, para obter uma supressão total da intensidade de emissão, indica a sensibilidade do sistema pelo ião cobre. Através dos estudos das espécies reativas de oxigénio, aniões e agentes oxidantes e redutores (AOR), pode se concluir que as espécies NaOCl e Na_2S interagem com o composto **L1**. Futuramente irá ser estudado o mecanismo de oxidação/redução do composto **L1**, para isso será realizado uma titulação por espectroscopia de RMN e também um estudo por MALDI-TOF a fim de verificar a alteração do peso molecular do composto. Os estudos de competição do composto **L1** com os iões metálicos e ROS/aniões/AOR demonstraram que não existem quaisquer alterações no sistema por parte de outros metais quando o composto interage com o ião cobre. O mesmo se sucedeu com as espécies NaOCl e Na_2S .

As nanopartículas metálicas foram funcionalizadas com o composto **L1**, nomeadamente AgNPs triangulares e AuNPs esféricas. O estudo das nanopartículas de prata permitiu concluir que quando tituladas com o composto **L1**, há uma agregação do sistema AgNPs@**L1**. No entanto, quando o sistema é titulado com Na_2S , é possível concluir que este agente redutor, produz uma alteração da cor do nanosistema de cinzento para amarelo. Quanto às AuNPs esféricas, após serem tituladas com o composto **L1**, observou-se através das imagens TEM que estas formavam agregados. Ao contrário das AgNPs triangulares, as AuNPs esféricas não sofreram nenhuma alteração por parte dos agentes oxidantes e redutores. Mediante estes resultados, um dos objetivos futuros passará pela aplicação do sistema AuNPs@**L1** em células cancerígenas (estudos toxicológicos).

No que diz respeito aos compostos **L2** e **L3**, ambos apresentaram ser reativos na presença das espécies NaOH , NaOCl e Na_2S verificando-se alterações espectrais significativas assim como

mudanças de cor de violeta (**L2**) e azul (**L3**) para amarelo, possivelmente devido a uma reação de oxidação-redução ou um equilíbrio ácido-base devido a desprotonação. Com intuito de se compreender o processo envolvido nestes dois compostos (**L2** e **L3**), futuramente irá proceder-se às titulações por espectroscopia de RMN. Outro estudo que também irá ser realizado para confirmar a alteração do peso molecular será pela técnica de MALDI-TOF.

REFERÊNCIAS

- [1] F. M. Eissa and R. S. A. Hameed, *Green Process. Synth.*, pp. 1–13, 2016.
- [2] M. V. Kuperman, S. V. Chernii, M. Y. Losytskyy, D. V. Kryvorotenko, N. O. Derevyanko, Y. L. Slominskii, V. B. Kovalska, and S. M. Yarmoluk, “Trimethine cyanine dyes as fluorescent probes for amyloid fibrils: The effect of N,N'-substituents,” *Anal. Biochem.*, vol. 484, pp. 9–17, 2015.
- [3] E. A. Owens, N. Bruschi, J. G. Tawney, and M. Henary, “A microwave-assisted and environmentally benign approach to the synthesis of near-infrared fluorescent pentamethine cyanine dyes,” *Dye. Pigment.*, vol. 113, pp. 27–37, 2015.
- [4] Y. Yadav, A. Levitz, S. Dharma, R. Aneja, and M. Henary, “Effects of heterocyclic N-alkyl chain length on cancer cell uptake of near infrared heptamethine cyanine dyes,” *Dye. Pigment.*, vol. 145, pp. 307–314, 2017.
- [5] T. L. Dost, M. T. Gressel, and M. Henary, “Synthesis and Optical Properties of Pentamethine Cyanine Dyes With Carboxylic Acid Moieties,” *Analytical Chemistry Insights*, vol. 12, pp. 1–6, 2017.
- [6] M. Mojzych, Mariusz. Henary, “Synthesis of Cyanine Dyes,” *Top Heterocycl Chem*, vol. 14, pp. 1–9, 2008.
- [7] X. Yi, F. Wang, W. Qin, X. Yang, and J. Yuan, “Near-infrared fluorescent probes in cancer imaging and therapy: an emerging field,” *Int. J. Nanomedicine*, vol. 9, pp. 1347–1365, 2014.
- [8] R. B. Mujumdar, L. A. Ernst, S. R. Mujumdar, C. J. Lewis, and A. S. Waggoner, “Cyanine Dye Labeling Reagents: Sulfoindocyanine Succinimidyl Esters,” *Bioconjug. Chem.*, vol. 4, no. 2, pp. 1–6, 1993.
- [9] H. Li, L. Guan, X. Zhang, H. Yu, D. Huang, and M. Sun, “A cyanine-based near-infrared fluorescent probe for highly sensitive and selective detection of hypochlorous acid and bioimaging,” *Talanta*, vol. 161, pp. 592–598, 2016.
- [10] E. A. Owens, H. Hyun, S. H. Kim, J. H. Lee, G. Park, Y. Ashitate, J. Choi, G. H. Hong, S. Alyabyev, S. J. Lee, G. Khang, M. Henary, and H. S. Choi, “Highly charged cyanine fluorophores for trafficking scaffold degradation,” *Biomed. Mater.*, vol. 8, no. 1, p. 14109, 2013.
- [11] B. Xie, M. A. Stammes, P. B. A. A. van Driel, L. J. Cruz, V. T. Knol-Blankevoort, M. A. M. Löwik, L. Mezzanotte, I. Que, A. Chan, J. P. H. M. van den Wijngaard, M. Siebes, S. Gottschalk, D. Razansky, V. Ntziachristos, S. Keereweer, R. W. Horobin, M. Hoehn, E. L. Kaijzel, E. R. van Beek, T. J. A. Snoeks, and C. W. G. M. Löwik, “Necrosis avid near infrared fluorescent cyanines for imaging cell death and their use to monitor therapeutic efficacy in mouse tumor models,” *Oncotarget*, vol. 6, no. 36, pp. 39036–39049, 2015.
- [12] J. Yuan, X. Yi, F. Yan, F. Wang, W. Qin, G. Wu, X. Yang, C. Shao, and L. W. K. Chung, “Nearinfrared fluorescence imaging of prostate cancer using heptamethine carbocyanine dyes,” *Mol. Med. Rep.*, vol. 11, no. 2, pp. 821–828, 2015.

- [13] A. Fei-Fei, K. Harikrishna, C. Nandi, and T. Richard, "A Conjugate of Pentamethine Cyanine and ^{18}F as a Positron Emission Tomography/Near-Infrared Fluorescence Probe for Multimodality Tumor Imaging," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 18, p. 1214, 2017.
- [14] S. Lee, R. G. Thomas, M. J. Moon, H. J. Park, I. Park, B. Lee, and Y. Y. Jeong, "Near-Infrared Heptamethine Cyanine Based Iron Oxide Nanoparticles for Tumor Targeted Multimodal Imaging and Photothermal Therapy", pp. 1–14, 2017.
- [15] A. Yuan, J. Wu, X. Tang, L. Zhao, F. Xu, and Y. Hu, "Application of Near-Infrared Dyes for Tumor Imaging, Photothermal, and Photodynamic Therapies," *J. Pharm. Sci.*, vol. 102, no. 1, pp. 6–28, 2013.
- [16] J. Qian, D. Wang, F. Cai, Q. Zhan, Y. Wang, and S. He, "Photosensitizer encapsulated organically modified silica nanoparticles for direct two-photon photodynamic therapy and In Vivo functional imaging," *Biomaterials*, vol. 33, no. 19, pp. 4851–4860, 2012.
- [17] X.-F. Qiao, J.-C. Zhou, J.-W. Xiao, Y.-F. Wang, L.-D. Sun, and C.-H. Yan, "Triple-functional core–shell structured upconversion luminescent nanoparticles covalently grafted with photosensitizer for luminescent, magnetic resonance imaging and photodynamic therapy in vitro," *Nanoscale*, vol. 4, no. 15, p. 4611, 2012.
- [18] R. Radzi, T. Osaki, T. Tsuka, T. Imagawa, S. Minami, Y. Nakamaya, and Y. Okamoto, "Photodynamic Hyperthermal Therapy with Indocyanine Green (ICG) induces Apoptosis and Cell Cycle Arrest in B16F10 Murine Melanoma Cells," *J. Vet. Med. Sci.*, vol. 74, no. 5, pp. 545–551, 2012.
- [19] G. Shafirstein, W. Bäumlner, L. J. Hennings, E. R. Siegel, R. Friedman, M. A. Moreno, J. Webber, C. Jackson, and R. J. Griffin, "Indocyanine green enhanced near-infrared laser treatment of murine mammary carcinoma," *Int. J. Cancer*, vol. 130, no. 5, pp. 1208–1215, 2012.
- [20] L. Tarazi, "Spectral characterization of a novel near-infrared cyanine dye: a study of its complexation with metal ions," *Talanta*, vol. 46, no. 6, pp. 1413–1424, 1998.
- [21] K. Vijay, C. Nandi, and S. D. Samant, "Synthesis of a dihydroquinoline based fluorescent cyanine for selective, naked eye, and turn off detection of Fe^{3+} ions," *RSC Adv.*, vol. 6, no. 55, pp. 49724–49729, 2016.
- [22] D. Oushiki, H. Kojima, T. Terai, M. Arita, K. Hanaoka, Y. Urano, and T. Nagano, "Development and Application of a Near-Infrared Fluorescence Probe for Oxidative Stress Based on Differential Reactivity of Linked Cyanine Dyes," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 132, no. 8, pp. 2795–2801, 2010.
- [23] Y. Wang, S.-Y. Gwon, Y.-A. Son, and S.-H. Kim, "Spectroscopic Characterization of Heptamethine Cyanine Dyes for the Interaction with the CN^- and F^- ," *Mol. Cryst. Liq. Cryst.*, vol. 566, no. 1, pp. 61–66, 2012.
- [24] M. Mameli, M. C. Aragoni, M. Arca, C. Caltagirone, F. Demartin, G. Farruggia, G. De Filippo, F. a Devillanova, A. Garau, F. Isaia, V. Lippolis, S. Murgia, L. Prodi, A. Pintus, and N. Zaccheroni, "A selective, nontoxic, OFF-ON fluorescent molecular sensor based on 8-hydroxyquinoline for probing Cd^{2+} in living cells.," *Chemistry*, vol. 16, no. 3, pp. 919–30,

- 2010.
- [25] C. Lodeiro, J. L. Capelo, J. C. Mejuto, E. Oliveira, H. M. Santos, B. Pedras, and C. Nuñez, "Light and colour as analytical detection tools: A journey into the periodic table using polyamines to bio-inspired systems as chemosensors," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 39, no. 8, p. 2948, 2010.
- [26] R. G. Pearson, "Hard and Soft Acids and Bases," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 85, no. 3, pp. 3533–3539, 1963.
- [27] Y. Zhao, X.-B. Zhang, Z.-X. Han, L. Qiao, C.-Y. Li, L.-X. Jian, G.-L. Shen, and R.-Q. Yu, "Highly sensitive and selective colorimetric and off-on fluorescent chemosensor for Cu²⁺ in aqueous solution and living cells.," *Anal. Chem.*, vol. 81, no. 16, pp. 7022–30, 2009.
- [28] T.-M. O. Jin-Wu Yan, Shuo-Bin Chen, Hui-Yun Liu, Wen-Jie Ye and L.-Q. G. and Z.-S. H. Jia-Heng Tan, Ding Li, "Development of a new colorimetric and red-emitting fluorescent dual probe for G-quadruplex nucleic acids," *Chem Comm*, vol. 50, pp. 6927–6930, 2014.
- [29] K. Hanaoka, Y. Muramatsu, Y. Urano, T. Terai, and T. Nagano, "Design and Synthesis of a Highly Sensitive Off–On Fluorescent Chemosensor for Zinc Ions Utilizing Internal Charge Transfer," *Chem. –A Eur. J.*, vol. 16, pp. 568–572, 2010.
- [30] W. Li, Y. Guo, K. McGill, and P. Zhang, "A facile synthesis of Ag nanoparticles for mercury ion detection with high sensitivity and selectivity," *New J. Chem.*, vol. 34, p. 1148, 2010.
- [31] I. Hoyle and R. D. Handy, "Dose-dependent inorganic mercury absorption by isolated perfused intestine of rainbow trout , *Oncorhynchus mykiss* , involves both amiloride-sensitive and energy-dependent pathways," *Aquat. Toxicology*, vol. 72, pp. 147–159, 2005.
- [32] W. B. Jensen, "The place of zinc, cadmium, and mercury in the periodic table.," *J. Chem. Educ.*, vol. 80, no. 8, pp. 952–961, 2003.
- [33] K. Kundu, S. F. Knight, N. Willett, S. Lee, W. R. Taylor, and N. Murthy, "Hydrocyanines : A Class of Fluorescent Sensors That Can Image Reactive Oxygen Species in Cell Culture , Tissue , and In Vivo," *Angew. Chem. Int.*, vol. 48, pp. 299–303, 2009.
- [34] Q. Xu, C. H. Heo, G. Kim, H. W. Lee, H. M. Kim, and J. Yoon, "Development of Imidazoline-2-Thiones Based Two-Photon Fluorescence Probes for Imaging Hypochlorite Generation in a Co-Culture System," *Angew. Chem. Int.*, vol. 54, pp. 1–6, 2015.
- [35] K. Nakamura, K. Yube, A. Miyatake, J. C. Cambier, and M. Hirashima, "Involvement of CD4 D3-D4 membrane proximal extracellular domain for the inhibitory effect of oxidative stress on activation-induced CD4 down-regulation and its possible role for T cell activation.," *Mol. Immunol.*, vol. 39, no. 15, pp. 909–21, 2003.
- [36] M. Los, W. Dröge, K. Stricker, P. A. Baeuerle, and K. Schulze-Osthoff, "Hydrogen peroxide as a potent activator of T lymphocyte functions," *Eur. J. Immunol.*, vol. 25, no. 1, pp. 159–165, 1995.
- [37] M. Lu, N. Kang, C. Chen, L. Yang, Y. Li, M. Hong, X. Luo, L. Ren, and X. Wang, "Plasmonic enhancement of cyanine dyes for near-infrared light-triggered photodynamic/photothermal therapy and fluorescent imaging," *Nanotechnology*, vol. 28, no. 44, p. 445710, 2017.
- [38] I. Khan, K. Saeed, and I. Khan, "Nanoparticles : Properties , applications and toxicities,"

Arab. J. Chem., 2017.

- [39] I. S. Lim, F. Goroleski, D. Mott, N. Kariuki, W. Ip, and J. Luo, "Adsorption of Cyanine Dyes on Gold Nanoparticles and Formation of J-Aggregates in the Nanoparticle Assembly," *J. Phys. Chem. B*, vol. 110, no. 13, pp. 6673–6682, 2006.
- [40] A. P. de Silva, H. Q. N. Gunaratne, T. Gunnlaugsson, A. J. M. Huxley, C. P. McCoy, J. T. Rademacher, and T. E. Rice, "Signaling recognition events with fluorescent sensors and switches," *Chem. Rev.*, vol. 97, no. 5, pp. 1515–1566, 1997.
- [41] C. Lodeiro, F. Pina, a. J. Parola, A. Bencini, A. Bianchi, C. Bazzicalupi, S. Ciattini, C. Giorgi, A. Masotti, B. Valtancoli, and J. Seixas de Melo, "Exploring the photocatalytic properties and the long-lifetime chemosensor ability of Cl₂[Ru(Bpy)₂L] (L = 2,5,8,11,14-pentaaza[15]-2,2'-bipyridilophane)," *Inorg. Chem.*, vol. 40, no. 4, pp. 6813–6819, 2001.
- [42] D. Maity and T. Govindaraju, "Highly Selective Colorimetric Chemosensor for Co²⁺," *Inorg. Chem.*, vol. 50, no. 22, pp. 11282–11284, 2011.
- [43] Y. J. Na, Y. W. Choi, G. R. You, and C. Kim, "A novel selective colorimetric chemosensor for cobalt ions in a near perfect aqueous solution," *Sensors Actuators B. Chem.*, vol. 223, pp. 234–240, 2016.
- [44] T. Gunnlaugsson, H. D. P. Ali, M. Glynn, P. E. Kruger, G. M. Hussey, F. M. Pfeffer, C. M. G. dos Santos, and J. Tierney, "Fluorescent Photoinduced Electron Transfer (PET) Sensors for Anions; From Design to Potential Application," *J. Fluoresc.*, vol. 15, no. 3, pp. 287–299, 2005.
- [45] M. Y. Berezin and S. Achilefu, "Fluorescence Lifetime Measurements and Biological Imaging," *Chem. Rev.*, vol. 110, no. 5, pp. 2641–2684, 2010.
- [46] Z. Han, X. Zhang, Z. Li, Y. Gong, X. Wu, Z. Jin, C. He, L. Jian, J. Zhang, G. Shen, and R. Yu, "Letters to Analytical Chemistry Efficient Fluorescence Resonance Energy Transfer-Based Ratiometric Fluorescent Cellular Imaging Probe for Zn²⁺ Using a Rhodamine Spirolactam as a Trigger," *Anal. Chem.*, vol. 82, no. 8, pp. 3108–3113, 2010.
- [47] C. Li, Y. Zhou, Y. Li, C. Zou, and X. Kong, "Chemical Efficient FRET-based colorimetric and ratiometric fluorescent chemosensor for Al³⁺ in living cells," *Sensors Actuators B. Chem.*, vol. 186, pp. 360–366, 2013.
- [48] B. Kaur, N. Kaur, and S. Kumar, "Colorimetric metal ion sensors – A comprehensive review of the years 2011 – 2016," *Coord. Chem. Rev.*, vol. 358, pp. 13–69, 2018.
- [49] K. Rurack, "Flipping the light switch 'ON' - The design of sensor molecules that show cation-induced fluorescence enhancement with heavy and transition metal ions," *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, vol. 57, no. 11, pp. 2161–2195, 2001.
- [50] E. U. Akkaya, M. E. Huston, and A. W. Czarnik, "Chelation-enhanced fluorescence of anthrylazamacrocyclic conjugate probes in aqueous solution," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 112, no. 9, pp. 3590–3593, 1990.
- [51] X. H. D. Y. Jiao, B. C. Zhu, J. H. Chen, "Fluorescent Sensing of Fluoride in Cellular System," *Theranostics*, vol. 5, pp. 173–187, 2015.
- [52] V. Martinez and M. Henary, "Nile Red and Nile Blue : Applications and Syntheses of

- Structural Analogues," *Chem. - A Eur. J.*, vol. 22, pp. 1–20, 2016.
- [53] J. Isak and M. Eyring, "Cresyl violet chemistry and photophysics in various solvents and micelles," *J. Photochem. Photobiol. A*, vol. 64, pp. 343–358, 1992.
- [54] E. Oliveira, C. I. M. Santos, H. M. Santos, and A. Fernández-Lodeiro, "From visible to far-red excitable chromophores derivatives of vitamin B6. evaluation as pH-responsive probes and solvatochromic study," *Dye. Pigment.*, vol. 110, pp. 219–226, 2014.
- [55] D. A. Skoog, J. F. Holler, and S. R. Crouch, *Principles of instrumental analysis*, 6th ed. 2007.
- [56] C. Washington, E. Horwood, *Particle size analysis in pharmaceuticals and other industries : theory and practice*. 1992.
- [57] D. B. Williams, *The transmission electron microscope*, S.S.B. Med. Transmission Electron Microscopy, 1996.
- [58] C. S. Ho, C. W. K. Lam, M. H. M. Chan, R. C. K. Cheung, L. K. Law, L. C. W. Lit, K. F. Ng, M. W. M. Suen, and H. L. Tai, "Electrospray ionisation mass spectrometry: principles and clinical applications.," *Clin. Biochem. Rev.*, vol. 24, no. 1, pp. 3–12, 2003.
- [59] M. J. Kamlet, J. L. M. Abboud, and R. W. Taft, "An Examination of Linear Solvation," *Prog. Phys. Org. Chem.*, vol. 13, pp. 485–630, 1981.
- [60] M. J. K. and R. W. Taft, "Linear Solvation Energy Relationships. Part 3.I Some Reinterpretations of Solvent Effects based on Correlations with Solvent and a Values," *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, vol. 2, pp. 349–356, 1979.
- [61] M. J. Kamlet and R. W. Taft, "The solvatochromic comparison method. I. The .beta.-scale of solvent hydrogen-bond acceptor (HBA) basicities," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 98, pp. 377–383, 1976.
- [62] P. Gans, A. Sabatini, and A. Vacca, "Investigation of equilibria in solution. Determination of equilibrium constants with the HYPERQUAD suite of programs," *Talanta*, vol. 43, no. 10, pp. 1739–1753, 1996.
- [63] T. C. Barros, S. H. Toma, H. E. Toma, E. L. Bastos, and M. S. Baptista, "Polymethine cyanine dyes in β -cyclodextrin solution: Multiple equilibria and chemical oxidation," *J. Phys. Org. Chem.*, vol. 23, no. 10, pp. 893–903, 2010.
- [64] A. J. Frank, N. Cathcart, K. E. Maly, and V. Kitaev, "Synthesis of Silver Nanoprisms with Variable Size and Investigation of Their Optical Properties: A First-Year Undergraduate Experiment Exploring Plasmonic Nanoparticles," *J. Chem. Educ.*, vol. 87, no. 10, pp. 1098–1101, 2010.
- [65] M. J. Mayoral, P. Ovejero, J. Antonio Campo, J. Vicente Heras, E. Oliveira, B. Pedras, C. Lodeiro, and M. Cano, "Exploring photophysical properties of new boron and palladium(II) complexes with b-diketone pyridine type ligands: from liquid crystals to metal fluorescence probes," *J. Mater. Chem.*, vol. 21, no. 4, pp. 1255–1263, 2011.
- [66] L. Soria, M. Cano, J. A. Campo, M. R. Torres, and C. Lodeiro, "Silver compounds based on N,N,N-tridentate pyridylpyrazolate ligands. An opportunity to build cyclic trimetallic and oligomeric luminescent liquid crystals," *Polyhedron*, vol. 125, pp. 141–150, 2017.

- [67] J. Fernandez-lodeiro, C. Nunez, O. Nieto, J. Luis, C. Lodeiro, J. S. Seixas, D. Melo, and C. Silva, "Novel emissive podands based on 8-OH-quinoline : Synthesis , fluorescence materials , DFT and complexation studies," *Inorganica Chim. Acta*, vol. 381, pp. 218–228, 2012.
- [68] J. Turkevich, P. C. Stevenson, and J. Hillier, "A Study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold," *Discuss. Faraday Soc.*, vol. 11, pp. 55–75, 1951.
- [69] A. Fernandez-lodeiro, J. Fernandez-lodeiro, C. Nunez, and R. Bastida, "Polyamine Ligand-Mediated Self-Assembly of Gold and Silver Nanoparticles into Chainlike Structures in Aqueous Solution : Towards New Nanostructured Chemosensors," *Chem. open*, vol. 2, pp. 200–207, 2013.
- [70] D. I. Kreller and P. V. Kamat, "Photochemistry of Sensitizing Dyes. Spectroscopic and Redox Properties of Cresyl Violet," *J. Phys. Chem.*, vol. 95, no. 11, pp. 4406–4410, 1991.

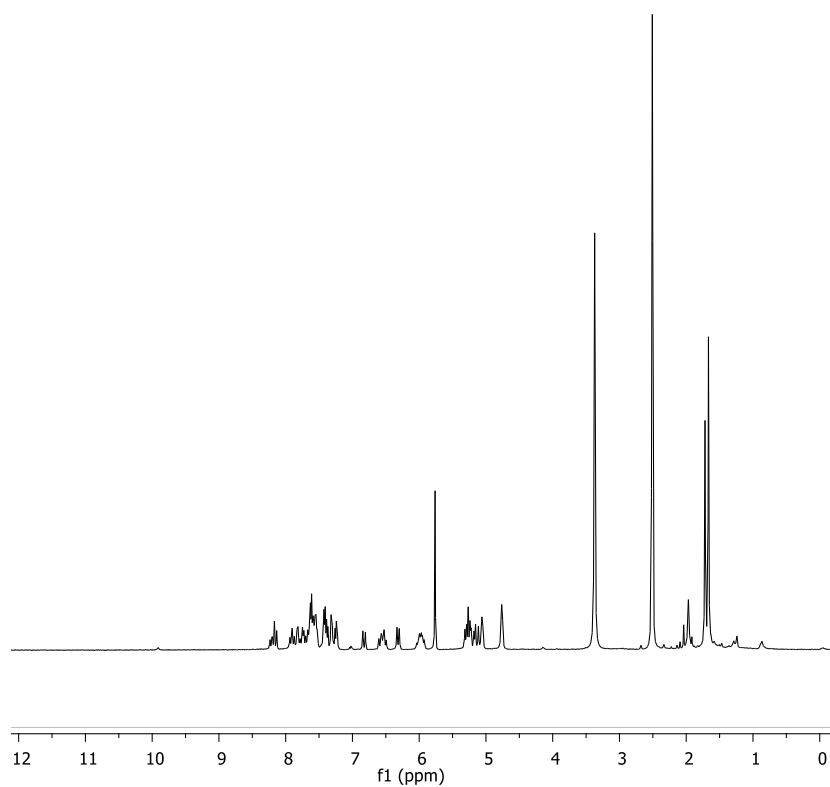


Figura 1 | Espectro de RMN ¹H do composto L1 em DMSO deuterado.

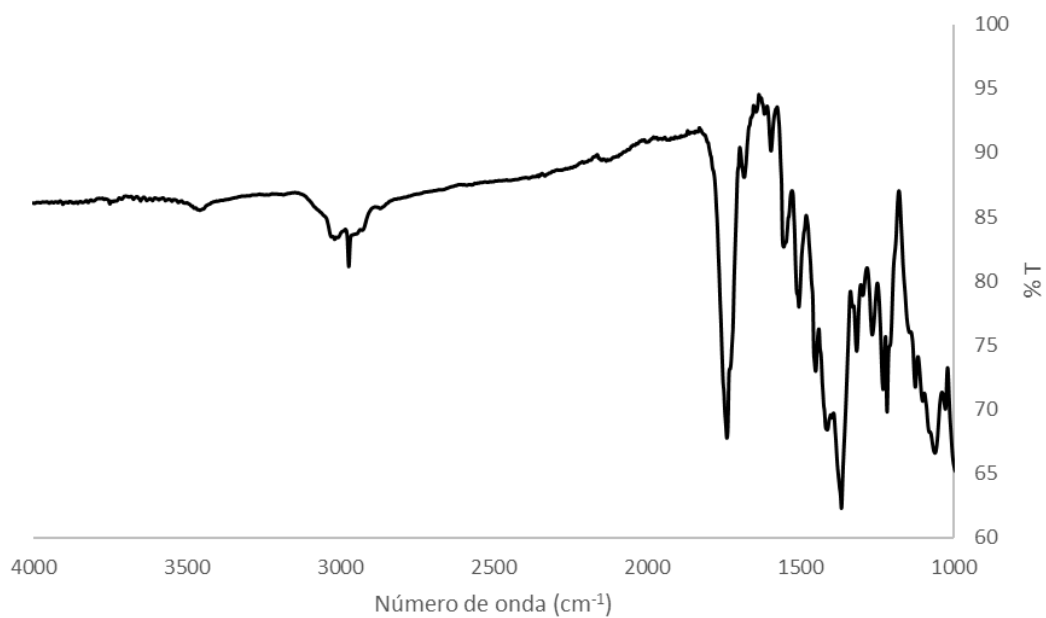


Figura 2 | Espectro de FT-IR do composto L1.

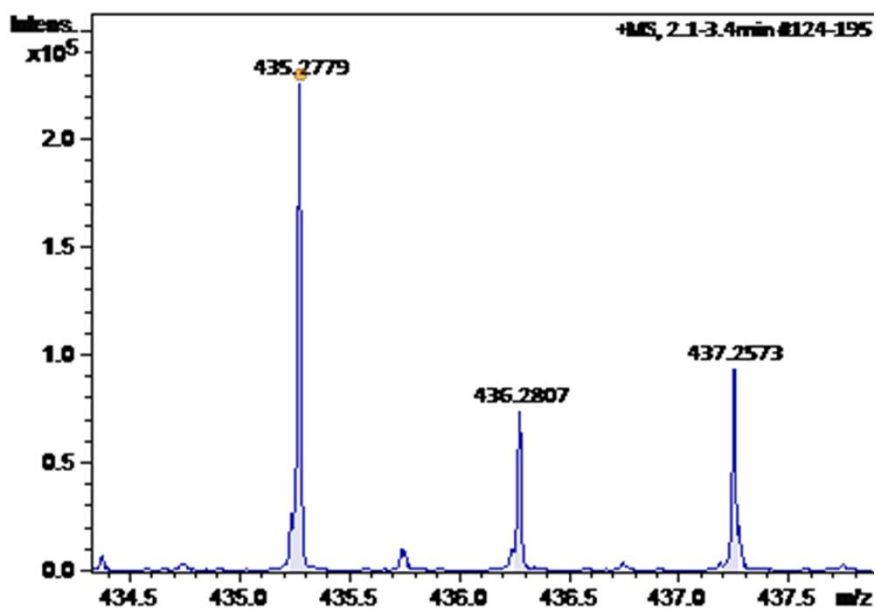


Figura 3 | Espectro de ESI-TOF-MS do composto L1.

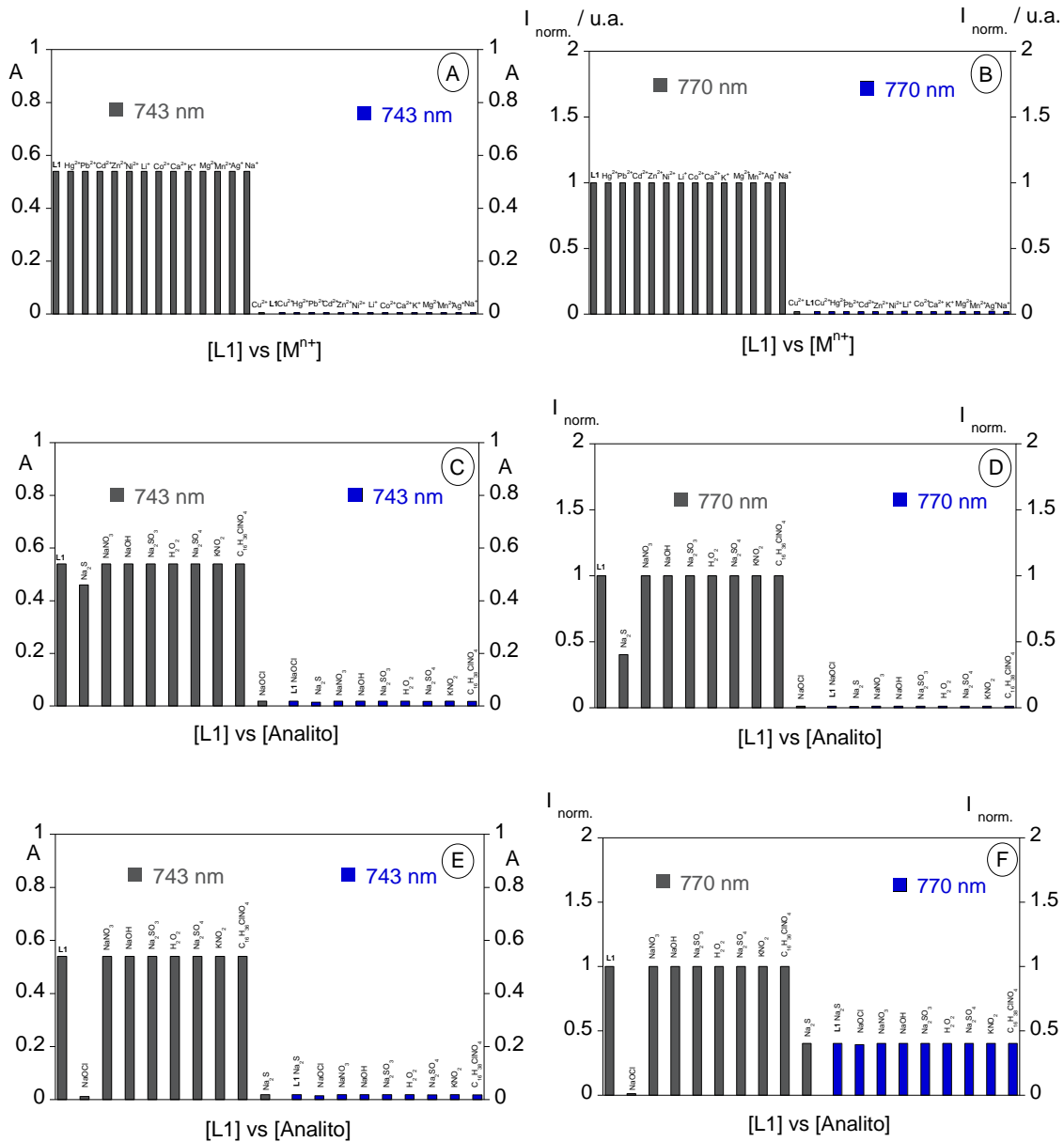


Figura 1 | Absorção (A) e emissão (B) normalizadas a 743 nm e 770 nm, respectivamente, do composto **L1** após adição de 10 equivalentes de íons metálicos (barra verde); absorção (A) e emissão (B) normalizadas do sistema **L1Cu²⁺** após adição de 20 equivalentes de **Mⁿ⁺** (barra azul) (**[L1]** = 1×10^{-5} M, solvente: Acetonitrilo, λ_{exc} = 680 nm, Adição ordenada de **Mⁿ⁺** = Cu²⁺, Hg²⁺, Pb²⁺, Cd²⁺, Zn²⁺, Ni²⁺, Li⁺, Co²⁺, Ca²⁺, K⁺, Mg²⁺, Mn²⁺, Ag⁺, Na⁺ em acetonitrilo. Absorção (C) e emissão (D) normalizadas a 743 nm e 770 nm, respectivamente, do composto **L1** após adição de 10 equivalentes de analito (barra verde); absorção (C) e emissão (D) normalizadas do sistema **L1NaOCl** após adição de 20 equivalentes de analito (barra azul). Absorção (E) e emissão (F) normalizadas a 743 nm e 770 nm, respectivamente, do composto **L1** após adição de 10 equivalentes de analito (barra verde); absorção (E) e emissão (F) normalizadas do sistema **L1Na₂S** após adição de 20 equivalentes de analito (barra azul). (**[L1]** = 1×10^{-5} M, solvente: Acetonitrilo, λ_{exc} = 680 nm, Adição ordenada de analitos = NaOCl, Na₂S, NaNO₃, NaOH, Na₂SO₃, H₂O₂, Na₂SO₄, KNO₃, C₁₆H₃₆ClNO₄ em água mili-Q.

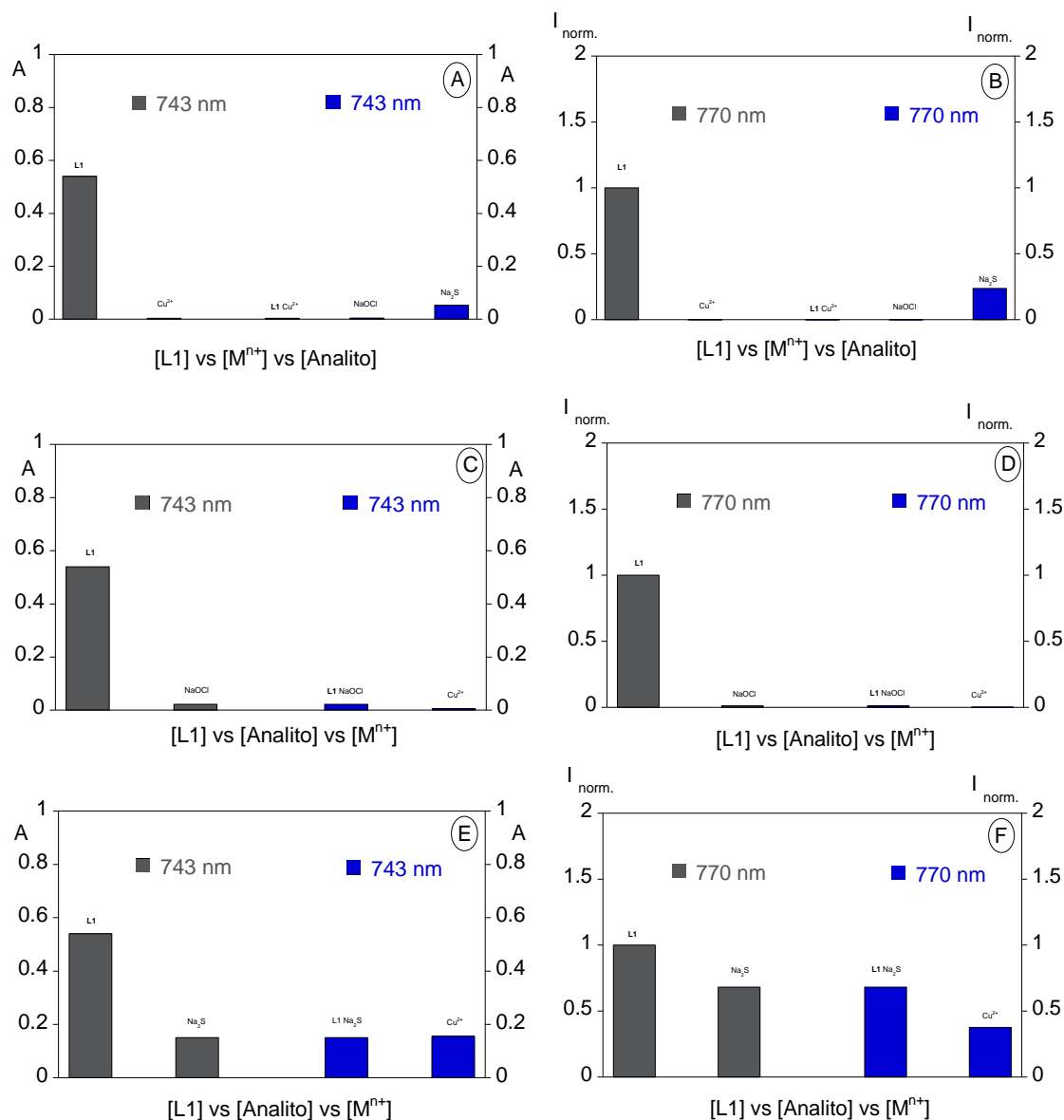


Figura 2 | Absorção (A) e emissão (B) normalizadas a 743 nm e 770 nm, respectivamente, do composto **L1** após adição de 4 equivalentes de Cu²⁺ (barra verde); absorção (A) e emissão (B) normalizadas do sistema **L1Cu²⁺** após adição de 14 equivalentes de NaOCl e 47 equivalentes de Na₂S (barra azul) ([**L1**] = 1×10⁻⁵ M, solvente: Acetonitrilo, λ_{exc} = 680 nm, Mⁿ⁺ = Cu²⁺ em acetonitrilo, analito = NaOCl e Na₂S em água mili-Q. Absorção (C) e emissão (D) normalizadas a 743 nm e 770 nm, respectivamente, do composto **L1** após adição de 14 equivalentes de NaOCl (barra verde); absorção (C) e emissão (D) normalizadas do sistema **L1NaOCl** após adição de 4 equivalentes de Cu²⁺ (barra azul) ([**L1**] = 1×10⁻⁵ M, solvente: Acetonitrilo, λ_{exc} = 680 nm, analito = NaOCl em água mili-Q. Mⁿ⁺ = Cu²⁺ em acetonitrilo. Absorção (E) e emissão (F) normalizadas a 743 nm e 770 nm, respectivamente, do composto **L1** após adição de 10 equivalentes de Na₂S (barra verde); absorção (E) e emissão (F) normalizadas do sistema **L1Na₂S** após adição de 4 equivalentes de Cu²⁺ (barra azul) ([**L1**] = 1×10⁻⁵ M, solvente: Acetonitrilo, λ_{exc} = 680 nm, analito = Na₂S em água mili-Q. Mⁿ⁺ = Cu²⁺ em acetonitrilo.

Nanopartículas de prata triangulares

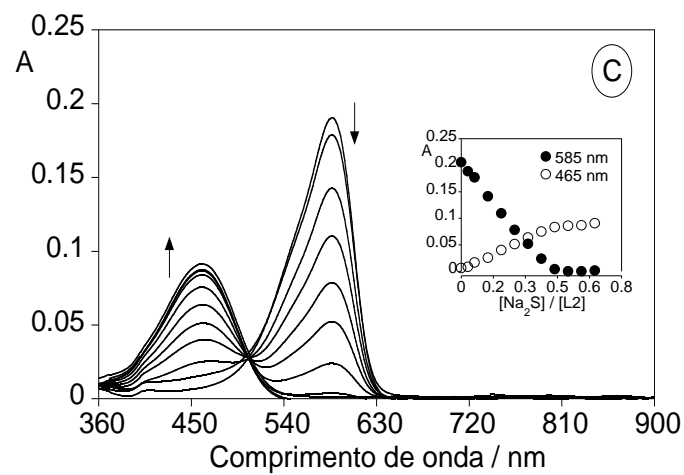
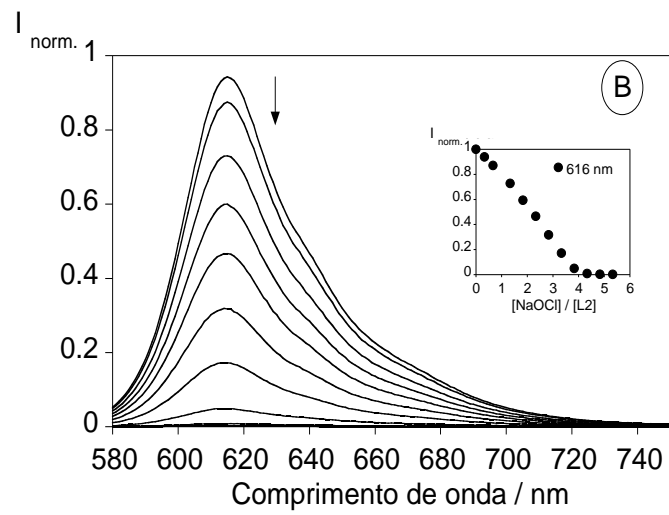
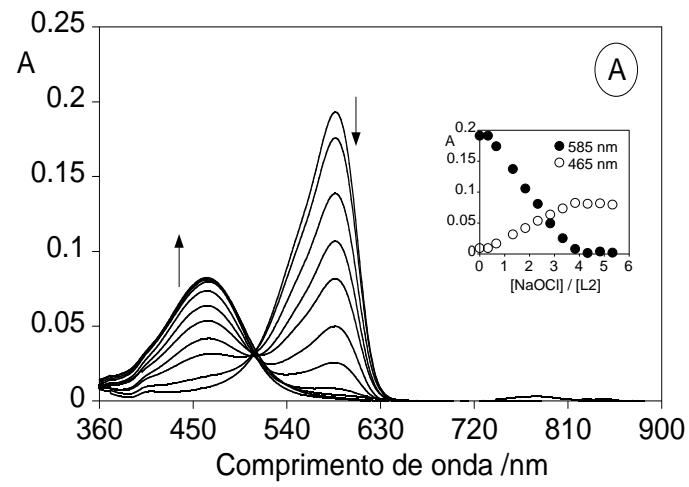
1. Preparação das nanopartículas de prata: método de Frank

1. Síntese das AgNPs triangulares
 - 1.2.1. Prepare 2.0 mL de citrato de sódio 1.25×10^{-2} M em água mili-Q.
 - 1.2.2. Prepare 5.0 mL de nitrato de prata 3.75×10^{-4} M em água mili-Q.
 - 1.2.3. Prepare 5.0 mL de peróxido de hidrogénio 5.00×10^{-2} M em água mili-Q.
 - 1.2.4. Prepare 2.5 mL de borohidreto de sódio 5.0×10^{-3} M em água mili-Q.
 - 1.2.5. Misture as soluções seguintes num *vial* pela seguinte ordem: 2.0 mL de citrato de sódio 1.25×10^{-2} M, 5.0 mL de nitrato de prata 3.75×10^{-4} M e 5.0 mL de peróxido de hidrogénio 5.0×10^{-2} M.
 - 1.2.6. Adicione à solução anterior 2.5 mL de uma solução de borohidreto de sódio 5.0×10^{-3} M para o passo de redução da prata.
 - 1.2.7. Agite com cuidado a solução final à temperatura ambiente até observar uma cor azul (3 min). A cor indicar a formação das nanopartículas triangulares de prata.
 - 1.2.8. Armazene as AgNPs triangulares a 4 °C.

Nanopartículas esféricas de ouro

2. Preparação das nanopartículas esféricas de ouro: método de Turkevich

2. Síntese de AuNPs
 - 2.1.1. Adicione 4.9 mg de tetracloroaurato de hidrogénio (III) hidratado a 12.5 mL de água mili-Q. (solução I)
 - 2.1.2. Adicione 12.5 mg de citrato de sódio tribásico a 1.25 mL de água mili-Q. (solução II)
 - 2.1.3. Aqueça a solução I a 100 °C.
 - 2.1.4. Adicione a solução II.
 - 2.1.5. Mantenha a mistura de reação sobre refluxo durante 15 min.
 - 2.1.6. Continue aquecendo até observar a cor vermelha.
 - 2.1.7. Armazene as AuNPs esféricas a 4 °C.



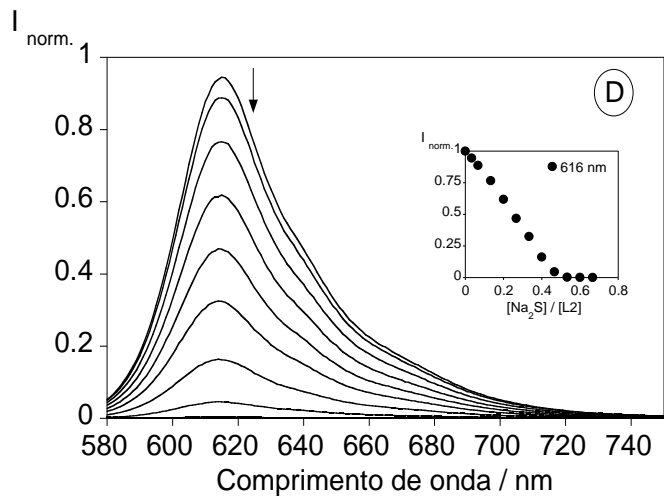
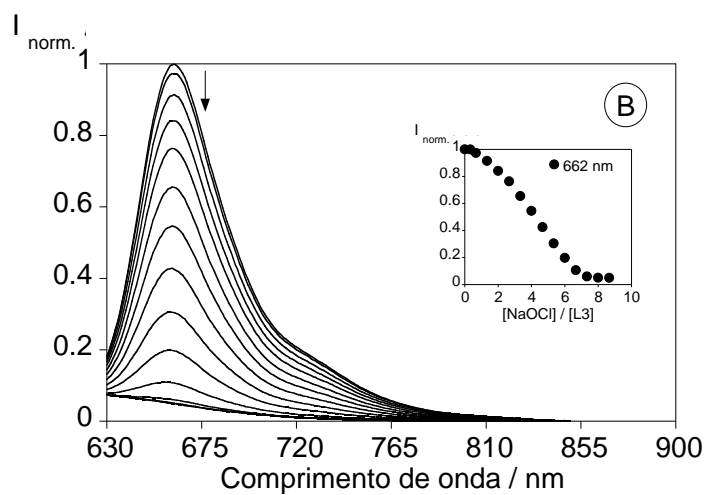
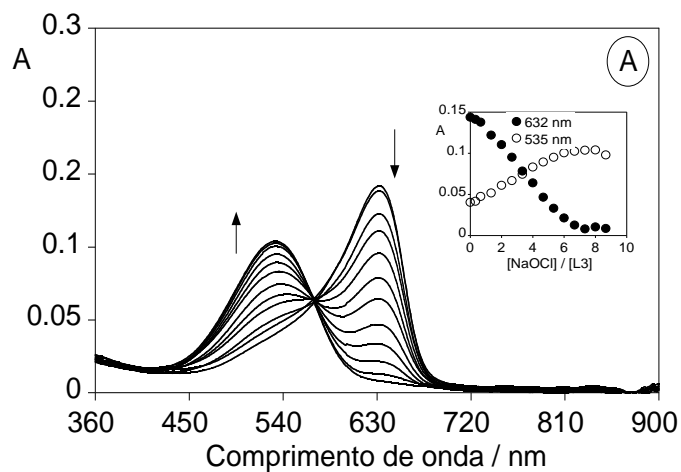


Figura 1 | Titulação espectrofotométrica (A) e espectralfluorimétrica (B) de L2 em acetonitrilo com a adição de NaOCl em água mili-Q. Inset: Absorção a 585 nm e 465 nm com a função de $[\text{NaOCl}]/[\text{L2}]$. Inset: Emissão a 616 nm com a função de $[\text{NaOCl}]/[\text{L2}]$. Titulação espectrofotométrica (C) e espectralfluorimétrica (D) de L2 em acetonitrilo com a adição de Na_2S em água mili-Q. Inset: Absorção a 585 nm e 465 nm com a função de $[\text{Na}_2\text{S}]/[\text{L2}]$. Inset: Emissão a 616 nm com a função de $[\text{Na}_2\text{S}]/[\text{L2}]$. ($T = 298 \text{ K}$, $[\text{L2}] = 1.0 \times 10^{-5} \text{ M}$, $\lambda_{\text{exc}} = 585 \text{ nm}$).



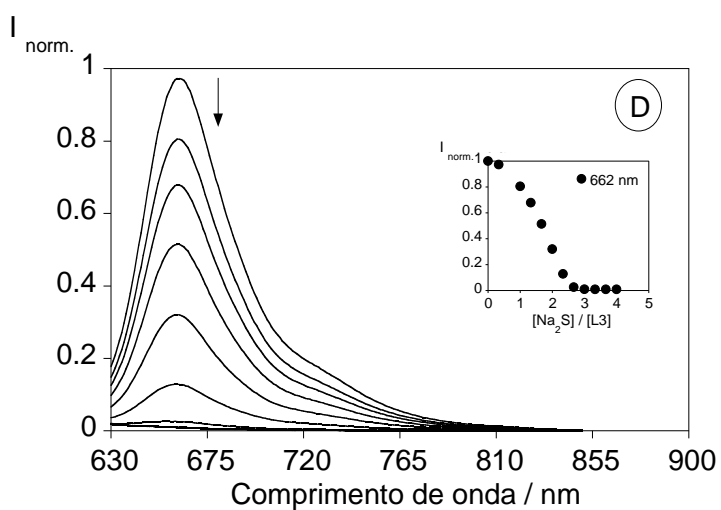
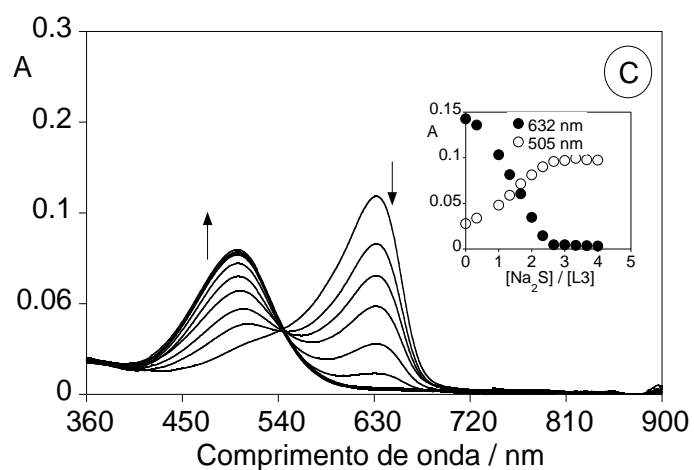


Figura 2 | Titulação espectrofotométrica (A) e espectralfluorimétrica (B) de L3 em acetonitrilo com a adição de NaOCl em água mili-Q. Inset: Absorção a 632 nm e 505 nm com a função de $[\text{NaOCl}]/[\text{L3}]$. Inset: Emissão a 662 nm com a função de $[\text{NaOCl}]/[\text{L3}]$. Titulação espectrofotométrica (C) e espectralfluorimétrica (D) de L3 em acetonitrilo com a adição de Na_2S em água mili-Q. Inset: Absorção a 632 nm e 505 nm com a função de $[\text{Na}_2\text{S}]/[\text{L3}]$. Inset: Emissão a 662 nm com a função de $[\text{Na}_2\text{S}]/[\text{L3}]$. ($T = 298 \text{ K}$, $[\text{L3}] = 1.0 \times 10^{-5} \text{ M}$, $\lambda_{\text{exc}} = 632 \text{ nm}$).