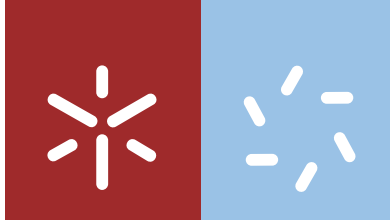




**Universidade do Minho**  
Escola de Ciências

Raquel da Costa Rainha Gonçalves

***Design, síntese e caracterização de derivados de BODIPY novos para aplicação como sensores químicos óticos, sondas para bioimagem molecular e componentes para sistemas de libertação de fármacos***



**Universidade do Minho**  
Escola de Ciências

Raquel da Costa Rainha Gonçalves

***Design, síntese e caracterização de derivados de BODIPY novos para aplicação como sensores químicos óticos, sondas para bioimagem molecular e componentes para sistemas de libertação de fármacos***

Dissertação de Mestrado  
Mestrado em Técnicas de Caracterização e Análise Química

Trabalho efetuado sob a orientação da  
**Professora Doutora Maria Manuela Marques Raposo**  
e da  
**Professora Doutora Susana Paula Graça Costa**

## Declaração

DE ACORDO COM A LEGISLAÇÃO EM VIGOR NÃO É PERMITIDA A REPRODUÇÃO DE QUALQUER PARTE DESTA DISSERTAÇÃO POR UM PERÍODO DE CINCO ANOS.

Universidade do Minho, 16 de outubro de 2019.

## Agradecimentos

De facto, a escrita de uma dissertação de mestrado é um trabalho individual e autónomo, no entanto não teria conseguido concluir esta etapa da minha vida sem a ajuda e o contributo de várias pessoas, às quais deixo o meu sincero agradecimento.

À Professora Doutora Manuela Raposo e à Professora Doutora Susana Costa, que já me acompanham desde o projeto final de licenciatura. Agradeço a oportunidade e a confiança que depositaram em mim para continuar a fazer parte deste trabalho, a orientação e a disponibilidade total demonstrada tanto no esclarecimento de dúvidas, como comentários e correções científicas. Agradeço ainda a simpatia e a motivação para seguir em frente.

À Fundação da Ciência e Tecnologia (FCT) pelo financiamento do projeto PTDC/QUI-COL/28052/2017 onde parte deste trabalho foi inserido em colaboração com o INL.

À Doutora Rosa Batista pela disponibilidade demonstrada em me ajudar ao longo deste trabalho.

À Dra. Elisa Pinto e à Dra. Vânia Azevedo pelo empenho e rapidez na realização dos espectros de RMN.

Ao Doutor Manuel Bañobre-López, ao Doutor Juan Gallo e a todo o grupo AmTheNa, não só pela oportunidade de concretização dos estudos biológicos, mas também pelo acolhimento e pelos bons momentos proporcionados durante a minha estadia no INL. Agradeço em especial à Milene, por todo o tempo que despendeu para me acompanhar e ajudar durante a realização do trabalho, pela paciência e persistência na busca das células mais “fotogénicas”.

A todos os meus colegas, pelos bons momentos passados no Departamento de Química. Em especial às minhas colegas do laboratório 40, não só pelo companheirismo e espírito de interajuda, mas também pelas sessões de *karaoke* proporcionadas pela rádio local.

À minha cara amiga, cara colega Cátia Martins. Nem sei bem por onde começar...foram 5 longos anos de momentos partilhados, de histórias para contar, de desabafos e gargalhadas. Seria impossível dizer tudo num parágrafo, mas acho que consigo transmitir o meu agradecimento numa só palavra - Amizade. Obrigada pela amizade!

De um modo muito especial, à minha família. Obrigada por serem o meu porto de abrigo, pelas palavras de carinho e por nunca duvidarem das minhas capacidades. Acredito que sem vocês não teria chegado onde cheguei!

## **Declaração de integridade**

Declaro ter atuado com integridade na elaboração do presente trabalho académico e confirmo que não recorri à prática de plágio nem a qualquer forma de utilização indevida ou falsificação de informações ou resultados em nenhuma das etapas conducente à sua elaboração. Mais declaro que conheço e que respeitei o Código de Conduta Ética da Universidade do Minho.

## Resumo

### ***Design, síntese e caracterização de derivados de BODIPY novos para aplicação como sensores químicos óticos, sondas para bioimagem molecular e componentes para sistemas de libertação de fármacos***

Atualmente, existe uma grande variedade de sensores químicos óticos baseados em moléculas orgânicas, no entanto os derivados de 4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-sindaceno, designados usualmente como BODIPYs, constituem uma nova classe de fluoróforos que tem vindo a despertar grande interesse nas mais diversas áreas de investigação. As propriedades fotofísicas e a versatilidade química dos derivados de BODIPY explicam o seu crescimento exponencial, destacando-se a sua aplicação como sensores óticos para o reconhecimento e deteção de espécies químicas ou ainda como sondas fluorescentes em microscopia de fluorescência. De facto, as moléculas fluorescentes tornaram-se uma ferramenta indispensável em bioimagem molecular, já que permitem a visualização de estruturas celulares e caracterização de fenómenos que ocorrem nos sistemas biológicos, através de imagens de alta resolução, em tempo real e sem perturbação das funções celulares. Por outro lado, a incorporação de fluoróforos como componente de sinalização em sistemas de libertação de fármacos é uma estratégia para a monitorização e avaliação da eficiência de terapia no tratamento de diversas doenças.

O objetivo deste trabalho consistiu no *design*, síntese e caracterização de novos derivados funcionalizados com diferentes grupos substituintes na posição 2 do núcleo do BODIPY, visando a diversificação fotofísica e estrutural dos compostos. Numa segunda etapa, o estudo das capacidades dos derivados de BODIPY como sensores óticos de iões metálicos com importância biológica e ambiental foi realizado através de titulações espectrofotométricas e espectrofluorimétricas na presença de  $\text{Pd}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  e  $\text{Al}^{3+}$ , na sequência do estudo preliminar que revelou a seletividade/sensibilidade para estes catiões. A potencial aplicação de um dos compostos sintetizados como sonda fluorescente em bioimagem foi avaliada em células cancerígenas HeLa recorrendo a técnicas de fluorescência e microscopia confocal, tendo-se obtido resultados promissores. Por fim, foi realizada a síntese de derivados de tiofeno com o intuito de serem incorporados como unidades de sinalização em sistemas de libertação de fármacos.

**Palavras-chave:** bioimagem; BODIPY; catiões; sensores cromofluorogénicos; sondas fluorescentes.

## Abstract

### Design, synthesis and characterization of novel BODIPY derivatives for application as optical chemosensors, molecular bioimaging probes and components in drug delivery systems

Currently, there are many optical chemical sensors based on organic molecules, however 4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene derivatives, commonly known as BODIPYs, represent a new class of fluorophores which have been arousing considerable interest across a wide variety of research fields. The photophysical properties and chemical versatility of BODIPY derivatives explain their exponential growth, highlighting their application as optical sensors for the recognition and detection of chemical species or as fluorescent probes for fluorescence microscopy. In fact, fluorescent molecules have become a key tool for molecular bioimaging, as it allows the visualization of cellular structures and characterization of biological phenomena through real-time and high-resolution images without disturbing cellular functions. On the other hand, incorporation of fluorophores as a signaling component in drug delivery systems is a strategy for monitoring and evaluating the therapy efficacy for the treatment of several diseases.

The aim of this work was the design, synthesis and characterization of new functionalized derivatives with different substituent groups at position 2 of the BODIPY core, intending to diversify the compounds' photophysical properties and chemical structure. In a second stage, the study on the ability of BODIPY derivatives as optical sensors for metal ions with biological and environmental relevance was performed by spectrophotometric and spectrofluorimetric titrations in the presence of  $\text{Pd}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  and  $\text{Al}^{3+}$ , as a result of the preliminary study which revealed the selectivity/sensitivity towards these cations. The potential application of one of the compounds synthesized as fluorescent probe in bioimaging was evaluated in HeLa cancer cells using fluorescence techniques and confocal microscopy, revealing promising results. Finally, thiophene derivatives were synthesized aiming to be used as signaling units in drug delivery systems.

**Keywords:** bioimaging; BODIPY; cations; chromofluorogenic sensors; fluorescence probes.



## Índice Geral

Declaração .....	ii
Agradecimentos.....	iii
Declaração de integridade.....	v
Resumo.....	vi
Abstract.....	vii
Índice Geral.....	viii
Lista de abreviaturas e símbolos .....	xi
Índice de Figuras .....	xiv
Índice de Esquemas .....	xvii
Índice de Tabelas .....	xviii
Comunicações Científicas .....	xix
<b>1. Introdução Teórica .....</b>	<b>1</b>
1.1. Química supramolecular: reconhecimento molecular .....	1
1.2. Sensores químicos óticos .....	2
1.2.1. Sensores colorimétricos.....	5
1.2.2. Sensores fluorimétricos.....	6
1.2.2.1. Mecanismos de sinalização.....	8
1.3. Derivados de BODIPY .....	13
1.3.1. BODIPY como sensor ótico: reconhecimento de íões metálicos.....	20
1.3.2. BODIPY como sonda fluorescente: aplicação em bioimagem molecular .....	23
<b>2. Descrição Experimental.....</b>	<b>29</b>
2.1. Síntese de derivados de BODIPY.....	30
2.1.1. Síntese do derivado de BODIPY <b>1</b> funcionalizado na posição <i>meso</i> .....	30
2.1.2. Síntese do derivado de BODIPY <b>2</b> formilado através da reação de Vilsmeier-Haack.....	31

2.1.3.	Síntese do derivado de BODIPY 3 funcionalizado com benzimidazol.....	32
2.2.	Caraterização fotofísica dos derivados de BODIPY 1-3.....	33
2.3.	Avaliação dos derivados de BODIPY 1-3 como sensores óticos de iões metálicos.....	34
2.3.1.	Estudo preliminar da capacidade sensora dos derivados de BODIPY 1-3.....	34
2.3.2.	Titulações espectrofotométricas e espectrofluorimétricas dos derivados de BODIPY 2 e 3.....	34
2.4.	Avaliação do derivado de BODIPY 3 como sonda fluorescente em sistemas biológicos.....	35
2.4.1.	Linha celular.....	35
2.4.2.	Viabilidade celular.....	35
2.4.3.	Deteção de Hg <sup>2+</sup> e Fe <sup>3+</sup> intracelular.....	36
2.4.4.	Internalização e localização subcelular do derivado de BODIPY 3.....	37
2.5.	Síntese de derivados de tiofeno por acoplamento de Suzuki.....	38
3.	<b>Discussão de Resultados</b> .....	41
3.1.	Síntese dos derivados de BODIPY.....	41
3.1.1.	Síntese do derivado de BODIPY 1 funcionalizado na posição <i>meso</i> .....	41
3.1.2.	Síntese do derivado de BODIPY 2 formilado através da reação de Vilsmeier-Haack.....	42
3.1.3.	Síntese do derivado de BODIPY 3 funcionalizado com benzimidazol.....	43
3.2.	Caraterização fotofísica dos derivados de BODIPY 1-3.....	45
3.3.	Avaliação dos derivados de BODIPY 1-3 como sensores óticos de iões metálicos.....	47
3.3.1.	Estudo preliminar da capacidade sensora dos derivados de BODIPY 1-3.....	47
3.3.2.	Titulações espectrofotométricas e espectrofluorimétricas dos derivados de BODIPY 2 e 3.....	51
3.4.	Avaliação do derivado de BODIPY 3 como sonda fluorescente em sistemas biológicos.....	58
3.4.1.	Viabilidade celular.....	58
3.4.2.	Deteção de Hg <sup>2+</sup> e Fe <sup>3+</sup> intracelular.....	59
3.4.3.	Internalização e localização subcelular do derivado de BODIPY 3.....	61

3.5. Síntese de derivados de tiofeno por acoplamento de Suzuki .....	67
4. Conclusões e Perspetivas Futuras .....	70
5. Referências Bibliográficas .....	73

## Lista de abreviaturas e símbolos

<b>Abs</b>	Absorvância
<b>Ac</b>	Grupo acetilo
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>AIE</b>	Emissão induzida por agregação (do inglês <i>Aggregation-Induced Emission</i> )
<b>BODIPY</b>	4,4-Difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno
<b>CHEF</b>	Aumento de fluorescência por quelação (do inglês <i>Chelation Enhancement of Fluorescence</i> )
<b>d</b>	Dupleto
<b>dd</b>	Duplo dupleto
<b>dt</b>	Duplo tripleto
<b>DCM</b>	Diclorometano
<b>DDQ</b>	2,3-Dicloro-5,6-diciano- <i>p</i> -benzoquinona
<b>DME</b>	1,2-Dimetoxietano
<b>DMEM</b>	Meio de cultura celular (do inglês <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> )
<b>DMF</b>	<i>N,N</i> -Dimetilformamida
<b>DMSO-<i>d</i><sub>6</sub></b>	Dimetilssulfóxido hexadeuterado
<b>DSSC</b>	Célula solar sensibilizada por corante (do inglês <i>Dye Sensitized Solar Cell</i> )
<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b>EM</b>	Espetrometria de massa
<b>EMAR</b>	Espetrometria de massa de alta resolução
<b>Et</b>	Grupo etilo
<b>ESI</b>	Ionização por <i>electrospray</i> (do inglês <i>Electrospray Ionization</i> )
<b>FRET</b>	Transferência de energia por ressonância de Förster (do inglês <i>Förster Resonance Energy Transfer</i> )
<b>GSH</b>	Glutationa
<b>HBSS</b>	Solução tampão e isotônica (do inglês <i>Hank's Balanced Salt Solution</i> )
<b>HeLa</b>	Células epiteliais do cancro do colo do útero

HMBC	Correlação heteronuclear através de múltiplas ligações (do inglês <i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i> )
HMQC	Correlação heteronuclear quântica múltipla (do inglês <i>Heteronuclear Multiple Quantum Correlation</i> )
HOMO	Orbital molecular ocupada de maior energia (do inglês <i>Highest Occupied Molecular Orbital</i> )
HSAB	Ácidos e bases duros e moles (do inglês <i>Hard-Soft Acids-Bases</i> )
I	Intensidade de fluorescência final
I <sub>0</sub>	Intensidade de fluorescência inicial
ICT	Transferência intramolecular de carga (do inglês <i>Intramolecular Charge Transfer</i> )
IV	Infravermelho
J	Constante de acoplamento
K <sub>ass</sub>	Constante de associação
LE	Estado localmente excitado
LUMO	Orbital molecular não ocupada de menor energia (do inglês <i>Highest Unoccupied Molecular Orbital</i> )
m	Multiplete
M:L	Metal:Ligando
m/z	Relação massa/carga
NHS	N-Hidroxissuccinimida
NIR	Infravermelho próximo (do inglês <i>Near Infrared</i> )
PDI	Inativação fotodinâmica (do inglês <i>Photodynamic Inactivation</i> )
PDT	Terapia fotodinâmica (do inglês <i>Photodynamic Therapy</i> )
PET	Transferência eletrônica fotoinduzida (do inglês <i>Photoinduced Electron Transfer</i> )
s	Singleto
t.a.	Temperatura ambiente
TFA	Ácido trifluoroacético
TLC	Cromatografia em camada fina (do inglês <i>Thin Layer Chromatography</i> )

<b>u.a.</b>	Unidades arbitrárias
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>Vis</b>	Visível
<b><sup>13</sup>C RMN</b>	Ressonância magnética nuclear de carbono 13
<b><sup>1</sup>H RMN</b>	Ressonância magnética nuclear de próton
<b><math>\epsilon</math></b>	Absortividade molar
<b><math>\delta</math></b>	Desvio químico em ressonância magnética nuclear
<b><math>\phi_f</math></b>	Rendimento quântico relativo de fluorescência
<b><math>\lambda_{\text{abs}}</math></b>	Comprimento de onda máximo de absorção
<b><math>\lambda_{\text{em}}</math></b>	Comprimento de onda máximo de emissão
<b><math>\lambda_{\text{exc}}</math></b>	Comprimento de onda excitação

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Modelo proposto para a interação entre cromóforos derivados de antraquinona e um anião através de pontes de hidrogênio.....	6
<b>Figura 2.</b> Representação simplificada das transições eletrônicas envolvidas no processo de fluorescência. ....	8
<b>Figura 3.</b> Processo de sinalização baseado na transferência eletrônica fotoinduzida representado através do diagrama das orbitais moleculares. ....	9
<b>Figura 4 .</b> Diagrama de energia associado ao mecanismos ICT em compostos com grupos doadores (D) e aceptadores (A) de elétrons ligados através de sistemas $\pi$ -conjugados.....	10
<b>Figura 5.</b> Sensor fluorimétrico de $\text{Cd}^{2+}$ baseado no mecanismo ICT.....	11
<b>Figura 6.</b> Representação da influência da aproximação molecular entre duas espécies dador/aceitador na eficiência do mecanismo de FRET.....	12
<b>Figura 7.</b> Estrutura química do núcleo do BODIPY e numeração respectiva. ....	14
<b>Figura 8.</b> Mapa de potencial eletrostático e distribuição de cargas do núcleo do BODIPY.....	14
<b>Figura 9.</b> Estrutura química de diversos BODIPYs disponíveis comercialmente.....	15
<b>Figura 10.</b> Eficiência de fluorescência de derivados de BODIPY funcionalizados com grupos metilamino e metoxilo na posição <i>meso</i> e grupos alquilo nas posições 3 e 5 em solvente polar (etanol) e apolar (ciclohexano). ....	17
<b>Figura 11.</b> Exemplos de derivados de BODIPY funcionalizados com diferentes grupos (hetero)aromáticos e respectivos comprimentos de onda de absorção/emissão.....	18
<b>Figura 12.</b> Exemplos de derivados de BODIPY obtidos através da fusão com diferentes grupos (hetero)aromáticos e respectivos comprimentos de onda de absorção/emissão. ....	18
<b>Figura 13.</b> Exemplos de aza-BODIPYs e respectivos comprimentos de onda de absorção/emissão. ....	19
<b>Figura 14.</b> Representação do local de interação entre o derivado de BODIPY e os iões mercúrio e zinco. ....	22

<b>Figura 15.</b> Derivado de BODIPY como sensor cromofluorogênico seletivo de mercúrio(II) em solução aquosa.....	23
<b>Figura 16.</b> Exemplo de derivado de BODIPY como sonda de fluorescência NIR. ....	25
<b>Figura 17.</b> Exemplo de derivado de BODIPY para a marcação de estruturas proteicas.....	26
<b>Figura 18.</b> Exemplo de derivado de BODIPY para a marcação da mitocôndria.....	26
<b>Figura 19.</b> Estrutura química dos derivados de BODIPY sintetizados. ....	44
<b>Figura 20.</b> Espectros de absorção <b>(a)</b> e de emissão <b>(b)</b> normalizados dos derivados de BODIPY <b>1</b> (azul), <b>2</b> (vermelho) e <b>3</b> (cinza), em acetonitrilo. ....	45
<b>Figura 21.</b> Soluções do composto <b>2</b> em acetonitrilo sob incidência de luz natural <b>(a)</b> e sob incidência de radiação UV a 365 nm <b>(b)</b> , após a adição de 50 equivalentes de diferentes cátions. ....	48
<b>Figura 22.</b> Soluções do composto <b>2</b> em acetonitrilo/água (75:25) sob incidência de luz natural <b>(a)</b> e sob incidência de radiação UV a 365 nm <b>(b)</b> , após a adição de 50 equivalentes de diferentes cátions. ....	50
<b>Figura 23.</b> Titulações espectrofotométricas do composto <b>3</b> com adição de quantidades crescentes de Fe <sup>3+</sup> , Al <sup>3+</sup> e Hg <sup>2+</sup> em acetonitrilo/água (75:25). O inset representa a absorvância normalizada a 497/499 nm e a 510 nm em função de [cátion]/[ <b>3</b> ]. ([ <b>3</b> ] = 1x10 <sup>-5</sup> M, [cátion] = 1x10 <sup>-2</sup> M). ....	53
<b>Figura 24.</b> Titulações espectrofluorimétrica do composto <b>2</b> com adição de quantidades crescentes de Fe <sup>3+</sup> e Al <sup>3+</sup> em acetonitrilo/água (75:25). O inset representa a intensidade de fluorescência normalizada a 514 nm em função de [cátion]/[ <b>2</b> ]. ([ <b>2</b> ] = 1x10 <sup>-5</sup> M, [cátion] = 1x10 <sup>-2</sup> M). ....	55
<b>Figura 25.</b> Titulações espectrofluorimétricas do composto <b>3</b> com adição de quantidades crescentes de Fe <sup>3+</sup> e Hg <sup>2+</sup> em acetonitrilo/água (75:25). O inset representa a intensidade de fluorescência normalizada a 521 nm em função de [cátion]/[ <b>3</b> ]. ([ <b>3</b> ] = 1x10 <sup>-5</sup> M, [cátion] = 1x10 <sup>-2</sup> M). ....	56
<b>Figura 26.</b> Avaliação da viabilidade das células HeLa após a incubação de 4 h com diferentes concentrações de BODIPY <b>(a)</b> e dos cátions Fe <sup>3+</sup> e Hg <sup>2+</sup> <b>(b)</b> . A viabilidade celular foi determinada através do método de <i>AquaBluer</i> . Os dados estão apresentados sob a forma de média ± desvio padrão. ....	59
<b>Figura 27.</b> Avaliação da capacidade sensora do BODIPY <b>3</b> para a detecção Fe <sup>3+</sup> e Hg <sup>2+</sup> intracelular em células HeLa. [BODIPY] = 5 µg/mL e [Fe <sup>3+</sup> ] = [Hg <sup>2+</sup> ] = 20 µM. A intensidade de fluorescência foi medida a λ <sub>exc/emis</sub> = 490/520 nm. Os dados estão apresentados sob a forma de média ± desvio padrão. ....	60



<b>Figura 28.</b> Imagens de fluorescência das células HeLa tratadas com o BODIPY (5 µg/mL) <b>(a)</b> e 15 minutos após a adição de Hg <sup>2+</sup> (100 µM) <b>(b)</b> . Marcação fluorescente do núcleo celular (azul) e BODIPY (vermelho).....	61
<b>Figura 29.</b> Evolução temporal da internalização celular do BODIPY <b>3</b> . Imagem de fluorescência das células HeLa na ausência do composto <b>(a)</b> , 2 minutos <b>(b)</b> e 10 minutos <b>(c)</b> após a adição.....	62
<b>Figura 30.</b> Imagens de fluorescência das células HeLa tratadas com BODIPY <b>3</b> adquiridas com diferentes lasers de excitação. A imagem no canal verde foi adquirida com um filtro de emissão entre 490-570 nm após a excitação a 488 nm <b>(a)</b> e a imagem no canal vermelho foi adquirido com um filtro de emissão entre 580-729 nm após a excitação a 561 nm <b>(b)</b> .....	62
<b>Figura 31.</b> Imagens de fluorescência das células HeLa tratadas com derivados de BODIPY funcionalizados com diferentes substituintes na posição 2 e na posição <i>meso</i> . As imagens foram adquiridas no canal verde, utilizando o laser 488 nm e no canal vermelho, utilizando o laser 561 nm. ....	63
<b>Figura 32.</b> Imagens de fluorescência das células HeLa tratadas com <i>MitoSpy™ Green FM</i> <b>(a)</b> e com BODIPY <b>(b)</b> . Sobreposição das imagens <b>a</b> e <b>b</b> <b>(c)</b> .....	64

## Índice de Esquemas

<b>Esquema 1.</b> Representação da abordagem supramolecular.....	1
<b>Esquema 2.</b> Reconhecimento do analito pelo sensor químico segundo a abordagem “subunidade de ligação - subunidade sinalização” . .....	3
<b>Esquema 3.</b> Reconhecimento do analito pelo sensor químico segundo a abordagem "por deslocamento".. .....	4
<b>Esquema 4.</b> Reconhecimento do analito pelo sensor químico segundo a abordagem do "quimiosímetro".. .....	4
<b>Esquema 5.</b> Esquema de síntese proposto por Treibs e Kreuzer para a acetilação do pirrol que resultou na obtenção do primeiro derivado de BODIPY. ....	13
<b>Esquema 6.</b> Exemplo de derivado BODIPY como componente de sistema de libertação de fármacos. 27	
<b>Esquema 7.</b> Síntese do derivado de BODIPY 1. ....	41
<b>Esquema 8.</b> Síntese do derivado de BODIPY 2. ....	43
<b>Esquema 9.</b> Síntese do derivado de BODIPY 3. ....	44
<b>Esquema 10.</b> Síntese do derivado de tiofeno 4 e 5.....	67

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1.</b> Resultados obtidos do estudo de espectroscopia de UV-Vis e de fluorescência dos derivados de BODIPY <b>1-3</b> em acetonitrilo.....	47
<b>Tabela 2.</b> Resultados obtidos da avaliação da capacidade sensora dos derivados de BODIPY na presença de vários cátions através de alterações do comportamento colorimétrico e fluorimétrico, em acetonitrilo. ....	49
<b>Tabela 3.</b> Resultados obtidos da avaliação da capacidade sensora dos derivados de BODIPY na presença de vários cátions através de alterações do comportamento colorimétrico e fluorimétrico, em acetonitrilo/água (75:25).....	50
<b>Tabela 4.</b> Valores da intensidade de fluorescência relativa ( $I/I_0$ ) e da capacidade de resposta fluorimétrica para a interação dos compostos <b>2</b> e <b>3</b> e os respectivos cátions em acetonitrilo/água (75:25).....	56
<b>Tabela 5.</b> Logaritmo da constante de associação ( $\log K_{ass}$ ), correspondente à interação 1:2 (M:L) entre os cátions $Hg^{2+}$ , $Fe^{3+}$ , $Fe^{3+}$ e $Al^{3+}$ e os compostos <b>2</b> e <b>3</b> , em acetonitrilo/água (75:25).....	57

## Comunicações Científicas

Parte do trabalho desenvolvido durante esta dissertação deu origem duas comunicações em congressos e a um artigo num livro de atas de um congresso internacional:

### Comunicações em congressos

**Gonçalves, R.;** Nogueira, M.; Costa, S. P. G.; Raposo, M. M. M.; BODIPY derivatives: synthesis and evaluation of their optical properties; comunicação electrónica, 22nd International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry 1-30 de novembro de 2018. Sciforum Electronic Conferences Series. <https://sciforum.net/paper/view/conference/5700>

**Gonçalves, R. C. R;** Pinto, S. C. S.; Costa, S. P. G.; Raposo, M. M. M. A dual channel naphthyl-BODIPY probe for the detection of cations in mixed aqueous solution. P03, comunicação em painel, 4th Symposium on Medicinal Chemistry of the University of Minho, 24 de maio 2019, Braga, Portugal.

### Artigos em livros de atas de congressos internacionais

**Gonçalves, R.;** Nogueira, M.; Costa, S. P. G.; Raposo, M. M. M.; BODIPY derivatives: synthesis and evaluation of their optical properties. *Proceedings of the 22nd Int. Electron. Conf. Synth. Org. Chem.*, 1 a 30 de novembro de 2018, Sciforum Electronic Conferences Series, *Proceedings* **2019**, *9*(1), 10. Seijas, J. A. and Tato, M. P. V. (Eds), MDPI, Basel, Switzerland, 2019 (ISN: 2071-1050); ISBN 978-3-03897-547-2. <https://doi.org/10.3390/ecsoc-22-05700>

## Capítulo 1

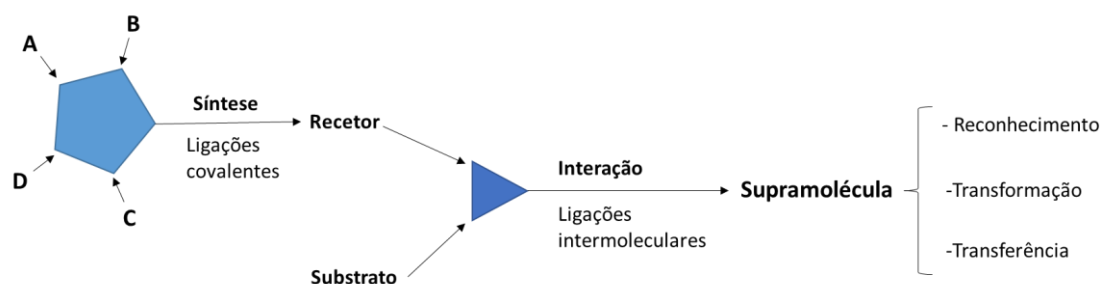
### *Introdução Teórica*

## 1. Introdução Teórica

### 1.1. Química supramolecular: reconhecimento molecular

O conceito “Química Supramolecular” foi definido por Jean-Marie Lehn como a química para além das moléculas, tendo como objetivo a construção de sistemas químicos funcionalmente complexos e organizados através da associação de duas ou mais entidades químicas unidas por forças intermoleculares. As estruturas supramoleculares são formadas devido às interações fracas entre moléculas individuais, nas quais se incluem pontes de hidrogénio, forças hidrofóbicas, forças de Van der Waals, forças eletrostáticas e interações de coordenação.<sup>1</sup>

A Química Supramolecular está intimamente ligada ao reconhecimento molecular, já que um dos seus princípios fundamentais é baseado no modelo primordial chave-fechadura/analito-recetor. As espécies químicas que efetuam o reconhecimento são designadas por recetor, enquanto que o analito se refere à molécula que é reconhecida. A abordagem supramolecular foca-se no desenvolvimento da arquitetura molecular do recetor, de forma a que o seu local de complexação possua as propriedades químicas e estruturais necessárias para a identificação específica do analito (molécula de natureza orgânica, inorgânica ou biológica). Desta forma, a ligação do recetor ao analito forma uma “supramolécula” que se caracteriza pela sua estabilidade termodinâmica (**Esquema 1**).<sup>2,3</sup>



**Esquema 1.** Representação da abordagem supramolecular, adaptado da referência 1.

Muitos dos processos de reconhecimento biológico baseiam-se em interações supramoleculares (por exemplo a atividade enzimática), pelo que a mimetização destes processos é uma das estratégias para a conceção de derivados supramoleculares artificiais.<sup>3</sup>

Para além disso, estes sistemas supramoleculares conduzem-nos ao conceito de sensor químico, já que o processo de reconhecimento está acoplado ao processo de deteção devido às alterações das propriedades físico-químicas destes recetores moleculares induzidas pela formação dos complexos com o analito.<sup>4</sup>

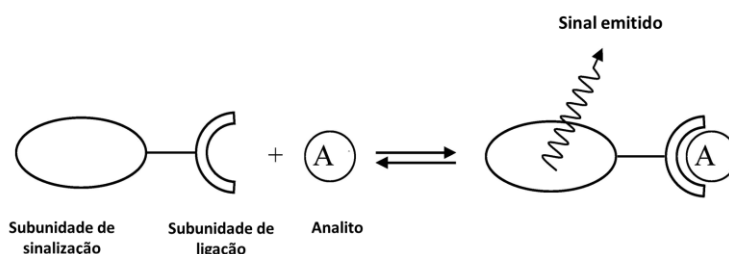
## 1.2. Sensores químicos óticos

Um sensor químico é uma molécula capaz de detetar a presença de um analito através da conversão da informação química, que ocorre a nível molecular, num sinal analítico, ampliado a nível macroscópico. Este processo resulta da interação seletiva entre o sensor e a espécie química permitindo uma análise qualitativa e quantitativa do analito em estudo.

Convencionalmente, um sensor químico é constituído por duas subunidades ligadas entre si, sendo que cada uma delas desempenha uma função específica. A subunidade de ligação/reconhecimento proporciona a seletividade do sensor químico, já que é responsável pela ligação à espécie de interesse. A subunidade de sinalização irá permitir detetar a interação entre o analito e a subunidade de ligação. No que diz respeito ao sensor químico ótico, a subunidade de sinalização atua como um transdutor ótico que converte o evento de reconhecimento num sinal expresso através de alterações das propriedades óticas da subunidade de sinalização. As técnicas de transdução óticas mais utilizadas por estes sensores são de absorção ótica e luminescência, apesar de existirem também sistemas baseados noutras técnicas espetroscópicas (por exemplo infravermelho, Raman) e parâmetros óticos (por exemplo índice de refração, refletividade). Efetivamente, dentro do grupo dos sensores óticos, os sistemas fluorimétricos e colorimétricos são aqueles que têm despertado maior interesse, já que possibilitam a deteção de espécies relevantes em tempo real, de uma forma diretamente observável (por exemplo mudança de cor, emissão de fluorescência) ou com recurso a equipamentos relativamente acessíveis.<sup>5</sup>

O desenvolvimento e a conceção de novos sensores químicos óticos pode seguir três abordagens clássicas que se distinguem pela forma como a subunidade de ligação e de sinalização estão acopladas e interagem com o analito.<sup>6</sup>

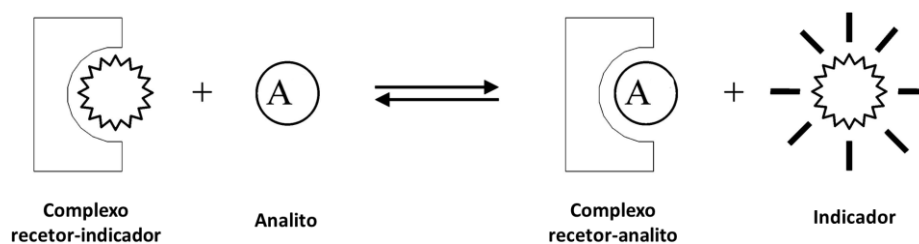
Na abordagem “subunidade de ligação - subunidade de sinalização”, o sensor é constituído por duas subunidades ligadas entre si covalentemente. O analito ao interagir com o local de ligação irá induzir alterações das propriedades da subunidade de sinalização, podendo estas manifestarem-se através de variações de cor, no caso de se tratar de um sensor colorimétrico, ou alteração da fluorescência, no caso do sensor fluorimétrico (**Esquema 2**).



**Esquema 2.** Reconhecimento do analito pelo sensor químico segundo a abordagem “subunidade de ligação - subunidade de sinalização”, adaptado da referência 6.

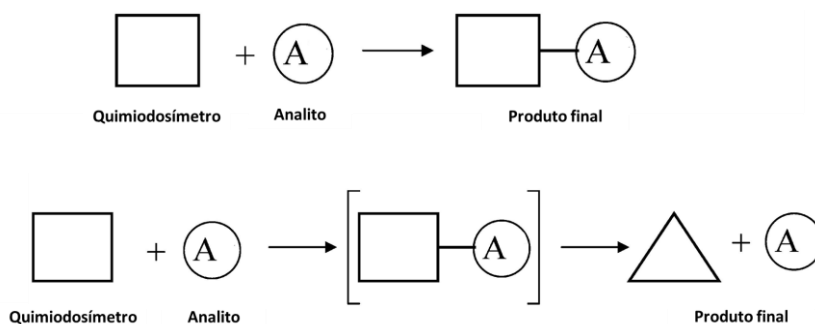
Na abordagem “por deslocamento”, o sensor é igualmente constituído por duas subunidades que formam um complexo de coordenação recetor-indicador, no entanto esta ligação não é covalente. Na presença do analito ocorre uma reação de substituição em que o local onde se encontra o indicador é ocupado pelo analito, formando-se um novo complexo de ligação recetor-analito. Este fenómeno ocorre uma vez que a constante de estabilidade do complexo recetor-indicador é menor que a do complexo recetor-analito. Os sistemas são desenvolvidos de forma a que os recetores moleculares possuam locais de ligação com tamanho e distribuição de carga adequados ao analito de interesse. Assim, a libertação do indicador para a solução resulta num sinal analiticamente mensurável (**Esquema 3**).





**Esquema 3.** Reconhecimento do analito pelo sensor químico segundo a abordagem "por deslocamento", adaptado da referência 6.

A abordagem do "quimiosímetro" envolve reações químicas altamente específicas e, normalmente irreversíveis, induzidas pela presença do analito. Nesta abordagem pode ocorrer uma reação em que o analito se liga covalentemente ao quimiosímetro ou, por outro lado, o analito poderá catalisar uma reação química. Em ambos os casos, o composto final é diferente do composto presente inicialmente. Estas reações originam alterações seletivas na cor ou na fluorescência da solução, estando estas diretamente relacionadas com a concentração do analito (**Esquema 4**).



**Esquema 4.** Reconhecimento do analito pelo sensor químico segundo a abordagem do "quimiosímetro", adaptado da referência 6.

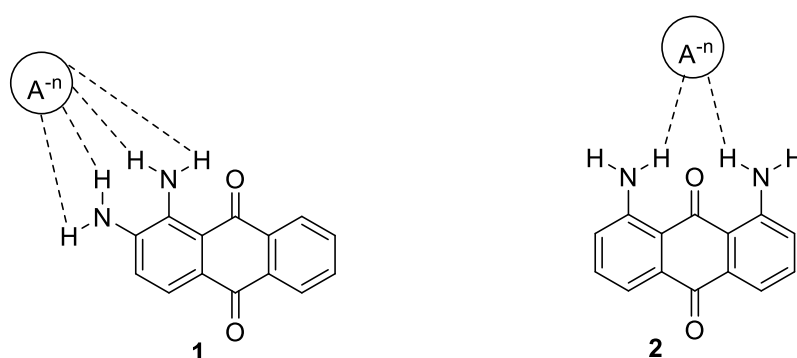
### 1.2.1. Sensores colorimétricos

Atualmente, a tecnologia baseada em sensores colorimétricos tem como fatores chave a simplicidade, a rapidez de resposta e uma boa relação custo-eficiência. A análise colorimétrica permite obter informações qualitativas e quantitativas relativamente à presença de compostos químicos (por exemplo iões, gases tóxicos e moléculas) ou biomoléculas (por exemplo proteínas e ADN) através de uma alteração da cor da subunidade de sinalização, denominada de cromóforo, possibilitando a deteção imediata a “olho nú” ou com recurso à espetroscopia de absorção UV-Vis.<sup>6,7</sup>

O fenómeno inerente a este método de deteção deve-se à absorção de radiação eletromagnética da zona do visível (400-700 nm aproximadamente) pelos compostos químicos. A cor adquirida por um determinado composto depende da sua estrutura química, nomeadamente, da presença de ligações duplas conjugadas. Estes sistemas  $\pi$ -conjugados levam à diminuição da diferença de energia entre as orbitais envolvidas nas transições eletrónicas. Assim, a diferença de energia entre a orbital ocupada de maior energia (HOMO) e a orbital desocupada de menor energia (LUMO) dos cromóforos irá corresponder a um determinado comprimento de onda na zona do visível. Adicionalmente, quanto maior for a extensão do sistema  $\pi$ -conjugado, menor é esta diferença energética logo maior será o deslocamento da banda de absorção do composto para comprimentos de onda maior (desvio batocrómico).

Para além disso, podem ser incorporados no cromóforo grupos aceitadores ou dadores de eletrões que também irão conduzir a uma alteração do comprimento de onda do composto. Por norma, os grupos dadores aumentam a densidade eletrónica dos sistemas, induzindo uma diminuição da diferença energética entre os estados excitado e fundamental, o que resulta num desvio da banda de absorção para comprimentos de onda superiores (desvio batocrómico). Contrariamente, a introdução de grupos retiradores na estrutura do composto, diminui a densidade eletrónica do sistema  $\pi$ -conjugado, verificando-se um aumento da diferença energética entre o estado excitado e fundamental, o que resulta no deslocamento da posição da banda de absorção no sentido dos comprimentos de onda menores (desvio hipsocrómico).<sup>8,9,10</sup>

A coordenação entre o composto  $\pi$ -conjugado (cromóforo) com o analito leva à formação de um complexo que apresenta uma banda de absorção com uma posição diferente no espectro do visível, resultando numa alteração da cor. Por exemplo, quando um anião interage com um grupo dador do cromóforo (**Figura 1**), irá aumentar o caráter dador desse grupo, aumentando a densidade eletrónica do sistema  $\pi$ -conjugado, induzindo um desvio batocrómico da banda de absorção. Caso a interação ocorra com um catião, o efeito dador diminui, e consequentemente, induz um desvio hipsocrómico.<sup>6</sup>



**Figura 1.** Modelo proposto para a interação entre cromóforos derivados de antraquinona e um anião através de pontes de hidrogénio, adaptada da referência 6.

### 1.2.2. Sensores fluorimétricos

A espectroscopia de fluorescência tem vindo a tornar-se uma técnica analítica cada vez mais recorrente nas mais variadas áreas de investigação. Esta técnica baseada na emissão de fluorescência apresenta vantagens quando comparada a outras ferramentas de análise, nomeadamente, a elevada sensibilidade, o que permite atingir limites de deteção menores e quantificar analitos em amostras biológicas e ambientais.<sup>11,12</sup>

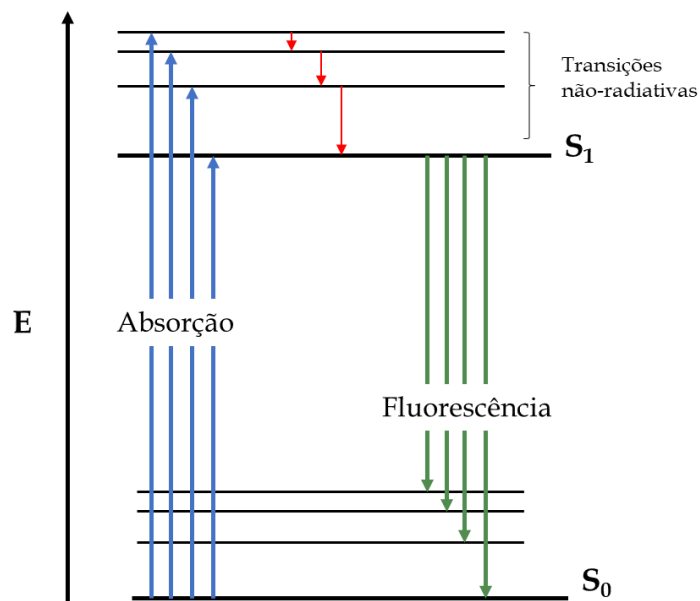
O *design* e a síntese de novas moléculas capazes de sofrer variações das suas propriedades emissivas tem sido um foco central da química orgânica. O recurso a métodos de modificação estrutural através da introdução ou remoção de grupos funcionais é uma das estratégias cruciais no desenvolvimento de sondas fluorimétricas com a máxima eficiência e seletividade.<sup>13,14</sup>

Um sensor fluorimétrico extrínseco é constituído pela subunidade de sinalização fluorescente, também designada de fluoróforo, ligada à subunidade de reconhecimento/recetor. A subunidade de sinalização e de reconhecimento podem estar separadas por um espaçador que tem como função mediar a separação e arranjo geométrico molecular. Por outro lado, num sensor fluorimétrico intrínseco ambas as funções de reconhecimento e sinalização são efetuadas pela mesma subunidade.<sup>15,16</sup>

Um sensor ideal deve corresponder a dois requisitos básicos: o recetor deve ter a maior afinidade possível com o analito de interesse, isto é, seletividade de interação. Adicionalmente, o sinal de fluorescência deve evitar interferências, a fluorescência residual da matriz em análise e o fluoróforo deve ser estável para evitar a fotodegradação.

O processo de fluorescência inicia-se quando os eletrões de uma determinada molécula passam para um estado de maior energia devido à absorção de radiação eletromagnética. A instabilidade no estado excitado, leva a que os eletrões regressem ao estado energético fundamental, ocorrendo a libertação da energia absorvida. Estas perdas de energia podem ser através de processos não-radiativos (relaxação vibracional ou conversão interna), no entanto apenas se observa fluorescência caso ocorra relaxação radiativa entre o nível vibracional mais baixo do primeiro estado excitado da mesma multiplicidade ( $S_1$ ) para qualquer um dos níveis vibracionais do estado fundamental ( $S_0$ ).

Devido à dissipação de energia por processos não-radiativos, a radiação emitida tem menor energia que a radiação absorvida, logo corresponde a um comprimento de onda maior (**Figura 2**).<sup>17</sup>



**Figura 2.** Representação simplificada das transições eletrônicas envolvidas no processo de fluorescência. Imagem adaptada da referência 17

### 1.2.2.1. Mecanismos de sinalização

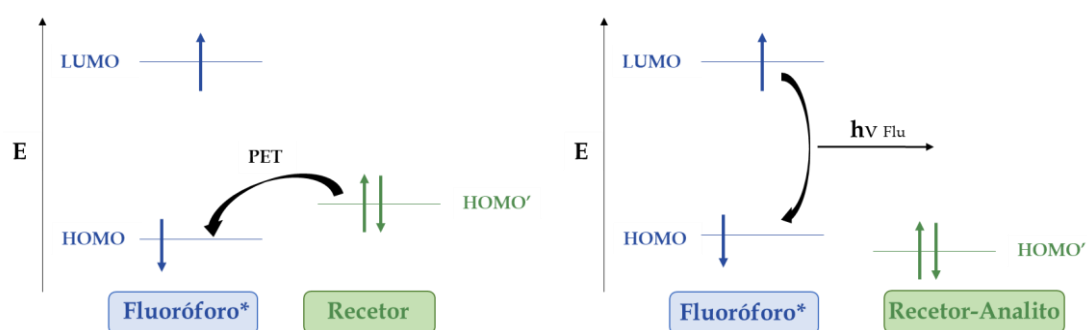
A complexação com o analito desencadeia um processo de sinalização no qual ocorre uma modulação das características fotofísicas do fluoróforo, nomeadamente, a posição da banda de emissão, o tempo de vida e/ou a intensidade de fluorescência. Alguns dos mecanismos convencionais envolvidos no processo de sinalização das sondas fluorescentes são a transferência eletrônica fotoinduzida (PET), a transferência intramolecular de carga (ICT) e a transferência de energia por ressonância de Förster (FRET).<sup>11,12,15</sup>

#### Transferência eletrônica fotoinduzida (PET)

A transferência eletrônica fotoinduzida tem sido dos mecanismos mais usados em sondas fluorimétricas. Na maioria dos casos, a fluorescência de um fluoróforo é suprimida devido à ocorrência de PET e pode ser reestabelecida através da inibição deste processo após a complexação do analito com o recetor.<sup>13</sup>

Este mecanismo ocorre quando o recetor possui átomos que contêm pares de eletrões não ligantes. Desta forma, a orbital molecular ocupada de maior energia, HOMO, do recetor vai estar localizada a uma energia intermédia entre a HOMO e a LUMO do fluoróforo. Assim, quando ocorre a excitação de um eletrão da HOMO para a LUMO do fluoróforo por absorção de radiação, pode acontecer uma transferência do eletrão da HOMO do recetor para a HOMO do fluoróforo, provocando assim uma inibição da fluorescência devido à transição do estado excitado para o estado fundamental ser feita por um caminho alternativo não-radiativo.<sup>18</sup>

Quando o par de eletrões não ligantes presentes no recetor está envolvido numa complexação, a energia da HOMO do recetor baixa, pelo que a probabilidade de transferência de um eletrão entre a HOMO do recetor para a HOMO do fluoróforo diminui consideravelmente. Desta forma, a relaxação do eletrão da LUMO do fluoróforo para a respetiva HOMO ocorre através da emissão de fluorescência (**Figura 3**).<sup>19</sup>

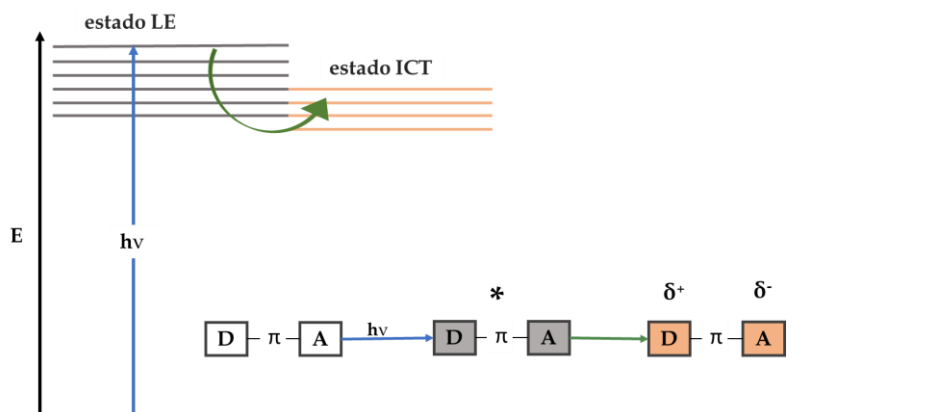


**Figura 3.** Processo de sinalização baseado na transferência eletrónica fotoinduzida representado através do diagrama das orbitais moleculares, adaptada da referência 19.

### Transferência intramolecular de carga (ICT)

No contexto das sondas fluorescentes, a transferência interna de carga é característica em fluoróforos que possuem grupos dadores (D) e aceitadores (A) de eletrões ligados através de sistemas  $\pi$ -conjugados. A excitação radiativa destas moléculas resulta num estado localmente excitado (LE), a partir do qual se forma um estado excitado através de ICT devido à cedência de um eletrão do grupo dador para o grupo aceitador, o que leva a redistribuição da densidade eletrónica formando um momento

dipolar acentuado (**Figura 4**). Desta forma, o fluoróforo pode apresentar dupla emissão de fluorescência correspondente aos diferentes estados excitados.<sup>20</sup>



**Figura 4** . Diagrama de energia associado ao mecanismos ICT em compostos com grupos doadores (D) e aceptores (A) de elétrons ligados através de sistemas  $\pi$ -conjugados, adaptada da referência 20.

A conjugação de um fluoróforo com uma subunidade de reconhecimento com capacidade ICT constitui uma das estratégias para o desenvolvimento de novas sondas fluorescentes (**Figura 5**). A complexação destes recetores com o analito pode induzir a ativação ou inibição do estado excitado através de ICT, o que resulta num deslocamento do espectro de excitação/emissão do fluoróforo para comprimentos de onda superiores (desvio batocrômico) ou para comprimentos de onda inferiores (desvio hipsocrômico).<sup>21</sup>

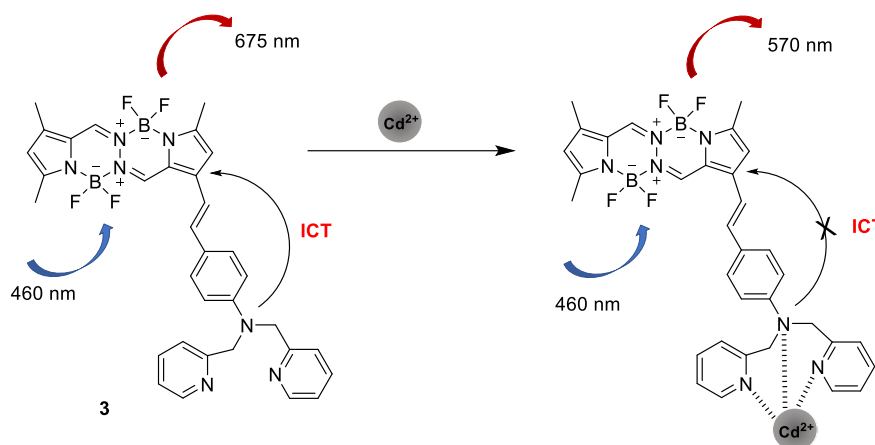


Figura 5. Sensor fluorimétrico de  $\text{Cd}^{2+}$  baseado no mecanismo ICT, adaptada da referência 21.

Assim, a ICT resulta num sinal “raciométrico” que permite diminuir interferências através da autocalibração entre a banda de excitação/emissão correspondente à sonda fluorescente e a banda de excitação/emissão do complexo sonda-analito, permitindo uma determinação quantitativa em amostras mais complexas (células e tecidos vivos).<sup>11,22,23,24,25,26</sup>

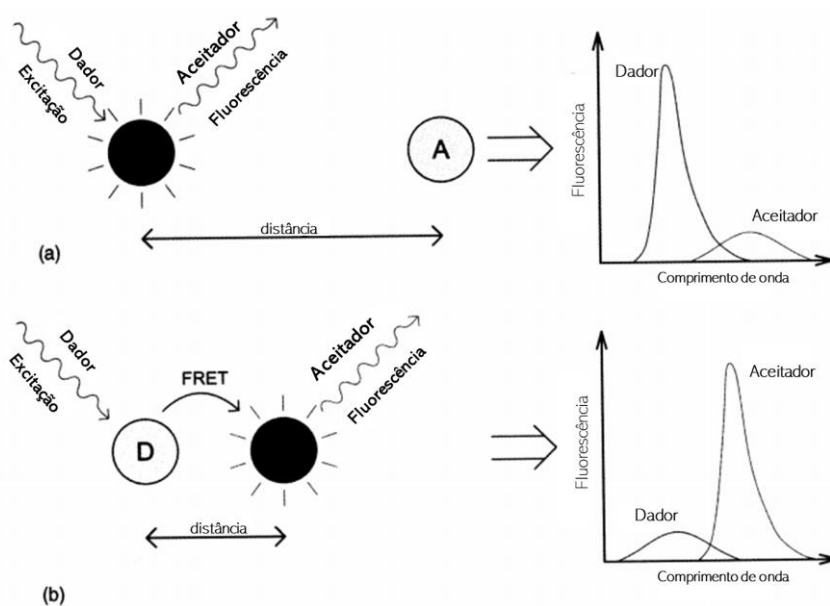
### Transferência de energia por ressonância de Förster (FRET)

A transferência de energia por ressonância de Förster é um processo através do qual é possível gerar um sinal fluorimétrico sensível às conformações e associações moleculares. Este mecanismo de sinalização permitiu uma evolução das áreas do diagnóstico médico e biologia molecular já que possibilita o estudo da conformação de macromoléculas (por exemplo proteínas e ácidos nucleicos) e monitorização de eventos dinâmicos biomoleculares (por exemplo atividade enzimática) através da ativação ou inibição de FRET.<sup>27,28,29,30</sup> As propriedades de emissão dos sistemas fluorimétricos baseados neste mecanismo são bastante promissoras já que os elevados comprimentos de onda de excitação exibidos por estas moléculas permitem diminuir os efeitos de autofluorescência e danificação das matrizes biológicas.<sup>31</sup>

Para além disso, os sensores químicos baseados em FRET são uma ferramenta poderosa para a deteção e quantificação de vários analitos, tal como iões metálicos com importância ambiental e biológica.<sup>32,33,34</sup>



A transferência de energia por ressonância de Förster é um fenômeno eletrodinâmico através do qual ocorre um processo não-radiativo em que a energia de uma molécula no estado excitado (dador) é transferida para outra molécula no estado fundamental (aceitador). A eficiência deste mecanismo está diretamente dependente da distância a que a espécie dadora se encontra da espécie aceitadora, devendo estar próximas o suficiente (10-100 Å) para que ocorra FRET. Por outro lado, tem que ocorrer uma sobreposição do espectro de emissão do dador com o espectro de excitação do aceitador, de forma a que este seja capaz de absorver a energia emitida pelo dador. Assim, a emissão de fluorescência detetada será correspondente à da espécie aceitadora, caso seja um fluoróforo (**Figura 6**).<sup>35</sup> No caso do aceitador ser um *quencher*, será analisada a diminuição da fluorescência do dador.

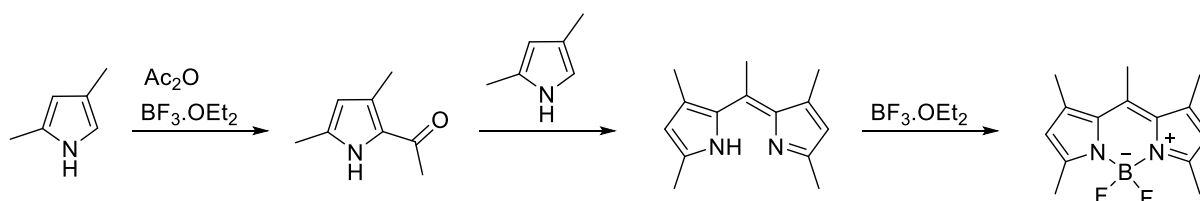


**Figura 6.** Representação da influência da aproximação molecular entre duas espécies dador/aceitador na eficiência do mecanismo de FRET, adaptada da referência 35.

Tal como no caso do mecanismo ICT, é possível desenvolver sensores “raciométricos” baseados no FRET recorrendo às intensidades de fluorescência para os diferentes comprimentos de onda de emissão. Adicionalmente, estas sondas fluorescentes apresentam normalmente um desvio de Stokes elevado, o que permite uma maior eficiência na deteção de fluorescência e uma diminuição da possibilidade de *self-quenching*.<sup>36,37</sup>

### 1.3. Derivados de BODIPY

Atualmente, existe uma enorme variedade de compostos orgânicos desenvolvidos no âmbito dos sensores químicos óticos, no entanto os derivados de 4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-sindaceno, designados usualmente como BODIPYs, constituem uma nova classe de fluoróforos que tem vindo a destacar-se na investigação com abordagem supramolecular. A sua descoberta ocorreu em 1968 por Treibs e Kreuzer (**Esquema 5**)<sup>38</sup>, no entanto, até ao final da década de 1980 poucos foram os estudos feitos usando estes compostos. Desde então, tem-se verificado um aumento exponencial do seu reconhecimento por parte da comunidade científica, resultando no *design* de novos derivados de BODIPY com as mais variadas aplicações.<sup>39,40,41</sup>



**Esquema 5.** Esquema de síntese proposto por Treibs e Kreuzer para a acetilação do pirrol que resultou na obtenção do primeiro derivado de BODIPY.<sup>38</sup>

A estrutura do núcleo do BODIPY apresenta duas unidades pirrónicas unidas por uma ponte metino, que por sua vez estão complexadas, através do par de elétrons não ligantes do nitrogénio pirrónico, com um grupo difluoroborilo (**Figura 7**). Devido à sua estrutura simétrica, o momento de dipolo molecular está orientado ao longo do eixo transversal e a carga negativa está localizada em torno dos átomos de flúor, enquanto que a carga positiva está situada na posição *meso* (**Figura 8**). O núcleo do cromóforo é totalmente plano e rígido, o que garante a elevada probabilidade do relaxamento da molécula excitada por processos radiativos, evitando a desativação por transições não-radiativas, tal como conversão interna e cruzamento intersistemas.<sup>42</sup>

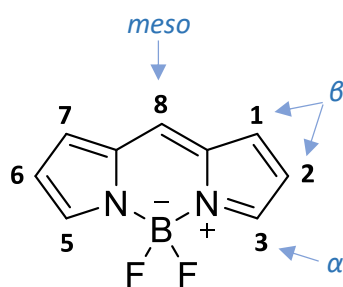


Figura 7. Estrutura química do núcleo do BODIPY e numeração respectiva.

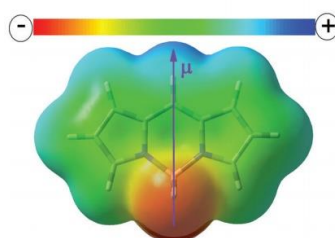
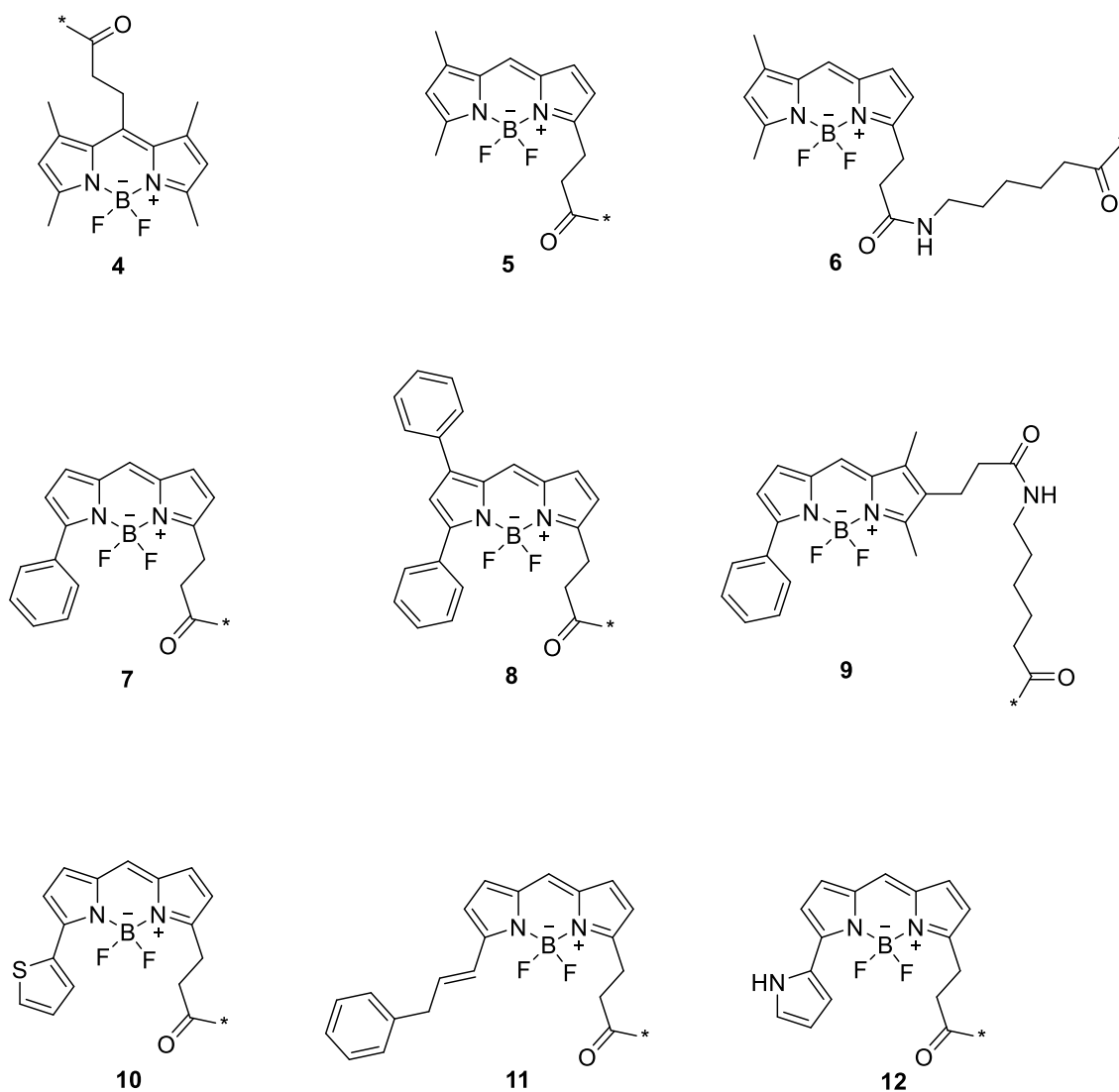


Figura 8. Mapa de potencial eletrostático e distribuição de cargas do núcleo do BODIPY.<sup>42</sup>

A popularidade crescente desta classe de compostos deve-se particularmente à sua estabilidade química e fotoquímica, às suas características fotofísicas, das quais se destacam o elevado coeficiente de absorvidade molar ( $\epsilon$ ), o elevado rendimento quântico de fluorescência ( $\Phi_f$ ), tempo de vida no estado excitado relativamente longo e as bandas de absorção/emissão com comprimento de onda na zona do visível.<sup>39,40</sup>

A biblioteca de BODIPYs disponíveis comercialmente (**Figura 9**) reflete não só a importância desta classe de compostos, bem como a possibilidade de funcionalização e obtenção de BODIPYs com diversas propriedades.<sup>43</sup>

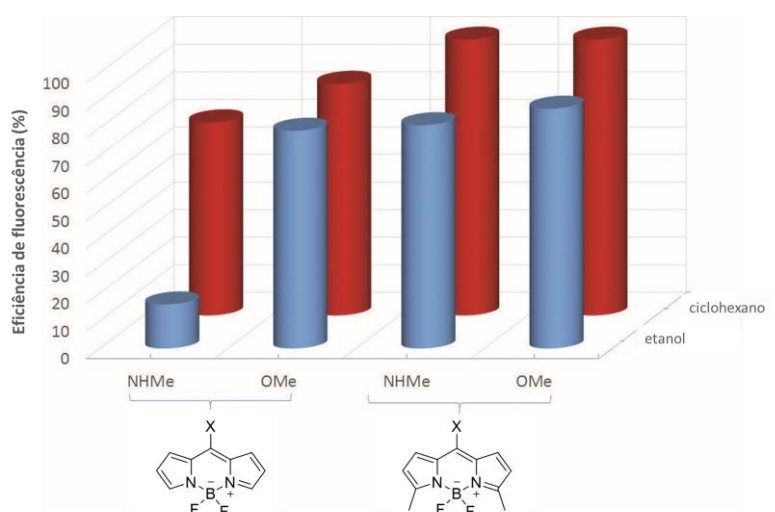


**Figura 9.** Estrutura química de diversos BODIPYs disponíveis comercialmente (\* grupo éster NHS), adaptada da referência 43.

De facto, o núcleo do BODIPY pode ser facilmente funcionalizado com diferentes grupos substituintes através de diversas vias de síntese, com o intuito de otimizar as suas propriedades químicas e fotofísicas. Existem várias estratégias para modelar as bandas de absorção e emissão do BODIPY, induzindo desvios hipsocrômicos ou batocrômicos nos espetros, mas mantendo a alta eficiência de fluorescência.<sup>40</sup>

A funcionalização do núcleo do BODIPY com heteroátomos diretamente ligados na posição *meso* é uma das estratégias para induzir desvios hipsocrômicos. Consoante a eletronegatividade e a capacidade dadora de eletrões do átomo ou grupo de átomos introduzidos poderá obter-se um desvio espectral de moderado a acentuado. Este efeito está relacionado com um aumento da energia associada à orbital molecular desocupada de menor energia (LUMO) na presença do átomo ou grupo de átomos dadores, o que leva a uma maior separação energética em relação à orbital molecular ocupada de maior energia (HOMO). Desta forma, a transição eletrónica é energeticamente superior, o que se reflete no deslocamento da banda de absorção/emissão para comprimentos de onda inferiores. Os grupos substituintes podem ser facilmente introduzidos na posição *meso* através de reações de substituição nucleofílica. Esta posição específica é bastante suscetível ao efeito do grupo dador, uma vez que estes provocam uma alteração acentuada da densidade eletrónica do núcleo do BODIPY.<sup>44,45,46,47</sup>

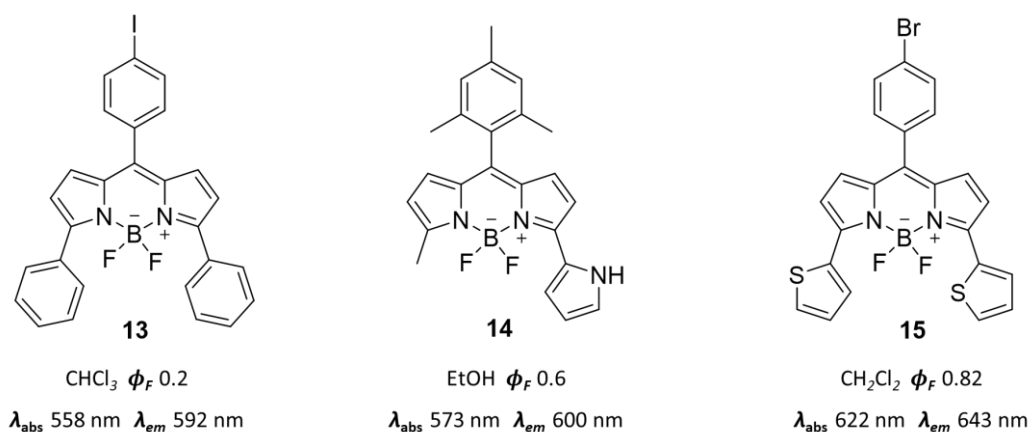
No entanto, a funcionalização do BODIPY com os heteroátomos pode influenciar a eficiência da fluorescência. Por exemplo, os BODIPYs que contêm um grupo metoxilo (-OMe) na posição *meso* são bastante fluorescentes, independentemente de fatores externos. Contrariamente, a emissão de fluorescência pelos análogos com grupos metilamino (-NHMe) depende da polaridade do solvente. O *quenching* da fluorescência nesses derivados poderá estar associado ao mecanismo ICT. A elevada capacidade dadora do grupo amino leva a um deslocamento do espetro para comprimentos de onda inferiores, no entanto esta capacidade poderá induzir ICT, uma vez que o núcleo do BODIPY atua como espécie aceitadora de eletrões. Por outro lado, a capacidade dadora do grupo metoxilo parece não ser suficiente para ativar o mecanismo ICT, mantendo a eficiência de fluorescência do composto elevada. Adicionalmente, a introdução de grupos alquilo na posição 3 e 5 diminui o caráter aceitador do núcleo e reduz a probabilidade de ocorrência do efeito ICT (**Figura 10**).<sup>42</sup>



**Figura 10.** Eficiência de fluorescência de derivados de BODIPY funcionalizados com grupos metilamino e metoxilo na posição *meso* e grupos alquila nas posições 3 e 5 em solvente polar (etanol) e apolar (ciclohexano), adaptada da referência 42.

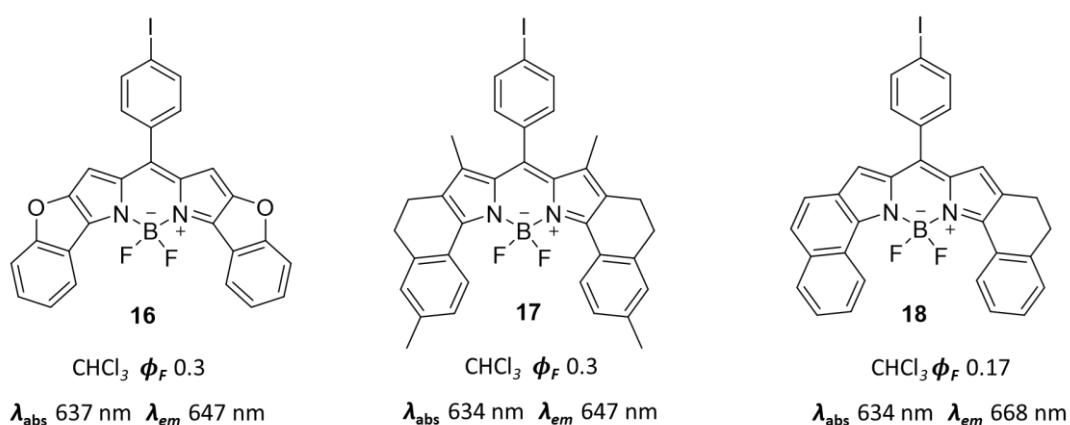
No que diz respeito aos desvios batocrômicos, estão descritas na literatura diferentes estratégias com o intuito de modelar os espectros para comprimentos de onda superiores, tal como a funcionalização com grupos de forma a aumentar a extensão do sistema  $\pi$ -conjugado ou ainda através da substituição do carbono *meso* por um átomo de nitrogénio (aza-BODIPY).<sup>48</sup>

De facto, o método mais direto para a extensão da deslocalização eletrónica do BODIPY é a introdução de grupos (hetero)aromáticos nas posições 3 e 5. A introdução de grupos fenilo nestas posições aumenta a extensão do sistema  $\pi$ -conjugado, no entanto os desvios batocrômicos são limitados. Por outro lado, a funcionalização com unidades aromáticas heterocíclicas tal como o pirrol e o tiofeno induz um deslocamento mais acentuado das bandas de absorção/emissão (**Figura 11**).<sup>48</sup>



**Figura 11.** Exemplos de derivados de BODIPY funcionalizados com diferentes grupos (hetero)aromáticos e respectivos comprimentos de onda de absorção/emissão, adaptada da referência 48.

Comparativamente à funcionalização com os grupos anteriormente mencionados, a extensão do sistema  $\pi$ -conjugado poderá ser mais eficiente através da fusão do BODIPY com grupos heterocíclicos. Esta estratégia permite aumentar a conjugação do sistema mantendo a rigidez estrutural, de forma a reduzir a possibilidade de perdas de energia do estado excitado através da rotação dos substituintes aromáticos, mantendo assim a eficiência de fluorescência (**Figura 12**).<sup>48</sup>



**Figura 12.** Exemplos de derivados de BODIPY obtidos através da fusão com diferentes grupos (hetero)aromáticos e respectivos comprimentos de onda de absorção/emissão, adaptada da referência 48.

Nos últimos anos, os derivados aza-BODIPYs, nos quais o átomo de carbono da posição *meso* foi substituído pelo átomo de nitrogênio, têm surgido como uma classe promissora de compostos com bandas de absorção/emissão na região do infravermelho próximo. De modo semelhante ao BODIPY, os aza-BODIPY podem ser funcionalizados no sentido de aumentar a extensão do sistema  $\pi$ -conjugado, tanto através da introdução de substituintes heterocíclicos, assim como através da fusão com unidades aromáticas (Figura 13).<sup>48,49</sup>

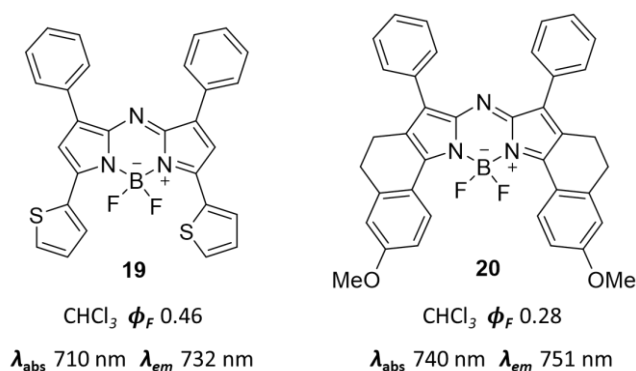


Figura 13. Exemplos de aza-BODIPYs e respectivos comprimentos de onda de absorção/emissão, adaptada da referência 48.

A versatilidade química dos BODIPYs despertou grande interesse nas mais diversas áreas de investigação, podendo ser aplicado como sonda fluorescente em bioimagem para a detecção e marcação de biomoléculas, como agente fotossensibilizador na terapia fotodinâmica (PDT) para o tratamento de cancro ou na inativação fotodinâmica (PDI) de microorganismos patogênicos. Pode ainda ser utilizado como sensor químico óptico para diversos analitos, como componente orgânico em células solares sensibilizadas por corante (DSSC) e, ainda, como complexo antena em sistemas fotossintéticos.<sup>50,51,52,53,54</sup>



### 1.3.1. BODIPY como sensor ótico: reconhecimento de iões metálicos

Os iões metálicos desempenham um papel fundamental em diversos processos bioquímicos, como por exemplo, a nível do sistema nervoso, os iões  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$  participam no mecanismo de transmissão de impulsos nervosos através da alteração do potencial elétrico das membranas celulares. Podem ainda formar complexos com proteínas (metaloproteínas), permitindo a sua regulação a nível de atividade enzimática (por exemplo  $\text{Cu}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ) ou o transporte de moléculas, tal como a presença do  $\text{Fe}^{2+}$  na hemoglobina fazendo com que esta seja capaz de transportar o oxigénio através da corrente sanguínea.<sup>55,56</sup> Por outro lado, variações significativas das concentrações destas espécies iónicas podem induzir uma desregulação dos sistemas biológicos.<sup>57,58</sup>

O desenvolvimento de métodos capazes de quantificar iões metálicos é uma área de investigação que tem sofrido um crescimento significativo. A espectroscopia de absorção e emissão atómica, a espetrometria de massa acoplada a plasma indutivo e a voltametria de redissolução anódica representam algumas das técnicas analíticas utilizadas, no entanto apresentam custos elevados e não permitem um monitorização contínua.<sup>59</sup> Já os métodos baseados em sensores fluorimétricos apresentam diversas vantagens em termos de sensibilidade, tempos de resposta e monitorização localizada (por exemplo através da microscopia de fluorescência).<sup>56,60</sup> A combinação de sondas fluorescentes com a microscopia permite resolver questões relativas à existência e localização de metais no meio intracelular assim como a forma como a concentração do metal origina uma resposta a eventos celulares.<sup>61,62</sup>

O recurso a sensores químicos capazes de detetar seletivamente catiões/aniões constitui uma ferramenta extremamente importante para a ciência moderna.<sup>6,8,9,13,14,63,64,65,66,67</sup>

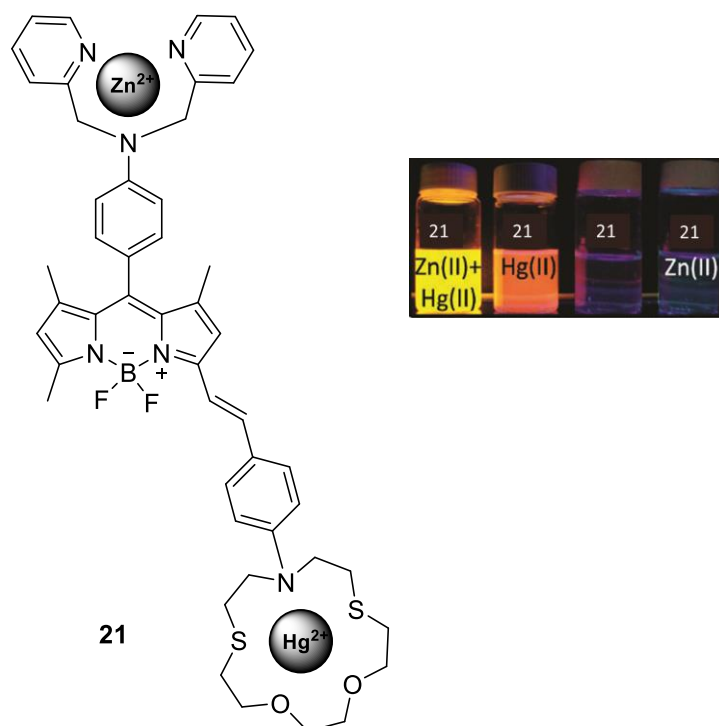
Os sensores químicos devem ser sensíveis e seletivos, pelo que uma das estratégias durante o seu *design* foca-se na modificação da estrutura da subunidade de reconhecimento dos iões metálicos (ionóforo). A seletividade está relacionada com a força de interação responsável pela formação do complexo metal-sensor e é influenciada por diversos fatores, tais como a natureza química dos átomos do ionóforo, a estereoquímica do complexo metálico (rigidez, posição do local de coordenação), as propriedades eletrónicas do ião metálico, o estado de oxidação, o raio iónico e o seu carácter “duro-macio” (teoria HSAB, do inglês, *Hard-Soft Acids-Bases*). A teoria de HSAB permite explicar a estabilidade relativa

dos complexos metálicos através do princípio de que os ácidos duros coordenam preferencialmente com bases duras e os ácidos macios coordenam preferencialmente com bases macias. Os termos “macio-duro” descrevem a capacidade elevada/baixa de polarizabilidade dos ácidos e bases de Lewis que formam o composto de coordenação. Desta forma, os iões metálicos macios (por exemplo  $\text{Cu}^+$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ) têm maior afinidade para ionóforos com átomos macios (por exemplo os átomos de fósforo e enxofre), os iões metálicos duros (por exemplo  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ) formam complexos mais estáveis com átomos duros (por exemplo o átomo de oxigénio), já os iões metálicos com carácter intermédio (por exemplo  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Pd}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ) ligam-se preferencialmente com átomos de acidez/basicidade intermédia (por exemplo o átomo de nitrogénio).<sup>9,68,69,70,71</sup>

Desta forma, através da funcionalização do núcleo de BODIPY é possível desenvolver sensores moleculares seletivos para a deteção de diversos iões metálicos, assim como otimizar as suas propriedades de absorção/emissão e modelar o mecanismo de sinalização envolvido no processo de reconhecimento. Os principais mecanismos de sinalização dos sensores fluorimétricos baseados em derivados de BODIPY são a transferência de eletrões fotoinduzida (PET) e a transferência intramolecular de carga (ICT). A distinção mais evidente entre os sensores baseados no PET e os sensores que seguem o mecanismo ICT reside no tipo de resposta fluorescente após a coordenação com o analito em estudo. No caso de se tratar de um mecanismo de transferência de eletrões, assim que o analito se liga ao sensor ocorre uma alteração da intensidade de fluorescência, não se verificando alteração na posição das bandas de emissão. Quando o sensor é baseado na transferência intramolecular de carga verifica-se um desvio hipsocrómico/batocrómico no espectro de emissão do sensor livre em relação ao do complexo sensor-analito. Simultaneamente, pode ocorrer uma variação de cor, o que permite a deteção a olho nu, resultando em sensores cromofluorogénicos bastante promissores.<sup>72,73,74</sup>

O composto **21** representado na **figura 14** ilustra a influência que a posição em que a subunidade de reconhecimento está ligada ao núcleo do BODIPY tem no mecanismo de sinalização, assim como as diferentes afinidades que estas subunidades têm para diferentes catiões metálicos. Neste caso verificou-se que a substituição do núcleo do BODIPY na posição *meso* com um grupo dador permite modelar o mecanismo PET, já a substituição na posição  $\alpha$  influencia a eficiência do processo de ICT. Para além disso, foi demonstrado que o ião mercúrio(II) tinha maior afinidade para o recetor na posição  $\alpha$  e o ião zinco(II) para o ligando na posição *meso*, o que vai de encontro com a teoria HSAB. Desta forma, a

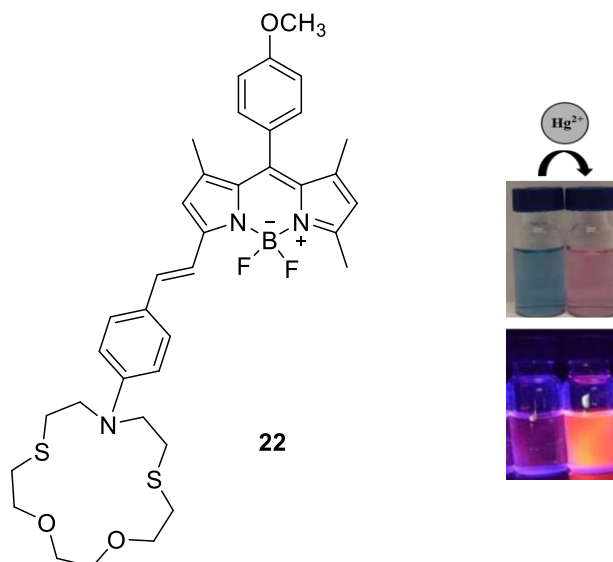
coordenação do derivado de BODIPY com o mercúrio(II) induzia um desvio hipsocrômico da banda de emissão sem alteração da intensidade de fluorescência. Contrariamente, a interação do zinco(II) bloqueia o mecanismo PET, o que resulta num aumento da intensidade de fluorescência, sem alteração da posição da banda de emissão.<sup>73</sup>



**Figura 14.** Representação do local de interação entre o derivado de BODIPY e os íões mercúrio e zinco, adaptada da referência 73.

Recentemente foi publicado um novo derivado de BODIPY como sensor cromofluorogénico para a deteção de mercúrio(II) em solução aquosa pelo grupo de investigação onde se desenvolveu esta tese de mestrado (**Figura 15**). O derivado de BODIPY foi funcionalizado na posição  $\alpha$  com uma subunidade recetora de tioza éter de coroa que revelou ser seletiva para o mercúrio(II) num solvente mais competitivo, isto é, em solução de acetonitrilo/água (95:5), originando simultaneamente um sinal fluorimétrico e colorimétrico. A coordenação do ião metálico com o composto refletiu-se através da inibição do caráter ICT das bandas de UV-Vis, ou seja, verificou-se um desvio hipsocrômico da banda de absorção. É de salientar que a alteração da absorção é claramente visível a olho nu, já que a solução

deste derivado de BODIPY mudou de azul para cor-de-rosa. Simultaneamente, verificou-se um aumento progressivo da intensidade de fluorescência com adições sucessivas de mercúrio(II).<sup>75</sup>



**Figura 15.** Derivado de BODIPY como sensor cromofluorogénico seletivo de mercúrio(II) em solução aquosa, adaptada da referência 75.

### 1.3.2. BODIPY como sonda fluorescente: aplicação em bioimagem molecular

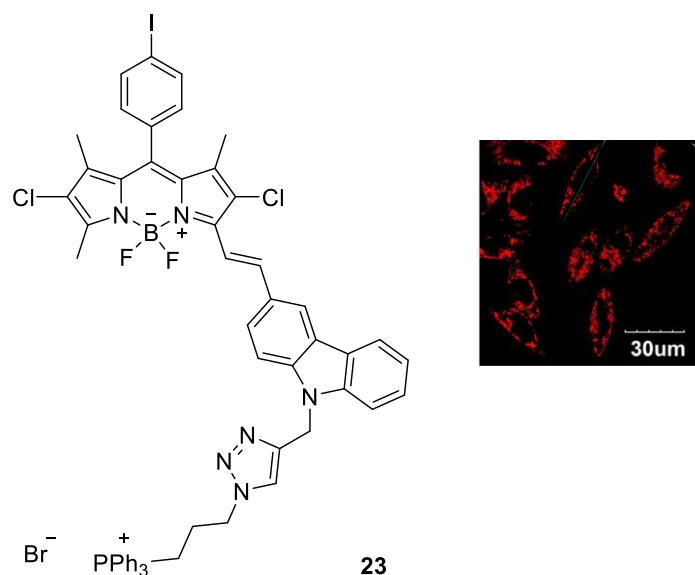
A bioimagem molecular compreende um conjunto de técnicas que permitem a deteção, visualização e caracterização, em tempo real, de estruturas e fenómenos biológicos que acontecem a nível molecular e celular, no interior de organismos. De entre as diversas técnicas disponíveis, tais como a marcação com radioisótopos ou a ressonância magnética, a imagem por fluorescência revelou ser uma ferramenta bastante promissora, já que apresenta elevada sensibilidade e precisão, permite obter imagens de alta resolução de uma forma não-invasiva e sem perturbar as funções celulares. Para além disso, utilizando a microscopia de fluorescência é possível obter informação detalhada da dinâmica de células vivas e saudáveis durante a aquisição das imagens.<sup>76</sup>

Com a continua evolução da bioimagem de fluorescência, surgiu a necessidade de desenvolver sondas fluorescentes para a marcação de biomoléculas (por exemplo proteínas, lípidos, ADN), estruturas/organelos celulares (por exemplo mitocôndria, lisossoma, retículo endoplasmático) ou

sensíveis a alterações das condições fisiológicas (por exemplo viscosidade, pH, potencial de membrana) de forma a facilitar o estudo do comportamento celular. Por outro lado, estas sondas constituem uma ferramenta bastante promissora no âmbito do diagnóstico precoce de várias doenças e avaliação da eficiência de terapias através de sistemas de libertação de fármacos.<sup>77,78,79</sup>

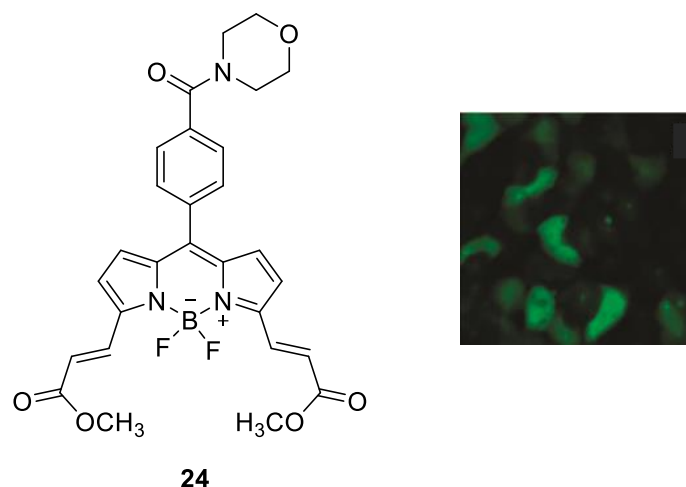
Neste sentido existem várias classes de moléculas orgânicas que são tradicionalmente utilizadas como fluoróforos, das quais se destacam as cianinas, as rodaminas, as cumarinas e as fluoresceínas. No entanto, novas classes de compostos têm sido usadas nesta área e mais uma vez, os derivados de BODIPY, devido às suas excelentes propriedades fotofísicas mencionadas anteriormente, têm demonstrado ser sondas fluorescentes promissoras para aplicação em bioimagem. De facto, é de salientar que a sua elevada estabilidade fotofísica permite obter imagens dos sistemas biológicos durante um maior período de tempo sem perda significativa da eficiência de fluorescência inicial. Adicionalmente, a facilidade de funcionalização do núcleo do BODIPY permite também melhorar a sua solubilidade em meio aquoso e a permeabilidade celular.<sup>50</sup>

Por outro lado, a possibilidade de ajustar as propriedades fotofísicas dos derivados de BODIPY de forma a que estes sejam excitáveis na região do infravermelho próximo (NIR) representa uma vantagem (**Figura 16**). Os fluoróforos frequentemente empregues em bioimagem utilizam radiação na região UV-Vis, no entanto quando as amostras biológicas são submetidas a esta radiação a probabilidade de ocorrer autofluorescência e interferir com a fluorescência da sonda fluorescente é maior. Consequentemente, a exposição prolongada das células vivas à radiação UV poderá causar danos biológicos. Logo, ao utilizar a radiação NIR, de menor energia, estes inconvenientes poderão ser ultrapassados.<sup>78,79,80</sup>



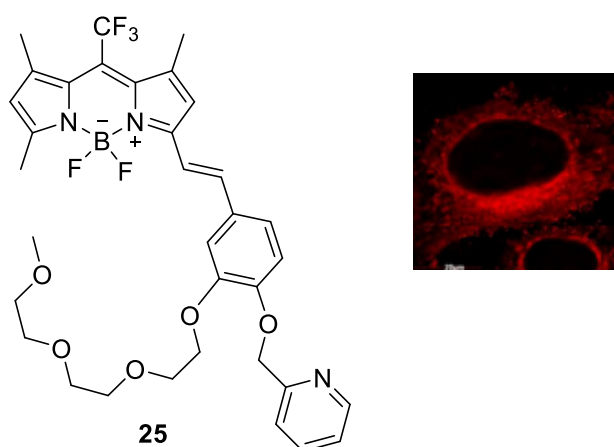
**Figura 16.** Exemplo de derivado de BODIPY como sonda de fluorescência NIR, adaptada da referência 80.

O derivado de BODIPY **23** representado na **figura 17** foi desenvolvido para a marcação específica de proteínas no meio intracelular. O composto apresenta um desvio do espectro de excitação e emissão para comprimentos de onda superiores quando interage com a estrutura proteica. O facto da posição espacial entre os dois grupos acrílo da sonda fluorescente ser semelhante à distância que separa os dois grupos reativos da proteína alvo, permite uma interação sonda fluorescente-alvo bastante eficiente e específica.<sup>81</sup>



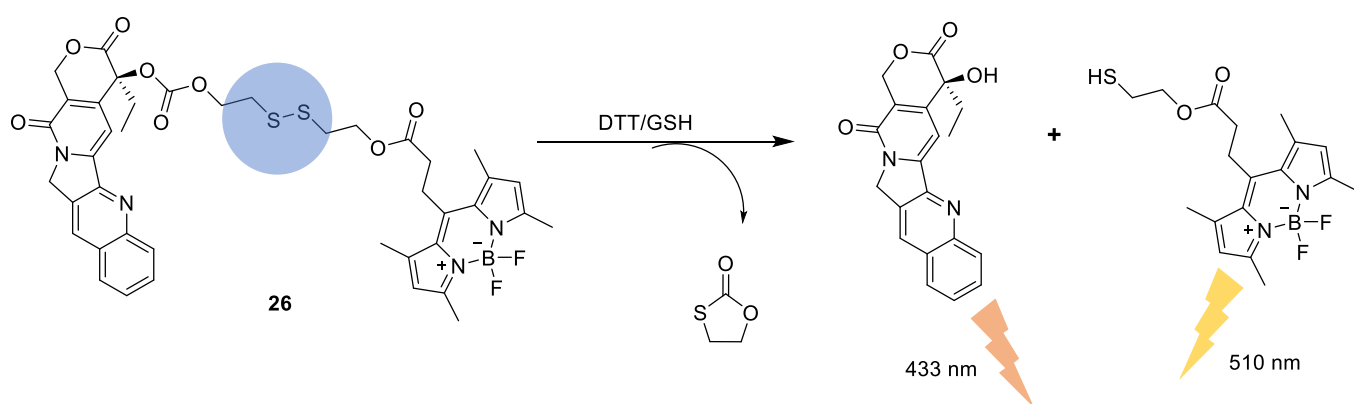
**Figura 17.** Exemplo de derivado de BODIPY para a marcação de estruturas proteicas, adaptada da referência 81.

Recentemente foi publicada uma nova sonda fluorescente baseada nesta classe de compostos para a localização da mitocôndria (**Figura 18**). A funcionalização na posição 3 do núcleo do BODIPY permitiu equilibrar o caráter hidrofílico-lipofílico da sonda fluorescente, aumentando assim a sua permeabilidade celular. Por outro lado, foi introduzido o grupo  $-CF_3$  na posição *meso* com o intuito de aumentar a afinidade e a acumulação específica do fluoróforo na mitocôndria.<sup>82</sup>



**Figura 18.** Exemplo de derivado de BODIPY para a marcação da mitocôndria, adaptada da referência 82.

Foi também recentemente reportado um derivado de BODIPY **26** como componente de sistemas de liberação de fármacos (**Esquema 6**). O fluoróforo foi incorporado na estrutura de um fármaco antitumoral (camptotecina) através de uma ligação dissulfureto. Assim que o sistema é captado pelas células-alvo, ocorre a quebra da ligação devido aos agentes redutores presentes no meio intracelular (DTT/GSH) e, conseqüentemente, verifica-se um aumento da emissão de fluorescência a 433 nm e a 510 nm. Desta forma, através das alterações desta dupla fluorescência é possível monitorizar em tempo real a liberação do fármaco a nível celular e determinar a eficiência da terapia.<sup>83</sup>



**Esquema 6.** Exemplo de derivado BODIPY como componente de sistema de liberação de fármacos, adaptado da referência 83.



## Capítulo 2

# *Descrição Experimental*

## 2. Descrição Experimental

Os espectros de absorção UV-Vis foram obtidos num espectrofotômetro UV/2501PC (Shimadzu) e os espectros de emissão de fluorescência foram obtidos num espectralfluorímetro FluoroMax-4 (Horiba).

Os espectros de ressonância magnética nuclear de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  foram registados num aparelho Bruker Avance III a 400 MHz e 100,6 MHz, respetivamente, utilizando o pico do solvente como referência interna. A atribuição dos sinais de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  foi efetuada recorrendo às técnicas de correlação heteronuclear bidimensionais. Os solventes deuterados utilizados na espectroscopia de ressonância magnética nuclear foram o  $\text{CDCl}_3$  com 99,8% de grau de deuturação, contendo 0,03% v/v de tetrametilsilano e o  $\text{DMSO-}d_6$  com grau de deuturação de 99,9%, contendo 0,1% v/v de tetrametilsilano, ambos da marca Aldrich.

Os espectros de massa de baixa e alta resolução foram realizados no “C.A.C.T.I. – *Unidade de Espectrometria de Masas*”, na Universidade de Vigo, Espanha.

Os espectros de IV foram obtidos num aparelho ABB FTLA2000, em pastilha de KBr.

A cromatografia em camada fina (TLC) foi efetuada em placa de sílica gel 60 com indicador de fluorescência F254 (Merck). A cromatografia em coluna foi efetuada usando sílica gel 60 de diâmetro entre 230-400 mesh (Merck).

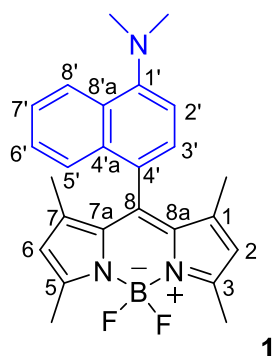
Os reagentes e solventes das marcas Sigma-Aldrich, Acros e Fluka foram utilizados tal como recebidos.

A intensidade de fluorescência determinada nos estudos biológicos foi obtida através do leitor de microplacas SYNERGY H1 (Biotek).

As imagens de fluorescência em meio celular foram adquiridas através do microscópio confocal LSM 780 (Zeiss).

## 2.1. Síntese de derivados de BODIPY

### 2.1.1. Síntese do derivado de BODIPY 1 funcionalizado na posição *meso*



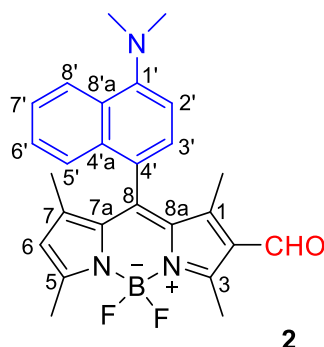
O 2,4-dimetilpirrol (190 mg, 2 mmol) e o 4-(*N,N*-dimetilamino)-1-naftaldeído (200 mg, 1 mmol) foram dissolvidos em DCM seco (100 mL). Foi adicionada uma gota de TFA e a mistura reacional foi colocada sob agitação, à temperatura ambiente, durante 50 minutos. Uma solução de DDQ (331 mg, 1,5 mmol) dissolvida em DCM seco (100 mL) foi adicionada à mistura. A agitação continuou por mais 50 minutos. De seguida, adicionou-se trietilamina (1,7 mL, 12 mmol) e após 15 minutos foi adicionado  $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$  (2,5 mL, 20 mmol), ficando sob agitação durante 30 minutos. O resíduo obtido por evaporação foi submetido a uma cromatografia *dry flash* (éter petróleo/AcOEt, 4:1). O BODIPY puro **1** foi obtido na forma de um sólido vermelho escuro (63 mg, 22%).

**$^1\text{H RMN}$**  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 1,09 (s, 6H,  $\text{CH}_3$ -1 e  $\text{CH}_3$ -7), 2,58 (s, 6H,  $\text{CH}_3$ -3 e  $\text{CH}_3$ -5), 3,05 (s, 6H,  $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ), 5,94 (s, 2H, H-2 e H-6), 7,25 (d,  $J$ =7,6 Hz, 1H, H-2'), 7,30 (d,  $J$ =7,6 Hz, 1H, H-3'), 7,44 (dt,  $J$ =1,2 e 7,2 Hz, 1H, H-7'), 7,54 (dt,  $J$ =1,2 e 7,4 Hz, H-6'), 7,77 (d,  $J$ =8,4 Hz, 1H, H-5'), 8,31 (d,  $J$ =8,4 Hz, 1H, H-8') ppm.

**$^{13}\text{C RMN}$**  (100,6 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 13,89 ( $\text{CH}_3$ -1 e  $\text{CH}_3$ -7), 14,60 ( $\text{CH}_3$ -3 e  $\text{CH}_3$ -5), 45,53 ( $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ), 114,08 (C2'), 121,07 (C2 e C6), 123,88 (C8'), 125,55 (C5'), 125,83 (C3'), 126,16 (C6'), 127,18 (C7'), 128,04 (C4'), 132,19 (C7a e C8a), 132,95 (C4'a e C8'a), 140,36 (C8), 143,01 (C1 e C7), 150,25 (C1'), 155,43 (C3 e C5) ppm.

**EM** (ESI)  $m/z$  (%): 419 ( $[\text{M} + 2]^+$ , 27), 418 ( $[\text{M} + 1]^+$ , 100), 417 ( $[\text{M}]^+$ , 40), 291 (4), 102 (5); **EMAR** (ESI)  $m/z$ :  $[\text{M} + 1]^+$  calculado para  $\text{C}_{25}\text{H}_{27}\text{BF}_2\text{N}_3$ , 418,2261; obtido 418,2269.

### 2.1.2. Síntese do derivado de BODIPY 2 formilado através da reação de Vilsmeier-Haack



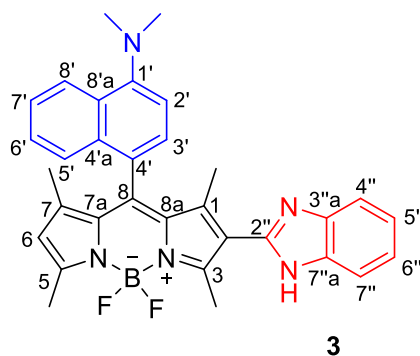
Uma mistura de DMF (1,79 mL, 23 mmol) e POCl<sub>3</sub> (1,70 mL, 18,2 mmol) foi colocada em agitação num banho de gelo durante 5 minutos sob atmosfera de azoto. Deixou-se a mistura atingir a temperatura ambiente e de seguida ficou sob agitação durante 30 minutos. Adicionou-se o BODIPY 1 (50 mg, 0,127 mmol) dissolvido em dicloroetano (7 mL) à mistura reacional. A mistura foi aquecida a 50 °C e ficou em agitação durante 2 horas. Após arrefecimento da mistura reacional à temperatura ambiente, esta foi lentamente adicionada a uma solução aquosa saturada de NaHCO<sub>3</sub> (40 mL) num banho de gelo. A mistura obtida foi retirada do banho de gelo tendo permanecido em agitação por mais 30 minutos. Adicionou-se acetato de etilo (5 mL) à mistura e a fase orgânica obtida foi lavada com água destilada (2 x 50 mL). Posteriormente, a fase orgânica foi seca com sulfato de magnésio anidro, filtrada e concentrada por evaporação num evaporador rotativo. O composto foi purificado por cromatografia em coluna, usando como eluente o diclorometano, tendo-se obtido o BODIPY 2 puro na forma de um sólido vermelho escuro (32 mg, 59 %).

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 1,12 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-7), 1,37 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-1), 2,64 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-5), 2,84 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-3), 3,13 (s, 6H, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 6,11 (s, 1H, H-6), 7,33 (m, 2H, H-2' e H-3'), 7,48 (t, *J*=7,6 Hz, 1H, H-7'), 7,62 (t, *J*=7,6 Hz, H-6'), 7,72 (d, *J*=8,4 Hz, 1H, H-5'), 8,31 (s, 1H, H-8'), 9,94 (s, 1H, CHO) ppm.

<sup>13</sup>C RMN (100,6 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 10,99 (CH<sub>3</sub>-1), 13,03 (CH<sub>3</sub>-3), 14,40 (CH<sub>3</sub>-7), 15,09 (CH<sub>3</sub>-5), 45,69 (N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 124,01 (C6), 124,19 (C8'), 125,21 (C5'), 125,60 (C2' e C3'), 126,19 (C2), 127,03 (C8a), 127,45 (C6'), 127,90 (C7'), 130,26 (C4'), 132,75 (C4'a e C8'a), 134,79 (C7a), 141,80 (C8), 142,51 (C1), 147,01 (C7), 147,19 (C1'), 156,58 (C3), 161,91 (C5), 185,87 (CHO) ppm.

**EM** (ESI)  $m/z$  (%): 447 ( $[M + 2]^{+}$ , 29), 446 ( $[M + 1]^{+}$ , 100), 445 ( $[M]^{+}$ , 28), 201 (1); **EMAR** (ESI)  $m/z$ :  $[M + 1]^{+}$  calculado para  $C_{26}H_{27}BF_2N_3O$ , 446,2210; obtido 446,2208.

### 2.1.3. Síntese do derivado de BODIPY 3 funcionalizado com benzimidazol



Num balão de fundo redondo adicionou-se o BODIPY 2 (50 mg, 0,11 mmol), etanol (10 mL) e  $NaHSO_3$  (10 mg, 0,09 mmol). A mistura permaneceu sob agitação à temperatura ambiente durante 4 horas. Após este tempo adicionou-se à mistura reacional DMF seco (5 mL) e a *orto*-fenilenodiamina (8 mg, 0,07 mmol). A solução foi aquecida durante 2 horas a 80 °C. A mistura foi arrefecida à temperatura ambiente, adicionou-se acetato de etilo (10 mL) e a fase orgânica obtida foi lavada com água (3 x 10 mL) e seca com sulfato de magnésio anidro. Evaporou-se o extrato orgânico sob vácuo no evaporador rotativo. Após purificação por cromatografia em coluna usando como eluente diclorometano obteve-se o BODIPY 3 puro (15 mg, 31%) na forma de um sólido vermelho.

**$^1H$  RMN** (400 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  = 1,10 (s, 3H,  $CH_3$ -7), 1,25 (s, 3H,  $CH_3$ -1), 2,63 (s, 3H,  $CH_3$ -5), 2,76 (s, 3H,  $CH_3$ -3), 2,90 (s, 6H,  $N(CH_3)_2$ ), 6,05 (s, 1H, H-6), 7,03 (d,  $J$ =7,6 Hz, 1H, H-2'), 7,08 (d,  $J$ =7,6 Hz, 1H, H-3'), 7,21-7,25 (m, 2H, H-5'' e H-6''), 7,27 (s, 1H, H-7'), 7,40 (t,  $J$ =1,2 e 7,6 Hz, H-6'), 7,51-7,53 (m, 2H, H-4'' e H-7''), 7,58 (d,  $J$ =8 Hz, 1H, H-5'), 8,19 (d,  $J$ =8,4 Hz, 1H, H-8') ppm.

**$^{13}C$  RMN** (100,6 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  = 12,36 ( $CH_3$ -1), 13,57 ( $CH_3$ -3), 14,21 ( $CH_3$ -7), 14,93 ( $CH_3$ -5), 45,07 ( $N(CH_3)_2$ ), 113,44 ( $C_2'$ ), 114,57 ( $C_4''$  e  $C_7''$ ), 199,03 (C2), 122,88 (C6), 123,43 ( $C_5''$  e  $C_6''$ ), 124,51 ( $C_8'$ ), 124,98 ( $C_5'$ ), 125,54 ( $C_6'$ ), 125,63 ( $C_4'$ ), 125,82 ( $C_3'$ ), 127,06 ( $C_7'$ ), 128,45 ( $C_4'a$ ), 131,22

(C8a), 132,61 (C8'a), 134,12 (C7), 136,41 (C3''a e C7''a), 139,91 (C1), 142,28 (C8), 145,75 (C7a), 146,19 (C2''), 152,35 (C3), 152,46 (C1'), 159,54 (C5) ppm.

**EM** (ESI)  $m/z$  (%): 535 ( $[M + 2]^+$ , 30), 534 ( $[M + 1]^+$ , 80), 533 ( $[M]^+$ , 21), 267 (100); **EMAR** (ESI)  $m/z$ :  $[M + 1]^+$  calculado para  $C_{32}H_{31}BF_2N_5$ , 534,2635; obtido 534,2633.

## 2.2. Caracterização fotofísica dos derivados de BODIPY 1-3

Os estudos fotofísicos dos compostos **1-3** foram realizados em soluções de acetonitrilo com concentrações de  $1 \times 10^{-5}$  M, utilizando como padrão de fluorescência a Rodamina 6G em etanol ( $\Phi_f = 0,95$ ) com uma concentração de  $1 \times 10^{-2}$  M, em células de quartzo.

A fluorescência foi medida num ângulo de  $90^\circ$  em relação à radiação incidente de excitação. O comprimento de onda de excitação dos derivados de BODIPY **1-3** foi de 450 nm. O padrão foi excitado no comprimento de onda de excitação de cada composto. Após traçar o espectro de fluorescência, foi determinada a respetiva área abaixo da curva.

O cálculo do rendimento quântico relativo de fluorescência dos derivados de BODIPY sintetizados, foi efetuado através da equação:

$$\frac{\Phi_{F_{comp}}}{\Phi_{F_p}} = \frac{A_p \times F_{comp} \times n_p^2}{A_{comp} \times F_p \times n_{comp}^2}$$

em que,  $A_p$  e  $A_{comp}$  são as absorvâncias das soluções nos comprimentos de onda de excitação do padrão e do composto em estudo, respetivamente;  $F_p$  e  $F_{comp}$  correspondem às áreas abaixo da curva de fluorescência do padrão e do composto em estudo;  $n_p$  e  $n_{comp}$  representam o valor do índice de refração do solvente da solução do padrão e do composto em análise, respetivamente.

## 2.3. Avaliação dos derivados de BODIPY 1-3 como sensores óticos de iões metálicos

### 2.3.1. Estudo preliminar da capacidade sensora dos derivados de BODIPY 1-3

O estudo preliminar da capacidade sensora dos derivados de BODIPY **1-3** permitiu verificar de forma rápida e simples a possível interação dos compostos com os aniões e catiões metálicos escolhidos devido à sua importância a nível biológico e ambiental.

Prepararam-se soluções dos derivados de BODIPY em acetonitrilo, com concentração  $1 \times 10^{-5}$  M. As soluções dos catiões ( $\text{Ag}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Pd}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  e  $\text{Al}^{3+}$ ) sob a forma de sais de perclorato, com exceção do  $\text{Pd}^{2+}$  e  $\text{Li}^+$  cujo contra-íão foi o tetrafluoroborato, e dos aniões ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ,  $\text{HSO}_4^-$ ,  $\text{CN}^-$ ,  $\text{F}^-$ ,  $\text{I}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{AcO}^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{ClO}_4^-$ ,  $\text{BzO}^-$ ) sob a forma de sais de tetrabutilamónio, foram preparadas em acetonitrilo e com concentração  $1 \times 10^{-2}$  M. Procedeu-se ao estudo, adicionando-se 50 equivalentes de cada ião à solução de cada um dos compostos **1-3**.

Consoante os resultados obtidos no estudo preliminar da capacidade sensora dos derivados de BODIPY **1-3** em acetonitrilo, procedeu-se a um novo ensaio. Foram utilizadas as mesmas soluções dos iões e preparou-se as soluções dos compostos com concentração  $1 \times 10^{-5}$  M em acetonitrilo/água (75:25). Analogamente, adicionou-se 50 equivalentes de cada ião à solução de cada um dos compostos **1-3**.

Em ambos os ensaios, a variação de cor das soluções foi observada sob incidência de luz natural e a variação de fluorescência foi verificada através de uma câmara de UV a um comprimento de onda de 365 nm.

### 2.3.2. Titulações espectrofotométricas e espectralfluorimétricas dos derivados de BODIPY 2 e 3

As titulações espectrofotométricas e espectralfluorimétricas foram realizadas para os derivados de BODIPY que apresentaram resposta colorimétrica e/ou fluorimétrica no estudo preliminar. Foram utilizadas as soluções dos compostos **2 e 3** em acetonitrilo/água (75:25) com concentração  $1 \times 10^{-5}$  M e as soluções dos iões ( $\text{Pd}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  e  $\text{Al}^{3+}$ ) em acetonitrilo com concentração  $1 \times 10^{-2}$  M. Adicionou-se

sucessivamente um determinado número de equivalentes de cada um dos iões às soluções dos compostos e foram traçados os respetivos espectros de absorção e emissão após cada adição.

As constantes de associação ( $K_{ass}$ ) dos compostos **2** e **3** com os respetivos catiões foram determinadas através do programa *HypSpec*.

## 2.4. Avaliação do derivado de BODIPY 3 como sonda fluorescente em sistemas biológicos

### 2.4.1. Linha celular

A linha celular utilizada nestes ensaios experimentais foi a linha cancerígena HeLa, originalmente obtida a partir de células epiteliais do cancro do colo do útero. As células HeLa são frequentemente usadas como modelo celular em diversas áreas da investigação devido à sua elevada taxa de replicação e estabilidade *in vitro*.

As células HeLa foram mantidas em cultura utilizando DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) com um suplemento de 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos e incubadas a uma temperatura de 37 °C com atmosfera de CO<sub>2</sub> 5%.

Antes de cada ensaio, as células foram previamente lavadas com uma solução de HBSS (*Hank's Balanced Salt Solution*) e depois submetidas ao processo de tripsinização por 5 minutos a 37 °C. A atividade da tripsina foi inibida através da adição de DMEM e procedeu-se à contagem do número de células na câmara de *Neubauer* de forma a determinar a concentração celular adequada ao ensaio a realizar.

### 2.4.2. Viabilidade celular

A avaliação da viabilidade celular na presença do derivado de BODIPY **3** e das soluções de Hg<sup>2+</sup> e Fe<sup>3+</sup> foi efetuada através do método do *AquaBluer*. O seu princípio baseia-se na resposta colorimétrica/fluorimétrica induzida pela reação de redução do *Aquabluer*. As células viáveis transformam a forma oxidada do composto (não-fluorescente e azul) na forma reduzida (fluorescente e



vermelha). Desta forma, a intensidade de fluorescência detetada é proporcional ao número de células vivas, assim como a variação da cor azul para vermelho.

As células HeLa foram plaqueadas em placas de 96 poços com aproximadamente 3 000 células por poço e incubadas durante 24 horas. Foi preparada uma solução concentrada do BODIPY 3 de  $5,5 \times 10^3$   $\mu\text{g}/\text{mL}$  em DMSO. Uma solução com 550  $\mu\text{g}/\text{mL}$  do composto foi preparada através da diluição de 10  $\mu\text{L}$  da solução concentrada em DMEM num volume final de 100  $\mu\text{L}$ . As soluções concentradas de  $\text{Hg}^{2+}$  e de  $\text{Fe}^{3+}$  ( $10 \times 10^3$   $\mu\text{M}$ ) foram preparadas com os respetivos sais de perclorato hidratado dissolvidos em acetonitrilo e diluídas para as respetivas concentrações em DMEM.

As células foram tratadas com diferentes concentrações do composto (1, 5 e 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e doses (5-100  $\mu\text{M}$ ) e incubadas por 4 horas. Posteriormente, adicionou-se uma solução de *AquaBluer* e após 4 horas de incubação, mediu-se a fluorescência a um comprimento de onda de excitação de 540 nm e de um comprimento de onda de emissão a 590 nm. A intensidade de fluorescência foi determinada no leitor de microplacas e os valores da viabilidade celular foram calculados e expressos percentualmente em relação aos valores obtidos do controlo negativo (células não tratadas). Para cada ensaio foram feitas três réplicas independentes para as quais se determinou a média  $\pm$  desvio padrão. A análise estatística dos resultados foi feita através do software *GraphPad Prism 5.0*.

#### 2.4.3. Detecção de $\text{Hg}^{2+}$ e $\text{Fe}^{3+}$ intracelular

Para as medições da intensidade de fluorescência, foram plaqueadas aproximadamente 3 000 células por poço numa placa de 96 poços. As células foram tratadas com diferentes concentrações de BODIPY 3 (0,5-10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e incubadas por 1 hora. De seguida, procedeu-se à incubação das células com diferentes concentrações de  $\text{Fe}^{3+}$  e  $\text{Hg}^{2+}$  (5-100  $\mu\text{M}$ ) por mais 2 horas. Por fim, as células foram lavadas com HBSS e foi adicionada uma nova solução de DMEM. A deteção da fluorescência foi feita no leitor de microplacas a um comprimento de onda de excitação de 490 nm e a um comprimento de onda de emissão a 520 nm. Os valores de intensidade de emissão registados foram normalizados relativamente aos valores do controlo negativo (células não tratadas). Para cada ensaio foram feitas três

réplicas independentes para as quais se determinou a média  $\pm$  desvio padrão. A análise estatística dos resultados foi feita através do software *GraphPad Prism 5.0*.

Para a aquisição das imagens de fluorescência, foram plaqueadas aproximadamente 10 000 células por placa de *Petri* 35 mm. As células foram tratadas com a solução do derivado de BODIPY (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e incubadas por 1 hora. De seguida, procedeu-se à marcação fluorescente do núcleo celular incubando as células com uma solução do marcador *Hoechst* 33342 (1:1000, cat. no. ab139481, Abcam) por 20 min. A solução da sonda fluorescente comercial foi preparada consoante as instruções dos fornecedores. As células foram lavadas com HBSS e foi adicionada uma nova solução de DMEM. Por fim, adicionou-se a solução do catião (100  $\mu\text{M}$ ) e iniciou a monitorização em tempo real adquirindo as imagens de fluorescência a cada 5 minutos durante 20 minutos. As células foram analisadas através do microscópio confocal utilizando o laser de excitação de 405 nm e de 561 nm, para a localização do núcleo celular e do BODIPY 3, respetivamente.

#### **2.4.4. Internalização e localização subcelular do derivado de BODIPY 3**

Foram plaqueadas aproximadamente 10 000 células por placa de *Petri* 35 mm. As células foram tratadas com uma solução do marcador *Hoechst* 33342 e incubadas durante 20 minutos. As células foram lavadas com HBSS e foi adicionada uma nova solução de DMEM. Por fim, adicionou-se a solução de BODIPY (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e iniciou a monitorização em tempo real adquirindo as imagens de fluorescência a cada 2 minutos durante 20 minutos.

Para o estudo de co-localização, as células previamente tratadas com o derivado de BODIPY (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), foram incubadas por 20 minutos com uma solução de *MitoSpy™ Green FM* (300 nM, cat. no. 424805, Biolegend) de forma a marcar a estrutura da mitocôndria, com uma solução de *ER Staining Green Fluorescence* (1:1000, cat. no. ab139481, Abcam) para a marcação do retículo endoplasmático ou com uma solução de *LysoTracker Deep Red* (74 nM, cat. no. L12492, Invitrogen) para a marcação dos lisossomas. As soluções das sondas fluorescentes comerciais foram preparadas consoante as instruções dos fornecedores.

As células foram analisadas através do microscópio confocal, utilizando o laser de 405 nm para visualizar o núcleo celular, o laser de 488 nm para visualizar a mitocôndria e o retículo endoplasmático, o laser de 561 nm para visualizar o derivado de BODIPY **3** e o laser de 633 nm para visualizar os lisossomas. Foram utilizados diferentes grupos de células incubadas com um único marcador fluorescente como grupos controlo.

## 2.5. Síntese de derivados de tiofeno por acoplamento de Suzuki



Num balão de fundo redondo introduziu-se o ácido 5-bromo-2-tiofen-óico (0,46 mmol) dissolvido em DME seco (4 mL) e adicionou-se  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$  (0,025 mmol). Deixou-se sob atmosfera de  $\text{N}_2$  durante aproximadamente 10 minutos, com agitação. Adicionou-se o respetivo ácido borónico (0,61 mmol) dissolvido no menor volume possível de etanol e adicionou-se a solução aquosa de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  2 M (0,67 mmol). Deixou-se sob agitação com aquecimento a 80 °C. A reação foi monitorizada por TLC (tempo reacional = 13 horas). A mistura reacional arrefeceu até à temperatura ambiente. Adicionou-se água destilada (10 mL) e diclorometano (10 mL). Após a separação das duas fases, a fase aquosa foi lavada com diclorometano (2 x 10 mL) e acidificada com HCl até pH=1. Após a precipitação do respetivo composto, filtrou-se sob condições de vácuo e lavou-se com éter etílico, dando origem ao produto de acoplamento puro.

O derivado de tiofeno **4** foi obtido a partir do precursor ácido 4-(*N,N*-dimetilamino)fenilo borónico na forma de sólido castanho (10 mg, 9%).

$^1\text{H RMN}$  (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta$  = 2,90 (s, 6H,  $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ), 6,71 (d,  $J$  = 8,8 Hz, 2H, H-3' e H-5'), 7,03 (d,  $J$  = 3,6 Hz, 1H, H-4), 7,05 (d,  $J$  = 3,6 Hz, 1H, H-3), 7,41 (d,  $J$  = 8,8 Hz, 2H, H-2' e H-6') ppm.

**IV** (KBr):  $\nu$  = 3452; 2925; 1611; 1542; 1455; 1409; 1359; 1229; 1122; 811; 783  $\text{cm}^{-1}$ .

O derivado de tiofeno **5** foi obtido a partir do precursor ácido 4-(*N,N*-difenilamino)fenilo borónico na forma de sólido verde (18 mg, 24%).

**<sup>1</sup>H RMN** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  =6,96 (d,  $J$  = 8,8 Hz, 2H, H-3' e H-5'), 7,06-7,12 (m, 6H, Ar-H), 7,34 (dt,  $J$  = 0,8 e 7,6 Hz, 4H, Ar-H), 7,43 (d,  $J$  = 3,6 Hz, 1H, H-4), 7,62 (d,  $J$  = 8,8 Hz, 2H, H-2' e H-6'), 7,67 (d,  $J$  = 3,6 Hz, 1H, H-3) ppm.

**IV** (KBr):  $\nu$  = 3446; 2853; 1671; 1590; 1536; 1490; 1448; 1314; 1281; 1193; 1109; 1043; 931; 812; 753; 696; 636; 513 cm<sup>-1</sup>.

## Capítulo 3

# *Discussão de Resultados*

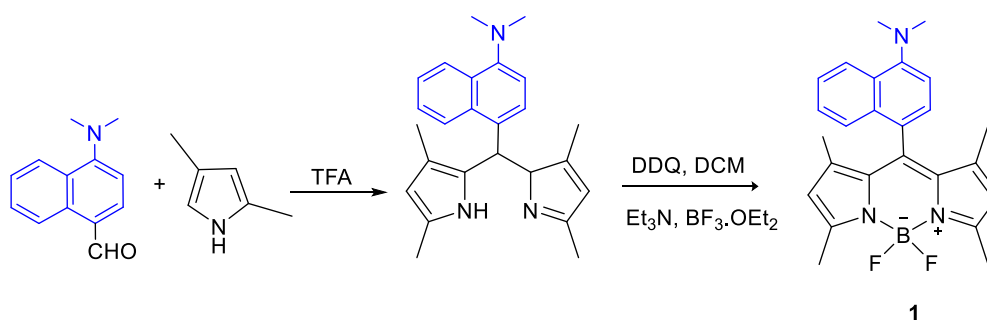
### 3. Discussão de Resultados

#### 3.1. Síntese dos derivados de BODIPY

Tendo em conta o efeito da funcionalização do núcleo de BODIPY nas propriedades fotofísicas e capacidade sensora destes derivados, decidiu-se sintetizar os BODIPYs **1-3** funcionalizados com um grupo fortemente dador na posição *meso* e diferentes grupos retiradores na posição 2. Adicionalmente, o grupo dador e os grupos retiradores de elétrões, devido à sua estrutura aumentam também a conjugação do sistema  $\pi$ -conjugado.

##### 3.1.1. Síntese do derivado de BODIPY **1** funcionalizado na posição *meso*

A síntese do derivado de BODIPY **1** funcionalizado na posição *meso* foi efetuada em dois passos reacionais.<sup>84</sup> Inicialmente ocorreu a síntese do núcleo de dipirrometano através da reação de condensação entre o 2,4-dimetilpirrol com 4-(*N,N*-dimetilamino)-1-naftalaldeído na presença de uma quantidade catalítica de ácido trifluoroacético. De seguida, ocorreu o segundo passo reacional em que o dipirrometano foi oxidado a dipirrometeno usando a 2,3-dicloro-5,6-diciano-*p*-benzoquinona (DDQ). O intermediário dipirrometano não foi purificado nem isolado tendo sido submetido de imediato à reação de complexação com  $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$  na presença de base. O composto puro **1** foi obtido na forma de sólido vermelho escuro com um rendimento de 22% após cromatografia *dry flash* (Esquema 7).



Esquema 7. Síntese do derivado de BODIPY **1**.

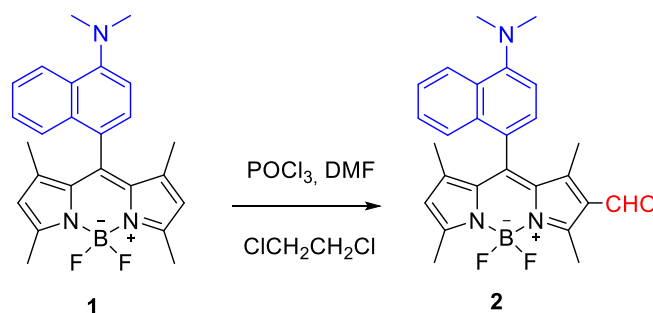
Através da caracterização do composto por espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  confirmou-se a estrutura assim como a pureza do BODIPY sintetizado. No espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , foi possível distinguir os sinais característicos dos substituintes na posição *meso* assim como os sinais correspondentes ao núcleo do BODIPY. O sinal correspondente aos prótons H-2 e H-6 surgiu a um desvio químico de 5,94 ppm. O sinal dos prótons dos grupos metilo nas posições 1 e 7 apareceu com um desvio químico de 1,09 ppm, enquanto que o das posições 3 e 5 surgiu a 2,58 ppm.

A presença dos prótons do grupo substituinte aromático na posição *meso* foi confirmada através de vários sinais na zona aromática na forma de duplos tripletos correspondentes aos prótons H-6' e H-7' e na forma de dupletos para os restantes prótons aromáticos. O singleto a 3,05 ppm corresponde aos prótons dos dois grupos metilos ligados ao átomo de nitrogénio.

### 3.1.2. Síntese do derivado de BODIPY 2 formilado através da reação de Vilsmeier-Haack

A formilação de Vilsmeier-Haack consiste na reação entre anéis aromáticos ricos em eletrões e o agente formilante, o reagente de Vilsmeier, que atua como um eletrófilo. Este eletrófilo é obtido através da reação entre uma formamida substituída, *N,N*-dimetilformamida (DMF), com o oxiclreto de fósforo ( $\text{POCl}_3$ ). Assim que se forma o reagente de Vilsmeier, este irá reagir com o composto aromático através de uma substituição aromática eletrofílica, seguida de hidrólise em presença de água, originando o produto final funcionalizado com o grupo formilo.<sup>85</sup>

Deste modo, procedeu-se à funcionalização do derivado de BODIPY 1 nas condições experimentais descritas anteriormente, tendo-se obtido o derivado de BODIPY formilado 2 com um rendimento de 59% após cromatografia em coluna (**Esquema 8**).



**Esquema 8.** Síntese do derivado de BODIPY **2**.

A presença do grupo formilo no núcleo do BODIPY na posição 2 foi comprovada através de espectroscopia de ressonância magnética nuclear de  $^1\text{H}$ , tendo-se observado o aparecimento de um singlete com desvio químico de 9,94 ppm.

Adicionalmente, verificou-se a presença de um singlete com um desvio químico de 6,11 ppm correspondente ao próton da posição 6 do núcleo do derivado de BODIPY, tendo-se deixado de observar o singlete correspondente ao próton na posição 2, devido à funcionalização dessa posição pelo grupo formilo.

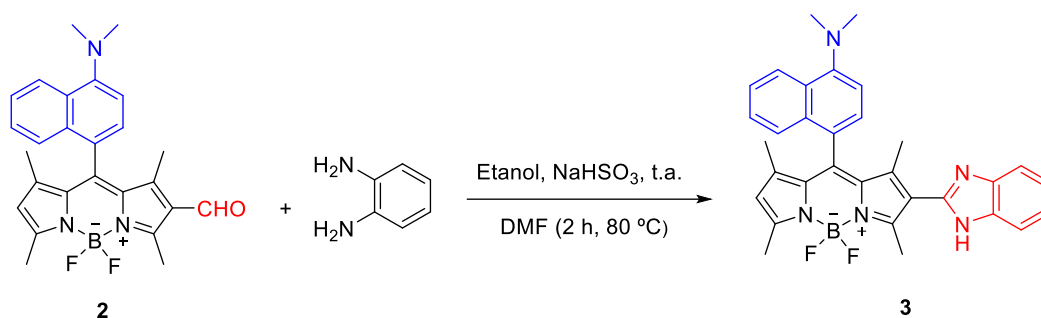
### 3.1.3. Síntese do derivado de BODIPY **3** funcionalizado com benzimidazol

Tendo em conta a aplicação dos derivados de BODIPYs como sensores óticos, decidiu-se preparar o composto **3** contendo um anel de benzimidazol devido à versatilidade deste heterociclo como sensor ótico de cátions e aniões.<sup>63,64,86</sup>

O derivado de BODIPY **3** foi sintetizado através da reação de ciclo-condensação da *orto*-fenilenodiamina com o BODIPY **2** sob catálise básica, em que o  $\text{NaHSO}_3$  atua como agente ativador da diamina, de forma a facilitar o ataque nucleofílico do grupo amino ao grupo carbonilo. Formou-se inicialmente uma imina e de seguida a ciclização intramolecular originou o produto intermediário ciclizado que após aromatização do anel de imidazol levou à formação do produto final (**Esquema 9**).<sup>87,88</sup>

O derivado de BODIPY funcionalizado com o grupo benzimidazol obteve-se sob a forma de sólido vermelho, com um rendimento de 31% após purificação por cromatografia em coluna.





Esquema 9. Síntese do derivado de BODIPY 3.

A presença do anel de benzimidazol no derivado de BODIPY 3 foi comprovada recorrendo à espectroscopia de ressonância magnética nuclear de protão, através da qual foi possível detetar os sinais correspondente aos protões aromáticos do anel de benzimidazol, tendo-se observado dois multipletos entre 7,21-7,25 ppm devido aos protões 5'' e 6'' e entre 7,51-7,53 ppm devido aos protões 4'' e 7''.

Na **figura 19** estão representadas as estruturas dos compostos sintetizados no presente trabalho.

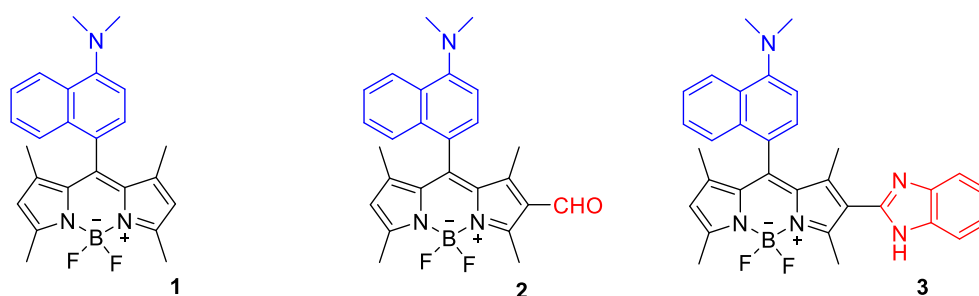


Figura 19. Estrutura química dos derivados de BODIPY sintetizados.

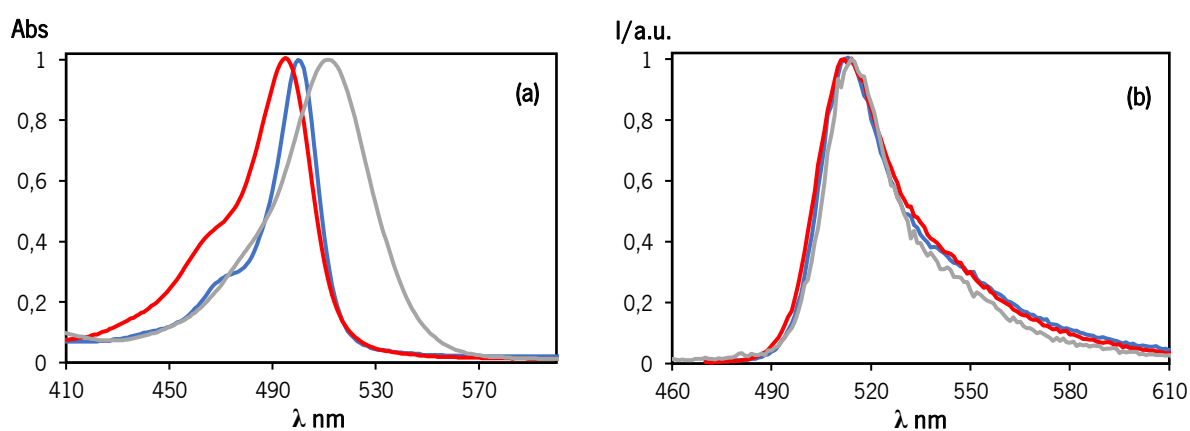
A estrutura química e a pureza dos derivados de BODIPY 1-3 sintetizados foi comprovada através das técnicas de caracterização de espetrometria de massa e espectroscopia de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ . A atribuição dos sinais dos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  foi feita com base nas técnicas bidimensionais HMQC e HMBC. A identidade dos novos compostos foi também confirmada através da análise por espetrometria de massa de alta resolução uma vez que as massas moleculares obtidas experimentalmente corresponderam às massas moleculares teóricas calculadas.

### 3.2. Caracterização fotofísica dos derivados de BODIPY 1-3

A síntese de derivados de BODIPY funcionalizados com diferentes grupos funcionais na posição 2 do núcleo tinha como intuito a diversificação das propriedades fotofísicas e otimizar a capacidade de reconhecimento molecular dos novos compostos visando a sua aplicação como sondas óticas em amostras biológicas.

Deste modo, procedeu-se à caracterização por espectroscopia de UV-Vis e fluorescência o que permitiu avaliar a influência da extensão do sistema  $\pi$ -conjugado assim como o caráter eletrônico dos substituintes nas propriedades de absorção/emissão dos derivados sintetizados.

Os estudos fotofísicos dos compostos **1-3** foram realizados em soluções de acetonitrilo com concentrações de  $1 \times 10^{-5}$  M. O padrão de fluorescência utilizado para o cálculo do rendimento quântico de fluorescência foi a Rodamina 6G em etanol ( $\Phi_f = 0,95$ ) com uma concentração de  $1 \times 10^{-5}$  M.



**Figura 20.** Espectros de absorção (a) e de emissão (b) normalizados dos derivados de BODIPY **1** (azul), **2** (vermelho) e **3** (cinza), em acetonitrilo.

Os compostos exibiram bandas de absorção intensas ( $\log \varepsilon = 4,58$  e  $4,75$ ) na região espectral compreendida entre 494-512 nm (**Figura 20a**). Como podemos verificar, o comprimento de onda máximo de absorção ( $\lambda_{\text{abs}}$ ) dos derivados de BODIPY sintetizados sofre um deslocamento consoante a estrutura e o caráter eletrónico do grupo funcional presente na posição 2 do núcleo do BODIPY. Considerando o derivado **1** como composto de referência, após a introdução do grupo formilo (derivado **2**) verificou-se um deslocamento do comprimento de onda máximo de absorção de 500 nm para 494 nm. Este desvio hipsocrômico pode ser atribuído ao efeito eletrónico retirador do grupo funcional nesta posição do núcleo do BODIPY que induz uma maior separação energética entre a LUMO e a HOMO.

Por outro lado, o composto **3** funcionalizado com um anel de benzimidazol demonstrou um comportamento oposto ao derivado anteriormente mencionado. Neste caso verificou-se um desvio batocrômico em relação ao derivado de BODIPY **1** devido ao aumento da extensão do sistema  $\pi$ -conjugado, que se refletiu num deslocamento da banda de absorção para os 514 nm.

Os espetros de emissão dos compostos demonstraram que a introdução dos grupos funcionais não influenciou significativamente os comprimentos de onda máximos de emissão, tendo ocorrido apenas um ligeiro desvio batocrômico de 2 nm para o composto **3** comparativamente ao derivado sem substituinte na posição 2 (**Figura 20b**). Os rendimentos quânticos de fluorescência calculados para os derivados de BODIPY **1** e **2** foram de 0,117 e 0,148, respetivamente, já o derivado **3** apresentou um valor significativamente menor de 0,031 (**Tabela 1**). A diminuição acentuada do rendimento quântico de fluorescência deste derivado de BODIPY poderá estar relacionada com o mecanismo de transferência fotoinduzida (PET) entre o grupo dador benzimidazol e o BODIPY.<sup>89</sup> Por outro lado, a existência de solvatocromismo também poderá influenciar o rendimento quântico calculado, pelo que estudos futuros poderão ser realizados, utilizando diferentes tipos de solventes na determinação das propriedades fotofísicas.

Os desvios de Stokes obtidos foram relativamente baixos, no entanto são característicos desta classe de compostos. Por outro lado, este fator não limitou a aplicação do derivado **3** em bioimagem, como será demonstrado nos estudos efetuados posteriormente.

Na **tabela 1** estão representados os resultados obtidos relativamente à espectroscopia de UV-Vis e à espectroscopia de fluorescência.

**Tabela 1.** Resultados obtidos do estudo de espectroscopia de UV-Vis e de fluorescência dos derivados de BODIPY **1-3** em acetonitrilo.

Composto	UV-Vis		Fluorescência		
	$\lambda_{\text{abs}}$ (nm)	Log $\epsilon$	$\lambda_{\text{em}}$ (nm)	$\Phi_f$	desvio de Stokes (nm)
<b>1</b>	500	4,58	512	0,117	12
<b>2</b>	494	4,75	512	0,148	18
<b>3</b>	512	4,75	514	0,031	2

### 3.3. Avaliação dos derivados de BODIPY 1-3 como sensores óticos de iões metálicos

#### 3.3.1. Estudo preliminar da capacidade sensora dos derivados de BODIPY 1-3

Foi realizado o estudo preliminar da interação dos derivados BODIPY **1-3** com diversos catiões e aniões, com o intuito de fazer uma rápida avaliação da capacidade sensora e perceber a influência dos grupos substituintes na capacidade sensora dos compostos.

Desta forma, prepararam-se soluções dos derivados com concentração de  $1 \times 10^{-5}$  M e soluções de  $1 \times 10^{-2}$  M dos catiões e aniões, selecionados devido à sua relevância biológica e ambiental. O estudo foi feito em acetonitrilo uma vez que é um solvente aprótico, logo não possui a capacidade de estabelecer ligações de hidrogénio e interferir com o sistema de reconhecimento destes analitos.

Após a adição de 50 equivalentes de cada um dos iões às soluções dos BODIPYs, verificou-se que estes compostos não exibiram qualquer sinal colorimétrico e/ou fluorimétrico na presença dos aniões, no entanto, eram capazes de detetar alguns dos catiões em estudo.

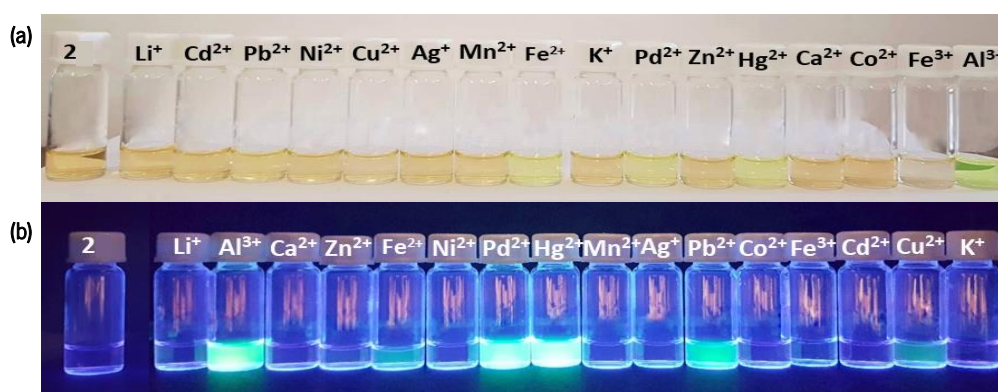
Relativamente ao comportamento colorimétrico, observou-se que o derivado **2** e **3** sofreram alteração de cor na interação com diversos catiões bivalentes e trivalentes. O composto **2** sinalizou a presença de  $\text{Pd}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  e  $\text{Al}^{3+}$ , tendo-se observado uma mudança da coloração da solução do composto de cor de laranja para amarelo na presença de  $\text{Pd}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{2+}$ , enquanto que a interação com  $\text{Al}^{3+}$  originou uma alteração da coloração da solução do composto de cor de laranja para verde. Por outro lado, a interação com  $\text{Fe}^{3+}$  originou uma descoloração da solução do composto (**Figura 21a**).

A interação do composto **3** com os cátions induziu sinais colorimétricos visíveis para o  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Pd}^{2+}$  através da alteração da solução do composto de cor de rosa para cor de laranja. No caso do  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  e  $\text{Al}^{3+}$  observou-se uma alteração da cor da solução do composto de cor de laranja para amarelo. No que diz respeito ao derivado **1**, verificou-se que não ocorreu variação colorimétrica para nenhum dos cátions testados.

As mesmas soluções foram analisadas sob uma lâmpada de UV a 365 nm e verificou-se que a interação dos derivados de BODIPY **1-3** com determinados cátions induziu um sinal fluorimétrico.

Apesar de se ter verificado que não ocorre alteração colorimétrica do derivado **1** após a adição dos cátions, obteve-se uma resposta fluorimétrica resultante da interação com o  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  e o  $\text{Pd}^{2+}$ . A interação com estes cátions foi detetada através de um aumento acentuado da intensidade de fluorescência.

A **figura 21b** corresponde ao estudo com o derivado **2** a partir da qual é possível verificar que na presença de  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Pd}^{2+}$  e  $\text{Hg}^{2+}$  a intensidade de fluorescência do composto sofre um aumento bastante acentuado. A interação com  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$  também induz um sinal fluorimétrico, no entanto este aumento de intensidade é relativamente menor. Por outro lado, a fluorescência resultante da interação com o  $\text{Fe}^{3+}$  demonstrou ser consideravelmente menos intensa comparativamente aos cátions anteriormente mencionados.



**Figura 21.** Soluções do composto **2** em acetonitrilo sob incidência de luz natural **(a)** e sob incidência de radiação UV a 365 nm **(b)**, após a adição de 50 equivalentes de diferentes cátions.

De forma semelhante, a intensidade do sinal fluorimétrico detetado no derivado **3** difere consoante o catião em estudo. A interação com  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  e  $\text{Al}^{3+}$  induziu um sinal bastante mais intenso comparativamente à interação do composto com  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Pd}^{2+}$ .

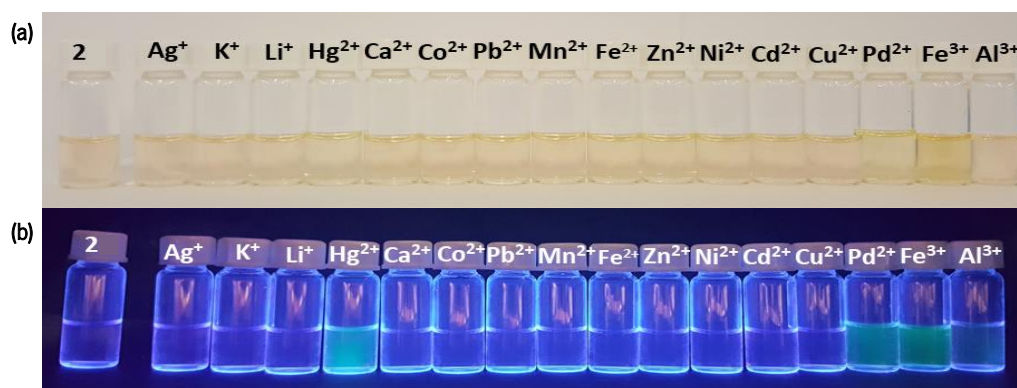
Na **tabela 2** estão representados os catiões para os quais os derivados de BODIPY sintetizados são capazes de reconhecer em soluções de acetonitrilo, simultaneamente através de variações colorimétricas e fluorimétricas, no caso do derivado **2** e **3**, ou exclusivamente através de um sinal fluorimétrico, no caso do derivado **1**.

**Tabela 2.** Resultados obtidos da avaliação da capacidade sensora dos derivados de BODIPY na presença de vários catiões através de alterações do comportamento colorimétrico e fluorimétrico, em acetonitrilo.

Composto	Sinal Colorimétrico	Sinal Fluorimétrico
1	-	$\text{Cu}^{2+}$ , $\text{Co}^{2+}$ , $\text{Pd}^{2+}$
2	$\text{Pd}^{2+}$ , $\text{Hg}^{2+}$ , $\text{Fe}^{2+}$ , $\text{Fe}^{3+}$ , $\text{Al}^{3+}$	$\text{Cu}^{2+}$ , $\text{Pb}^{2+}$ , $\text{Pd}^{2+}$ , $\text{Hg}^{2+}$ , $\text{Fe}^{2+}$ , $\text{Fe}^{3+}$ , $\text{Al}^{3+}$
3	$\text{Co}^{2+}$ , $\text{Zn}^{2+}$ , $\text{Cd}^{2+}$ , $\text{Mn}^{2+}$ , $\text{Cu}^{2+}$ , $\text{Ni}^{2+}$ , $\text{Pd}^{2+}$ , $\text{Hg}^{2+}$ , $\text{Fe}^{2+}$ , $\text{Fe}^{3+}$ , $\text{Al}^{3+}$	$\text{Cu}^{2+}$ , $\text{Ni}^{2+}$ , $\text{Pd}^{2+}$ , $\text{Hg}^{2+}$ , $\text{Fe}^{2+}$ , $\text{Fe}^{3+}$ , $\text{Al}^{3+}$

Consoante os resultados obtidos no estudo em acetonitrilo, procedeu-se a um segundo ensaio em acetonitrilo/água (75:25). Analogamente, adicionou-se 50 equivalentes de cada ião à solução de cada um dos compostos **1-3**.

Nestas condições, verificou-se que o derivado **1** perdeu por completo a capacidade sensora, deixando de apresentar sinal fluorimétrico para o  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  e  $\text{Pd}^{2+}$ . Aparentemente, o derivado **2** tornou-se sensor colorimétrico apenas para o  $\text{Fe}^{3+}$ , no entanto os estudos espectrofotométricos efetuados posteriormente comprovaram que não ocorre deslocamento da banda de absorção do composto na presença de  $\text{Fe}^{3+}$ , pelo que a intensificação de cor da solução observada é devido à coloração laranja da solução do catião (**Figura 22a**). Por outro lado, sob uma lâmpada de UV foi possível observar a interação dos iões  $\text{Pd}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{3+}$  através de um ligeiro aumento da intensidade de fluorescência na solução aquosa do composto **2** (**Figura 22b**).



**Figura 22.** Soluções do composto **2** em acetonitrilo/água (75:25) sob incidência de luz natural **(a)** e sob incidência de radiação UV a 365 nm **(b)**, após a adição de 50 equivalentes de diferentes cátions.

Por fim, o derivado **3** demonstrou ser o recetor mais seletivo em meio aquoso, uma vez que o reconhecimento passou a ser apenas para três cátions: o  $\text{Hg}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{3+}$ , através do sinal colorimétrico e fluorimétrico e para o  $\text{Al}^{3+}$  apenas através do sinal colorimétrico.

Na **tabela 3** estão representados os cátions para os quais os derivados de BODIPY sintetizados são capazes de reconhecer em soluções de acetonitrilo/água (75:25), através de variações colorimétricas e/ou fluorimétricas.

**Tabela 3.** Resultados obtidos da avaliação da capacidade sensora dos derivados de BODIPY na presença de vários cátions através de alterações do comportamento colorimétrico e fluorimétrico, em acetonitrilo/água (75:25).

Composto	Sinal Colorimétrico	Sinal Fluorimétrico
1	-	-
2	-	$\text{Pd}^{2+}$ , $\text{Hg}^{2+}$ , $\text{Fe}^{3+}$ , $\text{Al}^{3+}$
3	$\text{Hg}^{2+}$ , $\text{Fe}^{3+}$ , $\text{Al}^{3+}$	$\text{Hg}^{2+}$ , $\text{Fe}^{3+}$

Deste modo, a intensidade da resposta obtida no estudo da capacidade sensora em meio aquoso demonstrou ser menor em relação ao estudo em solvente orgânico, o que poderá estar associado ao efeito de solvatação dos iões pelas moléculas de água, levando à diminuição da eficácia de interação com os derivados de BODIPY.<sup>90</sup> Por outro lado, os estudos demonstraram que em solução aquosa ocorre um aumento da seletividade destes recetores que passaram a detetar um número mais restrito de catiões, tanto através da variação da cor das soluções dos compostos como através do aumento da fluorescência. Estes resultados são bastante promissores tendo em conta a aplicação dos derivados de BODIPY como sondas em amostras biológicas, já que os estudos implicam a estabilidade dos compostos e uma eficiência de reconhecimento sob as condições do meio fisiológico/aquoso.

### 3.3.2. Titulações espectrofotométricas e espectralfluorimétricas dos derivados de BODIPY 2 e 3

Conforme os resultados obtidos na avaliação preliminar da capacidade sensora dos derivados de BODIPY sintetizados e tendo em vista a aplicação destes em amostras biológicas, foram realizadas titulações espectrofotométricas e espectralfluorimétricas dos derivados **2** e **3**, já que foi verificado no estudo anterior que apenas estes dois compostos demonstraram ser sensores colorimétricos e fluorimétricos em meio aquoso. Desta forma, foram testados os catiões para qual ocorreu resposta colorimétrica e fluorimétrica, isto é, o Pd<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup> e Al<sup>3+</sup>.

As titulações foram realizadas em acetonitrilo/água (75:25) através da adição sequencial de pequenas quantidades de solução dos catiões às soluções dos compostos do qual se pretendia avaliar a capacidade sensora, sendo traçado o espectro de absorção/emissão e registando as alterações das bandas de absorção/emissão consoante o número de equivalentes de cada catião adicionado. As soluções dos catiões foram preparadas com uma concentração superior às das soluções dos compostos em estudo (cerca de 10<sup>3</sup> vezes), de modo a que as adições sucessivas não alterassem o volume final da solução.

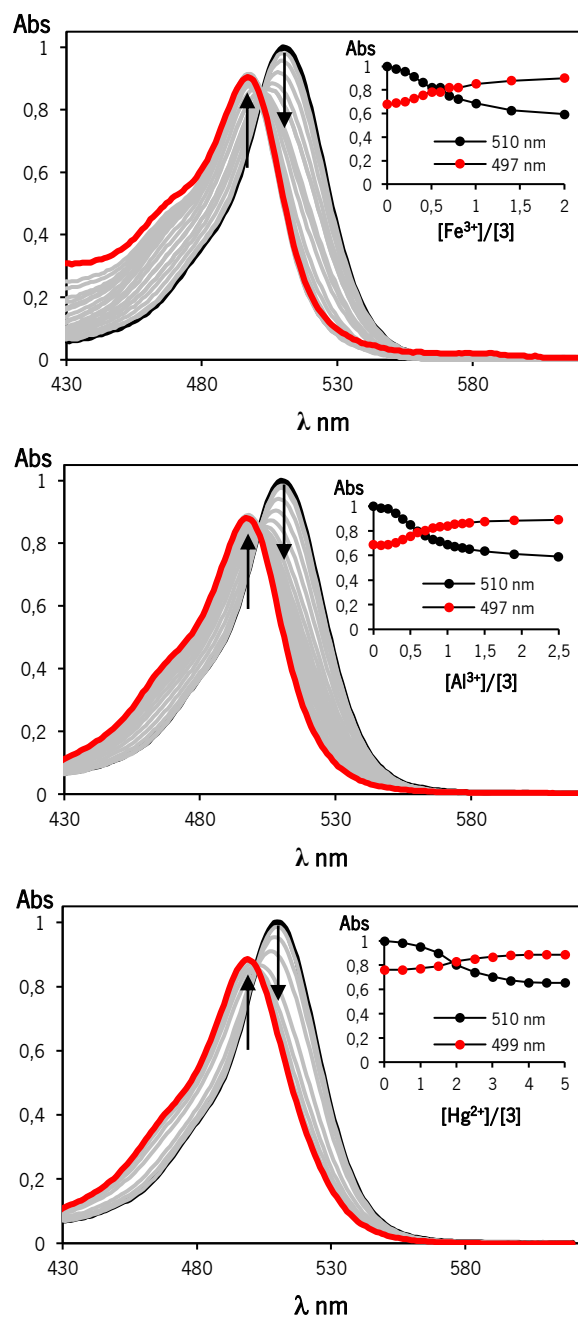
No estudo preliminar em acetonitrilo/água (75:25), o composto **2** aparentemente apresentou uma intensificação da sua coloração laranja na presença de Fe<sup>3+</sup>, no entanto, após a titulação espectrofotométrica, verificou-se uma sobreposição sucessiva das bandas de absorção com a adição



---

crescente de ião. Desta forma, verificou-se que o derivado **2** não é sensor colorimétrico para o  $\text{Fe}^{3+}$  e que a intensificação de cor da solução se deveu à coloração laranja intensa da solução do catião, tal como já foi mencionado anteriormente.

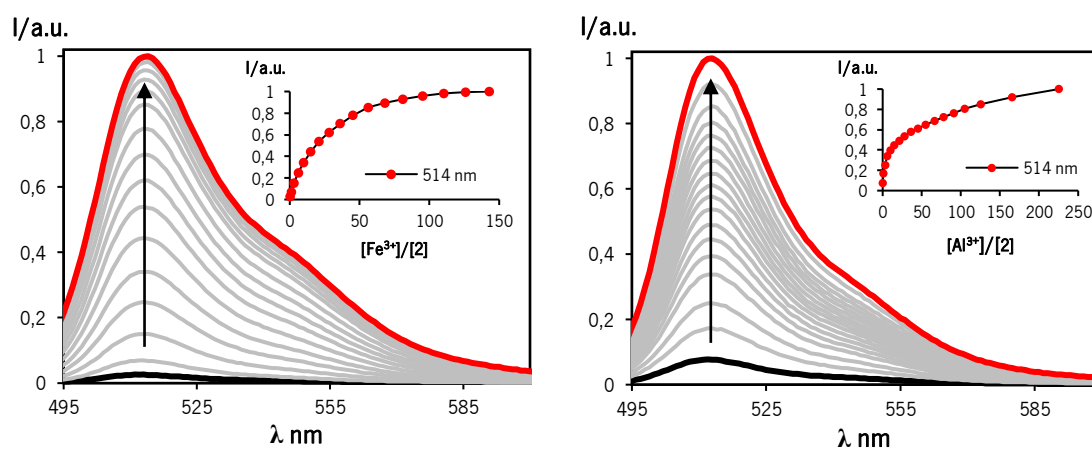
Sendo assim, procedeu-se à titulação espectrofotométrica do derivado **3**, tendo-se confirmado que, efetivamente, a banda de absorção do derivado **3** sofria um desvio na presença de  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  e  $\text{Al}^{3+}$  (**Figura 23**). Como podemos verificar, a adição sucessiva dos catiões resulta num ligeiro desvio hipsocrómico, em que a banda de absorção centrada a 510 nm diminui de intensidade, surgindo uma nova banda a 499 nm, na presença do  $\text{Hg}^{2+}$  e a 497 nm para o  $\text{Fe}^{3+}$  e o  $\text{Al}^{3+}$ . É observado em cada um dos espectros de absorção um único ponto isobéstico bem definido a 502 nm, o que confirma que em solução o derivado **3** existe em duas formas espectralmente distintas: na forma livre e na forma de complexo ligando-catião e para esse comprimento de onda as duas espécies químicas apresentam a mesma absorvância. Por outro lado, verificou-se ainda que para atingir o ponto isobéstico foi necessário apenas cerca de 0,7 equivalentes de  $\text{Fe}^{3+}$  e de  $\text{Al}^{3+}$  e cerca de 2 equivalentes no caso do  $\text{Hg}^{2+}$ . Deste modo, os resultados obtidos indicam que o recetor é bastante sensível à presença dos respetivos catiões, no entanto a necessidade de um maior número de equivalentes de  $\text{Hg}^{2+}$  sugere que o composto apresenta uma menor afinidade para o catião bivalente comparativamente aos catiões trivalentes.



**Figura 23.** Titulações espectrofotométricas do composto **3** com adição de quantidades crescentes de  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$  e  $\text{Hg}^{2+}$  em acetonitrilo/água (75:25). O inset representa a absorvância normalizada a 497/499 nm e a 510 nm em função de  $[\text{cati\~{o}}]/[\mathbf{3}]$ . ( $[\mathbf{3}] = 1 \times 10^{-5}$  M,  $[\text{cati\~{o}}] = 1 \times 10^{-2}$  M).

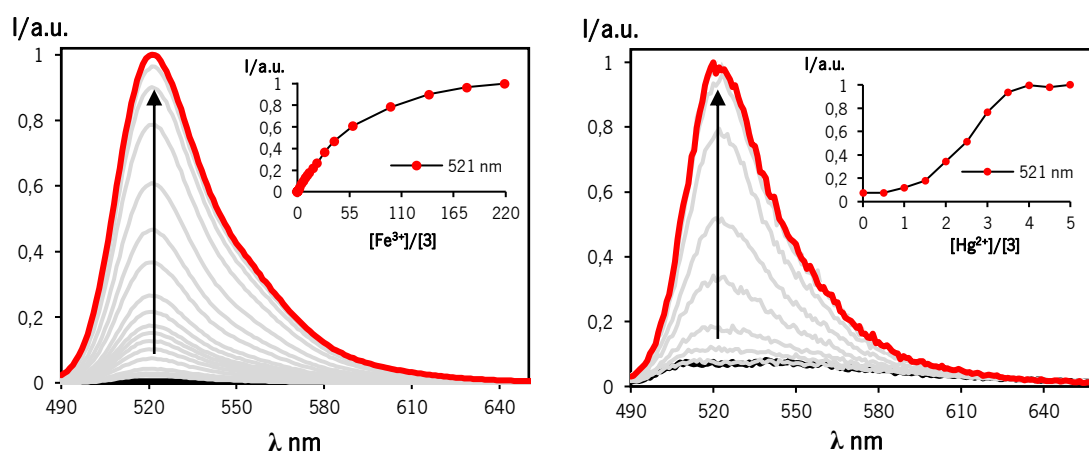
Relativamente às titulações espectralfluorimétricas, os resultados foram concordantes com o estudo preliminar. Foram traçados os espectros de fluorescência e registadas as alterações na intensidade de emissão dos derivados **2** e **3** consoante o número crescente de equivalentes de cada um dos catiões adicionados. Verificou-se que, em todos os casos, a adição dos catiões às soluções dos compostos induziu o aumento da intensidade de fluorescência, o qual se designa por efeito CHEF (*Chelation Enhancement of Fluorescence*). A capacidade de resposta fluorimétrica foi expressa através da intensidade de fluorescência relativa ( $I/I_0$ ) em função do número de equivalentes de catião necessários para atingir um máximo de fluorescência (**Tabela 4**).

Os ensaios espectralfluorimétricos para o derivado **2** foram realizados na presença do  $\text{Pd}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  e do  $\text{Al}^{3+}$ . Verificou-se que houve um comportamento bastante semelhante para os catiões  $\text{Pd}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{3+}$ , em que a intensidade de fluorescência relativa resultante da formação do novo complexo, foi aproximadamente igual na presença de cada um dos catiões. No entanto, verificou-se que no caso do  $\text{Fe}^{3+}$ , a capacidade de resposta fluorimétrica foi ligeiramente superior uma vez que foi necessário uma menor quantidade de ião (aproximadamente 100 equivalentes) para induzir o máximo de fluorescência. A presença do  $\text{Al}^{3+}$  também induziu um aumento da intensidade de fluorescência, no entanto, observou-se uma menor capacidade de resposta fluorimétrica, uma vez que foi necessário um maior número de equivalentes (cerca de 220 equivalentes) de forma a induzir um aumento significativo mas incompleto da intensidade de fluorescência (**Figura 24**). Estes resultados são concordantes com as diferentes intensidades de fluorescência observadas no estudo preliminar da capacidade sensora do derivado de BODIPY **2** em meio aquoso.



**Figura 24.** Títulações espectralfluorimétrica do composto **2** com adição de quantidades crescentes de  $\text{Fe}^{3+}$  e  $\text{Al}^{3+}$  em acetonitrilo/água (75:25). O *inset* representa a intensidade de fluorescência normalizada a 514 nm em função de  $[\text{catião}]/[\mathbf{2}]$ . ( $[\mathbf{2}] = 1 \times 10^{-5} \text{ M}$ ,  $[\text{catião}] = 1 \times 10^{-2} \text{ M}$ ).

Os ensaios espectralfluorimétricos para o derivado **3** foram realizados na presença do  $\text{Hg}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{3+}$  (**Figura 25**). Observou-se que as sucessivas adições dos cátions induziram um aumento da intensidade de fluorescência, tendo-se detetado um máximo de fluorescência após a adição de aproximadamente 220 equivalentes no caso do  $\text{Fe}^{3+}$  e de apenas 4 equivalentes no caso do  $\text{Hg}^{2+}$ . No entanto, apesar de ser necessária uma maior quantidade de  $\text{Fe}^{3+}$ , verificou-se um aumento bastante mais acentuado da intensidade de fluorescência relativa, o que se refletiu numa capacidade de resposta fluorimétrica relativamente superior (**Tabela 4**).



**Figura 25.** Titulações espectralfluorimétricas do composto **3** com adição de quantidades crescentes de  $\text{Fe}^{3+}$  e  $\text{Hg}^{2+}$  em acetonitrilo/água (75:25). O *inset* representa a intensidade de fluorescência normalizada a 521 nm em função de [catião]/[**3**]. ([**3**] =  $1 \times 10^{-5}$  M, [catião] =  $1 \times 10^{-2}$  M).

**Tabela 4.** Valores da intensidade de fluorescência relativa ( $I/I_0$ ) e da capacidade de resposta fluorimétrica para a interação dos compostos **2** e **3** e os respectivos cátions em acetonitrilo/água (75:25).

Composto	Intensidade de Fluorescência relativa ( $I/I_0$ )				Capacidade de resposta fluorimétrica			
	$\text{Pd}^{2+}$	$\text{Hg}^{2+}$	$\text{Fe}^{3+}$	$\text{Al}^{3+}$	$\text{Pd}^{2+}$	$\text{Hg}^{2+}$	$\text{Fe}^{3+}$	$\text{Al}^{3+}$
<b>2</b>	39	39	40	13	0,19	0,14	0,36	0,06
<b>3</b>	-	13	890	-	-	3,26	4,06	-

As constantes de associação ( $K_{\text{ass}}$ ) dos compostos **2** e **3** com os diferentes cátions foram calculadas pelo programa *HypSpec* recorrendo aos dados experimentais obtidos da titulação espectralfluorimétrica, no caso da interação do composto **3** com o  $\text{Al}^{3+}$  e das titulações espectralfluorimétricas para as restantes interações. Os valores das constantes de associação foram atribuídos consoante as possíveis estequiometrias para a formação do complexo metal:ligando, tendo-se constatado invariavelmente que as constantes de associação mais elevadas correspondem à interação 1:2 (**Tabela 5**). Por falta de tempo, não foi possível confirmar a estequiometria através da realização de Job plots, no entanto está previsto como estudo futuro.

**Tabela 5.** Logaritmo da constante de associação ( $\log K_{ass}$ ), correspondente à interação 1:2 (M:L) entre os cátions  $Hg^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $Fe^{3+}$  e  $Al^{3+}$  e os compostos **2** e **3**, em acetonitrilo/água (75:25).

Ligando	Metal	$\log k_{ass}$
2	$Fe^{3+}$	$7,880 \pm 0,005$
	$Hg^{2+}$	$7,121 \pm 0,005$
	$Pd^{2+}$	$7,133 \pm 0,005$
	$Al^{3+}$	$7,308 \pm 0,012$
3	$Al^{3+}$	$10,364 \pm 0,007$
	$Fe^{3+}$	$10,413 \pm 0,076$
	$Hg^{2+}$	$11,209 \pm 0,087$

Considerando os resultados obtidos, pode-se afirmar que a funcionalização do núcleo do BODIPY na posição 2 com diferentes grupos funcionais, nomeadamente, o grupo formilo (derivado **2**) e o grupo benzimidazol (derivado **3**) influencia não só a seletividade e sensibilidade do BODIPY mas também o tipo de resposta obtida no processo de reconhecimento dos cátions. De facto, ao contrário do derivado **2**, verificou-se que a introdução do benzimidazol permitiu a deteção de  $Hg^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$  e  $Al^{3+}$  em solução de acetonitrilo/água (75:25) através de um sinal colorimétrico, que se refletiu num desvio hipsocrómico do comprimento de onda máximo de absorção dos 510 nm para os 497/499 nm, após a adição de pequenas quantidades dos cátions (de 1 a 3 equivalentes). Este deslocamento hipsocrómico da banda de absorção sugere que o efeito dador do grupo benzimidazol introduzido no cromóforo (núcleo do BODIPY) diminui após a interação com os cátions o que induz uma diminuição da densidade eletrónica do sistema  $\pi$ -conjugado.

Efetivamente, o derivado **3** demonstrou ser um sensor colorimétrico bastante sensível, com uma ligeira maior afinidade para os cátions trivalentes. Para além das alterações das suas propriedades de absorção, verificou-se também que a interação do composto com o  $Hg^{2+}$  e  $Fe^{3+}$  induziu um aumento da intensidade de fluorescência, tendo-se obtido uma resposta mais eficiente para o  $Fe^{3+}$ . A interação do BODIPY funcionalizado com o grupo formilo (derivado **2**) com os cátions também induziu um aumento da intensidade de fluorescência na presença de  $Pd^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$  e  $Al^{3+}$ , no entanto não se verificou qualquer alteração do espectro de absorção.

Considerando os dois compostos como sondas fluorescentes de cátions em meio aquoso, pode-se afirmar que o derivado de BODIPY **3** é mais seletivo e apresenta valores significativamente mais elevados de capacidade de resposta fluorimétrica. O comportamento fluorescente observado em ambos os derivados, sugere que o mecanismo de sinalização envolvido no processo de coordenação com os cátions é a transferência eletrônica fotoinduzida (PET). A interação do cátion com a subunidade recetora do composto irá bloquear o processo PET, permitindo o restabelecimento da emissão de fluorescência do fluoróforo, o que se reflete num aumento da intensidade de fluorescência, sem que ocorra deslocamento da banda de emissão.

### 3.4. Avaliação do derivado de BODIPY **3** como sonda fluorescente em sistemas biológicos

Tendo em vista a aplicação dos derivados de BODIPY sintetizados em bioimagem molecular e considerando os resultados discutidos anteriormente, verificou-se que o derivado **3** demonstrou potencialidades como sonda fluorescente. A sua maior seletividade em meio aquoso e capacidade de resposta fluorimétrica foram fatores influentes na escolha deste composto no presente estudo.

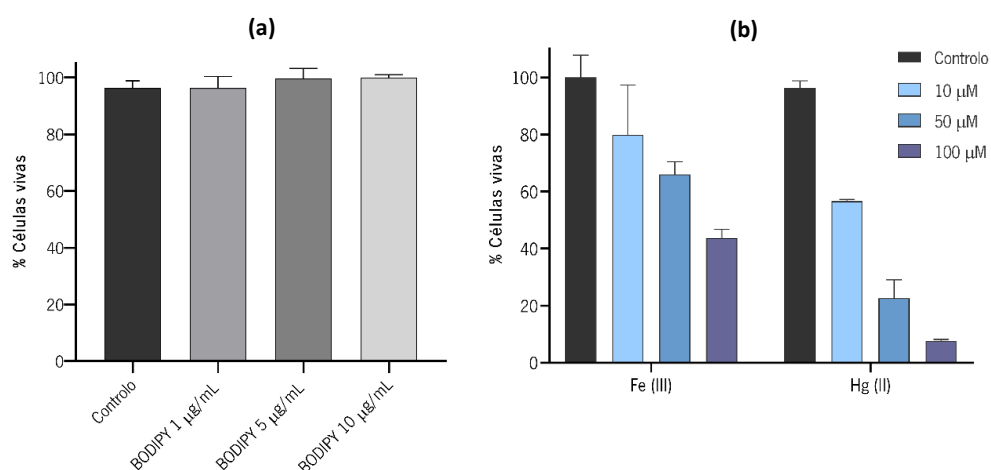
Esta segunda parte do trabalho foi efetuada nas instalações do Laboratório Ibérico Internacional de Nanotecnologia (INL), no âmbito de um projeto em colaboração, e consistiu no estudo do comportamento do derivado de BODIPY **3** em células cancerígenas HeLa através de técnicas de fluorescência e microscopia confocal.

#### 3.4.1. Viabilidade celular

O estudo *in vitro* da viabilidade celular foi efetuada através do método de *AquaBluer* e permitiu avaliar a biocompatibilidade do derivado de BODIPY **3** com a linha celular HeLa. Adicionalmente, foi também avaliado o efeito citotóxico dos iões de  $\text{Fe}^{3+}$  e  $\text{Hg}^{2+}$ , com o intuito de sustentar os estudos desenvolvidos posteriormente no âmbito da deteção de cátions no meio intracelular.

Nos gráficos apresentados na **figura 26** está representado o tratamento dos dados experimentais obtidos no estudo da viabilidade celular sob a forma de percentagem de células vivas após a incubação de 4 horas das células HeLa com diferentes concentrações de BODIPY e dos respetivos cátions.

Desta forma pode-se constatar que dentro da gama de concentrações testada (1-10  $\mu\text{g/mL}$ ), comparativamente aos valores do controlo negativo (células não tratadas), o composto não induz efeitos citotóxicos significativos, o que se traduz numa elevada percentagem de células vivas mesmo após a exposição a concentrações maiores (**Figura 26a**). Estes resultados são bastante satisfatórios uma vez que demonstram a biocompatibilidade do derivado de BODIPY. Por outro lado, após o tratamento das células com as soluções de  $\text{Fe}^{3+}$  e  $\text{Hg}^{2+}$  (10-100  $\mu\text{M}$ ) observou-se uma diminuição acentuada da percentagem de células vivas (**Figura 26b**). De facto, estes resultados sugerem que, efetivamente, variações significativas das concentrações destas espécies iónicas podem levar a uma desregulação dos sistemas biológicos.



**Figura 26.** Avaliação da viabilidade das células HeLa após a incubação de 4 horas com diferentes concentrações de BODIPY (a) e dos catiões  $\text{Fe}^{3+}$  e  $\text{Hg}^{2+}$  (b). A viabilidade celular foi determinada através do método de *AquaBlue*. Os dados estão apresentados sob a forma de média  $\pm$  desvio padrão.

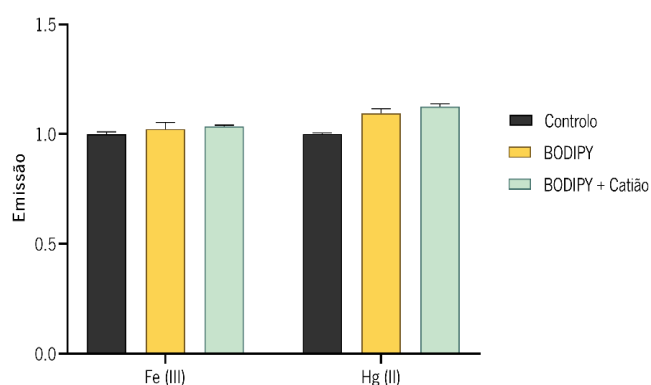
### 3.4.2. Detecção de $\text{Hg}^{2+}$ e $\text{Fe}^{3+}$ intracelular

Tendo em conta a capacidade de resposta fluorimétrica do derivado de BODIPY 3 na presença dos iões de  $\text{Fe}^{3+}$  e  $\text{Hg}^{2+}$  demonstrada nas titulações espectralfluorimétricas em meio aquoso, procedeu-se à avaliação da capacidade sensora em sistemas biológicos. O estudo foi efetuado em células HeLa incubadas com o BODIPY e tratadas com as soluções dos catiões.

Através da análise do gráfico de barras da intensidade de fluorescência apresentado na **figura 27** é possível verificar que comparativamente ao controlo, a fluorescência detetada nas células tratadas



com o BODIPY não difere significativamente. As células tratadas simultaneamente com o composto e o catião apresentaram um comportamento semelhante, não se observando um aumento significativo da intensidade de fluorescência como seria expectável. Estes resultados são pouco conclusivos, já que ausência de variação de fluorescência poderá ser devido à perda de capacidade sensora do derivado de BODIPY no meio intracelular, assim como devido à sua menor capacidade de permeação da membrana celular que dificulta que o composto seja transportado para o interior das células.

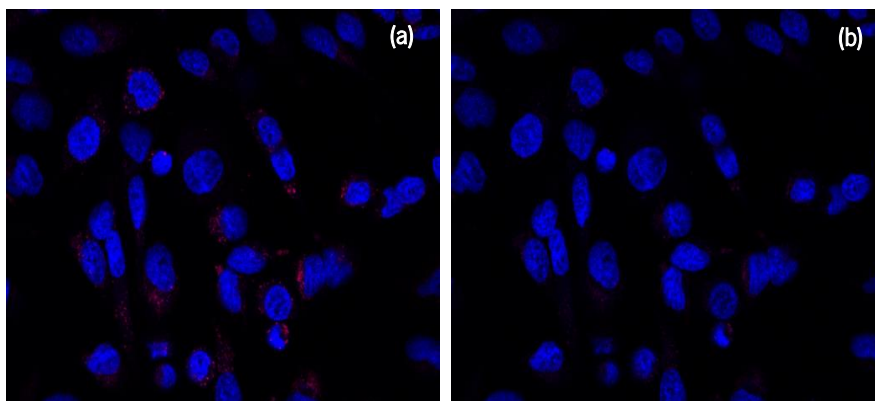


**Figura 27.** Avaliação da capacidade sensora do BODIPY **3** para a detecção  $\text{Fe}^{3+}$  e  $\text{Hg}^{2+}$  intracelular em células HeLa.  $[\text{BODIPY}] = 5 \mu\text{g/mL}$  e  $[\text{Fe}^{3+}] = [\text{Hg}^{2+}] = 20 \mu\text{M}$ . A intensidade de fluorescência foi medida a  $\lambda_{\text{exc/em}} = 490/520 \text{ nm}$ . Os dados estão apresentados sob a forma de média  $\pm$  desvio padrão.

Uma vez que o estudo anterior foi insatisfatório e ambíguo relativamente à resposta fluorimétrica intracelular do composto, procedeu-se à detecção de fluorescência com recurso à microscopia confocal, possibilitando assim a monitorização em tempo real da influência da presença do catião na intensidade de fluorescência do composto.

A **figura 28** corresponde às imagens obtidas através do microscópio confocal das células HeLa tratadas com o derivado de BODIPY **(a)** e 15 minutos após a adição de  $\text{Hg}^{2+}$  **(b)**. É possível observar que, contrariamente ao que seria previsto, ocorre um *quenching* da fluorescência do BODIPY na presença do catião. O mesmo estudo foi efetuado com o ião de  $\text{Fe}^{3+}$ , não se tendo verificado qualquer variação da fluorescência do BODIPY após a adição do catião. De facto, foi demonstrada anteriormente a citotoxicidade do  $\text{Hg}^{2+}$  e estudos indicam que a exposição a este catião poderá induzir alterações da morfologia dos organelos,<sup>57</sup> pelo que a extinção da fluorescência observada poderá estar associada à rutura das estruturas celulares que leva à dispersão do BODIPY pelo meio celular.

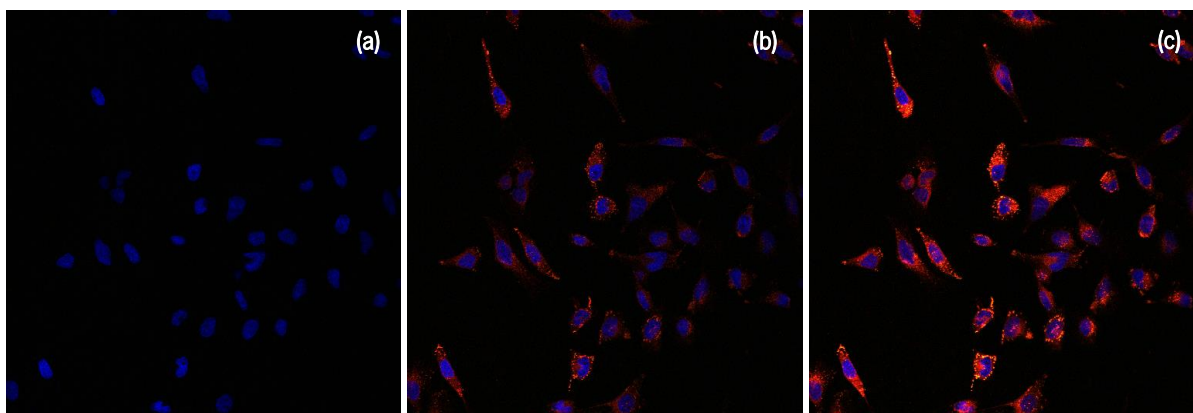
Desta forma, pode-se constatar que, efetivamente, o derivado de BODIPY não é uma sonda fluorescente de  $\text{Hg}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{3+}$  intracelular em células HeLa, no entanto o composto é capaz de difundir através da membrana celular e acumular-se no interior das células.



**Figura 28.** Imagens de fluorescência das células HeLa tratadas com o BODIPY (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (a) e 15 minutos após a adição de  $\text{Hg}^{2+}$  (100  $\mu\text{M}$ ) (b). Marcação fluorescente do núcleo celular (azul) e BODIPY (vermelho).

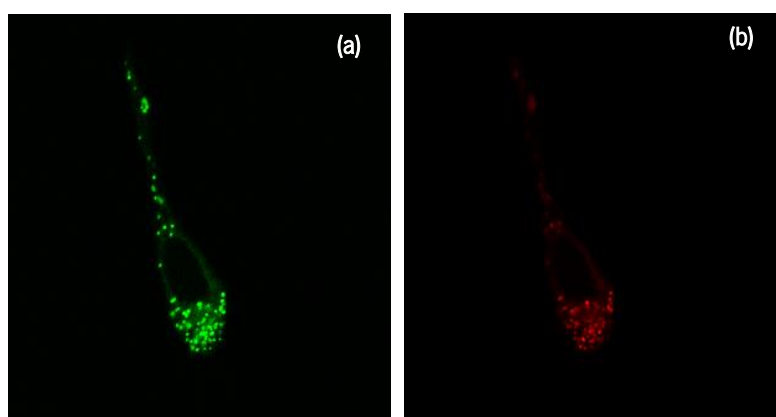
### 3.4.3. Internalização e localização subcelular do derivado de BODIPY 3

Tal como já foi mencionado anteriormente, o derivado de BODIPY 3 demonstrou permear a membrana celular. Neste sentido, procedeu-se ao estudo de microscopia confocal em tempo real de forma a investigar o tempo necessário para que ocorra a internalização do composto pelas células HeLa. As imagens de fluorescência foram adquiridas a cada 2 minutos durante 20 minutos após a adição do BODIPY (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Com base na **figura 29** correspondente à sequência temporal da internalização celular, foi possível verificar que na ausência do composto apenas é observável a fluorescência do marcador do núcleo celular (**Figura 29a**). No entanto, foi visível em torno do núcleo o surgimento de fluorescência intensa 2 minutos após a adição do composto, tendo-se acentuado num espaço de 10 minutos (**Figura 29c**).



**Figura 29.** Evolução temporal da internalização celular do BODIPY 3. Imagem de fluorescência das células HeLa na ausência do composto **(a)**, 2 minutos **(b)** e 10 minutos **(c)** após a adição.

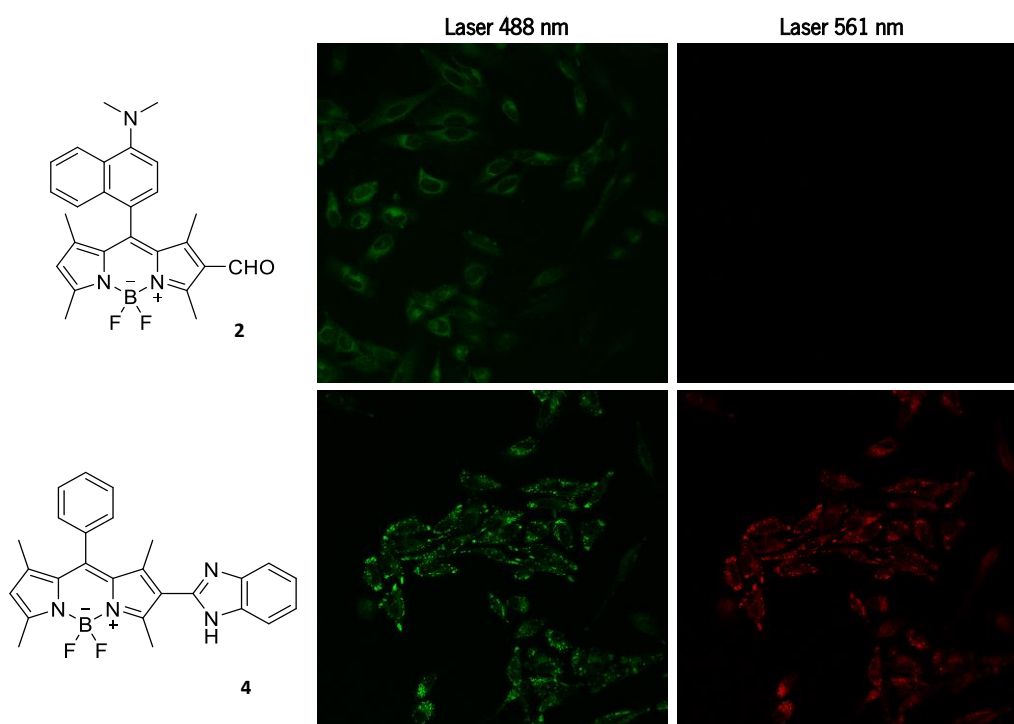
Estes resultados sugerem a fácil permeabilidade celular e rápida difusão do derivado de BODIPY para o meio intracelular. De facto, o composto entra no interior da célula, no entanto a sua localização não é dentro do núcleo celular, mas sim no citoplasma, tal como se pode observar mais detalhadamente na **figura 30**. O padrão de fluorescência do BODIPY sugere a sua acumulação em locais específicos no citoplasma. Adicionalmente, foi observado que a fluorescência do BODIPY 3 é detetada simultaneamente no canal verde, utilizando o laser 488 nm e no canal vermelho, através do laser 561 nm.



**Figura 30.** Imagem de fluorescência das células HeLa tratadas com BODIPY 3 adquiridas com diferentes lasers de excitação. A imagem no canal verde foi adquirida com um filtro de emissão entre 490-570 nm após a excitação a 488 nm **(a)** e a imagem no canal vermelho foi adquirida com um filtro de emissão entre 580-729 nm após a excitação a 561 nm **(b)**.

Esta particularidade relativamente ao comportamento fluorescente do composto no interior das células foi investigada através de um estudo comparativo com dois derivados de BODIPY funcionalizados com diferentes substituintes na posição 2 e na posição *meso*. O derivado **2** faz parte do grupo de compostos sintetizados no âmbito desta dissertação, e difere estruturalmente do derivado **3** apenas na posição 2, contendo um grupo formilo. O derivado **4** foi previamente sintetizado por investigadores do grupo de investigação onde decorreu o trabalho desta dissertação. Este composto foi descrito como sonda fluorescente para a marcação específica de lisossomas.<sup>89</sup> Comparativamente ao derivado **3**, este composto apenas difere estruturalmente na posição *meso*, contendo um grupo fenilo.

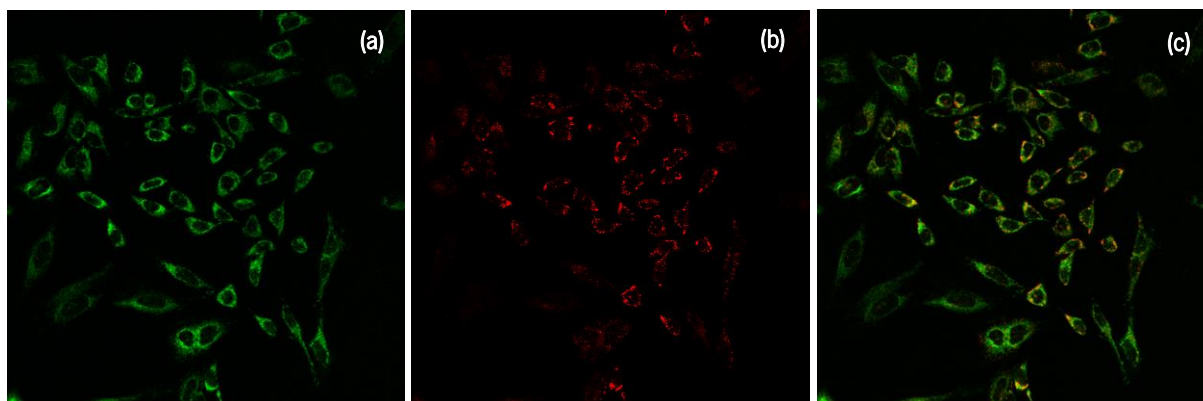
Tal como se pode verificar na **figura 31**, o BODIPY **2** apresenta apenas fluorescência no canal verde, contrariamente, a fluorescência do BODIPY **4** é detetada simultaneamente no canal verde e no canal vermelho. Estes resultados são bastante interessantes uma vez que sugerem que, efetivamente, o grupo funcional inserido no núcleo do BODIPY poderá estar relacionado com este comportamento intracelular. Possivelmente, o grupo benzimidazol poderá estar envolvido no mecanismo da “dupla fluorescência”, uma vez que tanto o derivado **3** como o derivado **4** estão funcionalizados na posição 2 com este heterociclo.



**Figura 31.** Imagens de fluorescência das células HeLa tratadas com derivados de BODIPY funcionalizados com diferentes substituintes na posição 2 e na posição *meso*. As imagens foram adquiridas no canal verde, utilizando o laser 488 nm e no canal vermelho, utilizando o laser 561 nm.

Por fim, com o intuito de avaliar a distribuição subcelular do derivado de BODIPY **3** procedeu-se ao estudo de co-localização utilizando sondas fluorescentes comerciais para a marcação específica de organelos celulares, nomeadamente, da mitocôndria, do retículo endoplasmático e dos lisossomas. Com este ensaio pretendeu-se observar se ocorria sobreposição da fluorescência da sonda e do BODIPY, indicando a sua afinidade para o mesmo organelo celular.

As células HeLa foram tratadas com o derivado de BODIPY **3** (10 µg/mL) e com a sonda comercial *MitoSpy™ Green FM* (300 nM). A fluorescência do composto comercial é observada através do canal verde (**Figura 32a**), enquanto que a marcação fluorescente pelo BODIPY **3** é detetada através do canal vermelho (**Figura 32b**). Foi possível constatar que as marcações fluorescentes não apresentam um padrão semelhante, como é evidenciado após a sobreposição das imagens. Se tal acontecesse, a cor resultante desta sobreposição seria maioritariamente amarela (**Figura 32c**). Desta forma, estes dados sugerem que o derivado de BODIPY não se localiza na mitocôndria.



**Figura 32.** Imagens de fluorescência das células HeLa tratadas com *MitoSpy™ Green FM* (a) e com BODIPY (b). Sobreposição das imagens a e b (c).

O mesmo estudo foi efetuado com as sondas comerciais para o retículo endoplasmático e para os lisossomas, tendo-se verificado de igual forma que não houve sobreposição dos padrões de fluorescência, indicando que a marcação fluorescente pelo BODIPY também não ocorre nos referidos organelos.

Os resultados obtidos ao longo deste estudo em células HeLa demonstraram que o derivado de BODIPY **3** não é uma sonda fluorescente de  $\text{Hg}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{3+}$  intracelular, no entanto o composto mostrou ser biocompatível e capaz de se difundir através da membrana celular, acumulando-se no interior das células. De facto, os valores pouco promissores determinados em solução de acetonitrilo para o seu rendimento quântico de fluorescência e desvio de Stokes, parecem não afetar a capacidade do BODIPY **3** como sonda fluorescente em sistemas biológicos, uma vez que as imagens obtidas por microscopia confocal, apresentaram uma boa marcação fluorescente e um padrão de fluorescência intracelular definido e identificável.

Outro aspeto a ter em consideração é a deteção da “dupla fluorescência”. Por norma, este processo radiativo está associado a dois estados de excitação distintos resultantes do rearranjo eletrónico do fluoróforo.<sup>91</sup> Desta forma, os resultados obtidos sugerem a formação de diferentes conformações eletrónicas do derivado de BODIPY com propriedades emissivas distintas. Tendo como referência estudos já reportados, o efeito da “dupla fluorescência” poderá envolver mecanismos, tais como a transferência intramolecular de carga (ICT) ou ainda a emissão induzida por agregação (AIE).<sup>92,93</sup>

Os resultados obtidos sugerem a existência de diferentes formas do BODIPY **3** em solução, com diferente sensibilidade para a excitação, que pode estar relacionada com o carácter solvatocrómico do núcleo do BODIPY, referido na literatura, e com a formação de agregados no estado excitado, que alteram o comprimento de onda máximo de absorção e emissão.

No que diz respeito à agregação, foi realizado um estudo de fluorescência preliminar do BODIPY **3** em soluções de acetonitrilo com diferentes concentrações, nomeadamente 5,3 mM, 0,53 mM e 0,53  $\mu\text{M}$ , com excitação nos comprimentos de onda usados na microscopia confocal,  $\lambda_{\text{exc}}$  480 nm (canal verde) e  $\lambda_{\text{exc}}$  561 nm (canal vermelho).

Na solução mais diluída (0,53  $\mu$ M), a excitação a 561 nm resultou numa banda pouco intensa a 640 nm, e a excitação a 480 nm originou um espectro de fluorescência com duas bandas de semelhante intensidade a 518 nm e 563 nm. Acresce que estas bandas eram três vezes mais intensas que a banda a 640 nm (obtida com  $\lambda_{exc}$  561 nm). Na solução com concentração 0,53 mM verificou-se que quando o composto foi excitado a 480 nm surgia uma banda de fluorescência a 586 nm, enquanto a excitação a 561 nm originava uma banda de emissão a 616 nm, com intensidades semelhantes. Na solução mais concentrada (5,3 mM), só foi detetada fluorescência com  $\lambda_{exc}$  561 nm tendo surgido uma banda por volta dos 615 nm. Estes resultados parecem sugerir que em soluções mais concentradas, o BODIPY **3** está numa forma agregada com maior comprimento de onda máximo de absorção.

Adicionalmente, estudos de fluorescência em solução do BODIPY **3** realizados em H<sub>2</sub>O e DMEM também revelaram diferenças na sensibilidade à excitação com diferentes comprimentos de onda ( $\lambda_{exc}$  450 e 490 nm): em H<sub>2</sub>O, a principal banda de fluorescência era visível por volta dos 515 nm e também surgia uma banda secundária pouco intensa na zona dos 680 nm. Estas duas bandas apresentavam maior intensidade quando  $\lambda_{exc}$  = 490 nm. Já em DMEM, surgia a banda principal cerca dos 515 nm mas a banda secundária deslocou-se para os 590 nm, com maior intensidade relativamente à que surgia quando o espectro foi obtido em H<sub>2</sub>O. Em DMEM, as duas bandas visíveis apresentavam maior intensidade quando  $\lambda_{exc}$  = 490 nm.

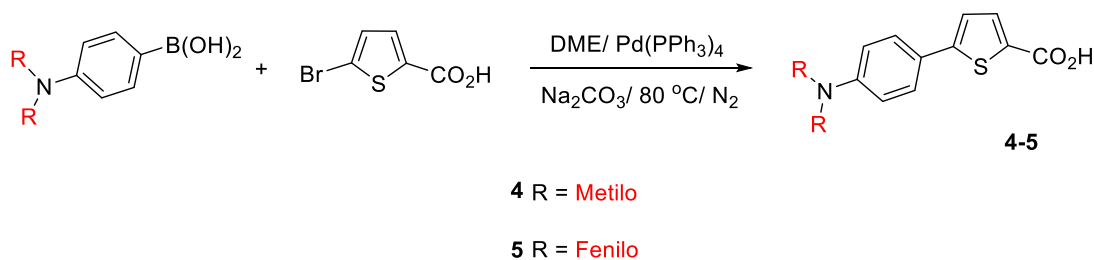
Por fim, importa referir que estudos posteriores serão necessários na tentativa de desvendar qual o alvo intracelular e qual o processo envolvido no fenómeno fotofísico do derivado de BODIPY **3**.

### 3.5. Síntese de derivados de tiofeno por acoplamento de Suzuki

Parte desta dissertação está associada ao projeto “*Self-reporting immunostimulating formulation for on-demand cancer therapy with real-time treatment response monitoring*” em colaboração com o INL. Neste contexto foram sintetizados os derivados de tiofeno através do acoplamento de Suzuki tendo como objetivo a funcionalização de péptidos com estes precursores heterocíclicos com o intuito de posteriormente serem incorporados como unidades de sinalização em sistemas de libertação de fármacos.

O acoplamento de Suzuki consiste na reação entre um grupo ácido borónico e um composto halogenado, tal como um brometo, na presença de um catalisador de paládio. O acoplamento cruzado de Suzuki-Miyaura é um dos mecanismos mais utilizados para a formação de ligações carbono-carbono entre compostos (hetero)aromáticos.<sup>94</sup>

Tendo como objetivo a preparação de derivados de tiofeno com diferentes propriedades fotofísicas, sintetizaram-se os derivados **4** e **5** funcionalizados com os grupos *N,N*-dimetilamino e *N,N*-difenilamino, respetivamente (**Esquema 10**).



**Esquema 10.** Síntese do derivado de tiofeno **4** e **5**.

Os compostos sintetizados foram obtidos com rendimentos baixos, devido a dificuldades no isolamento e purificação. Após tentativas de síntese sem sucesso, verificou-se que o produto da reação estava na forma desprotonada, pelo que se encontrava na fase aquosa e não na fase orgânica, como seria expectável. Desta forma, procedeu-se à acidificação da fase aquosa, com o intuito de promover a protonação e conseqüente precipitação do composto.



---

A estrutura de ambos os derivados sintetizados foi confirmada através das técnicas de espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$  e de infravermelho.

Os sinais correspondentes aos prótons aromáticos e heteroaromáticos do derivado **4** e **5** surgiram na forma de dupletos. A atribuição dos prótons dos sistemas (hetero)aromáticos foi possível através dos valores das constantes de acoplamento, sendo que os sinais correspondentes aos prótons H-3 e H-4 do anel de tiofeno apresentam uma constante de acoplamento menor ( $J=3,6$  Hz) que a dos prótons do anel de benzeno ( $J=8,8$  Hz). Em ambos os compostos, os prótons H-3' e H-5' aromáticos surgem a um desvio químico inferior em relação aos prótons H-2' e H-6' devido ao efeito dador de elétrons dos grupos amino. Os grupos funcionais *N,N*-dimetilamino e *N,N*-difetilamino influenciam os desvios químicos correspondentes aos prótons do sistema aromático, tendo-se verificado ainda que a introdução do *N,N*-difetilamino tem um efeito menos dador de elétrons.

Através dos espectros de infravermelho foi possível identificar as bandas de absorção características do grupo funcional carboxilo.

## Capítulo 4

# *Conclusões e Perspetivas Futuras*

#### 4. Conclusões e Perspetivas Futuras

Os novos derivados de BODIPY funcionalizados com diferentes grupos funcionais foram obtidos através de vias de síntese distintas com rendimentos moderados (22 - 59%). O derivado **1** foi sintetizado através da reação de condensação entre o 2,4-dimetilpirrol com 4-(*N,N*-dimetilamino)-1-naftaldeído. A funcionalização do composto **1** com o grupo formilo na posição 2 através da reação de Vilsmeier-Haack originou o derivado **2**. O derivado **3** funcionalizado com o grupo benzimidazol na posição 2 foi obtido através da reação de ciclo-condensação entre o precursor formilado **2** e *orto*-fenilenodiamina. Os derivados de BODIPY sintetizados foram caracterizados através das técnicas de espectrometria de massa e espectroscopia de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , a partir das quais foi possível comprovar as estruturas químicas e a pureza dos compostos.

A influência da extensão do sistema  $\pi$ -conjugado e do caráter eletrónico dos grupos funcionais nas propriedades fotofísicas dos derivados de BODIPY foi avaliada através de espectroscopia de absorção UV-Vis e fluorescência. Os resultados obtidos demonstraram que a introdução de um grupo retirador de elétrons (derivado **2**) induz um desvio hipsocrómico da banda de absorção, por outro lado, o aumento da extensão do sistema  $\pi$ -conjugado através da funcionalização com o grupo benzimidazol (derivado **3**) induz um desvio batocrómico. No que diz respeito aos espectros de fluorescência, não se observaram deslocamentos significativos das bandas de emissão. O baixo rendimento quântico determinado em acetonitrilo para o derivado de BODIPY **3** ( $\Phi_f = 0,031$ ) poderá estar relacionado com o mecanismo de transferência eletrónica fotoinduzida (PET) ou com a existência de solvatocromismo.

A avaliação dos derivados de BODIPY como sensores óticos de iões metálicos foi realizada através de titulações espectrofotométricas e espectralfluorimétricas em acetonitrilo/água (75:25), consoante os resultados obtidos do estudo preliminar. Foi possível concluir que a funcionalização do núcleo do BODIPY na posição 2 com diferentes grupos funcionais influencia não só a seletividade e sensibilidade do BODIPY mas também o tipo de resposta obtida no processo de reconhecimento dos catiões em meio aquoso. O derivado de BODIPY **2** exibiu fluorimétrica para  $\text{Pd}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  e  $\text{Al}^{3+}$ . Por outro lado, o derivado de BODIPY **3** demonstrou ser sensor colorimétrico de  $\text{Al}^{3+}$  e, simultaneamente, sensor colorimétrico e fluorimétrico de  $\text{Hg}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{3+}$ . O comportamento fluorescente observado em ambos os

derivados, sugere que o mecanismo de sinalização envolvido na coordenação com os catiões é a transferência eletrónica fotoinduzida (PET).

Os estudos efetuados com o derivado de BODIPY **3** utilizando as células cancerígenas HeLa como modelo biológico, contrariamente ao que seria expectável, demonstraram que o composto não é sonda fluorescente de  $\text{Fe}^{3+}$  e  $\text{Hg}^{2+}$  em meio intracelular. Por outro lado, verificou-se que o derivado é biocompatível e, através das imagens de fluorescência adquiridas por microscopia confocal, foi possível constatar que este consegue permear a membrana celular, acumulando-se no interior das células.

De facto, a boa marcação fluorescente e o padrão de fluorescência intracelular definido fazem deste composto uma sonda promissora em bioimagem celular. Estudos futuros focar-se-ão na investigação do alvo intracelular e do mecanismo envolvido no fenómeno da “dupla fluorescência” do derivado de BODIPY **3**.

No que diz respeito aos derivados de tiofeno **4** e **5** sintetizados através do acoplamento de Suzuki, as suas propriedades fotofísicas serão caracterizadas de forma a avaliar a possível aplicação como unidades de sinalização em sistemas de libertação de fármacos constituídos por derivados de péptidos.

## Capítulo 5

# *Referências Bibliográficas*

## 5. Referências Bibliográficas

- (1) Lehn, J. *Supramolecular Chemistry: Concepts and Perspectives*, Wiley: New York, 1995.
- (2) Ariga, K.; Kunitake, T. *Supramolecular Chemistry – Fundamentals and Applications*, Springer Berlin Heidelberg, 2006.
- (3) Yui, N. *Supramolecular Design for Biological Applications*, CRC Press: Boca Raton, 2002.
- (4) Poggi, A.; Fabbri, L. Sensors and Switches from Supramolecular Chemistry. *Chem. Soc. Rev.* **1995**, *24*, 197–202. <https://doi.org/10.1039/cs9952400197>.
- (5) McDonagh, C.; Burke, C. S.; MacCraith, B. D. Optical Chemical Sensors. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 400–422. <https://doi.org/10.1021/cr068102g>.
- (6) Martínez-Mañez, R.; Sancenón, F. Fluorogenic and Chromogenic Chemosensors and Reagents for Anions. *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 4419–4476. <https://doi.org/10.1021/cr010421e>.
- (7) Piriya V.S, A.; Joseph, P.; Daniel S.C.G., K.; Lakshmanan, S.; Kinoshita, T.; Muthusamy, S. Colorimetric Sensors for Rapid Detection of Various Analytes. *Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl.* **2017**, *78*, 1231–1245. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.05.018>.
- (8) Kaur, B.; Kaur, N.; Kumar, S. Colorimetric Metal Ion Sensors – A Comprehensive Review of the Years 2011–2016. *Coord. Chem. Rev.* **2018**, *358*, 13–69. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2017.12.002>.
- (9) Quang, D. T.; Kim, J. S. Fluoro- and Chromogenic Chemodosimeters for Heavy Metal Ion Detection in Solution and Biospecimens. *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 6280–6301. <https://doi.org/10.1021/cr100154p>.
- (10) Zollinger, H. *Color Chemistry*, Wiley: Weinheim, 2003.
- (11) De Silva, A. P.; Gunaratne, H. Q. N.; Gunnlaugsson, T.; Huxley, A. J. M.; McCoy, C. P.; Rademacher, J. T.; Rice, T. E. Signaling Recognition Events with Fluorescent Sensors and Switches. *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 1515–1566. <https://doi.org/10.1021/cr960386p>.
- (12) Wu, J.; Liu, W.; Ge, J.; Zhang, H.; Wang, P. New Sensing Mechanisms for Design of Fluorescent Chemosensors Emerging in Recent Years. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 3483–3495. <https://doi.org/10.1039/c0cs00224k>.
- (13) Wu, D.; Sedgwick, A. C.; Gunnlaugsson, T.; Akkaya, E. U.; Yoon, J.; James, T. D. Fluorescent Chemosensors: The Past, Present and Future. *Chem. Soc. Rev.* **2017**, *46*, 7105–7123. <https://doi.org/10.1039/c7cs00240h>.
- (14) Kwon, N.; Hu, Y.; Yoon, J. Fluorescent Chemosensors for Various Analytes Including Reactive Oxygen Species, Biothiol, Metal Ions, and Toxic Gases. *ACS Omega* **2018**, *3*, 13731–13751. <https://doi.org/10.1021/acsomega.8b01717>.
- (15) Jiang, P.; Guo, Z. Fluorescent Detection of Zinc in Biological Systems: Recent Development on the Design of Chemosensors and Biosensors. *Coord. Chem. Rev.* **2004**, *248*, 205–229. <https://doi.org/10.1016/j.cct.2003.10.013>.
- (16) Basabe-Desmonts, L.; Reinhoudt, D. N.; Crego-Calama, M. Design of Fluorescent Materials for Chemical Sensing. *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 993–1017. <https://doi.org/10.1039/b609548h>.

- (17) Valeur, B.; Berberan-Santos, M. N. *Molecular Fluorescence : Principles and Applications*; Wiley-VCH: Weinheim, 2012.
- (18) De Silva, A. P.; Moody, T. S.; Wright, G. D. Fluorescent PET (Photoinduced Electron Transfer) Sensors as Potent Analytical Tools. *Analyst* **2009**, *134*, 2385–2393. <https://doi.org/10.1039/b912527m>.
- (19) Ghosh, S. K.; Pal, T. Photophysical Aspects of Molecular Probes near Nanostructured Gold Surfaces. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2009**, *11*, 3831–3844. <https://doi.org/10.1039/b817373g>.
- (20) Roy, P.; Jha, A.; Yasarapudi, V. B.; Ram, T.; Puttaraju, B.; Patil, S.; Dasgupta, J. Ultrafast Bridge Planarization in Donor- $\pi$ -Acceptor Copolymers Drives Intramolecular Charge Transfer. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 1716 (1-10). <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01928-z>.
- (21) Cheng, D.; Liu, X.; Xie, Y.; Lv, H.; Wang, Z.; Yang, H.; Han, A.; Yang, X.; Zang, L. A Ratiometric Fluorescent Sensor for Cd<sup>2+</sup> Based on Internal Charge Transfer. *Sensors* **2017**, *17*, 2517 (1-10). <https://doi.org/10.3390/s17112517>.
- (22) Yoshihara, T.; Druzhinin, S. I.; Zachariasse, K. A. Fast Intramolecular Charge Transfer with a Planar Rigidized Electron Donor/Acceptor Molecule. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 8535–8539. <https://doi.org/10.1021/ja049809s>.
- (23) Chowdhury, S.; Rooj, B.; Dutta, A.; Mandal, U. Review on Recent Advances in Metal Ions Sensing Using Different Fluorescent Probes. *J. Fluoresc.* **2018**, *28*, 999–1021. <https://doi.org/10.1007/s10895-018-2263-y>.
- (24) Panja, S. K.; Dwivedi, N.; Saha, S. Tuning the Intramolecular Charge Transfer (ICT) Process in Push-Pull Systems: Effect of Nitro Groups. *RSC Adv.* **2016**, *6*, 105786–105794. <https://doi.org/10.1039/c6ra17521j>.
- (25) Kundu, P.; Banerjee, D.; Maiti, G.; Chattopadhyay, N. Dehydrogenation Induced Inhibition of Intramolecular Charge Transfer in Substituted Pyrazoline Analogues. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2017**, *19*, 11937–11946. <https://doi.org/10.1039/c7cp01121k>.
- (26) Misra, R.; Bhattacharyya, S. P. *Intramolecular Charge Transfer : Theory and Applications*; Wiley-VCH Verlag: Weinheim, 2018.
- (27) Truong, K.; Ikura, M. The Use of FRET Imaging Microscopy to Detect Protein-Protein Interactions and Protein Conformational Changes in Vivo. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2001**, *11*, 573–578. [https://doi.org/10.1016/S0959-440X\(00\)00249-9](https://doi.org/10.1016/S0959-440X(00)00249-9).
- (28) Stroik, D. R.; Yuen, S. L.; Janicek, K. A.; Schaaf, T. M.; Li, J.; Ceholski, D. K.; Hajjar, R. J.; Cornea, R. L.; Thomas, D. D. Targeting Protein-Protein Interactions for Therapeutic Discovery via FRET-Based High-Throughput Screening in Living Cells. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 12560 (1-13). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29685-z>.
- (29) Dolde, C.; Bischof, J.; Grüter, S.; Montada, A.; Halekotte, J.; Peifer, C.; Kalbacher, H.; Baumann, U.; Knippschild, U.; Suter, B. A CK1 FRET Biosensor Reveals That DDX3X Is an Essential Activator of CK1 $\epsilon$ . *J. Cell Sci.* **2018**, *131*, 207316 (1-13). <https://doi.org/10.1242/jcs.207316>.
- (30) Hochreiter, B.; Garcia, A. P.; Schmid, J. A. Fluorescent Proteins as Genetically Encoded FRET Biosensors in Life Sciences. *Sensors* **2015**, *15*, 26281–26314.

- <https://doi.org/10.3390/s151026281>.
- (31) Shrestha, D.; Jenei, A.; Nagy, P.; Vereb, G.; Szöllősi, J. Understanding FRET as a Research Tool for Cellular Studies. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16*, 6718–6756. <https://doi.org/10.3390/ijms16046718>.
- (32) Wandell, R. J.; Younes, A. H.; Zhu, L. Metal-Coordination-Mediated Sequential Chelation-Enhanced Fluorescence (CHEF) and Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) in a Heteroditopic Ligand System. *New J. Chem.* **2010**, *34*, 2176–2182. <https://doi.org/10.1039/c0nj00241k>.
- (33) Mansell, D.; Rattray, N.; Etchells, L. L.; Schwalbe, C. H.; Blake, A. J.; Bichenkova, E. V.; Bryce, R. A.; Barker, C. J.; Díaz, A.; Kremer, C. Fluorescent Probe: Complexation of Fe<sup>3+</sup> with the Myo-Inositol 1,2,3-Trisphosphate Motif. *Chem. Commun.* **2008**, *41*, 5161–5163. <https://doi.org/10.1039/b809238a>.
- (34) Ustimova, M. A.; Lebedeva, A. Y.; Fedorov, Y. V.; Berdnikova, D. V.; Fedorova, O. A. FRET-Based Metal Ion Sensing by a Crown-Containing Bisstyryl Dye. *New J. Chem.* **2018**, *42*, 7908–7913. <https://doi.org/10.1039/c8nj00205c>.
- (35) Walla, P. J. *Modern Biophysical Chemistry: Detection and Analysis of Biomolecules*; Wiley-VCH: Weinheim, 2014.
- (36) Georgiev, N. I.; Asiri, A. M.; Qusti, A. H.; Alamry, K. A.; Bojinov, V. B. A pH Sensitive and Selective Ratiometric PAMAM Wavelength-Shifting Bichromophoric System Based on PET, FRET and ICT. *Dyes Pigments* **2014**, *102*, 35–45. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2013.10.007>.
- (37) Panchenko, P. A.; Fedorov, Y. V.; Fedorova, O. A.; Jonusauskas, G. FRET versus PET: Ratiometric Chemosensors Assembled from Naphthalimide Dyes and Crown Ethers. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2015**, *17*, 22749–22757. <https://doi.org/10.1039/c5cp03510d>.
- (38) Treibs, A.; Kreuzer, F.-H. Difluorboryl-Komplexe von Di- Und Tripyrrylmethenen. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1968**, *718*, 208–223. <https://doi.org/10.1002/jlac.19687180119>.
- (39) Ulrich, G.; Zissel, R.; Harriman, A. The Chemistry of Fluorescent Bodipy Dyes: Versatility Unsurpassed. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2008**, *47*, 1184–1201. <https://doi.org/10.1002/anie.200702070>.
- (40) Loudet, A.; Burgess, K. BODIPY Dyes and Their Derivatives: Syntheses and Spectroscopic Properties. *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 4891–4932. <https://doi.org/10.1021/cr078381n>.
- (41) Bertrand, B.; Passador, K.; Goze, C.; Denat, F.; Bodio, E.; Salmain, M. Metal-Based BODIPY Derivatives as Multimodal Tools for Life Sciences. *Coord. Chem. Rev.* **2018**, *358*, 108–124. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2017.12.007>.
- (42) Llano, R. S.; Zaballa, E. A.; Bañuelos, J.; Durán, C. F. A. G.; Vázquez, J. L. B.; Cabrera, E. P.; Arbeloa, I. L. Tailoring the Photophysical Signatures of BODIPY Dyes: Toward Fluorescence Standards across the Visible Spectral Region. In *Photochemistry and Photophysics - Fundamentals to Applications*; InTech, 2018. <https://doi.org/10.5772/intechopen.74848>.
- (43) Invitrogen Molecular Probes: [www.invitrogen.com](http://www.invitrogen.com). Data de acesso: 27 de junho de 2019.
- (44) Esnal, I.; Valois-Escamilla, I.; Gómez-Durán, C. F. A.; Urias-Benavides, A.; Betancourt-Mendiola, M. L.; López-Arbeloa, I.; Bañuelos, J.; García-Moreno, I.; Costela, A.; Peña-Cabrera, E. Blue-to-Orange Color-Tunable Laser Emission from Tailored Boron-Dipyrromethene Dyes.



- ChemPhysChem* **2013**, *14*, 4134–4142. <https://doi.org/10.1002/cphc.201300818>.
- (45) Zhao, N.; Xuan, S.; Fronczek, F. R.; Smith, K. M.; Vicente, M. G. H. Enhanced Hypsochromic Shifts, Quantum Yield, and  $\pi$ - $\pi$  Interactions in a *Meso*, $\beta$ -Heteroaryl-Fused BODIPY. *J. Org. Chem.* **2017**, *82*, 3880–3885. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.6b02981>.
- (46) Arroyo-Córdoba, I. J.; Sola-Llano, R.; Epelde-Elezcano, N.; Arbeloa, I. L.; Martínez-Martínez, V.; Peña-Cabrera, E. Fully Functionalizable  $\beta$ , $\beta'$ -BODIPY Dimer: Synthesis, Structure, and Photophysical Signatures. *J. Org. Chem.* **2018**, *83*, 10186–10196. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.8b01429>.
- (47) Leen, V.; Yuan, P.; Wang, L.; Boens, N.; Dehaen, W. Synthesis of *Meso*-Halogenated BODIPYs and Access to *Meso*-Substituted Analogues. *Org. Lett.* **2012**, *14*, 6150–6153. <https://doi.org/10.1021/ol3028225>.
- (48) Ni, Y.; Wu, J. Far-Red and near Infrared BODIPY Dyes: Synthesis and Applications for Fluorescent pH Probes and Bio-Imaging. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 3774–3791. <https://doi.org/10.1039/c3ob42554a>.
- (49) Karlsson, J. K. G.; Harriman, A. Origin of the Red-Shifted Optical Spectra Recorded for Aza-BODIPY Dyes. *J. Phys. Chem. A* **2016**, *120*, 2537–2546. <https://doi.org/10.1021/acs.jpca.6b01278>.
- (50) Kowada, T.; Maeda, H.; Kikuchi, K. BODIPY-Based Probes for the Fluorescence Imaging of Biomolecules in Living Cells. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 4953–4972. <https://doi.org/10.1039/c5cs00030k>.
- (51) Abrahamse, H.; Hamblin, M. R. New Photosensitizers for Photodynamic Therapy. *Biochem. J.* **2016**, *473*, 347–364. <https://doi.org/10.1042/BJ20150942>.
- (52) Rice, D. R.; Gan, H.; Smith, B. D. Bacterial Imaging and Photodynamic Inactivation Using Zinc(II)-Dipicolylamine BODIPY Conjugates. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2015**, *14*, 1271–1281. <https://doi.org/10.1039/c5pp00100e>.
- (53) Singh, S. P.; Gayathri, T. Evolution of BODIPY Dyes as Potential Sensitizers for Dye Sensitized Solar Cells. *Eur. J. Org. Chem.* **2014**, *2014*, 4689–4707. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201400093>.
- (54) Ziessel, R.; Harriman, A. Artificial Light-Harvesting Antennae: Electronic Energy Transfer by Way of Molecular Funnels. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 611–631. <https://doi.org/10.1039/c0cc02687e>.
- (55) Williams, R. J. P. Role of Transition Metal Ions in Biological Processes. *R. Inst. Chem. Rev.* **1968**, *1*, 13–38. <https://doi.org/10.1039/rr9680100013>.
- (56) Valeur, B. Design Principles of Fluorescent Molecular Sensors for Cation Recognition. *Coord. Chem. Rev.* **2000**, *205*, 3–40. [https://doi.org/10.1016/S0010-8545\(00\)00246-0](https://doi.org/10.1016/S0010-8545(00)00246-0).
- (57) Vergilio, C. S.; Carvalho, C. E. V.; Melo, E. J. T. Mercury-Induced Dysfunctions in Multiple Organelles Leading to Cell Death. *Toxicol. Vitr.* **2015**, *29*, 63–71. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2014.09.006>.
- (58) Crichton, R. R. An Overview of Metals and Selected Nonmetals in Biology. In *Biological Inorganic Chemistry*; Elsevier: Oxford, 2012; pp 1–19.

- (59) Helaluddin, A. B. M.; Khalid, R. S.; Alaama, M.; Abbas, S. A. Main Analytical Techniques Used for Elemental Analysis in Various Matrices. *Trop. J. Pharm. Res.* **2016**, *15*, 427–434. <https://doi.org/10.4314/tjpr.v15i2.29>.
- (60) Qian, X.; Xu, Z. Fluorescence Imaging of Metal Ions Implicated in Diseases. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 4487–4493. <https://doi.org/10.1039/c4cs00292j>.
- (61) Carter, K. P.; Young, A. M.; Palmer, A. E. Fluorescent Sensors for Measuring Metal Ions in Living Systems. *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 4564–4601. <https://doi.org/10.1021/cr400546e>.
- (62) Lu, Z.; Fan, W.; Lu, Y.; Fan, C.; Zhao, H.; Guo, K.; Chu, W.; Lu, Y. A Highly Sensitive Fluorescent Probe for Bioimaging Zinc Ion in Living Cells and Zebrafish Models. *New J. Chem.* **2018**, *42*, 12198–12204. <https://doi.org/10.1039/C8NJ02197J>.
- (63) Esteves, C. I. C.; Raposo, M. M. M.; Costa, S. P. G. New 2,4,5-Triarylimidazoles Based on a Phenylalanine Core: Synthesis, Photophysical Characterization and Evaluation as Fluorimetric Chemosensors for Ion Recognition. *Dyes Pigments* **2016**, *134*, 258–268. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2016.07.020>.
- (64) Esteves, C. I. C.; Batista, R. M. F.; Raposo, M. M. M.; Costa, S. P. G. Novel Functionalised Imidazo-Benzocrown Ethers Bearing a Thiophene Spacer as Fluorimetric Chemosensors for Metal Ion Detection. *Dyes Pigments* **2016**, *135*, 134–142. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2016.04.037>.
- (65) Batista, R. M. F.; Costa, S. P. G.; Silva, R. M. P.; Lima, N. E. M.; Raposo, M. M. M. Synthesis and Evaluation of Arylfuryl-Bis(Indolyl)Methanes as Selective Chromogenic and Fluorogenic Ratiometric Receptors for Mercury Ion in Aqueous Solution. *Dyes Pigments* **2014**, *102*, 293–300. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2013.11.008>.
- (66) Zhou, Y.; Li, Z. X.; Zang, S. Q.; Zhu, Y. Y.; Zhang, H. Y.; Hou, H. W.; Mak, T. C. W. A Novel Sensitive Turn-on Fluorescent Zn<sup>2+</sup> Chemosensor Based on an Easy to Prepare C 3-Symmetric Schiff-Base Derivative in 100% Aqueous Solution. *Org. Lett.* **2012**, *14*, 1214–1217. <https://doi.org/10.1021/ol2034417>.
- (67) Esteves, C. I. C.; Ferreira, R. C. M.; Raposo, M. M. M.; Costa, S. P. G. New Fluoroionophores for Metal Cations Based on Benzo[d]Oxazol-5-yl-Alanine Bearing Pyrrole and Imidazole. *Dyes Pigments* **2018**, *151*, 211–218. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2017.12.040>.
- (68) Yan, Z.; Yuen, M. F.; Hu, L.; Sun, P.; Lee, C. S. Advances for the Colorimetric Detection of Hg<sup>2+</sup> in Aqueous Solution. *RSC Adv.* **2014**, *4*, 48373–48388. <https://doi.org/10.1039/c4ra07930b>.
- (69) Rurack, K. 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.* **2001**, *57*, 2161–2195. [https://doi.org/10.1016/S1386-1425\(01\)00492-9](https://doi.org/10.1016/S1386-1425(01)00492-9).
- (70) Yuan, M.; Li, Y.; Li, J.; Li, C.; Liu, X.; Lv, J.; Xu, J.; Liu, H.; Wang, S.; Zhu, D. A Colorimetric and Fluorometric Dual-Modal Assay for Mercury Ion by a Molecule. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 2313–2316. <https://doi.org/10.1021/ol0706399>.
- (71) Wang, B.; Anslyn, E. V. *Chemosensors: Principles, Strategies, and Applications*; Wiley: New Jersey, 2011.

- (72) Boens, N.; Leen, V.; Dehaen, W. Fluorescent Indicators Based on BODIPY. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 1130–1172. <https://doi.org/10.1039/c1cs15132k>.
- (73) Bozdemir, O. A.; Guliyev, R.; Buyukcakil, O.; Selcuk, S.; Kolemen, S.; Gulseren, G.; Nalbantoglu, T.; Boyaci, H.; Akkaya, E. U. Selective Manipulation of ICT and PET Processes in Styryl-Bodipy Derivatives: Applications in Molecular Logic and Fluorescence Sensing of Metal Ions. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 8029–8036. <https://doi.org/10.1021/ja1008163>.
- (74) Wu, D.; Chen, L.; Lee, W.; Ko, G.; Yin, J.; Yoon, J. Recent Progress in the Development of Organic Dye Based Near-Infrared Fluorescence Probes for Metal Ions. *Coord. Chem. Rev.* **2018**, *354*, 74–97. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2017.06.011>.
- (75) Lo Presti, M.; Martínez-Mañez, R.; Ros-Lis, J. V.; Batista, R. M. F.; Costa, S. P. G.; Raposo, M. M.; Sancenón, F. A Dual Channel Sulphur-Containing a Macrocycle Functionalised BODIPY Probe for the Detection of Hg(II) in a Mixed Aqueous Solution. *New J. Chem.* **2018**, *42*, 7863–7868. <https://doi.org/10.1039/c7nj04699e>.
- (76) Nagano, T. Development of Fluorescent Probes for Bioimaging Applications. *Proc. Japan Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* **2010**, *86*, 837–847. <https://doi.org/10.2183/pjab.86.837>.
- (77) Alamudi, S. H.; Chang, Y. T. Advances in the Design of Cell-Permeable Fluorescent Probes for Applications in Live Cell Imaging. *Chem. Commun.* **2018**, *54*, 13641–13653. <https://doi.org/10.1039/c8cc08107g>.
- (78) Guo, Z.; Park, S.; Yoon, J.; Shin, I. Recent Progress in the Development of Near-Infrared Fluorescent Probes for Bioimaging Applications. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 16–29. <https://doi.org/10.1039/c3cs60271k>.
- (79) Freidus, L. G.; Pradeep, P.; Kumar, P.; Choonara, Y. E.; Pillay, V. Alternative Fluorophores Designed for Advanced Molecular Imaging. *Drug Discov. Today* **2018**, *23*, 115–133. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2017.09.008>.
- (80) Zhang, X.; Xiao, Y.; Qi, J.; Qu, J.; Kim, B.; Yue, X.; Belfield, K. D. Long-Wavelength, Photostable, Two-Photon Excitable BODIPY Fluorophores Readily Modifiable for Molecular Probes. *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 9153–9160. <https://doi.org/10.1021/jo401379g>.
- (81) Lee, J. J.; Lee, S. C.; Zhai, D.; Ahn, Y. H.; Yeo, H. Y.; Tan, Y. L.; Chang, Y. T. Bodipy-Diacrylate Imaging Probes for Targeted Proteins Inside Live Cells. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 4508–4510. <https://doi.org/10.1039/c1cc10362h>.
- (82) Gayathri, T.; Karnewar, S.; Kotamraju, S.; Singh, S. P. High Affinity Neutral Bodipy Fluorophores for Mitochondrial Tracking. *ACS Med. Chem. Lett.* **2018**, *9*, 618–622. <https://doi.org/10.1021/acsmedchemlett.8b00022>.
- (83) Liu, Y.; Pei, Q.; Chen, L.; Li, Z.; Xie, Z. Reduction-Responsive Fluorescence off-on BODIPY-Camptothecin Conjugates for Self-Reporting Drug Release. *J. Mater. Chem. B* **2016**, *4*, 2332–2337. <https://doi.org/10.1039/c6tb00009f>.
- (84) Lakshmi, V.; Rajeswara Rao, M.; Ravikanth, M. Halogenated Boron-Dipyrromethenes: Synthesis, Properties and Applications. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 2501–2517. <https://doi.org/10.1039/c4ob02293a>.
- (85) Kürti, L.; Czako, B. *Strategic Applications of Named Reactions in Organic Synthesis : Background*

- and Detailed Mechanisms*; Elsevier: London, 2005.
- (86) Marín-Hernández, C.; Santos-Figueroa, L. E.; Moragues, M. E.; Raposo, M. M. M.; Batista, R. M. F.; Costa, S. P. G.; Pardo, T.; Martínez-Máñez, R.; Sancenón, F. Imidazoanthraquinone Derivatives for the Chromofluorogenic Sensing of Basic Anions and Trivalent Metal Cations. *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 10752–10761. <https://doi.org/10.1021/jo501515e>.
- (87) Batista, R. M. F.; Costa, S. P. G.; Belsley, M.; Raposo, M. M. M. Synthesis and Second-Order Nonlinear Optical Properties of New Chromophores Containing Benzimidazole, Thiophene, and Pyrrole Heterocycles. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 9842–9849. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2007.06.098>.
- (88) Beaulieu, P. L.; Haché, B.; Von Moos, E. A Practical Oxone - Mediated, High-Throughput, Solution-Phase Synthesis of Benzimidazoles from 1,2-Phenylenediamines and Aldehydes and Its Application to Preparative Scale Synthesis. *Synthesis* **2003**, *11*, 1683–1692. <https://doi.org/10.1055/s-2003-40888>.
- (89) Li, Z.; Li, L. J.; Sun, T.; Liu, L.; Xie, Z. Benzimidazole-BODIPY as Optical and Fluorometric pH Sensor. *Dyes Pigments* **2016**, *128*, 165–169. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2016.01.029>.
- (90) Marín-Hernández, C.; Santos-Figueroa, L. E.; El Sayed, S.; Pardo, T.; Raposo, M. M. M.; Batista, R. M. F.; Costa, S. P. G.; Sancenón, F.; Martínez-Máñez, R. Synthesis and Evaluation of the Chromo-Fluorogenic Recognition Ability of Imidazoquinoline Derivatives toward Ions. *Dyes Pigments* **2015**, *122*, 50–58. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2015.06.011>.
- (91) Brancato, G.; Signore, G.; Neyroz, P.; Polli, D.; Cerullo, G.; Abbandonato, G.; Nucara, L.; Barone, V.; Beltram, F.; Bizzarri, R. Dual Fluorescence through Kasha's Rule Breaking: An Unconventional Photomechanism for Intracellular Probe Design. *J. Phys. Chem. B* **2015**, *119*, 6144–6154. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.5b01119>.
- (92) Fan, J.; Sun, W.; Hu, M.; Cao, J.; Cheng, G.; Dong, H.; Song, K.; Liu, Y.; Sun, S.; Peng, X. An ICT-Based Ratiometric Probe for Hydrazine and Its Application in Live Cells. *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 8117–8119. <https://doi.org/10.1039/c2cc34168a>.
- (93) Bai, Y.; Liu, D.; Han, Z.; Chen, Y.; Chen, Z.; Jiao, Y.; He, W.; Guo, Z. BODIPY-Derived Ratiometric Fluorescent Sensors: pH-Regulated Aggregation-Induced Emission and Imaging Application in Cellular Acidification Triggered by Crystalline Silica Exposure. *Sci. China Chem.* **2018**, *61*, 1413–1422. <https://doi.org/10.1007/s11426-018-9284-4>.
- (94) Miyaura, N.; Suzuki, A. Palladium-Catalyzed Cross-Coupling Reactions of Organoboron Compounds. *Chem. Rev.* **1995**, *95*, 2457–2483. <https://doi.org/10.1021/cr00039a007>.