UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Síntese de heptameteno cianinas fotoativas: estudo fotofísico e imageamento

LOUISE KOMMERS REIMANN

Prof. Dr. Fabiano Severo Rodembusch
Orientador

Porto Alegre, Janeiro de 2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

LOUISE KOMMERS REIMANN

Síntese de heptameteno cianinas fotoativas: estudo fotofísico e imageamento

Dissertação apresentada como requisito parcial para a
obtenção do grau de Mestre em Química

Prof. Dr. Fabiano Severo Rodembusch
Orientador

Porto Alegre, Janeiro de 2020

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus pelo dom da vida, por me proteger e me abençoar infinitamente. Agradeço a Deus por me dar sabedoria e me guiar em todas as escolhas.

Agradeço aos meus pais, Nilo e Elaine, por não medirem esforços para eu poder realizar mais um sonho. Por me apoiarem e estarem ao meu lado em todas as etapas da minha vida. Obrigada por serem a minha referência.

À minha irmã, Flaviane, que é essencial na minha vida, agradeço pela sua amizade, por todo o amor e por estar sempre presente na minha vida.

Ao meu orientador, Professor Dr. Fabiano Severo Rodembusch, por ser um exemplo para mim, pela excelente orientação, por todos os conselhos e pela paciência. Minha gratidão por poder contar contigo.

Aos colegas de laboratório do E210, agradeço aos conhecimentos compartilhados e por tornarem o dia a dia mais leve e agradável.

Ao Programa de Pós Graduação do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) pela oportunidade concedida.

Aos órgãos de fomento CAPES, CNPq e FAPERGS pelas bolsas e auxílio financeiro.

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS VI

ÍNDICE DE TABELAS X

LISTA DE ABREVIATURAS XI

RESUMO XIII

ABSTRACT XIV

1. INTRODUÇÃO 1

2. OBJETIVOS 2

2.1. OBJETIVOS GERAIS 2

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 2

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 3

3.1. CIANINAS 3

3.2. SUBSTITUIÇÃO NA POSIÇÃO MESO DE HEPTAMETENO CIANINAS 5

3.3. PROCESSOS FOTOFÍSICOS 7

3.4. SOLVATOCROMISMO 12

3.5. AGREGADOS DO TIPO H E J 14

3.6. TRANSFERÊNCIA DE CARGA INTRAMOLECULAR 17

3.7. EFEITO DA POLARIDADE DO SOLVENTE NO MECANISMO ICT 19

3.8. BIOIMAGEAMENTO 20

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 23

4.1. ALQUILAÇÃO DE INDÓIS 23

4.2. SÍNTESE DE SAL PENTAMETÍNICO 24

4.3. SÍNTESE DE HEPTAMETENO CIANINAS 27

4.4. SÍNTESE DE HEPTAMETENO CIANINAS SUBSTITUÍDAS NA POSIÇÃO MESO 30

4.5. ESTUDO FOTOFÍSICO 33

4.6. EFEITO DA POLARIDADE DO SOLVENTE 41

4.7. AVALIAÇÃO DOS COMPOSTOS COMO SENSORES ÓPTICOS PARA ADULTERAÇÃO DO ETANOL COM METANOL 44

4.8. AVALIAÇÃO DOS COMPOSTOS SINTETIZADOS COMO SONDA PARA AMINOÁCIDOS 47

4.9. CICLIZAÇÃO INDUZIDA POR SOLVENTE 49

4.10. AVALIAÇÃO DOS COMPOSTOS SINTETIZADOS COMO POTENCIAIS MARCADORES CELULARES 52
5. CONCLUSÃO 55
6. PERSPECTIVAS 56
7. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS 57
7.1. MATERIAIS E MÉTODOS 57
7.2. ALQUILAÇÃO DE INDÓIS 58
7.3. SÍNTESE DE SAL PENTAMETÍNICO 58
7.4. SÍNTESE DE HEPTAMETENO CIANINAS 59
7.5. SÍNTESE DAS HEPTAMETENO CIANINAS SUBSTITUÍDAS NA POSIÇÃO MESO 60
7.6. ESPECTROSCOPIA DE MASSAS DE ALTA RESOLUÇÃO (HRMS) 61
7.7. SONDA PARA AMINOÁCIDOS 61
7.8. BIOIMAGEAMENTO 61
7.8.1. CULTURA DE CÉLULAS 61
7.8.2. COMPOSTOS FLUORESCENTES 61
7.8.3. FLUORESCÊNCIA EM CÉLULAS *IN VITRO* 61
7.8.4. FLUORESCÊNCIA EM CÉLULAS *IN VIVO* 62
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 63
9. ANEXOS 67

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Heptameteno cianinas substituídas na posição meso..... 2

Figura 2. Cianinas com diferentes números de carbonos sp²..... 3

Figura 3. Cianinas com diferentes momentos de dipolo..... 4

Figura 4. Momento de dipolo e mudança nos máximos de absorção. (Adaptado de Pascal, S.; Haefele, A.; Monnereau, C.; Charaf-Eddin, A.; Jacquemin, D.; Le Guennic, B.; Andraud, C.; Maury, O. *J. Phys. Chem. A* **2014**, *118* (23), 4038.)..... 4

Figura 5. Exemplo de composto meso. (Adaptado de Sun, W.; Guo, S.; Hu, C.; Fan, J.; Peng, X. *Chem. Rev.* **2016**, 116, 7768 e Duarte, R. C. *Síntese de novas heptameteno cianinas: estudo e aplicação de suas propriedades fotofisícas e fotoeletroquímicas*. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal do Rio Grande Do Sul, Porto Alegre, **2017**.)..... 5

Figura 6. Possíveis transições eletrônicas na molécula do formaldeído. (Adaptado de Valeur, B. *Molecular Fluorescence Principles and Applications*; 3. Ed. Wiley-VCH. **2001**.)..... 8

Figura 7. Efeitos das ligações π conjugadas na energia de transição eletrônica $\pi-\pi^*$. (Adaptado de Valeur, B. *Molecular Fluorescence Principles and Applications*; 3. Ed. Wiley-VCH. **2001**.)..... 8

Figura 8. Transições eletrônicas permitidas. (Adaptado de Valeur, B. *Molecular Fluorescence Principles and Applications*; 3. Ed. Wiley-VCH. **2001**.)..... 9

Figura 9. Distinção entre o estado singlete e triplete na molécula do formaldeído. (Adaptado de Valeur, B. *Molecular Fluorescence Principles and Applications*; 3. Ed. Wiley-VCH. **2001**.)..... 9

Figura 10. Diagrama de Jablonski e espectros de absorção, fluorescência e fosforescência. (Adaptado de Valeur, B. *Molecular Fluorescence Principles and Applications*; 3. Ed. Wiley-VCH. **2001**.)..... 10

Figura 11. Espectro de absorção e emissão estruturados do antraceno e transições entre níveis vibracionais. (Adaptado de Lakowicz, J. R. *Principals of Fluorescence Spectroscopy*; 3. Ed. Springer, **2006**.)..... 11

Figura 12. Solvatocromismo positivo e negativo e estabilização do HOMO e LUMO..... 13

Figura 13. Espectro de absorção da benzofenona e a influência da polaridade do solvente no solvatocromismo batocrômico e hipsocrômico. (Adaptado de Rouessac, F.; Rouessac, A. *Chemical Analysis: Modern Instrumentation Methods and Techniques*. 2. ed. Inglaterra: Wiley, **2007**.)..... 13

Figura 14. Representação da formação de agregados do tipo H e J. (Adaptado de Sun, W.; Guo, S.; Hu, C.; Fan, J.; Peng, X. *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 7768.)..... 14

Figura 15. Esquema de diferentes agregados formados nas cianinas. (Adaptado de Mishra, A.; Behera, R. K.; Behera, P. K.; Mishra, B. K.; Behera, G. B. *Chem. Rev.* **2000**, *100* (6), 1973.)..... 15

Figura 16. Espectros de absorção e emissão com a formação de agregados H e J em comparação com a espécie monomérica. (Adaptado de Bricks, J. L.; Slominskii, Y. L.; Panas, I. D.; Demchenko, A. P. *Methods Appl. Fluoresc.* **2018**, *6*, 1.)..... 16

Figura 17. Dependência da formação de agregados do tipo J em relação a concentração das soluções aquosas. (Adaptado de Bricks, J. L.; Slominskii, Y. L.; Panas, I. D.; Demchenko, A. P. *Methods Appl. Fluoresc*. **2018**, *6*, 1.)... 17

Figura 18. Deformação da molécula no estado localmente excitado e com transferência de carga intramolecular. (Adaptado de Valeur, B. *Molecular Fluorescence Principles and Applications*; 3. Ed. Wiley-VCH. **2001**.)..... 18

Figura 19. Espectros de emissão do fluoróforo na presença de diferentes solventes. (Adaptado de Valeur, B. *Molecular Fluorescence Principles and Applications*; 3. Ed. Wiley-VCH. **2001**.)..... 18

Figura 20. Espectros de emissão do fluoróforo na presença de diferentes solventes. (Adaptado de Lakowicz, J. R. *Principals of Fluorescence Spectroscopy*; 3. Ed. Springer, **2006**.)..... 19

Figura 21. Resultados obtidos com a utilização do marcador de núcleo (DAPI) e composto **16**. (A) Aplicação do composto **16** em células humanas normais incluindo células normais do estroma da medula óssea (HS-27A) e células normais epiteliais da próstata (NPE). (B) Aplicação do composto **16** *in vivo* em células cancerosas da próstata (C4-2) mama (MCF-7) e pulmão (H358). (Adaptado de Yang, X.; Shi, C.; Tong, R.; Qian, W.; Zhau, H. E. et al. *Clin Cancer Res.* **2010**, *16*, 2833.)..... 21

Figura 22. Nanopartículas (PF127) contendo o composto **17** na marcação de células cancerosas com o decorrer do tempo. (Adaptada de Pan, G.; Jia, H.; Zhu, Y.; Sun, W.; Cheng, X.; Wu, F. *ACS Appl. Nano Mater.* **2018**, *1*, 2885.)..... 22

Figura 23. Nanopartículas (PF127) contendo o composto **17** na proporção de células cancerosas 1:100 em relação a células normais. (Adaptada de Pan, G.; Jia, H.; Zhu, Y.; Sun, W.; Cheng, X.; Wu, F. *ACS Appl. Nano Mater.* **2018**, *1*, 2885.)..... 22

Figura 24. Espectro de RMN de ^{1}H do composto **19** em DMSO-d_6 (400 MHz)..... 24

Figura 25. Heptameteno cianinas simétricas sintetizadas **23** e **24**..... 27

Figura 26. Espectro de RMN de ^{1}H do composto **23** em $CDCl_3$ (400 MHz)..... 29

Figura 27. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **23** em $CDCl_3$ (100 MHz)..... 30

Figura 28. Heptameteno cianinas substituídas na posição meso **1** e **2**..... 31

Figura 29. Espectro de RMN de ^{1}H do composto **2** em DMSO-d_6 (400 MHz)..... 31

Figura 30. Espectro ampliado de RMN de ^{1}H, entre 2,80 e 0,80 ppm, do composto **2** em DMSO-d_6 (400 MHz)..... 32

Figura 31. Espectro ampliado de RMN de ^{1}H, entre 7,40 e 3,80 ppm, do composto **2** em DMSO-d_6 (400 MHz)..... 33

Figura 32. Espectro de absorção normalizado de UV na região do Vis-NIR do composto **2**..... 34

Figura 33. Espectro de absorção de UV na região do Vis-NIR do composto **2** em função da variação da concentração da solução em acetonitrila..... 35

Figura 34. Composto **1** na presença de 1,4-dioxano, diclorometano e acetonitrila (esquerda para a direita)..... 36

Figura 35. Espectro de emissão de fluorescência na região do Vis-NIR do composto **2**. (λ_{EXC} = 570-611 nm)..... 38

Figura 36. Espectro de emissão de fluorescência na região do Vis-NIR do composto **2**. (λ_{EXC} = 708-715 nm)..... 39

Figura 37. Espectros de absorção na região do UV-Vis (A), emissão de fluorescência (B) e função da polaridade do solvente Δf *vs.* posição das bandas de absorção, emissão e deslocamento de Stokes (C) do composto **2** em diferentes misturas de acetonitrila/1,4-dioxano..... 43

Figura 38. Proposta de estrutura responsável pelo ICT..... 44

Figura 39. Composto **1** na presença de etanol e metanol..... 45

Figura 40. Espectro de absorção normalizado de UV na região do Vis-NIR do composto **1** na presença de etanol com porcentagens de metanol variando entre 0,5% e 10% e máximos de absorção ampliado (figura da esquerda e direita, respectivamente)..... 46

Figura 41. Espectro de absorção normalizado de UV na região do Vis-NIR do composto **1** na presença de etanol com porcentagens de metanol variando entre 0,5% e 50% e máximos de absorção ampliado (figura da esquerda e direita, respectivamente)..... 46

Figura 42. Composto **23** testado como sensor de aminoácidos em acetonitrila. Esquerda para a direita: composto **23**, composto **23** na presença de fenilalanina, triptofano, glicina e prolina, respectivamente..... 48

Figura 43. Espectro de absorção normalizado do Vis-NIR do composto **23** em acetonitrila (A) e espectro normalizado do composto **23** testado como sensor de aminoácidos em acetonitrila (B)..... 49

Figura 44. Espectro de absorção de UV na região do Vis-NIR do composto **30**..... 50

Figura 45. Espectro de emissão de fluorescência na região do Vis-NIR da banda responsável pelo máximo de absorção do composto **30** em solução. (λ_{EXC}=750 nm)..... 52

Figura 46. Espectro de emissão de fluorescência na região do Vis-NIR do composto **30** em solução. (λ_{EXC}=500 nm)..... 52

Figura 47. Bioimageamento do composto **1** *in vivo* e *in vitro*..... 54

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Dados fotofísicos dos compostos **1** e **2** em solução, onde *A* é o valor da absorbância, λ_{ABS} e λ_{EM} são os máximo de absorção e de emissão, respectivamente, dados em nanômetros (nm), ε é o coeficiente de absortividade molar (10^4 $M^{-1}\cdot cm^{-1}$), $\Delta\lambda_{ST}$ é o deslocamento de Stokes (nm), f_e é a força de oscilador, k_e^0 é a constante de taxa radiativa (10^8 s^{-1}), τ^0 é o tempo de vida útil radiativa (ns)..... 37

Tabela 2. Dados fotofísicos dos compostos **1** e **2** em solução, λ_{ABS} e λ_{EM} são os máximo de absorção e de emissão, respectivamente, dados em nanômetros (nm) e $\Delta\lambda_{ST}$ é o deslocamento de Stokes (nm)..... 40

Tabela 3. Efeito da polaridade do solvente do composto **2**, para diferentes misturas de acetonitrila e 1,4-dioxano..... 41

LISTA DE ABREVIATURAS

Abs	Absorção
BSP	Bromossulftaleína
COSY	Espectroscopia de correlação homonuclear
d	Dubleto
DAPI	4',6'-diamino-2-fenil-indol
DCM	Diclorometano
dd	Duplo dubleto
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
Em	Emissão de fluorescência
eV	Elétron Volt
f_e	Força de oscilador
IC	*Internal Conversion* (em português conversão interna)
ICT	*Intramolecular Charge Transfer* (em português transferência de carga intramolecular)
ISC	*Intersystem crossing* (em português cruzamento entre sistemas)
HOMO	*Highest Occupied Molecular Orbital* (em português Orbital Molecular Ocupado de Maior Energia)
J	Constante de Acoplamento
k_e^0	Constante da taxa radiativa
LE	*Locally Excited* (em português localmente excitado)
LUMO	*Lowest Unoccupied Molecular Orbital* (em português Orbital Molecular Desocupado de Menor Energia)
m	Multipleto
MHz	10^6 Hertz
NIR	*Near Infrared* (em português Infravermelho Próximo)
nm	Nanômetro
n_{mix}	Índice de refração
OATP	*Organic Anion Transporting Polypeptide* (em português polipeptídeo transportador de ânions orgânicos)
RMN de ^{1}H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN de ^{13}C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono

s	Singleto
SET	*Single Electron Transfer* (em português transferência de um único elétron)
t	Tripleto
TEA	Trietilamina
TICT	*Twisted Internal Charge Transfer* (em português Transferência de Carga Intramolecular Torcida)
TP	Troca Protônica
UV	Ultravioleta
Vis-NIR	Visível-Infravermelho próximo
ε	Absortividade molar
ε_{mix}	Constante dielétrica da mistura de solventes
δ	Deslocamento químico
λ_{ABS}	Comprimento de onda de absorção
λ_{EM}	Comprimento de onda de emissão
τ^0	Tempo de vida útil radiativa
Δf	Função de Polaridade do Solvente
$\Delta\lambda_{ST}$	Deslocamento de Stokes

RESUMO

A presente dissertação apresenta a síntese de uma classe de heptameteno cianinas catiônicas substituídas na posição meso, onde a partir de heptameteno cianinas simétricas, foi realizada a substituição do átomo de cloro pela pirrolidina na presença de acetonitrila com rendimentos que variaram entre 75-78%.

Com o intuito de estudar suas propriedades fotofísicas, os compostos foram caracterizados através da técnica de espectroscopia de absorção e emissão na região do visível ao infravermelho próximo (Vis-NIR) em solventes com diferentes polaridades. De forma geral, observou-se que as heptameteno cianinas sintetizadas apresentaram solvatocromismo negativo e interações específicas com 1,4-dioxano. Com isso, foi realizado um estudo mais aprofundado do comportamento das cianinas sintetizadas no estado fundamental e no estado excitado através das relações de Lippert-Mataga e foi possível mensurar os respectivos momentos de dipolo, o qual apresentou ser maior no estado fundamental.

Assim, a partir das propriedades observadas, os compostos sintetizados foram estudados para a aplicação como quimiossensores colorimétricos na adulteração de etanol com metanol. Através dos resultados obtidos por espectroscopia de absorção, os compostos mostraram-se sensíveis para a identificação da adulteração do etanol com metanol, apresentando deslocamento das bandas de absorção para menores comprimentos de onda conforme é aumentada a quantidade de metanol e, ainda, apresentando uma diferença de 7,0 nm da banda de absorção, quando o corante se encontra em etanol puro e metanol puro.

Além disso, a heptameteno cianina simétrica precursora foi testada como sensor para os diferentes aminoácidos e, devido aos diferentes perfis das bandas de absorção, a mesma apresenta potencial aplicabilidade para sonda de aminoácidos. Também, a heptameteno cianina sintetizada foi testada como marcador celular *in vitro* e *in vivo*. Mostrando ser eficiente na marcação celular tanto *in vitro,* dentro do período de 24 h, como *in vivo*, apresentando distribuição homogênea no citoplasma.

Palavras-chave: bioimageamento *in vivo*, heptameteno cianinas, fluorescência, sensor óptico, grande deslocamento de Stokes.

ABSTRACT

This work presents the synthesis of cationic heptamethine cyanine dyes substituted at the meso position, based on symmetrical heptamethine cyanines presenting the chlorine atom that was replaced by pyrrolidine in the presence of acetonitrile.

In order to better characterize their photophysical behaviour, these compounds were investigated by absorption and emission spectroscopy in visible to the near infrared (Vis-NIR) using organic solvents with different polarities. The studied compounds showed a negative solvatochromism tendency with the polarity increase and specific interactions with 1,4-dioxane. The Lippert-Mataga relation indicates that these compounds present higher dipole moment in the ground state in comparison with their excited state. Thus, from the observed properties, the synthesized compounds were studied for an application as colorimetric chemosensors in the adulteration of ethanol with methanol. Through the results obtained by absorption spectroscopy, the compounds were used to identify adulteration of ethanol with methanol, display of absorption bands for minors of wavelength as the amount of methanol is increased and, still, a significant change of 7.0 nm of the absorption band when the dye is in pure ethanol and pure methanol.

In addition, a precursor symmetric cyanine heptameter was tested as a sensor for different amino acids and due to the different parameters of the absorption bands, it has potential applicability for amino acid probe. Also, a synthesized heptamethine cyanine was tested as a cell marker *in vitro* and *in vivo*. Showing to be efficient in cell labeling both *in vitro*, within a period of 24 hours, and *in vivo*, showing homogeneous distribution in the cytoplasm.

Keywords: *in vivo* imaging, heptamethine cyanine, fluorescence, optical sensor, large Stokes shift.

1. INTRODUÇÃO

A primeira cianina foi descrita na literatura em 1856, por C. H. G. Williams. Ao sintetizar a primeira cianina notou que esta tornava sensível à luz emulsões de haleto de prata na região espectral em que haletos de prata, na ausência de cianinas, não costumavam ser.[1] Dessa forma surgiu uma nova classe de moléculas orgânicas, que desde então vem sendo estudada como potencial aplicação em diversas áreas.

As cianinas são uma classe de corantes orgânicos que se caracterizam por possuir cadeia polimetínica conjugada, com número ímpar de carbonos, ligando dois centros, constituídos geralmente de nitrogênio, e podendo, ainda, ser carregada positivamente, negativamente, zwiteriônica ou neutra.[2] As cianinas podem, ainda, possuir diferentes substituintes em diferentes porções da sua cadeia, influenciando nas suas propriedades eletrônicas, como por exemplo, o seu momento de dipolo. Por possuírem uma longa conjugação eletrônica, a utilização de solventes com diferentes polaridades leva a diferentes momentos de dipolo. Devido a isso, as posições nos máximos de absorção e emissão poderão sofrer alterações e podem influenciar na aplicabilidade da mesma. Assim, em virtude destas diferentes características estruturais, as cianinas absorvem e emitem radiação numa grande faixa do espectro eletrônico: na região do visível ao infravermelho próximo (Vis-NIR).[1,3,4]

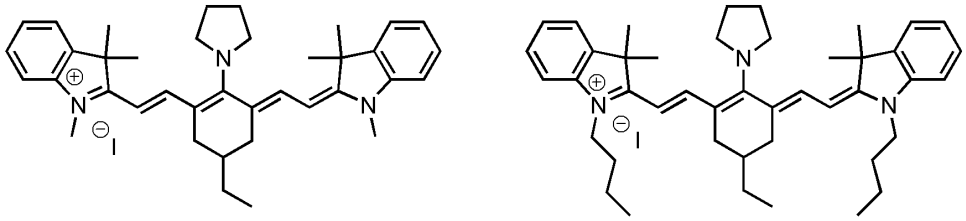
Dessa forma, a sua aplicação em diversas áreas vem ganhando destaque, por exemplo, como sensores ópticos,[5] sensores de pH,[6] fotossensibilizadores em células solares,[7] marcadores em células cancerosas,[8] fototerapia,[9] entre outros. Essa extensa área de aproveitamento se deve, principalmente, pela modulação dos máximos de absorção e emissão conforme a capacidade de conjugação da cadeia polimetínica e também conforme os diferentes substituintes, tanto na cadeia alquílica quanto na posição central ou, ainda, os diferentes anéis indólicos ligados nas partes terminais das cianinas.[3]

Visto que, por terem suas estruturas eletrônicas modificadas, a aplicação de heptameteno cianinas como sensores químicos e sensores ópticos é bastante interessante. Sendo assim, o presente trabalho apresenta a síntese de heptameteno cianinas substituídas na posição meso e a sua caracterização fotofísica, avaliando a potencial aplicação como sensores ópticos para as diferentes áreas, como o bioimageamento e sondas colorimétricas.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVOS GERAIS

Síntese de novas heptameteno cianinas substituídas na posição meso a partir de cianinas simétricas, que diferem entre si pelos substituintes alifáticos e, posteriormente, seu estudo como sensores ópticos.



(1) (2)

Figura 1. Heptameteno cianinas substituídas na posição meso.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Síntese de heptameteno cianinas substituídas na posição meso;
- Caracterização fotofísica por espectroscopia de absorção e emissão na região do Vis-NIR;
- Avaliação das características fotofísicas dos compostos sintetizados como sensores ópticos para a adulteração do etanol com metanol;
- Avaliação dos compostos sintetizados como sonda para aminoácidos;
- Avaliação da ciclização induzida por solvente;
- Avaliação dos compostos sintetizados como potenciais marcadores celulares;

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. CIANINAS

As cianinas são uma classe de corantes orgânicos que se caracterizam por possuírem cadeia polimetínica conjugada, no qual é variado o número de carbonos sp², sendo esse número ímpar e formando o sistema π conjugado entre o grupo doador e o grupo aceptor de elétrons. O sistema π conjugado liga os dois centros heterocíclicos das porções terminais que é, geralmente, constituído de nitrogênio (**Figura 2**).[2]

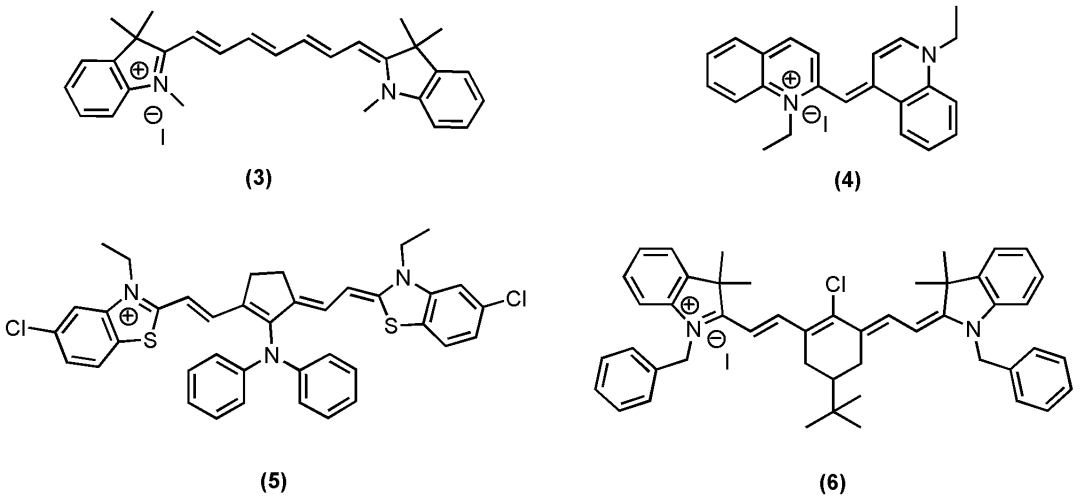


Figura 2. Cianinas com diferentes números de carbonos com hibridização sp².

Conforme o número de carbonos do tipo sp^2 presentes na estrutura química da molécula, a cianina pode ser classificada como mono, tri, penta ou heptameteno. Dessa forma, as diferentes classificações de cianinas compõem a classe de corantes polimetínicos caracterizados pela ampla faixa de absorção e emissão na região do visível ao infravermelho próximo no espectro eletromagnético. Cianinas do tipo monometeno e trimeteno frequentemente absorvem e emitem na região do visível. À medida que o número de carbonos do tipo sp^2 é aumentado, a absorção e emissão desses corantes orgânicos é deslocada para maiores comprimentos de onda. Sendo assim, a absorção e emissão das pentameteno e heptameteno localizam-se na região do infravermelho próximo (~650 nm).[10]

Ainda, dentro desta classe de corantes orgânicos, as cianinas podem ser zwiteriônicas (composto **7**), neutras (composto **8**), aniônicas (composto **9**) ou ainda catiônicas (composto **10**), conforme é apresentado na **Figura 3**. Essas características, em conjunto com o aumento da polaridade do solvente, levam a diferentes deslocalizações eletrônicas e conjugação dos elétrons π da molécula. Dessa forma, os máximos de absorção e emissão são modulados para diferentes

comprimentos de onda conforme a posição da carga formal na molécula e, consequentemente, o momento de dipolo da mesma (**Figura 4**).[3,11,12]

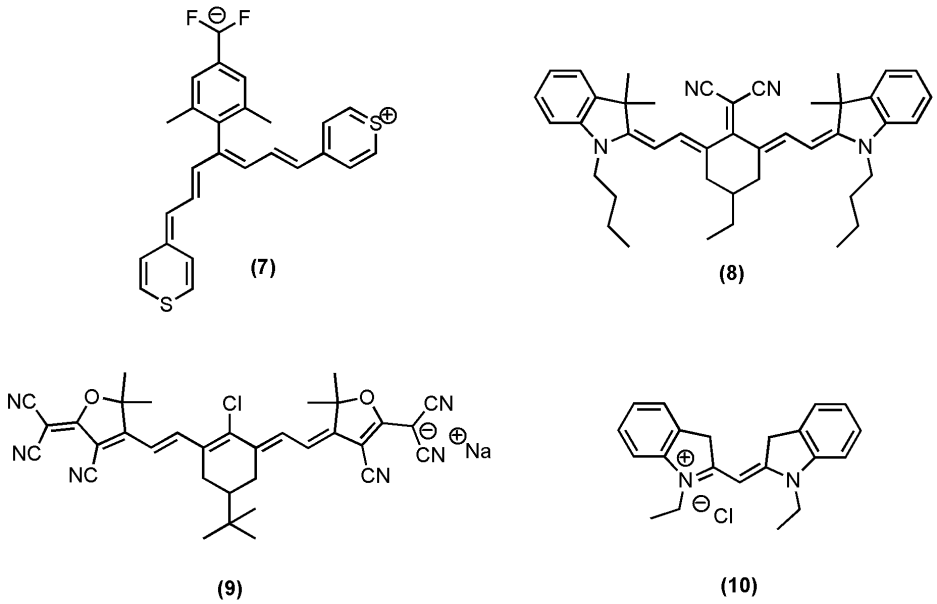


Figura 3. Cianinas com diferentes momentos de dipolo.

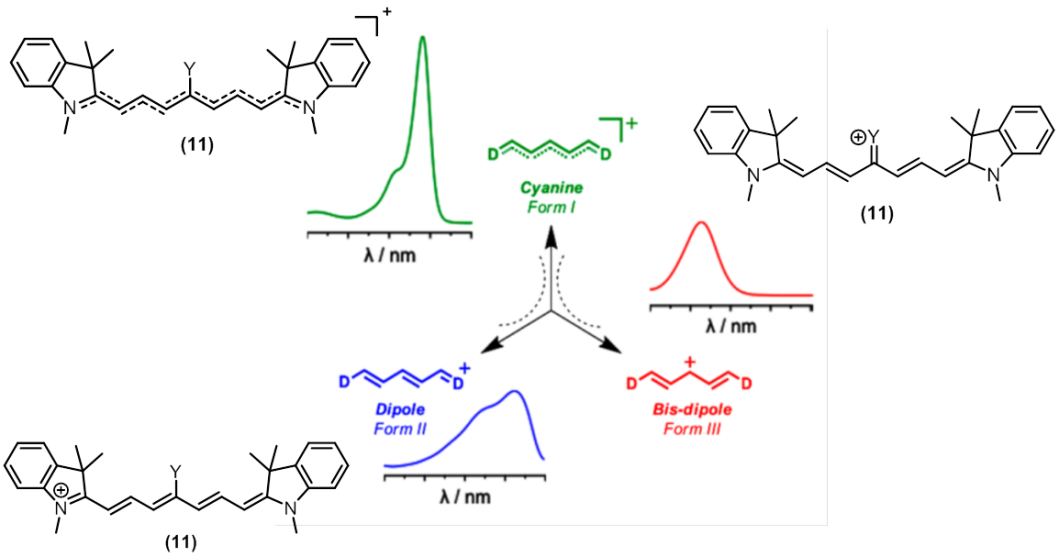


Figura 4. Momento de dipolo e mudança nos máximos de absorção. (Adaptado de Pascal, S.; Haefele, A.; Monnereau, C.; Charaf-Eddin, A.; Jacquemin, D.; Le Guennic, B.; Andraud, C.; Maury, O. *J. Phys. Chem. A* **2014**, *118* (23), 4038.)

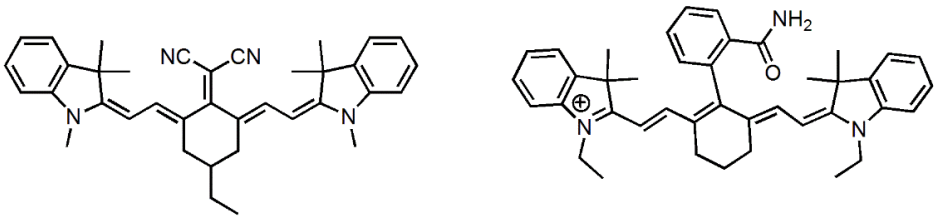
Assim, um importante aspecto das cianinas é a presença de grupos doadores e retiradores de elétrons que, quando interligados por um sistema de conjugação π, formam o sistema "*push-pull*" da molécula. Além de grupos heterocíclicos nas porções terminais, os

diferentes substituintes na posição central na molécula e/ou a presença de carga formal influenciam diretamente o comportamento deste sistema. [4,11,13,14]

Pascal e colaboradores propuseram que a presença de diferentes substituintes na posição central da molécula influenciam fortemente os diferentes momentos de dipolo, alterando assim a posição do máximo de absorção (**Figura 4**). Comparada com a Forma I, em que a cianina apresenta a carga positiva totalmente deslocalizada na molécula, a configuração dipolar (Forma II), ocorre na presença de solventes polares e, também, é influenciada pelo aumento do número de carbonos do tipo sp^2. Assim, a banda de absorção é deslocada para a região do azul do espectro eletromagnético, em relação à curva verde. Por outro lado, a presença de grupos fortemente doadores de elétrons apresenta o momento dipolar chamado bis-dipolo (Forma III), e, portanto, a carga formal positiva está localizada na posição central da molécula. Comparada com a cianina na Forma I, as cianinas na Forma III apresentam as bandas de absorção não tão intensas e deslocalizadas para a região do vermelho do espectro eletromagnético.[3]

3.2. SUBSTITUIÇÃO NA POSIÇÃO MESO DE HEPTAMETENO CIANINAS

Conforme vem sendo reportado, os diferentes substituintes na posição meso da cadeia polimetínica de cianinas podem influenciar diretamente o momento de dipolo, influenciando então as propriedades espectroscópicas da mesma.[3] Embora o termo meso em estereoquímica seja utilizado para definir um isômero que, apesar de conter um centro de quiralidade, são inativos, por possuírem plano de simetria, neste trabalho o termo é utilizado para referenciar à posição central com o centro de simetria unicamente (**Figura 5**).



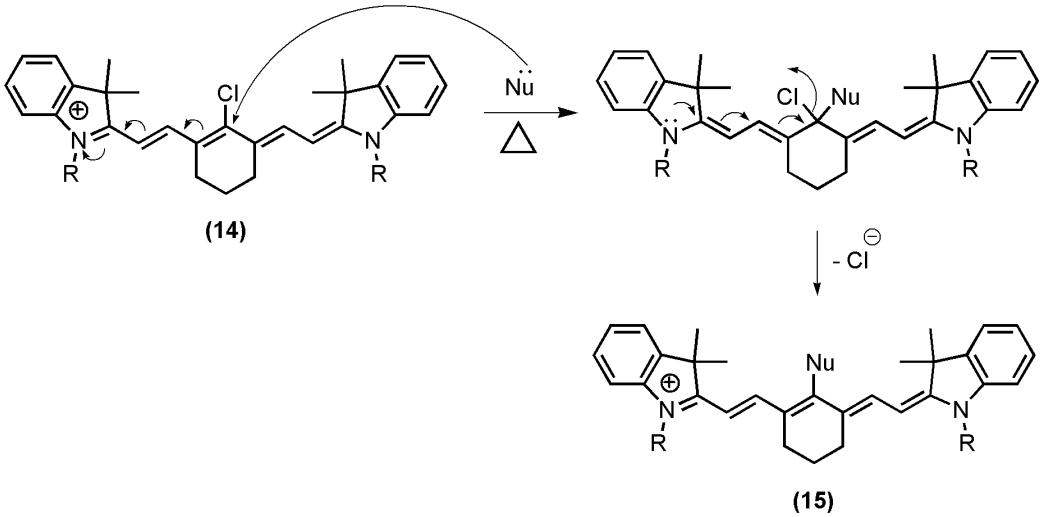
(12) (13)

Figura 5. Exemplo de composto meso. (Adaptado de Sun, W.; Guo, S.; Hu, C.; Fan, J.; Peng, X. *Chem. Rev.* **2016**, 116, 7768 e Duarte, R. C. *Síntese de novas heptameteno cianinas: estudo e aplicação de suas propriedades fotofisícas e fotoeletroquímicas*. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal do Rio Grande Do Sul, Porto Alegre, **2017**.)

Sendo assim, conforme são explorados diferentes substituintes na posição meso, o leque de aplicabilidades de heptameteno cianinas pode ser ampliado. Devido à alta deslocalização

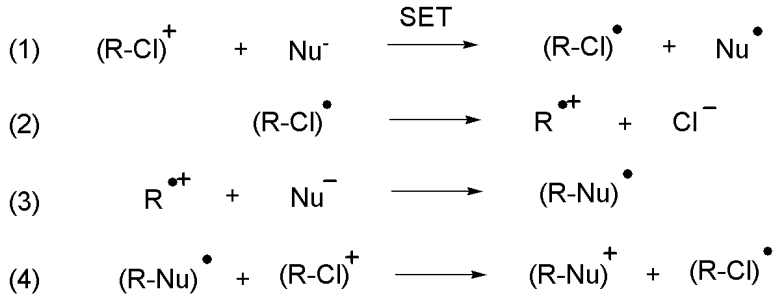
eletrônica na cadeia polimetínica, causado pelo sistema π conjugado e também pelo efeito *push-pull* da molécula, a presença de substituintes retiradores de elétrons na posição meso, como por exemplo, a presença de halogênios torna a posição mais deficiente de elétrons e suscetível ao ataque nucleofílico e, portanto, facilita a sua substituição.

Na literatura, diferentes substituições vêm sendo estudadas não só por substituintes nucleofílicos, como também a substituição do átomo de cloro por uma nova ligação C-C.[15-17] Em substituições nucleofílicas dois mecanismos podem ocorrer. A primeira proposta mecanística envolve a adição seguida de eliminação do átomo de cloro, conforme é apresentado no **Esquema 1**.[15] Acredita-se que essa proposta mecanística ocorra quando reações com nucleófilos do tipo hidróxidos, alcóxidos e alquilamina são utilizados.[16]



Esquema 1. Proposta de mecanismo envolvendo reações com aquecimento. (Adaptado de Gragg, J. L. *Synthesis of near-infrared heptamethine cyanine dyes.* Georgia State University, Atlanta, **2010**.)

A segunda proposta mecanística é apresentada no **Esquema 2**. Esse mecanismo é o mais aceito quando os nucleófilos são aminas e quando a reação é conduzida na presença de solventes polares apróticos, como DMF, DMSO ou acetonitrila.[16]



Esquema 2. Mecanismo radicalar na substituição meso para aminas na presença de solventes polares apróticos. (Adaptado de Gragg, J. L. *Synthesis of near-infrared heptamethine cyanine dyes.* Georgia State University, Atlanta, **2010**.)

3.3. PROCESSOS FOTOFÍSICOS

A ocorrência de processos fotofísicos está intimamente relacionada com a capacidade que algumas moléculas orgânicas possuem de absorver e emitir radiação. Para isso, as características estruturais como insaturações eletrônicas, apresentando ou não a conjugação eletrônica, rigidez estrutural e a presença de diferentes substituintes auxocromos influenciam o processo de transição eletrônica que podem ocorrer na molécula.

O processo de transição eletrônica consiste na absorção de um fóton e promoção de um elétron do orbital ocupado de mais alta energia (HOMO) para o orbital desocupado de mais baixa energia (LUMO). Assim, ao absorver um fóton a molécula atinge o estado excitado e ao emitir um fóton volta para seu estado eletrônico de mais baixa energia, o estado fundamental. Entretanto, as transições eletrônicas dependem dos tipos de orbitais envolvidos na estrutura da molécula orgânica. Por exemplo, moléculas que apresentam ligações do tipo π podem apresentar transições eletrônicas envolvendo os orbitais π, ou, a presença na molécula de heteroátomos contendo pares de elétrons não ligantes, como nitrogênio ou oxigênio, podem apresentar transições eletrônicas envolvendo os orbitais não ligantes.

Devido aos tipos de orbitais envolvidos na estrutura molecular, as diferentes transições eletrônicas dependem de maior ou menor energia para ocorrer. Por exemplo, a energia para promover um elétron do orbital σ para o orbital σ* é bastante grande e a transição eletrônica aparece no ultravioleta distante, essas transições são características de alcanos em geral. Em comparação, as transições eletrônicas envolvendo orbitais n para π* necessitam de uma energia muito menor e ocorrem no ultravioleta próximo, transições características de compostos que apresentam heteroátomos em sua estrutura molecular. As energias envolvidas nas diferentes transições eletrônicas para a molécula do formaldeído são apresentadas na seguinte relação (**Figura 6**).[18]

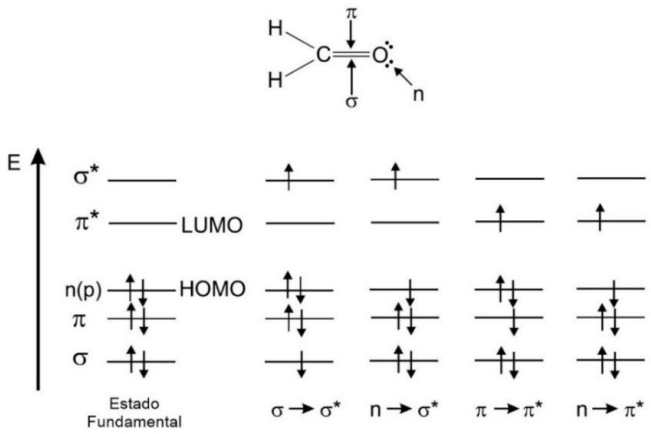


Figura 6. Possíveis transições eletrônicas na molécula do formaldeído. (Adaptado de Valeur, B. *Molecular Fluorescence Principles and Applications*; 3. Ed. Wiley-VCH. **2001**.)

Assim, a energia das transições eletrônicas em compostos orgânicos segue a seguinte ordem:

$$n \rightarrow \pi^* < \pi \rightarrow \pi^* < n \rightarrow \sigma^* < \sigma \rightarrow \pi^* < \sigma \rightarrow \sigma^*$$

As transições eletrônicas envolvendo orbitais π podem ter suas energias de transição entre o HOMO e o LUMO moduladas conforme o número de ligações π que o sistema possui. Dessa forma, moléculas que possuem sistema π conjugado possuem menor energia, comparado com análogos da molécula com ligações π isoladas para passar um elétron do HOMO para o LUMO. Como resultado da diminuição de energia, o máximo de absorção é deslocado para regiões de maior comprimento de onda conforme é aumentado o número de ligações duplas conjugadas (**Figura 7**).

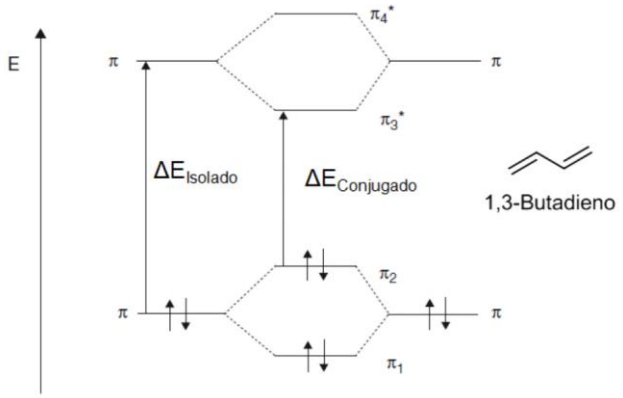


Figura 7. Efeitos das ligações π conjugadas na energia de transição eletrônica π–π*. (Adaptado de Valeur, B. *Molecular Fluorescence Principles and Applications*; 3. Ed. Wiley-VCH. **2001**.)

As transições eletrônicas entre dois estados podem, ainda, ser permitidas ou proibidas. Quando a transição eletrônica ocorrer com conservação da multiplicidade do spin, envolvendo a transferência de um elétron para o estado excitado, a transição é dita permitida e ocorre entre o estado fundamental (S_0), ou do estado excitado triplete (T_1), para outros estados excitados (S_1, S_2 ou T_2, T_3, respectivamente). Já as transições que ocorrem com mudança na multiplicidade do spin são transições ditas proibidas e envolvem transições entre o estado fundamental singlete (S_0) e o estrado excitado triplete (T_1), ou vice-versa. Por serem transições com mudança na multiplicidade de spin são transições com menor probabilidade de ocorrer (**Figuras 8** e **9**).

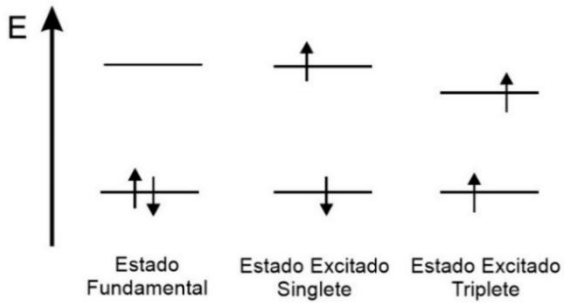


Figura 8. Transições eletrônicas permitidas. (Adaptado de Valeur, B. *Molecular Fluorescence Principles and Applications*; 3. Ed. Wiley-VCH. **2001**.)

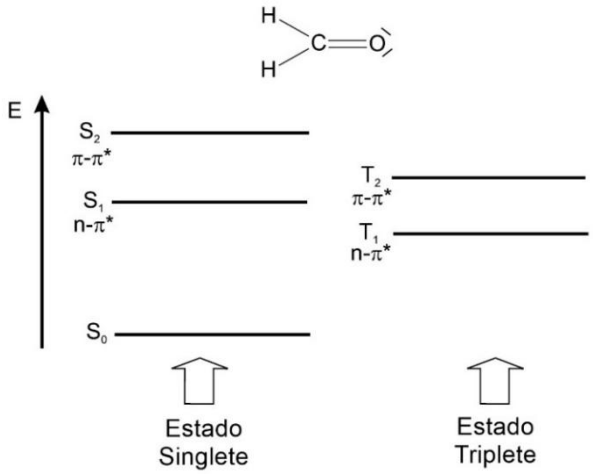


Figura 9. Distinção entre o estado singlete e triplete na molécula do formaldeído. (Adaptado de Valeur, B. *Molecular Fluorescence Principles and Applications*; 3. Ed. Wiley-VCH. **2001**.)

No diagrama de Jablonski é esquematizado como as transições eletrônicas podem ocorrer (**Figura 10**). A partir do processo da absorção do fóton a molécula passa a se encontrar no estado excitado, podendo ser S_1, S_2, ou S_3. Como consequência, diferentes processos de desativação de energia podem ocorrer para o elétron voltar para seu estado fundamental (S_0).

Os processos de desativação podem ser não radioativos ou podem ser radioativos. Os processos de desativação não radioativos envolvem relaxação vibracional, conversão interna (IC) ou cruzamento entre sistemas (ISC). Já as transições radioativas podem ser a fosforescência ou a fluorescência.

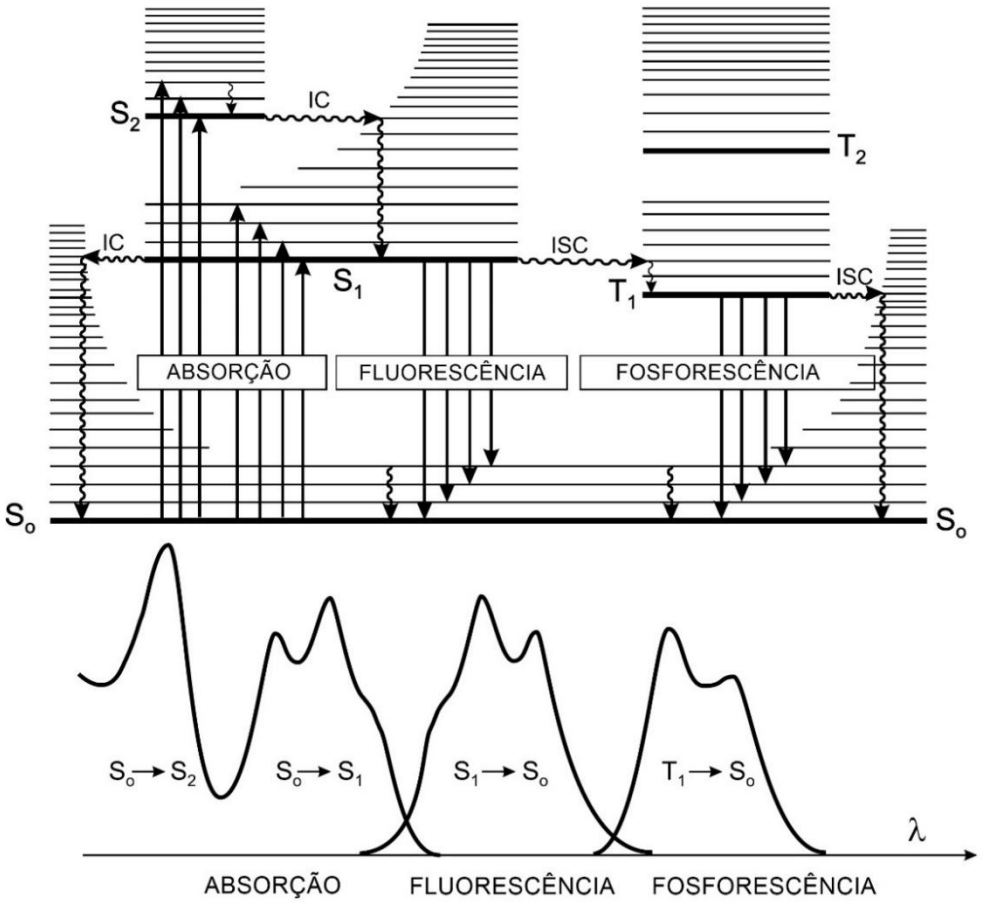


Figura 10. Diagrama de Jablonski e espectros de absorção, fluorescência e fosforescência. (Adaptado de Valeur, B. *Molecular Fluorescence Principles and Applications*; 3. Ed. Wiley-VCH. **2001**.)

Dentre os possíveis estados excitados existem diferentes níveis vibracionais em que o elétron pode se encontrar. Após absorver o fóton o elétron irá passar para o estado excitado, no entanto, não, necessariamente, para o nível vibracional de menor energia. Caso o elétron não se encontre no nível vibracional de menor energia, o processo de desativação por relaxação vibracional poderá ocorrer até o elétron se encontrar no menor nível de energia dentro do estado excitado. O processo de relaxação vibracional é bastante rápido (~10^{-12} s). A partir desse ponto duas transições eletrônicas podem ocorrer: transições radioativas (fosforescência ou fluorescência) ou as transições não radioativas (conversão interna ou cruzamento entre sistema).[18]

A conversão interna (IC) é uma transição não radioativa que ocorre entre estados eletrônicos de mesma multiplicidade de spin. Quando a conversão interna ocorre, ela é seguida de relaxação vibracional até o elétron se encontrar novamente no menor nível vibracional do estado eletrônico. O processo de conversão interna do S_1 para o S_0, por exemplo, tem tempo de duração de 10^{-13} - 10^{-11} s e pode ocorrer competitivamente com a fluorescência e o cruzamento entre sistemas (ISC) para o estado triplete, como é demonstrado na **Figura 10**.[18]

Fluorescência é um processo de emissão de fóton de $S_1 \longrightarrow S_0$. A emissão de um fóton ocorre em um tempo aproximado de 10^{-9} – 10^{-6} s, após excitar a molécula.[18] Devido à perda de energia por relaxação vibracional, os espectros de emissão de fluorescência se encontram em maiores comprimentos de onda comparados com o espectro de absorção, esse fenômeno é conhecido como Lei de Stokes. A diferença entre os níveis vibracionais no estado fundamental e excitado é similar, sendo assim, os espectros de fluorescência geralmente possuem a imagem invertida do espectro de absorção, conforme é apresentado na **Figura 10**. A diferença entre o máximo de emissão e o máximo de absorção é chamada de deslocamento de Stokes ($\Delta\lambda_{ST}$), e, quanto maior for esta diferença, menor a probabilidade de autoabsorção de energia. Ainda, moléculas orgânicas ao absorverem e emitirem um fóton apresentam, frequentemente, bandas de absorção e de emissão. No entanto, quando estamos tratando de moléculas rígidas, o espectro de absorção e emissão pode se apresentar de forma estruturada. Na **Figura 11** é apresentado o espectro de absorção e de emissão do antraceno, o qual possui 3 transições eletrônicas estruturadas, representando as transições entre os níveis vibracionais da molécula.

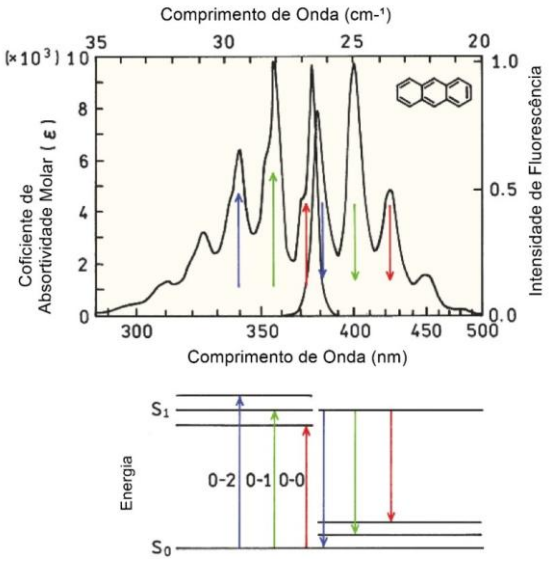


Figure 11. Espectro de absorção e emissão estruturados do antraceno e transições entre níveis vibracionais. (Adaptado de Lakowicz, J. R. *Principals of Fluorescence Spectroscopy*; 3. Ed. Springer, **2006**.)

O cruzamento intersistemas (ISC) é uma transição não radioativa entre dois níveis vibracionais isoenergéticos de multiplicidades diferentes, com tempo característico de 10^{-9} - 10^{-7} s. O cruzamento intersistema, $S_1 \longrightarrow T_1$, seguido da relaxação vibracional leva o elétron para o nível vibracional de mais baixa energia do estado tripleto T_1. O cruzamento intersistemas, por ser entre diferentes multiplicidades, é uma transição proibida de ocorrer, mas devido ao acoplamento spin órbita essa transição torna-se provável.[18] Após a cruzamento intersistemas $S_1 \longrightarrow T_1$ ocorrer, poderá novamente ocorrer o cruzamento intersistemas que levará o elétron do T_1 para o S_0 sem emissão de fóton, ou, poderá ocorrer a desativação radioativa com emissão de um fóton.

A desativação radioativa do estado tripleto-singleto ($T_1 \longrightarrow S_0$) é dita fosforescência. O tempo de decaimento é relativamente grande com duração de aproximadamente 10^{-3} – 1 s. Comparados com os espectros de absorção e de fluorescência, os espectros de fosforescência são observados em regiões de maiores comprimentos de onda devido ao processo de relaxação vibracional que ocorre dentro do estado triplete (T_1) e também devido à energia do nível vibracional no estado triplete (T1) ser menor comparado com ao do estado singlete (S_1).[18]

3.4. SOLVATOCROMISMO

Solvatocromismo é um fenômeno relacionado com a variação do máximo de absorção e/ou de emissão de um composto, causado pela alteração da polaridade do solvente e, também, por interações específicas entre soluto-solvente.[19] Esse fenômeno é resultante das diferentes interações e estabilizações que o solvente causa na molécula, tanto no estado fundamental quanto no estado excitado. Se na presença de um solvente polar o estado fundamental é solvatado e estabilizado mais fortemente que o estado excitado, o deslocamento é dito hipsocrômico, o solvatocromismo será negativo e as bandas de absorção são deslocadas para o azul. Este fato é explicado pela razão do estado excitado ser rapidamente formado, dessa forma o solvente polar não tem tempo o suficiente para se reorganizar e estabilizar a molécula excitada que possui diferente polaridade do estado fundamental, assim ocorre um aumento de energia entre o S_0 e S_1. Caso o estado excitado possuir maior momento de dipolo, a presença do solvente polar irá solvatar e estabilizar mais fortemente o estado excitado em comparação com o estado fundamental. Dessa forma o deslocamento será batocrômico e o solvatocromismo será positivo. Esse deslocamento permite que as bandas de absorção e emissão localizem-se em maiores comprimentos de onda, deslocando para a região do vermelho no espectro eletromagnético (**Figura 12**).[19]

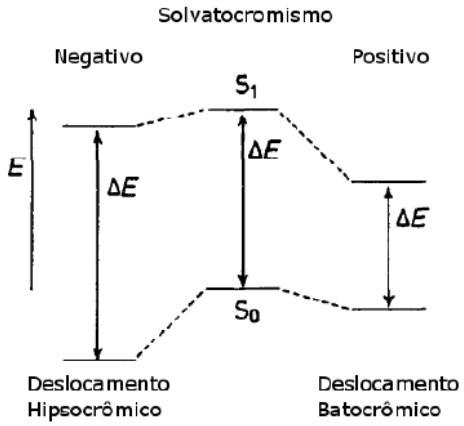


Figura 12. Solvatocromismo positivo e negativo e estabilização do HOMO e LUMO.

O solvatocromismo batocrômico ocorre, por exemplo, nas transições $\pi \rightarrow \pi^*$ que são devidas as ligações duplas dos hidrocarbonetos, por serem fracamente polar o efeito do solvente no estado fundamental é fraco. Dessa forma, no estado excitado ocorre uma maior separação de cargas aumentando o momento dipolar, assim, o estado excitado será mais solvatado e estabilizado na presença de um solvente polar. Em contrapartida, o solvatocromismo hipsocrômico, que ocorre quando os máximos de absorção e emissão são deslocados para menores comprimentos de onda, é decorrente, por exemplo, do efeito na transição $n \rightarrow \pi^*$ da carbonila da benzofenona. Como a ligação C=O é uma ligação bastante polar no estado fundamental, à medida que é aumentado a polaridade do solvente, o estado fundamental se torna cada vez mais estabilizado (**Figura 13**).[20,21]

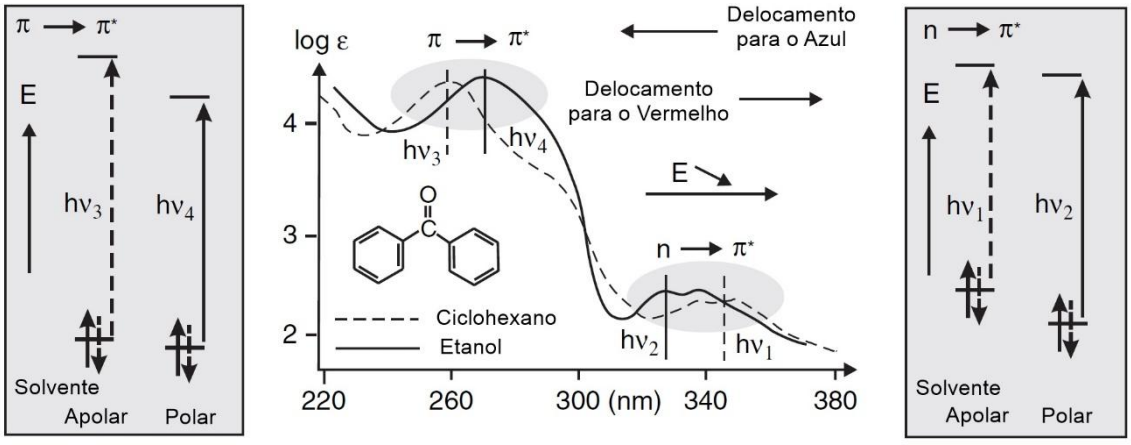


Figura 13. Espectro de absorção da benzofenona e a influência da polaridade do solvente no solvatocromismo batocrômico e hipsocrômico. (Adaptado de Rouessac, F.; Rouessac, A. *Chemical Analysis: Modern Instrumentation Methods and Techniques*. 2. ed. Inglaterra: Wiley, **2007**.)

3.5. AGREGADOS DO TIPO H E J

Devido a classe de corantes orgânicos polimetínicos apresentarem uma alta deslocalização eletrônica, característica que promove a polarizabilidade nas cianinas e causa uma deformação na cadeia polimetínica, as cianinas possuem uma interessante propriedade e a tendência de se auto agregar. A deformação[22] em conjunto com a forte interação π-π stacking[5] e a interação intermolecular atrativa de van der Waals, além das ligações de hidrogênio,[23] contribuem para a formação de agregados. Esses agregados, podendo ser do tipo H ou agregados do tipo J, exibem mudanças nas bandas de absorção e emissão comparadas com suas espécies monoméricas.

Os chamados agregados do tipo H ocorrem quando as moléculas se organizam de forma empacotada (arranjo sanduíche), já os agregados do tipo J ocorrem quando as moléculas se organizam de forma cabeça-cauda, conforme é apresentado na **Figura 14**. Devido à sua organização, os agregados H são caracterizados por uma banda de absorção deslocalizada para o azul pela ocorrência de estabilização do estado fundamental, comparada com a espécie monomérica. Já os agregados do tipo J apresentam a banda de absorção deslocada para maiores comprimentos de onda, devido a diminuição de energia entre o estado fundamental e o estado excitado. A deslocalização para regiões de menores energias ocorre pelo fato de a organização das moléculas na forma de agregados do tipo J estabilizar tanto o estado fundamental quanto o estado excitado, comparando com a forma monomérica (**Figura 15**).[1,24,25] Os agregados do tipo J ocorrem devido a interações π-π em partículas altamente polarizáveis em conjunto com interações eletrostáticas entre cargas opostas.[26]

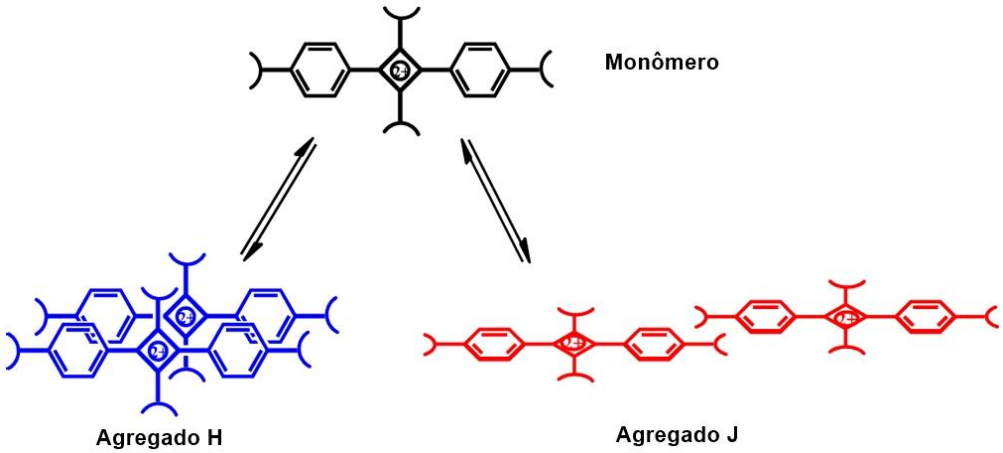


Figura 14. Representação da formação de agregados do tipo H e J. (Adaptado de Sun, W.; Guo, S.; Hu, C.; Fan, J.; Peng, X. *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 7768.)

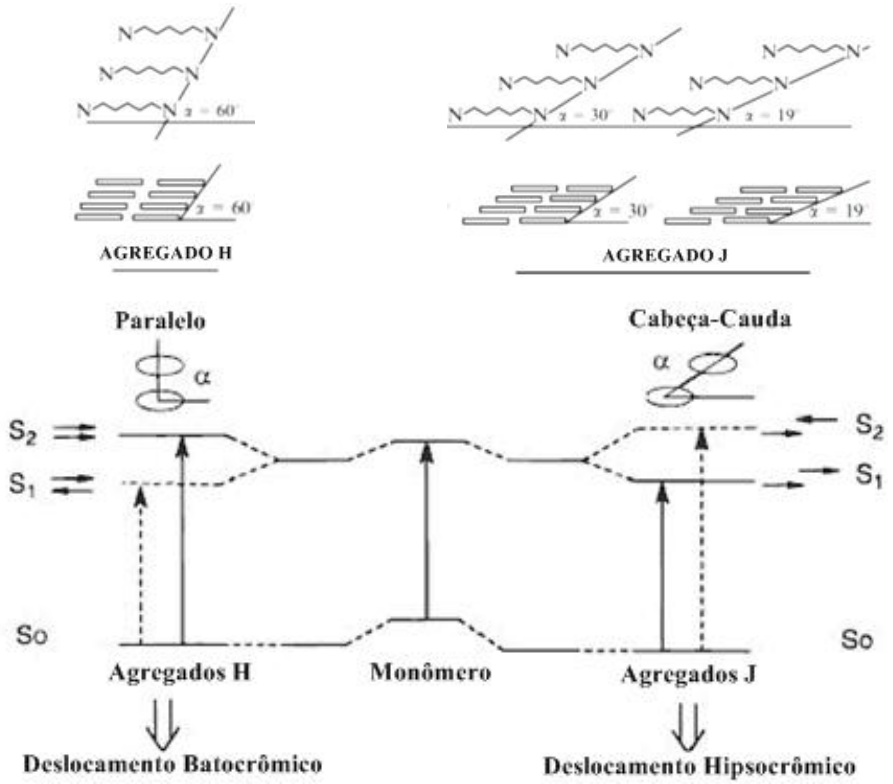


Figura 15. Esquema de diferentes agregados formados nas cianinas. (Adaptado de Mishra, A.; Behera, R. K.; Behera, P. K.; Mishra, B. K.; Behera, G. B. *Chem. Rev.* **2000**, *100* (6), 1973.)

Comparados com a espécie monomérica, agregados do tipo H deslocam a banda de absorção para regiões de maiores energia e as bandas de emissão para regiões de menores energias, sendo característica desse tipo de agregado grandes deslocamentos de Stokes. Os agregados do tipo J apresentam tanto a banda de absorção quando a banda de emissão deslocada para regiões de menores energia, comparados com a espécie monomérica, apresentando pequenos valores de deslocamento de Stokes e bandas bastante estreitas (**Figura 16**).[26,27] Além disso, em comparação com as espécies monoméricas, os agregados do tipo J apresentam um grande aumento no coeficiente de absortividade molar ε.[26]

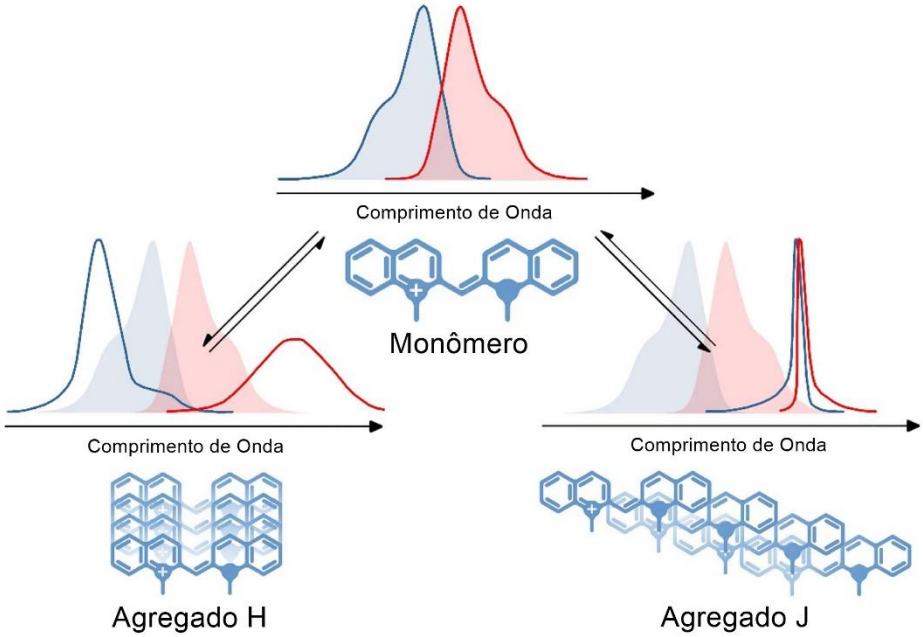


Figura 16. Espectros de absorção e emissão com a formação de agregados H e J em comparação com a espécie monomérica. (Adaptado de Bricks, J. L.; Slominskii, Y. L.; Panas, I. D.; Demchenko, A. P. *Methods Appl. Fluoresc.* **2018**, *6*, 1.)

Algumas características como um grande aumento no coeficiente de absortividade molar (ε)[26] e também as propriedades únicas de fluorescência[28] são encontradas em agregados do tipo J. Ainda, a formação dos agregados do tipo J ocorre de forma reversível e pode ser controlada, pois é dependente da concentração e do tipo de solvente utilizado, sendo favorecido por soluções aquosas. Já os agregados do tipo H ocorrem em situações irreversíveis e são pouco entendidos.[27,28]

Na **Figura 17** é apresentada a influência da formação dos agregados do tipo J (banda centrada em 573 nm) em função do aumento da concentração da pseudoisocianina (PIC) na solução aquosa, de modo que em concentrações muito altas do corante as características da forma monomérica e do agregado H (D) podem ser observadas. É importante notar que a formação dos agregados do tipo H e a presença da forma monomérica não desaparecem conforme é alterada a concentração da solução.[26]

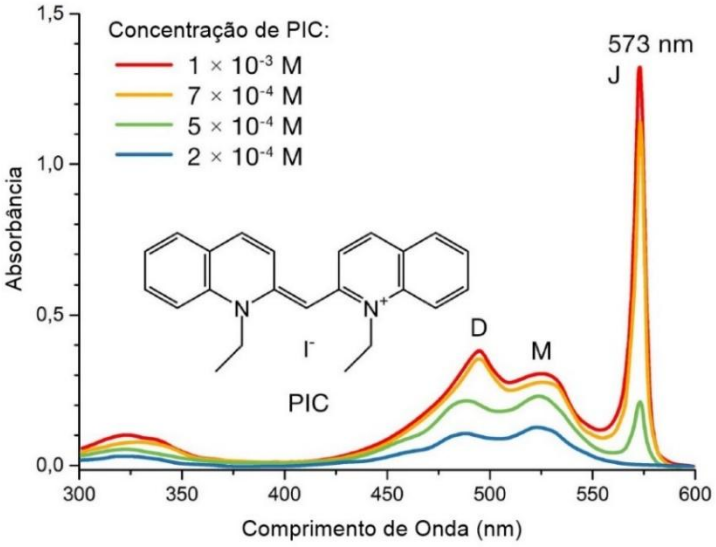


Figura 17. Dependência da formação de agregados do tipo J em relação a concentração das soluções aquosas. (Adaptado de Bricks, J. L.; Slominskii, Y. L.; Panas, I. D.; Demchenko, A. P. *Methods Appl. Fluoresc*. **2018**, *6*, 1.)

3.6. TRANSFERÊNCIA DE CARGA INTRAMOLECULAR

A dependência da existência de diferentes bandas de emissão com a polaridade do solvente é chamada de transferência de carga intramolecular (ICT). Processos envolvendo ICT ocorrem devido a interações específicas entre o solvente e o fluoróforo. Essas interações são decorrentes, principalmente, da presença de grupos doadores (D) e grupos aceptores (A) de elétrons, como por exemplo, o grupo amino (doador) e o grupo ciano (aceptor).[29] Mecanismos ICT envolvem a dependência entre a polaridade de solventes e a banda de emissão do fluoróforo. Assim, conforme o aumento da polaridade do meio, duas bandas de emissão podem ocorrer. Em solventes com baixa polaridade, o fluoróforo emite um comprimento de onda curto, chamado de estado localmente excitado (LE). Conforme é aumentada a polaridade dos solventes, uma segunda banda de emissão aparece. Essa segunda banda de emissão ocorre em maiores comprimentos de onda devido à transferência de carga intramolecular (ICT) que é decorrente do efeito "*push-pull*" e do sistema π conjugado que liga o grupo doador e o grupo aceptor de elétrons.[30] Sendo assim, em solventes polares ocorre uma dupla emissão de fluorescência.

Na **Figura 18** é apresentado como essa transferência de carga intramolecular pode ocorrer. Neste caso específico, no estado fundamental a molécula é quase planar e corresponde a máxima conjugação da molécula. De acordo com o princípio de Franck-Condon, o estado LE é planar, mas a presença de um solvente polar pode fazer com que ocorra uma rotação do grupo

doador de elétrons (D) de forma que a total conjugação da molécula é perdida. Assim, no estado excitado ocorre a transferência de carga intramolecular torcida (TICT) com a total separação de cargas na molécula.[18] A transferência de carga intramolecular torcida (TICT) ocorre em maiores comprimentos de onda em comparação com o estado localmente excitado (LE), conforme é apresentado na **Figura 19.** Neste exemplo, embora exista uma transferência de carga intramolecular que envolve uma torção entre os grupos doadores (D) e aceptores (A) de elétrons, o mecanismo é denominado de TICT.

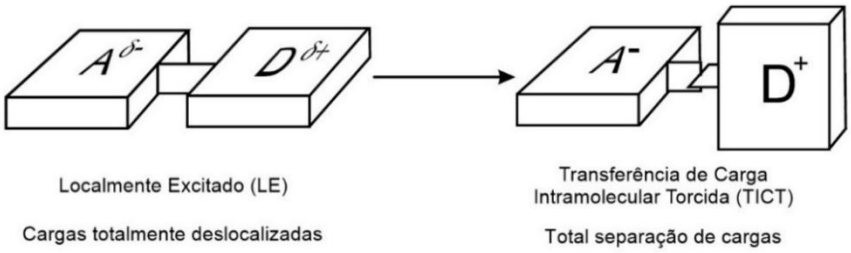


Figura 18. Deformação da molécula no estado localmente excitado e com transferência de carga intramolecular. (Adaptado de Valeur, B. *Molecular Fluorescence Principles and Applications*; 3. Ed. Wiley-VCH. **2001**.)

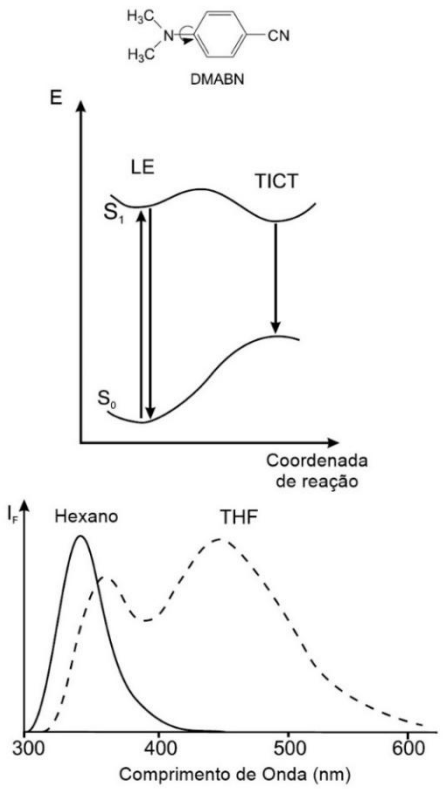


Figura 19. Espectros de emissão do fluoróforo na presença de diferentes solventes. (Adaptado de Valeur, B. *Molecular Fluorescence Principles and Applications*; 3. Ed. Wiley-VCH. **2001**.)

Na **Figura 20** é apresentado o efeito da polaridade do solvente em relação à banda de emissão no composto fluorazeno (FPP).[30] Devido ao composto ser rígido pela presença do grupo metileno, a transferência de carga intramolecular ocorre devido ao grupo doador e ao grupo aceptor de elétrons e não devido à torção. Com duração da transferência de carga intramolecular de 12 ps, evidenciando que mesmo em moléculas planares e sem a possibilidade de rotação, estando presente grupos doadores e aceptores de elétrons, é possível encontrar o mecanismo ICT.[31]

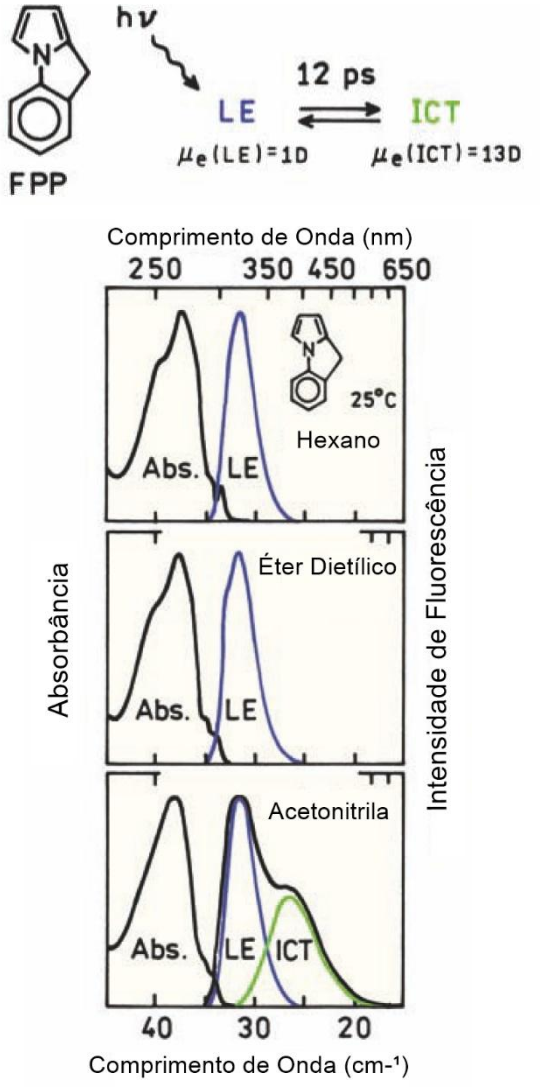


Figura 20. Espectros de emissão do fluoróforo na presença de diferentes solventes. (Adaptado de Lakowicz, J. R. *Principals of Fluorescence Spectroscopy*; 3. Ed. Springer, **2006**.)

3.7. EFEITO DA POLARIDADE DO SOLVENTE NO MECANISMO ICT

A transferência de carga intramolecular pode ser evidenciada a partir do estudo fotofísico em solução que correlaciona a dependência dos máximos de absorção e de emissão com a variação da polaridade do meio. Nas relações de Lippert-Mataga são correlacionados os

deslocamentos solvatocrômicos, a polaridade dos diferentes solventes e mistura de solventes, constante dielétrica (ε_{mix}) e o índice de refração (n_{mix}), como já descrito na literatura.[30,32-34]

$$\varepsilon_{mix} = f_A\varepsilon_A + f_B\varepsilon_B \qquad (1)$$

$$n^2_{mix} = f_A n^2_A + f_B n^2_B \qquad (2)$$

Nestas equações, f_A e f_B são frações volumétricas dos solventes ou mistura de solventes. Com base no pressuposto de que um dipolo pontual está situado no centro da cavidade esférica e negligenciando a polarizabilidade média do soluto (α) nos estados envolvidos na transição ($\alpha = \alpha_e = \alpha_g = 0$ onde *e* e *g* representam os estados excitados e fundamental respectivamente) obtém-se: [33-37]

$$hc\,\nu_{max} = hc\,\nu_{max}\,(0) - [2\mu_e(\mu_e-\mu_g)/\alpha^3]^*\Delta f \quad (3)$$

$$\Delta f = f(\varepsilon)-f(n) \qquad (4)$$

$$f(\varepsilon) = (\varepsilon-1)/(2\varepsilon+1);\ f(n) = (n^2-1)/(2n^2+1), \quad (5)$$

onde μ_g é o momento dipolar do soluto no estado fundamental, ν_{max} é o máximo de fluorescência equilibrado no solvente e $\nu_{max}\,(0)$ é o valor dos máximos de fluorescência extrapolados para a fase gasosa, *α* é o raio da cavidades em que o corante reside. O Δ*f* é o fator de polaridade do solvente puro ou de misturas de solventes.[34,38] Com base nas equações descritas acima, pode-se determinar através da inclinação da reta, as alterações do momento de dipolo da molécula através de gráficos que correlacionam os máximos de absorção e emissão e o deslocamento de Stokes, em função da polaridade do solvente (Δf).

3.8. BIOIMAGEAMENTO

A utilização da região do infravermelho próximo (NIR, 690-900 nm) para o mapeamento celular oferece vantagens únicas de imageamento *in vivo*. Principalmente por ser uma região onde os tecidos apresentam mínima absorção e fluorescência, utilizar corantes marcadores que absorvem e emitem nessa região é bastante vantajoso.[39] Dessa forma, o desenvolvimento da técnica de mapeamento celular utilizando a fluorescência em tecidos intactos e com alta profundidade de penetração é denominado bioimageamento. O bioimageamento é um método não invasivo no qual é possível fazer o mapeamento de células de interesse através da marcação celular efetuando a diferenciação entre células normais e células cancerosas. Assim, a classe de corantes orgânicos polimetínicos vem atuando como protagonistas da diferenciação celular.[40-42]

Dentro da classe dos corantes orgânicos das cianinas, as heptameteno cianinas vêm ganhando destaque como marcadores em células cancerosas, principalmente devido à sua baixa toxicidade, a habilidade que possuem em acumular nas mesmas, baixa autofluorescência,

superior razão sinal ruído e, superior estabilidade no ambiente celular.[43-46] Trabalhos recentes mostram as heptameteno cianinas como marcadores eficientes de células cancerosas, mas não em células normais, de diferentes partes do corpo.[8] Yang e colaboradores comprovaram a captação e retenção preferencial em células cancerosas, mas não em células normais do composto **16**, conforme é apresentado na **Figura 21**. Através de estudos detalhados Yang e colaboradores descreveram que a marcação preferencial em células cancerosas ocorria com a fixação do corante orgânico na mitocôndria e nos lisossomos.[8] Essa marcação preferencial se deve as células cancerosas apresentarem diferentes níveis de um polipeptídeo responsável pelo transporte de ânions orgânicos (OATP), comparado com as células normais. Devido aos níveis extremamente altos de OATP em células cancerosas, foi concluído ser esse o responsável pela retenção preferencial das heptameteno cianinas. Já em células normais a atividade de OATP é bloqueada pelo BSP, inibidor competitivo ao OATP.[8]

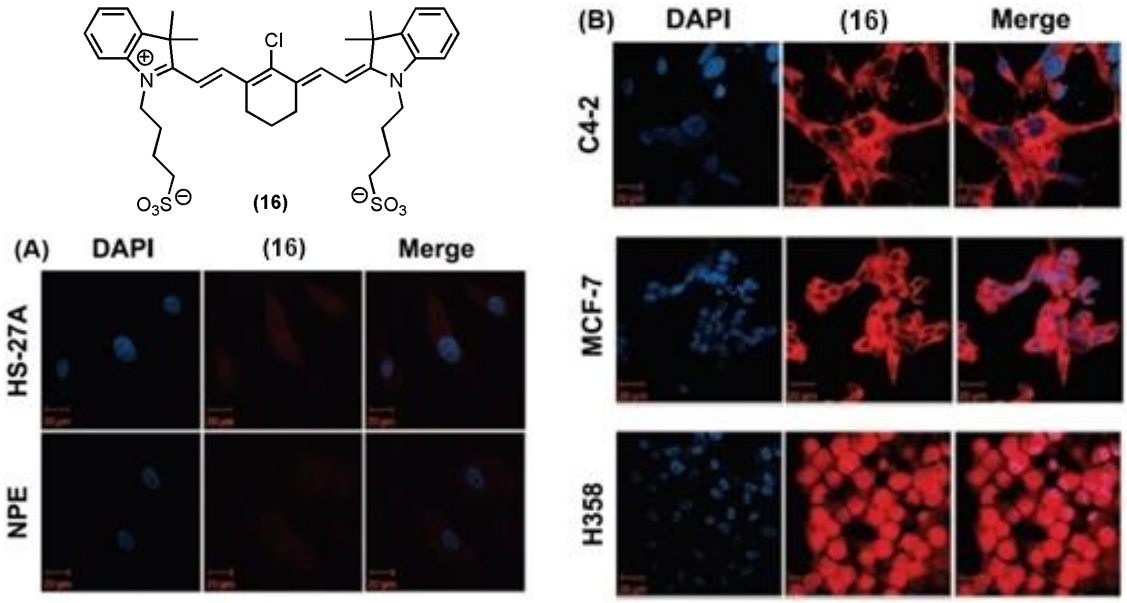


Figura 21. Resultados obtidos com a utilização do marcador de núcleo (DAPI) e composto **16**. (A) Aplicação do composto **16** em células humanas normais incluindo células normais do estroma da medula óssea (HS-27A) e células normais epiteliais da próstata (NPE). (B) Aplicação do composto **16** *in vivo* em células cancerosas da próstata (C4-2) mama (MCF-7) e pulmão (H358). (Adaptado de Yang, X.; Shi, C.; Tong, R.; Qian, W.; Zhau, H. E. et al. *Clin Cancer Res.* **2010**, *16*, 2833.)

Pan e colaboradores desenvolveram nanopartículas (**PF127**) contendo heptameteno cianina (composto **17**) capazes de marcar e diferenciar células cancerosas de células normais em estados iniciais de câncer, através da seletiva interação com a mitocôndria de células

cancerosas. Devido ao fato de células cancerosas terem maior atividade metabólica, as células cancerosas absorvem mais substâncias catiônicas que células normais, principalmente por apresentarem o potencial da membrana mitocondrial mais negativo, comparado a células normais. De acordo com os estudos realizados por Pan e colaboradores, as nanopartículas contendo o composto **17** apresentaram-se com marcação satisfatória e com sinais de fluorescência constantes dentro do período de 24h (**Figura 22**). Estudos adicionais mostram que mesmo quando a proporção de células cancerosas é bem menor que de células normais (1:100) a marcação e diferenciação de células cancerosas é satisfatória, conforme é apresentado na **Figura 23**.[47]

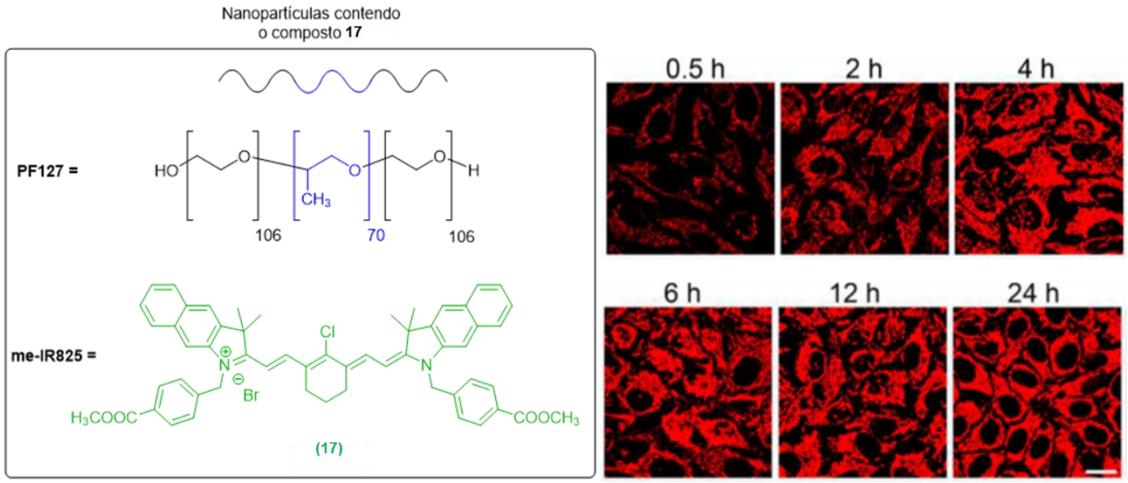


Figura 22. Nanopartículas (PF127) contendo o composto **17** na marcação de células cancerosas com o decorrer do tempo. (Adaptada de Pan, G.; Jia, H.; Zhu, Y.; Sun, W.; Cheng, X.; Wu, F. *ACS Appl. Nano Mater.* **2018**, *1*, 2885.)

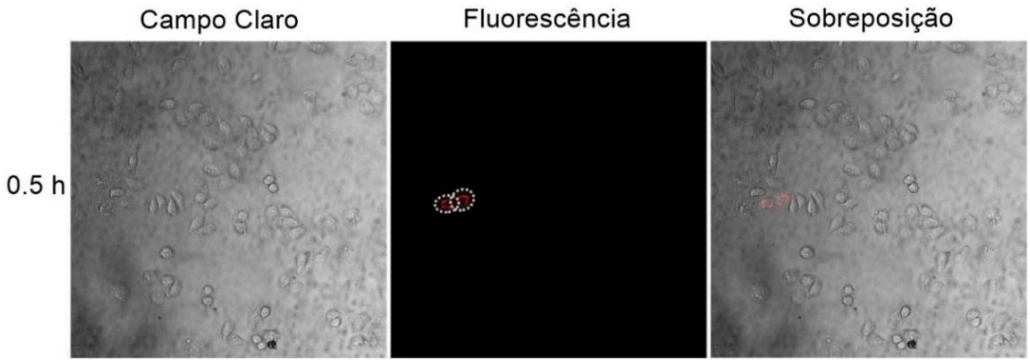
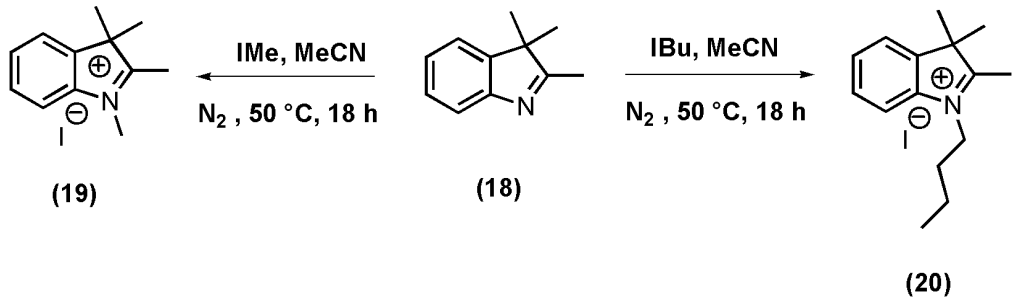


Figura 23. Nanopartículas (PF127) contendo o composto **17** na proporção de células cancerosas 1:100 em relação a células normais. (Adaptada de Pan, G.; Jia, H.; Zhu, Y.; Sun, W.; Cheng, X.; Wu, F. *ACS Appl. Nano Mater.* **2018**, *1*, 2885.)

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. ALQUILAÇÃO DE INDÓIS

Para a síntese de substituição na posição meso de novas heptametenos cianinas, realizou-se primeiramente a quaternização dos indóis de interesse (compostos **19-20**), conforme é apresentado no **Esquema 3**. Os indóis quaternizados foram sintetizados utilizando haleto de alquila de interesse em excesso[7,48] na presença do indol (**18**). A reação ocorre via mecanismo S_N2, na qual o par de elétrons não ligante do nitrogênio ataca o haleto de alquila, levando à formação dos compostos **19** e **20**. Decorrido o tempo de reação, os indóis foram obtidos por recristalização, conforme metodologia descrita na literatura. Os rendimentos obtidos foram similares aos rendimentos da literatura utilizada.[7Erro! Indicador não definido.]



Esquema 3. Quaternização dos compostos **19** e **20**.

Os compostos **19** e **20** foram caracterizados por ponto de fusão e ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ^{1}H). Estas análises confirmam as quaternizações do indol, principalmente devido aos sinais do RMN de ^{1}H referentes à presença dos diferentes grupos alquilas ligados ao nitrogênio do anel indólico. Na **Figura 24** é apresentado o RMN de ^{1}H do composto **19**. A partir da análise do espectro de RMN de ^{1}H foi possível confirmar a quaternização do anel indólico devido ao sinal singlete centrado em 3,98 ppm, referente à metila ligada ao nitrogênio do anel indólico quaternizado. Os singletes centrados em 3,78 e 1,53 ppm são os sinais referentes às demais metilas ligadas ao anel indólico.

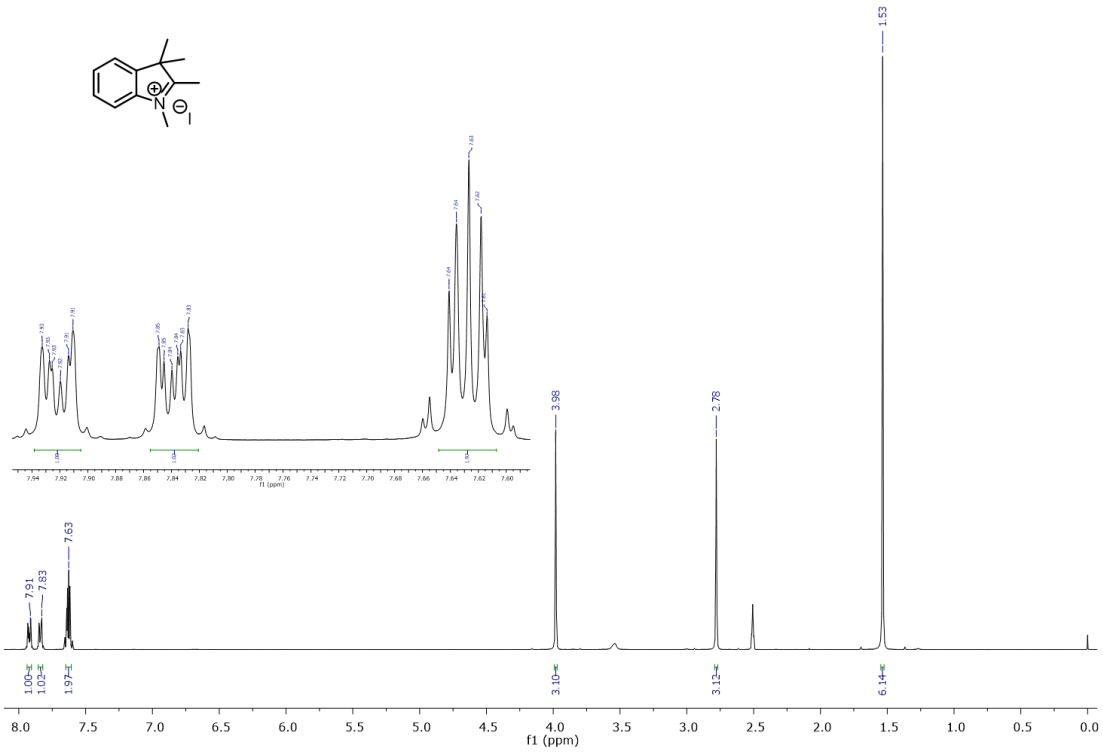
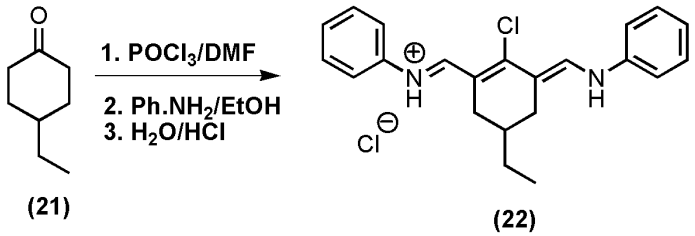


Figura 24. Espectro de RMN de ^{1}H do composto **19** em DMSO-d_6 (400 MHz).

4.2. SÍNTESE DE SAL PENTAMETÍNICO

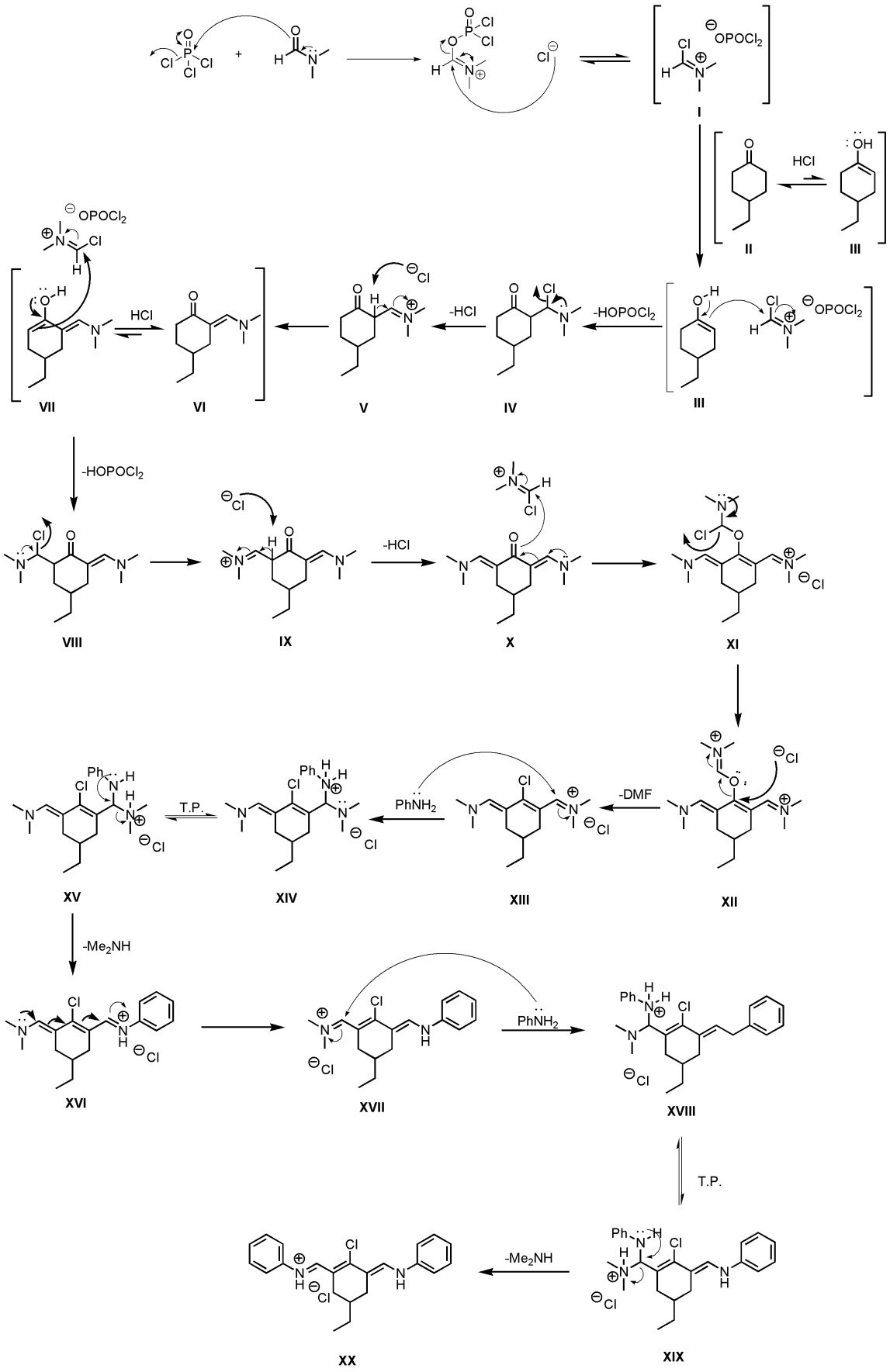
O sal pentametínico foi sintetizado conforme metodologia descrita na literatura[7,49] (**Esquema 4**). A síntese é realizada em duas etapas, na primeira ocorre a formação do reagente de Vilsmeier-Haack, seguido da formação *in situ* do sal pentametínico (composto **22**). O produto foi sintetizado com bons rendimentos, recristalizado em tolueno e banho de ultrassom e caracterizado por ponto de fusão e RMN de ^{1}H.



Esquema 4. Síntese do composto **22**.

A proposta mecanística para a síntese do sal pentametínico é apresentada no **Esquema 5**. Na primeira etapa ocorre a formação do reagente de Vilsmeier-Haack (**I**) por meio da adição lenta de $POCl_3$ em DMF e banho de gelo. Através do ataque do grupo carbonila da amida ao reagente $POCl_3$, ocorre à eliminação do átomo do cloro. O átomo de cloro ataca o composto formado, levando à eliminação do grupo diclorofosfato ($^{-}OPOCl_2$) e levando, por fim, a formação

do reagente de Vilsmeier-Haack (**I**). Decorridos 30 min da adição de $POCl_3$, é adicionada a etilcicloexanona (**II**) que, em equilíbrio com sua forma enol (**III**), leva ao ataque da ligação dupla ao reagente de Vilsmeier-Haack, através de reações de substituição nucleofílica, seguido de suscetíveis imino alquilações, leva a formação do subproduto **XIII**. Na seguinte etapa da reação, é adicionada uma solução alcoólica de anilina ao meio reacional. Através do ataque do par de elétrons não-ligantes do nitrogênio da anilina ao carbono da imina (**XVIII**) e, seguido da troca protônica, ocorre a eliminação do composto dimetilamina. O processo ocorre em ambos os lados do anel cicloexênico de forma a ser obtido o sal pentametínico **XX** (composto **23**).[7,50]

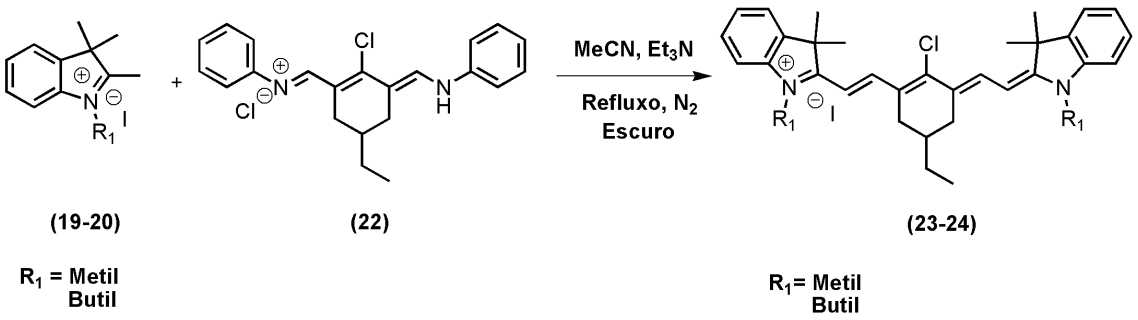


Esquema 5. Proposta mecanística para a formação do sal pentametínico.

Através da análise de RMN de ^{1}H (**Figura A3**, ver anexos), foi possível confirmar a formação do sal pentametínico desejado (composto **22**). Ressalta-se que, embora o espectro apresente contaminações, devido as dificuldades de purificação, com proporção minoritária, optou-se por dar sequência para a próxima etapa de síntese de heptameteno cianinas simétricas, pois o produto estava de acordo com os dados da literatura utilizada.[7]

4.3. SÍNTESE DE HEPTAMETENO CIANINAS

As heptameteno cianinas simétricas foram sintetizadas através da reação entre os compostos sintetizados anteriormente, conforme é apresentado no **Esquema 6**. Para isso, a reação foi conduzida protegida de luz e sob atmosfera de N_2 para evitar a ocorrência de foto-oxidação durante a reação. Assim, em um balão âmbar, o indol quaternizado de interesse (composto **19-20**) foi adicionado a uma solução de trietilamina e acetonitrila, para ocorrer a efetiva desprotonação do hidrogênio α indólico e levar à formação da enamina, sendo assim a solução foi deixada sob agitação por 5 min. Após, a solução é vertida em um balão contendo acetonitrila e o sal pentametínico (composto **22**). A reação é conduzida sob refluxo por 18 horas.



Esquema 6. Síntese dos compostos **23** e **24**.

Os compostos **23-24** foram obtidos com rendimentos bons, caracterizados por ponto de fusão, RMN de ^{1}H e RMN de ^{13}C.

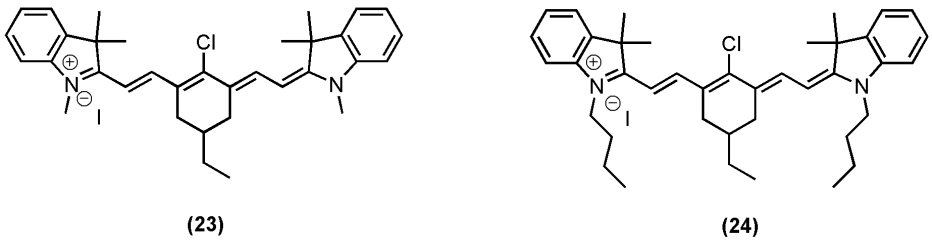
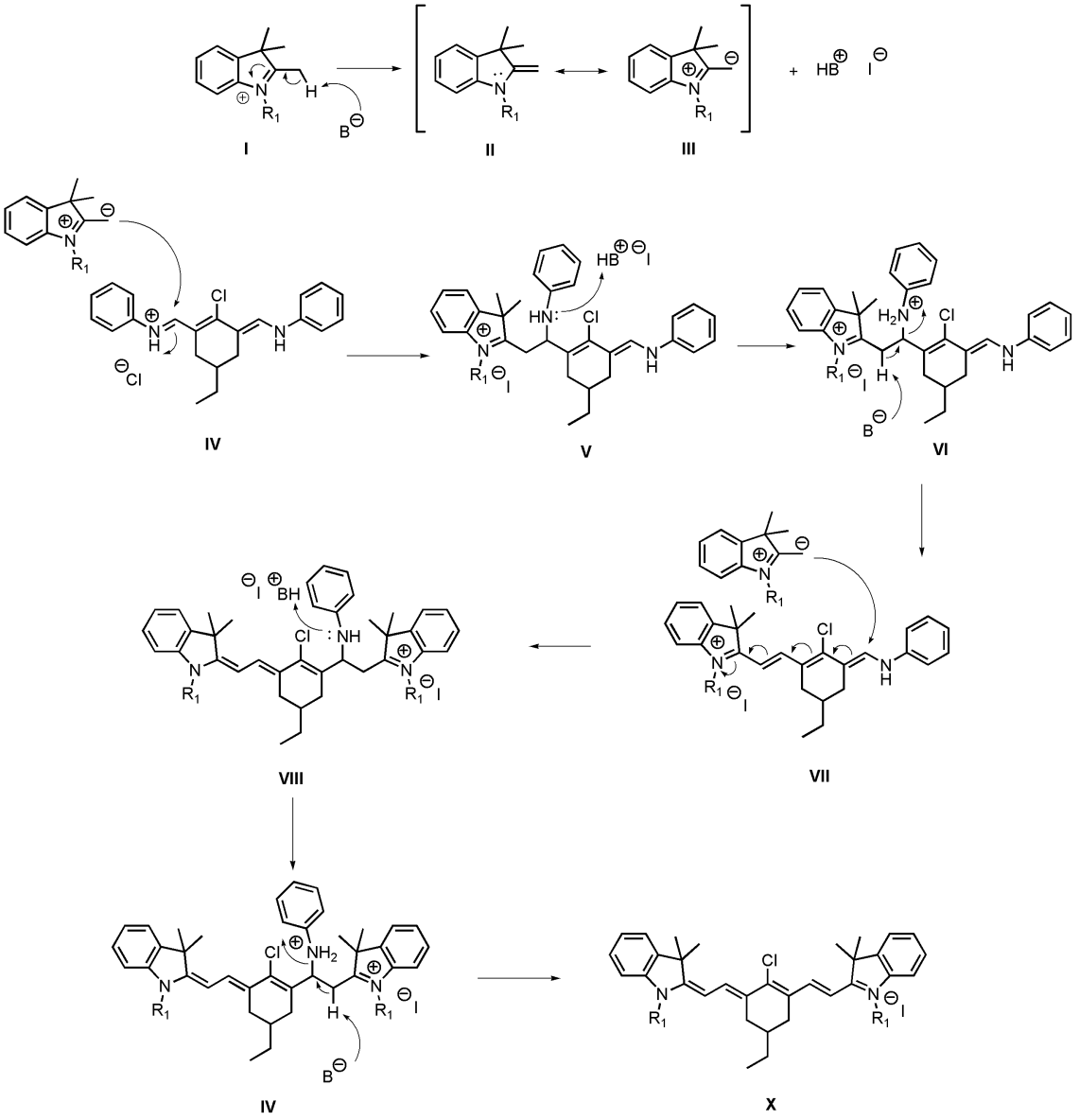


Figura 25. Heptameteno cianinas simétricas sintetizadas **23** e **24**.

A proposta mecanística para a síntese de heptameteno cianinas é apresentado no **Esquema 7**. Através da desprotonação do carbono α indólico em meio básico ocorre a formação

da enamina que, na presença de solvente polar aprótico a estrutura de ressonância **III** é favorecida, dando início a síntese da cianina através do ataque da enamina ao sal pentametínico preparado anteriormente, via mecanismo $E1_{cb}$, conforme é apresentado.[7]



Esquema 7. Proposta mecanística para a síntese de heptameteno cianinas simétricas.

Na **Figura 26** é apresentado o espectro de RMN de ^1H do composto **23**. Os sinais referentes a etila do anel cicloexênico estão centrados em 1,08 ppm, atribuído ao $–CH_3$, e em 1,60 ppm, atribuído ao $-CH_2-$. O singleto localizado em 1,74 ppm é referente aos hidrogênios das metilas dos anéis indólicos. Tanto em 2,90 ppm como em 2,27 ppm encontram-se os sinais referentes aos hidrogênios $–CH_2–$ do anel cicloexênico, não sendo possível atribuir de forma efetiva qual hidrogênio está acoplando com o hidrogênio trissubstituído do anel cicloexênico, pois para isso seria necessário realizar RMN de 2D. O singleto centrado em 3,75 ppm é atribuído aos

hidrogênios das metilas ligadas ao nitrogênio da porção indólica. Os hidrogênios da porção vinílica apresentam dois dubletos centrados em 6,16 e em 7,22 ppm. Entre 7,28 e 8,36 ppm estão localizados os sinais referentes aos hidrogênios aromáticos.

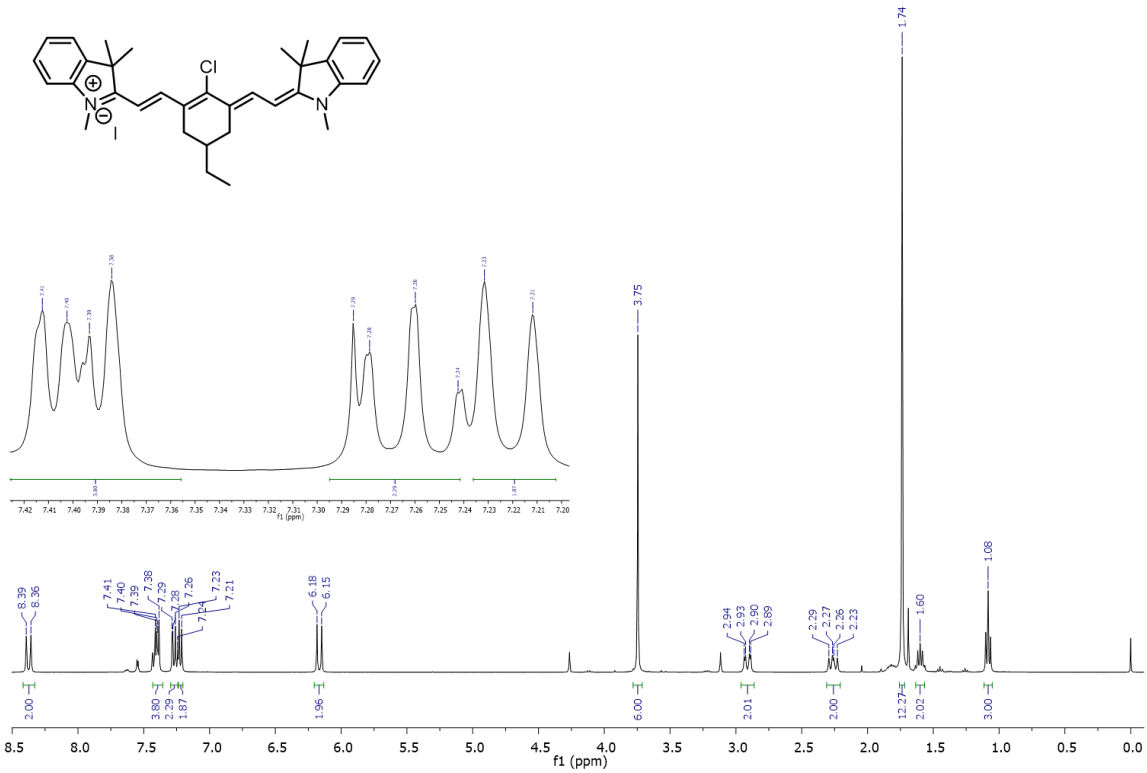


Figura 26. Espectro de RMN de ^{1}H do composto **23** em $CDCl_3$ (400 MHz).

Na **Figura 27** é apresentado o espectro de RMN de ^{13}C do composto **23**. Os carbonos referentes a etila ligado ao anel cicloexênico estão localizados em 11,91 e 28,13 ppm. Os carbonos do anel cicloexênico, carbonos vizinhos ao carbono da posição meso ligado ao átomo de cloro, aparecem em 144,65 ppm. O carbono ligado ao átomo de cloro tem seu sinal atribuído em 150,83 ppm. O sinal centrado em 49,34 ppm é o sinal referente as metilas ligadas ao nitrogênio do anel indólico. O sinal mais desblindado, localizado em 172,98 ppm, é o sinal referente ao carbono ligado ao nitrogênio do anel indólico.

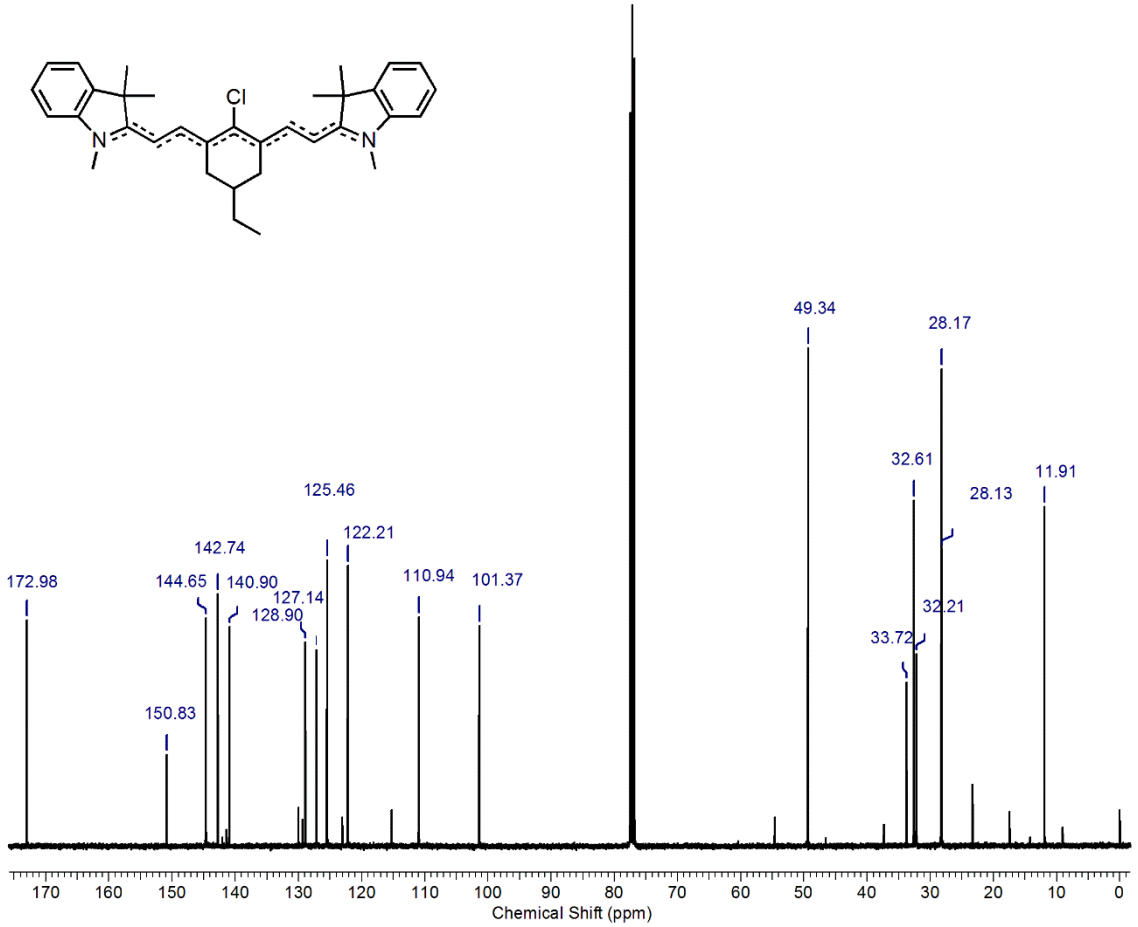
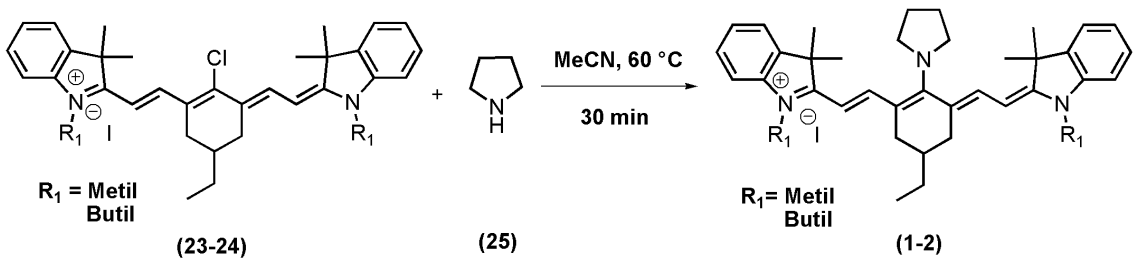


Figura 27. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **23** em $CDCl_3$ (100 MHz).

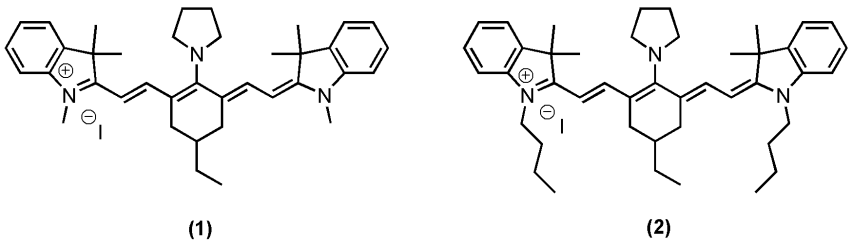
4.4. SÍNTESE DE HEPTAMETENO CIANINAS SUBSTITUÍDAS NA POSIÇÃO MESO

A substituição na posição meso do átomo de cloro de heptameteno cianinas ocorre através da reação da cianina de interesse (composto **23-24**) com a pirrolidina (composto **25**), conforme é apresentado no **Esquema 8.** A síntese dos compostos **1-2** pode ser realizada pelo fato da posição meso do anel cicloexênico ser um centro deficiente de densidade eletrônica devido à presença do átomo de cloro e, associada à presença de carga positiva e à alta conjugação eletrônica da molécula, torna essa região suscetível ao ataque nucleofílico do composto **25**, levando aos produtos **1-2**.



Esquema 8. Síntese dos compostos **1** e **2**.

Os compostos **1-2** foram caracterizados por espectroscopia de RMN de ^{1}H e RMN de ^{13}C, infravermelho, ponto de fusão e massas de alta resolução. As análises confirmam a formação de heptameteno cianina substituída na posição meso. Os rendimentos variaram entre 75-78%.



(1) (2)

Figura 28. Heptameteno cianinas substituídas na posição meso **1** e **2**.

Na **Figura 29** é apresentado o RMN de ^{1}H do composto **2**. O espectro apresenta sinais localizados em 4,03 ppm e em 1,99 ppm, ambos multipletos referentes aos hidrogênios da pirrolidina localizado na posição meso da heptameteno cianina. O sinal mais desblindado centrado em 4,03 ppm é referente aos hidrogênios vizinhos ao nitrogênio da pirrolidina.

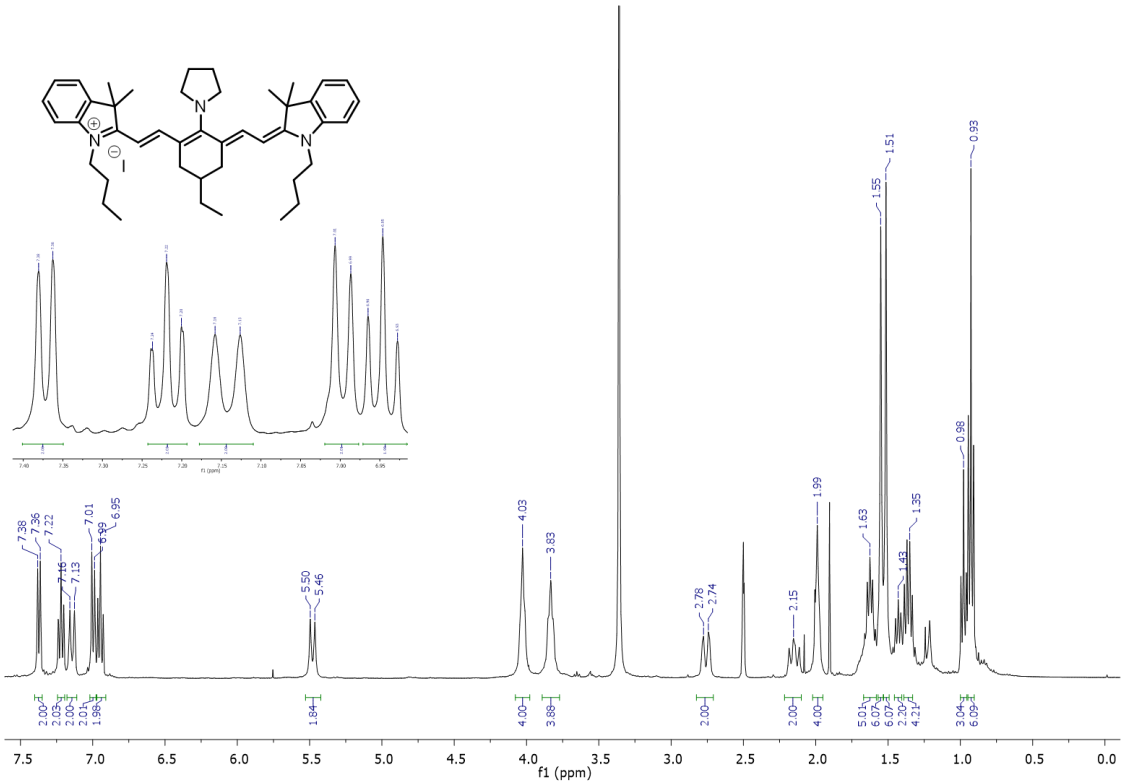


Figura 29. Espectro de RMN de ^{1}H do composto **2** em DMSO-d_6 (400 MHz).

Na **Figura 30** é apresentado o espectro ampliado, entre 2,80 e 0,80 ppm, de RMN de ^{1}H do composto **2**. O tripleto localizado em 0,93 ppm é atribuído ao -CH_3 terminal da cadeia butílica,

já os hidrogênios do grupo -CH_2- da cadeia butílica estão em 1,35, 1,63 e 3,83 ppm. Os sinais referente à etila do anel cicloexênico estão centrados em 0,98 ppm, tripleto referente ao -CH_3, e em 1,43 ppm, multipleto referente ao -CH_2-. Em, aproximadamente, 1,63 ppm está localizado o multipleto referente ao H do carbono trissubstituído do anel cicloexênico, já os hidrogênios –CH_2– do anel cicloexênico estão centrados em 2,15 ppm e 2,76 ppm. Os hidrogênios referentes às metilas presentes nos anéis indólicos estão localizados em 1,51 ppm e 1,55 ppm.

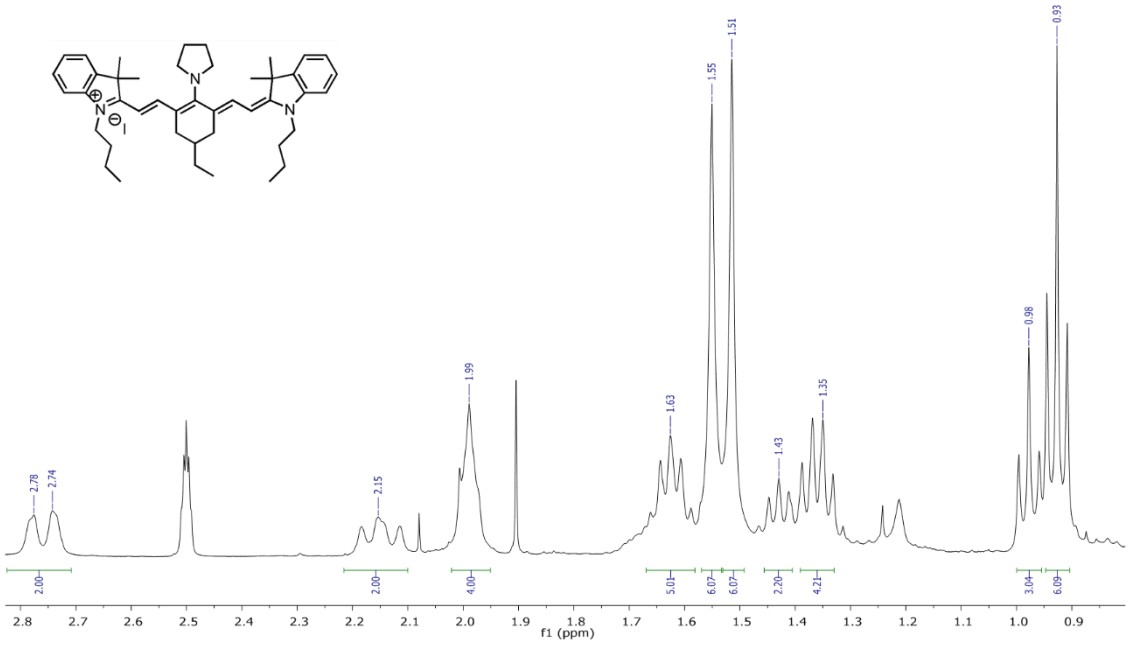


Figura 30. Espectro ampliado de RMN de ^{1}H, entre 2,80 e 0,80 ppm, do composto **2** em DMSO-*d*$_6$ (400 MHz).

Uma segunda ampliação do espectro de RMN de ^{1}H do composto **2** é feita na região entre 7,40 e 3,80 ppm e apresentado na **Figura 31**. Os hidrogênios da porção vinílica estão centrados em 7,14 ppm e 5,48 ppm, sendo atribuído aos hidrogênios próximos ao nitrogênio, com carga formal positiva, o dubleto centrado em 7,14 ppm e aos hidrogênios vizinhos ao anel cicloexênico é atribuído o dubleto centrado em 5,48 ppm. Os sinais referentes aos hidrogênios aromáticos estão localizados na região entre 6,95–7,37 ppm. Através da técnica de espectroscopia bidimensional de ^{1}H-COSY, foi possível confirmar as atribuições realizadas aos sinais de hidrogênios da molécula, conforme é apresentado na **Figura A15**.

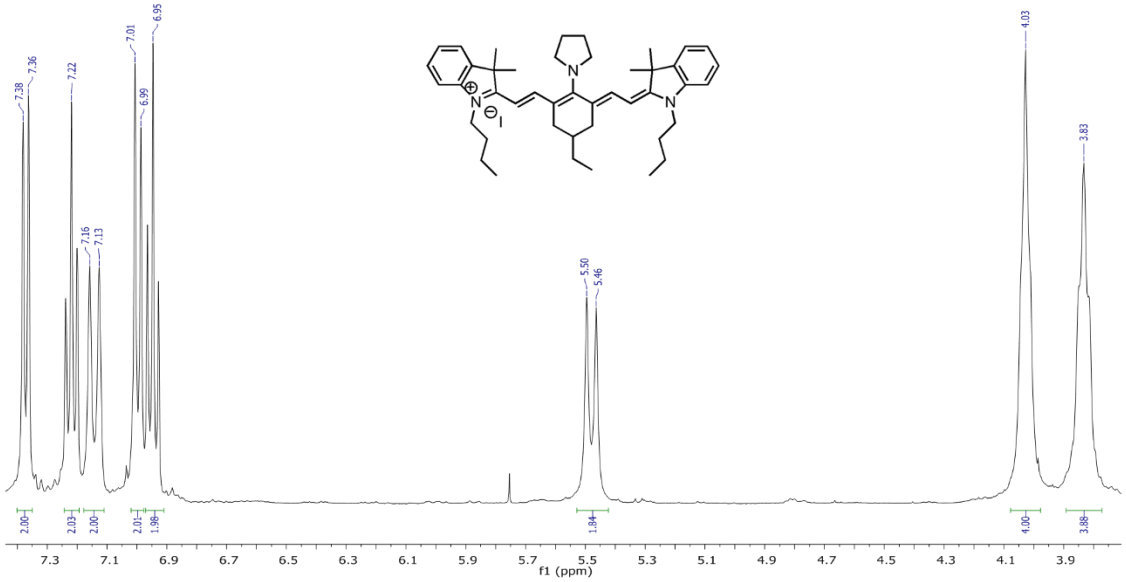


Figura 31. Espectro ampliado de RMN de ^{1}H, entre 7,40 e 3,80 ppm, do composto **2** em DMSO-d_6 (400 MHz).

4.5. ESTUDO FOTOFÍSICO

Os compostos sintetizados foram estudados através da técnica de espectroscopia de absorção na região do visível ao infravermelho próximo (Vis-NIR) com o objetivo de caracterizar as suas propriedades fotofísicas no estado fundamental. Para isso, o estudo fotofísico foi realizado com solventes orgânicos, com diferentes polaridades. Os espectros de absorção de UV-Vis-NIR foram obtidos com soluções com concentrações de 10^{-6} mol·L^{-1}.

Na **Figura 32** é apresentado o espectro de absorção normalizado do composto **2**. Diferentemente das moléculas precursoras **23-24**, que apresentam máximos de absorção localizados na região do infravermelho próximo (NIR), entre 774-789 nm,[7] as heptameteno cianinas substituídas na posição meso **1-2** apresentam a banda mais intensa de absorção na região do visível, entre 559-611 nm. Além disso, é possível notar que, para todos os solventes apresentados, houve influência no tamanho do substituinte da cadeia alquílica na porção indólica. Conforme é apresentado nas **Figuras A17, A19** e na **Tabela 1**, o aumento da cadeia alquílica aumentou a intensidade da absorbância para os compostos **1-2**.

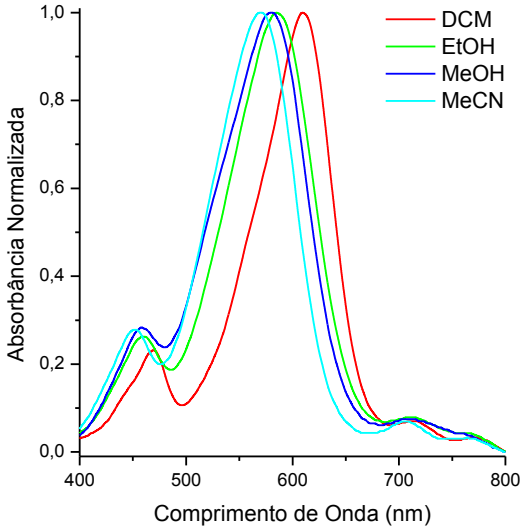


Figura 32. Espectro de absorção normalizado de UV na região do Vis-NIR do composto **2**.

A partir do espectro de absorção na região do Vis-NIR foi observada a formação de uma banda mais intensa centrada entre 559-602 nm e outras bandas menos intensas, tanto em maiores quanto em menores comprimentos de onda. Geralmente bandas deslocadas para regiões de menores comprimentos de onda, em relação à banda de absorção da espécie monomérica, são características da formação de agregados H que, pela razão de se auto-organizar de forma paralela (agregados do tipo sanduíche), deslocam os máximos de absorção para região de maiores energia.[25] Com o objetivo de compreender essas bandas menos intensas situadas em menores comprimentos de onda e verificar se ocorre, efetivamente, a formação de agregados H na molécula, foram calculados alguns parâmetros que são apresentados na **Tabela A1**. As bandas de absorção deslocadas para menores comprimentos de onda, localizada em torno de 450 nm, apresentaram parâmetros semelhantes aos calculados para a principal banda de absorção, como o coeficiente de absortividade molar (10^4 $M^{-1}\cdot cm^{-1}$) e a constante da taxa radiativa (10^8 s^{-1}), conforme é apresentado nas **Tabelas 1** e **A1**. Os valores da força de oscilador (~ 0,1) são inferiores ao observado na banda de absorção principal (~ 0,7). Já os valores comparáveis de tempo de vida útil radiativa τ^0 também indicam que ambas as absorções preenchem o mesmo estado excitado. Nesse caso, e com base nos parâmetros obtidos com essa absorção, acredita-se que essas bandas se originem das espécies monoméricas das cianinas e não dos agregados H, como geralmente relatado na literatura.[27]

A banda de absorção localizada maiores comprimentos de onda, em torno de 700 nm, apresentou parâmetros bastante diferentes em relação aos observados nas outras bandas de

absorção. Apesar dos valores relativamente altos do coeficiente de absortividade molar (10^3 $M^{-1}\cdot cm^{-1}$), os valores muito baixos de força de oscilador (~ 0,03) e constante da taxa radiativa (10^6 s^{-1}) indicam que se essa transição estiver relacionada às espécies monoméricas dessas cianinas, essa transição pode ser uma transição eletrônica proibida por simetria.[51] Além disso, o tempo de vida útil radiativa (~ 15 ns) indica que essas espécies estão preenchendo um estado excitado diferente do que as espécies responsáveis pelas absorções em torno de 450 nm e 550 nm.

Com o propósito de estudar a formação de agregados J, característicos de serem dependentes da concentração do meio,[26] foi realizado o estudo das propriedades de absorção do composto **2** em relação a variação de concentrações das soluções em acetonitrila, conforme é apresentado na **Figura 33**. A intensidade das bandas não se mostraram dependentes da concentração do meio. De acordo com a literatura, a formação de agregados J leva a bandas de absorção bastante intensas e finas (10-20 nm), além de apresentarem uma absorbância molar bastante grande em comparação com as espécies monoméricas,[26,52] comportamento que não foi observado nas bandas de absorção dos compostos **1-2**. Em adição, foram realizados experimentos em meio aquoso, como já descritos na literatura, a fim de induzir a formação de agregados[26,28,53] e, novamente, não houve indicação de sua formação, conforme é apresentado nas **Figuras A23** e **A24**. Assim, os compostos **1-2** não apresentam a formação de agregados J.

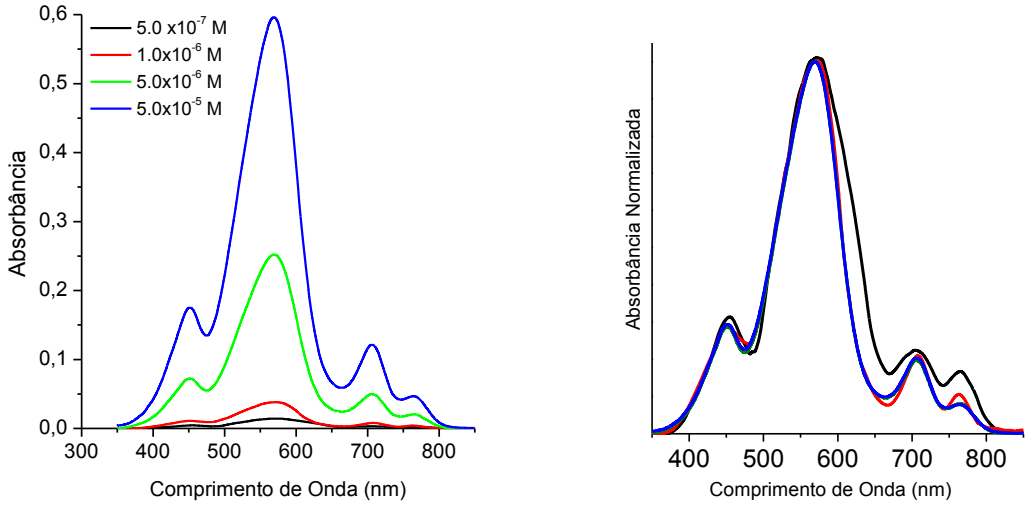


Figura 33. Espectro de absorção de UV na região do Vis-NIR do composto **2** em função da variação da concentração da solução em acetonitrila.

Contraditoriamente às características que as cianinas costumam apresentar, os compostos **1-2** não apresentaram uma tendência ao comportamento solvatocrômico bem

definido na presença de solventes com diferentes constantes dielétricas. O composto **1** apresenta o máximo de absorção na presença de 1,4-dioxano (ε 2,2) localizado em 559 nm e na presença de acetonitrila (ε 37,5) o máximo encontra-se em 559 nm. Em contrapartida, o máximo de absorção do composto **1** na presença de diclorometano (ε 9,1) está localizado em 602 nm. De forma geral, pode-se afirmar que o composto sintetizado apresentou solvatocromismo negativo e interações específicas com 1,4-dioxano que serão estudadas através da relação Lippert-Mataga. O comportamento do composto **1** na presença dos solventes 1,4-dioxano, diclorometano e acetonitrila é apresentado na **Figura 34**. Esse comportamento da molécula também é observado quando o substituinte da cadeia alquílica é o substituinte butila.[54]

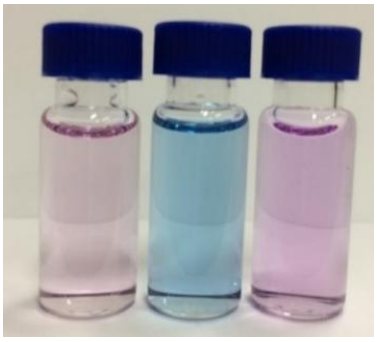
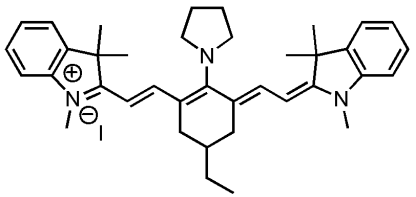
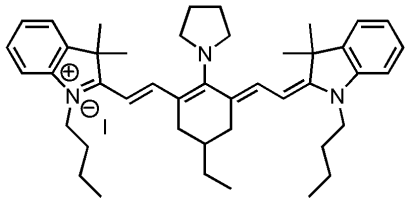


Figura 34. Composto **1** na presença de 1,4-dioxano, diclorometano e acetonitrila (esquerda para a direita).

Tabela 1. Dados fotofísicos dos compostos **1** e **2** em solução, onde ***A*** é o valor da absorbância, λ_{ABS} e λ_{EM} são os máximo de absorção e de emissão, respectivamente, dados em nanômetros (nm), ε é o coeficiente de absortividade molar (10^4 $M^{-1}\cdot cm^{-1}$), $\Delta\lambda_{ST}$ é o deslocamento de Stokes (nm), f_e é a força de oscilador, k_e^0 é a constante de taxa radiativa (10^8 s^{-1}), τ^0 é o tempo de vida útil radiativa (ns).

Composto	Solvente	A	λ_{ABS}	λ_{EM}		$\Delta\lambda_{ST}$		ε	f_e	k_e^0	τ^0
 (1)	Diclorometano	0,2374	602	659	767	57	165	4.74	0.578	1.60	0.627
	Etanol	0,2102	578	655	765	77	187	4.19	0.622	1.86	0.537
	Metanol	0,2139	572	652	763	80	191	4.29	0.578	1.77	0.566
	Acetonitrila	0,1804	559	650	759	90	200	3.60	0.525	1.68	0.595
 (2)	Diclorometano	0,3281	611	663	772	52	161	6.53	0.728	1.95	0.513
	Etanol	0,2781	587	636	767	49	180	5.56	0.753	2.19	0.458
	Metanol	0,2141	581	623	764	42	183	4.30	0.618	1.83	0.546
	Acetonitrila	0,2302	570	651	765	81	195	4.60	0.626	1.93	0.519

Os compostos sintetizados revelaram uma nova característica bastante interessante. Os compostos **1-2** apresentaram grandes valores para o deslocamento de Stokes comparados com os valores das moléculas precursoras **22-23**,[7] conforme mostrado na **Tabela 1**. Essas características já vêm sendo reportadas em outras moléculas contendo ligações C-N.[55,56] Os valores mostraram-se, de forma geral, dependente da polaridade do solvente, em que solventes mais polares apresentaram maiores valores para o deslocamento de Stokes. Esse comportamento indica que diferentes estruturas eletrônicas podem estar presentes entre o estado fundamental e o estado excitado, como já relatado na literatura para compostos similares.[55] Dessa forma, um grande deslocamento de Stokes pode ser indício de transferência de carga intramolecular (ICT) entre grupos doadores e aceptores de elétrons presentes na estrutura molecular, além de ser indício de estruturas bastante diferentes entre o estado fundamental e o estado excitado.[55]

Os espectros de emissão de fluorescência do composto **2** obtidos a partir da excitação com comprimentos de onda entre 570-611 nm e entre 708-715 nm estão apresentados nas **Figuras 35** e **36**.

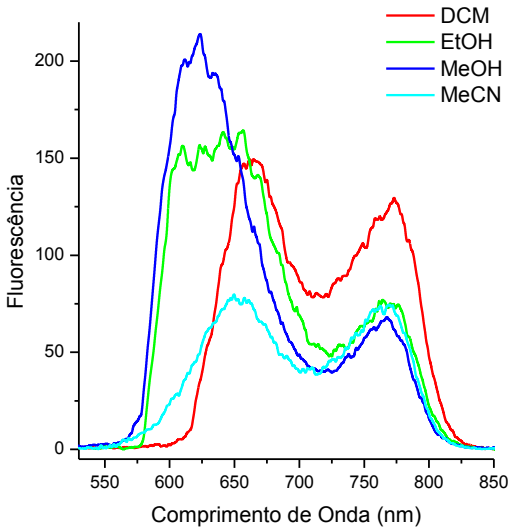


Figura 35. Espectro de emissão de fluorescência na região do Vis-NIR do composto **2**. (λ_{EXC} = 570-611 nm)

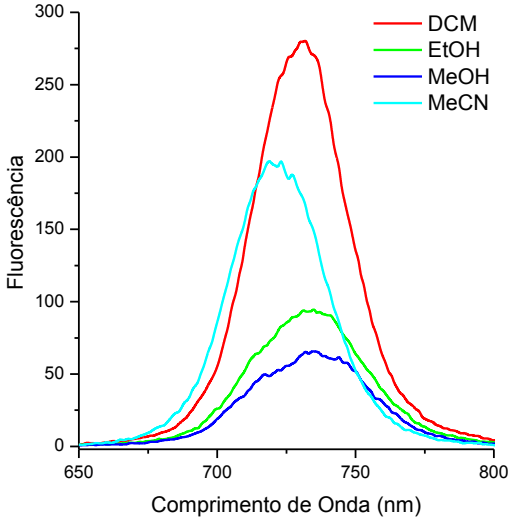
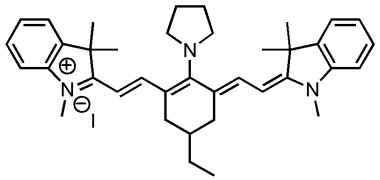
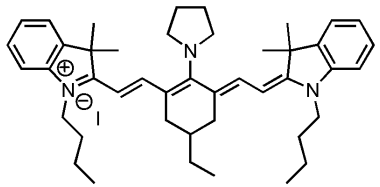


Figura 36. Espectro de emissão de fluorescência na região do Vis-NIR do composto **2**. (λ_{EXC} = 708-715 nm)

Ao excitar o composto estudado com comprimentos de onda entre 570-611 nm, duas bandas de emissão são observadas independentemente da polaridade do solvente. A primeira localizada em torno de 650 nm e a outra em 750 nm. A emissão de fluorescência mais intensa em diclorometano e em meio polar prótico está localizada em energias mais altas (650 nm). Por outro lado, em acetonitrila, as bandas de emissão apresentaram semelhante intensidade de fluorescência (**Figuras 35** e **Figura A26**). Dessa forma, a ocorrência desse perfil de emissão pode ser atribuída à transferência de carga intramolecular (ICT) no estado excitado. Assim, o estado localmente excitado (LE) pode ser relacionado com as bandas localizadas em torno de 650 nm e a transferência de carga intramolecular (ICT) com as bandas localizadas em 750 nm.

No entanto, ao excitar em comprimentos de onda entre 708-715 nm, apenas uma emissão de fluorescência pode ser observada, localizada em torno de 725 nm (**Figura 36**). Essa emissão única de fluorescência apresentou pequeno deslocamento de Stokes (em torno de 14 nm, apresentado na **Tabela 2**), e, portanto, é atribuído à espécie do estado localmente excitado. Com base nos resultados da fotofísica de absorção e emissão e com base nos dados obtidos na literatura, os perfis das bandas de emissão observados parecem não estar relacionados à formação de agregados em solução.[53,57-62]

Tabela 2. Dados fotofísicos dos compostos **1** e **2** em solução, λ_{ABS} e λ_{EM} são os máximo de absorção e de emissão, respectivamente, dados em nanômetros (nm) e $\Delta\lambda_{ST}$ é o deslocamento de Stokes (nm).

Composto	Solvente	λ_{EXC}	LE		ICT		λ_{EXC}	LE	
			λ_{EM}	$\Delta\lambda_{ST}$	λ_{EM}	$\Delta\lambda_{ST}$		λ_{EM}	$\Delta\lambda_{ST}$
 (1)	Diclorometano	602	659	57	767	165	712	731	19
	Etanol	578	655	77	765	187	708	735	27
	Metanol	572	652	80	763	191	703	736	33
	Acetonitrila	559	650	90	759	200	712	721	9
 (2)	Diclorometano	611	663	52	772	161	715	727	12
	Etanol	587	636	49	767	180	714	729	15
	Metanol	581	623	42	764	183	713	732	19
	Acetonitrila	570	651	81	765	195	708	718	10

4.6. EFEITO DA POLARIDADE DO SOLVENTE

Devido aos grandes deslocamento de Stokes entre os máximos de absorção e emissão que os compostos **1-2** apresentaram e com o objetivo de investigar a possibilidade de transferência de carga no estado fundamental e no estado excitado, aplicou-se as relações de Lippert-Mataga em diferentes misturas de acetonitrila/1,4-dioxano utilizando o composto **2** como modelo.[63] Na **Tabela 3** são apresentados os efeitos da polaridade da misturas de solventes (Δf), λ_{ABS} é o máximo de absorção e λ_{EM} o máximo de emissão, em cm^{-1} e o deslocamento de Stokes.

Tabela 3. Efeito da polaridade do solvente do composto **2**, para diferentes misturas de acetonitrila e 1,4-dioxano.

Volume Solvente (mL)		**Δf**	**λ_{ABS} (cm^{-1})**	**λ_{EM} (cm^{-1})**		**Stokes (cm^{-1})**	
MeCN	**1,4-Dioxano**						
1,0	0,5	0,298	17422	15267	13038	2155	4384
1,0	1,0	0,274	17331	15198	13038	2133	4293
1,0	1,5	0,254	17271	15221	13004	2050	4267
1,0	2,0	0,226	17182	15198	12970	1984	4212
1,0	2,5	0,205	17153	15198	12987	1955	4166

A partir dos dados apresentados, foi possível determinar a relação Lippert-Mataga entre o máximo de absorção e o máximo de emissão, conforme pode ser observado na **Figura 37.** A existência de uma relação linear entre o máximo de absorção ou emissão com a função de polaridade do solvente indica que a polaridade do solvente exerce influência no estado fundamental e/ou no estado excitado da molécula, por meio da mudança do momento de dipolo. Através do coeficiente angular é possível analisar se o aumento da polaridade do solvente estabiliza, ou não, o estado fundamental ou o estado excitado. Assim, conforme é apresentado na **Figura 37 (A)**, devido à existência de uma inclinação da reta crescente em função das bandas de absorção, existe um aumento do momento de dipolo no estado fundamental conforme

é aumentada a polaridade da solução. Sendo assim, a presença do solvente polar estabiliza o momento de dipolo deslocando as bandas de absorção para regiões de maiores energias.

Já as bandas de emissão, mesmo apresentando relação linear entre a mudança da polaridade do meio em relação às bandas de emissão, e, portanto, indicando que a polaridade do solvente também exerce influência no momento de dipolo no estado excitado, essa influência não é muito pronunciada e a presença de solventes com diferentes polaridades não influencia na estabilização do estado excitado da molécula, conforme é apresentado na **Figura 37 (B)**. O mesmo pode ser observado ao analisar a relação linear conforme o valor do deslocamento de Stokes apresentado na **Figura 37 (C)**.

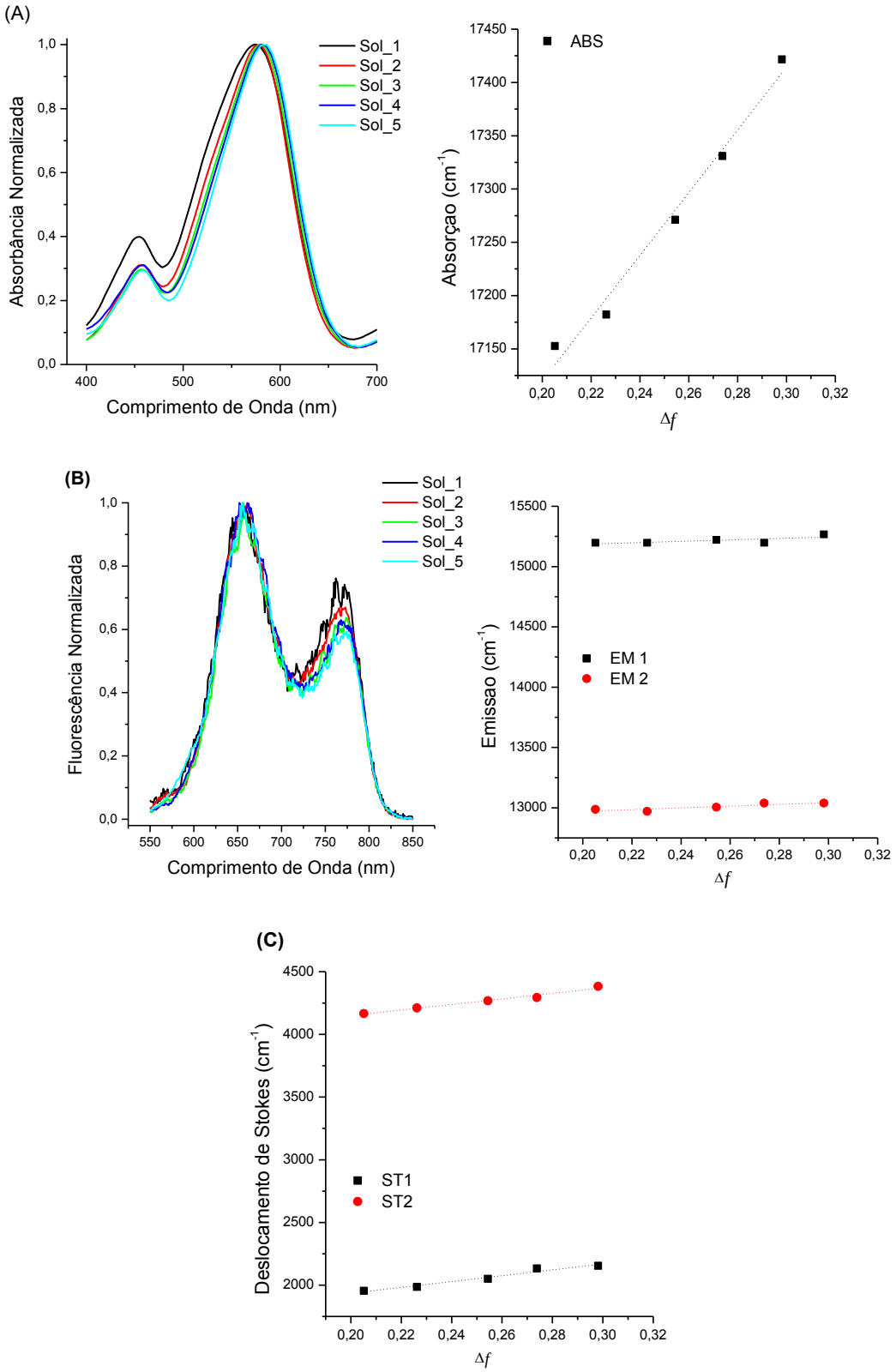


Figura 37. Espectros de absorção na região do UV-Vis (A), emissão de fluorescência (B) e função da polaridade do solvente Δ*f* *vs.* posição das bandas de absorção, emissão e deslocamento de Stokes (C) do composto **2** em diferentes misturas de acetonitrila/1,4-dioxano.

Com base nos resultados apresentados, podem ser propostas duas espécies com conjugação eletrônica dependente da polaridade do solvente. Essa estrutura eletrônica está de acordo com o estudo realizado por Pascal e colaboradores, no qual grupamentos químicos na posição meso com características fortemente doadoras de elétrons possuem a habilidade de situar a carga formal positiva no átomo central do substituinte, permitindo a formação do momento dipolar chamado bis-dipolo, conforme é apresentado na **Figura 38**.[3]

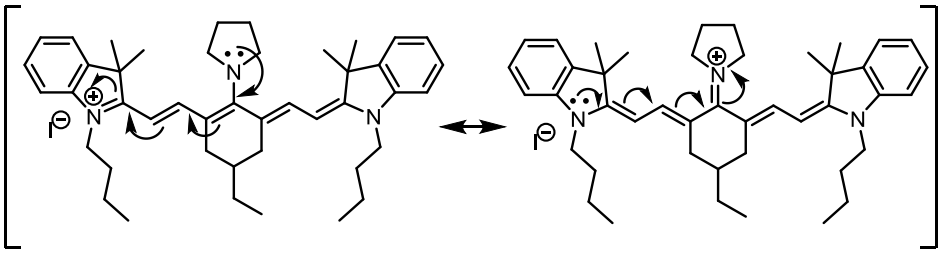


Figura 38. Proposta de estrutura responsável pelo ICT.

4.7. AVALIAÇÃO DOS COMPOSTOS COMO SENSORES ÓPTICOS PARA ADULTERAÇÃO DO ETANOL COM METANOL

Visto a maior resposta do momento de dipolo que os compostos **1-2** apresentam no estado fundamental, conforme o estudo do efeito da polaridade do solvente através das relações Lippert-Mataga, a classe de moléculas sintetizada foi testada como possível marcador óptico para variações de polaridade do meio. De acordo com a resposta que os compostos apresentam quando são inseridos na presença de etanol e na presença de metanol e, visto a semelhança química dos solventes em questão, a classe de compostos mostrou-se atrativa para o estudo da aplicação como sensores ópticos para a adulteração do etanol com metanol.

O desenvolvimento de corantes marcadores para combustíveis é uma prática que vem ganhando destaque principalmente devido aos inúmeros casos de adulteração de combustíveis, sendo estes derivados de petróleo ou não. Com o objetivo de inibir esta prática e permitir um maior controle na comercialização e na qualidade dos mesmos, os corantes marcadores são adicionados aos combustíveis permitindo uma identificação visual ou por técnicas que facilitam o controle dos mesmos através de comportamentos padrões estudados.[64]

Dentre os combustíveis, a utilização do etanol anidro como substituintes de combustíveis fósseis é bastante interessante, principalmente pelo fato de emitir menos gases de efeito estufa. Dessa forma, o controle da adulteração também deve ser intensificado, especialmente por fatores como a possibilidade de adição de etanol hidratado, conhecido como fraude do etanol molhado, e também a adição descontrolada de metanol. Assim, a adição do corante marcador

facilita o controle da fiscalização. Segundo a resolução da ANP é permitido por lei a adição de um corante marcador a solventes não derivados do petróleo no valor máximo de 15 ppm (15 $mg \cdot L^{-1}$) e o percentual máximo de metanol que pode ser adicionado ao etanol anidro é de apenas 0,5% em volume.[65] Assim, os corantes foram investigados como sensores ópticos para a marcação e controle da adulteração do etanol com metanol, utilizando espectroscopia de absorção na região do Vis-NIR. Na **Figura 39** é apresentado o composto **1** na presença de etanol e metanol, respectivamente. Embora a diferença visual não seja muito pronunciada, ao analisar principalmente a similaridade dos solventes em questão e, consequentemente, o momento de dipolo que o etanol e o metanol possuem (1,69 D e 1,70 D respectivamente), a diferença no comportamento que a molécula possui na presença dos solventes em questão torna-se considerável e apresenta a diferença entre os máximos de absorção é de 7,0 nm.

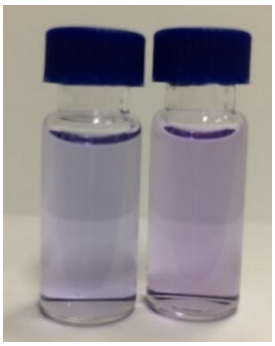


Figura 39. Composto **1** na presença de etanol e metanol.

O estudo para avaliar o comportamento do composto em diferentes porcentagens de metanol foi realizado através de sucessivas adições do metanol, partindo de uma concentração do corante marcador de 4 $mg \cdot L^{-1}$ (4 ppm). Nas **Figuras 40** e **41** são apresentados os espectros nas diferentes porcentagens de metanol. Mesmo na porcentagem permitida por lei, o valor da absorbância diminui de 0,297 (na presença de etanol puro) para 0,293 (com 0,5% de metanol), mostrando a eficiência da molécula como corante marcador.

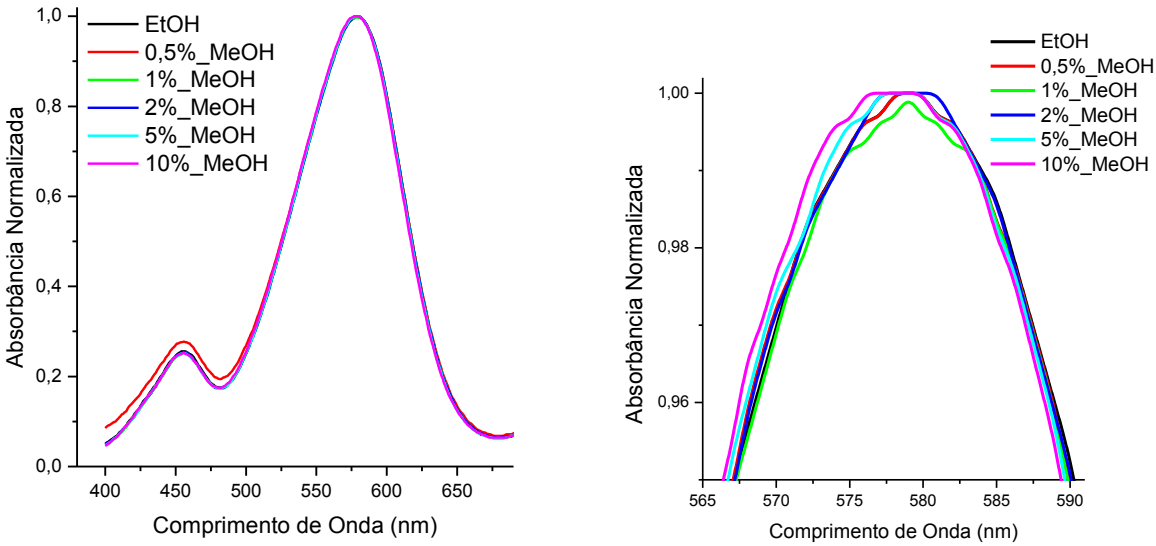


Figura 40. Espectro de absorção normalizado de UV na região do Vis-NIR do composto **1** na presença de etanol com porcentagens de metanol variando entre 0,5% e 10% e máximos de absorção ampliado (figura da esquerda e direita, respectivamente).

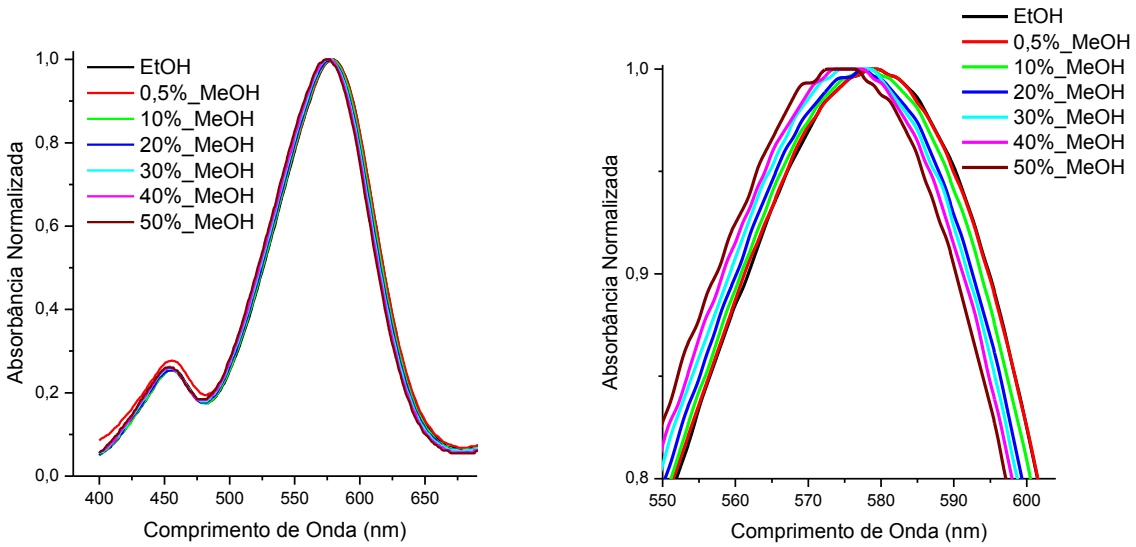


Figura 41. Espectro de absorção normalizado de UV na região do Vis-NIR do composto **1** na presença de etanol com porcentagens de metanol variando entre 0,5% e 50% e máximos de absorção ampliado (figura da esquerda e direita, respectivamente).

Através da análise dos espectros de absorção normalizados, é possível observar que com sucessivas adições de metanol, o máximo de absorção é deslocado para menores comprimentos de onda (deslocamento hipsocrômico), assim como os valores da absorbância. Dessa forma, os valores da absorbância de etanol com a porcentagem de metanol permitido por

lei (0,5%) será de 0,293. Caso o etanol seja adulterado com maiores porcentagens de metanol, além do permitido por lei, o valor da intensidade da absorbância diminui, além de ocorrer alterações nas posições dos máximos de absorção, conforme é mostrado nas **Figuras 40** e **41**.

4.8. AVALIAÇÃO DOS COMPOSTOS SINTETIZADOS COMO SONDA PARA AMINOÁCIDOS

Os aminoácidos são unidades fundamentais das proteínas, atuando como precursores bioquímicos de diversas funções e, assim, desempenhando papéis importantes no organismo. São categorizados em aminoácidos essenciais e não essenciais. Os aminoácidos não essenciais são aqueles que são produzidos pelo nosso organismo, sendo eles a glicina, a histidina, a cisteína e a prolina, por exemplo. Por outro lado, os aminoácidos essenciais são aqueles que não são sintetizados pelo nosso organismo e necessitam ser obtidos através da ingestão de alimentos. Nessa classe de aminoácidos temos o triptofano, a fenilalanina e a leucina como exemplos. Uma dieta rica em aminoácidos essenciais e não essenciais é necessária para a regulação de processos vitais, pois eles participam da síntese de neurotransmissores, síntese de hormônios, regeneração muscular e celular, função imunológica, entre outros. Assim, o controle dos diferentes aminoácidos no organismo é importante para garantir uma vida saudável e prevenir doenças.

Fenilcetonúria é uma doença genética rara que, ao nascer, o bebê apresenta alteração na função da enzima que processa o aminoácido fenilalanina e, consequentemente, leva ao acúmulo do aminoácido no organismo e causa problemas no cérebro, pois a criança não consegue desenvolver o sistema neurológico. A alteração da enzima causa na criança atraso mental grave, convulsões, hiperatividade, e afeta a fabricação de melanina. Através do teste do pezinho, realizado após 48h do nascimento, é possível identificar a doença. O teste mede o aumento da quantidade de fenilalanina no sangue. A doença não tem cura e as crianças que apresentam fenilcetonúria necessitam de tratamento por toda a vida.[66]

Dessa forma, desenvolver um corante marcador que consiga identificar os diferentes aminoácidos no organismo é bastante vantajoso. Na **Figura 42** é apresentado o composto **23** apenas na presença do solvente e o composto **23** na presença de aminoácidos, como a fenilalanina, o triptofano, a glicina e a prolina. O teste foi realizado a partir da reação entre o composto **23** e os diferentes aminoácidos. Como é possível observar, os compostos apresentaram diferentes comportamentos na presença de acetonitrila. Assim, o corante marcador foi investigado como sensor óptico para a sonda de aminoácidos utilizando espectroscopia de absorção na região do Vis-NIR.



Figura 42. Composto **23** testado como sensor de aminoácidos em acetonitrila. Esquerda para a direita: composto **23**, composto **23** na presença de fenilalanina, triptofano, glicina e prolina, respectivamente.

Na **Figura 43** é apresentado o espectro de absorção do composto **23** na ausência (A) e o composto **23** na presença dos diferentes aminoácidos (B). Através dos espectros de absorção verifica-se que para os diferentes aminoácidos apresentados, não só aspectos colorimétricos, mas também mudanças nos perfis das bandas de absorção foram observadas conforme a presença do aminoácido em questão com o corante marcador. Assim, conhecendo o comportamento padrão que o composto **22** apresenta na presença dos diferentes aminoácidos, seria também possível empregar os compostos como sonda de aminoácidos, pois o mesmo apresentou potencial aplicabilidade.

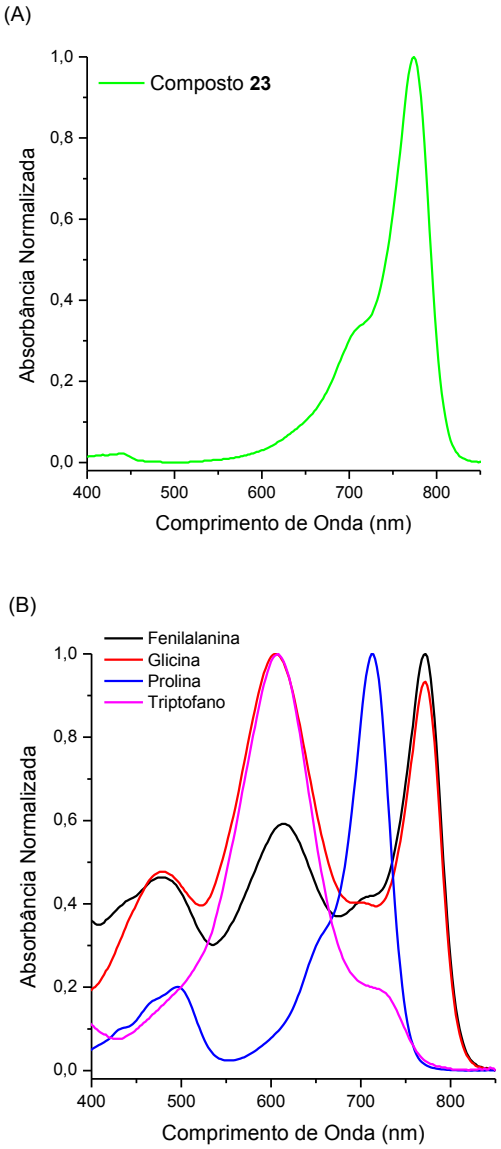


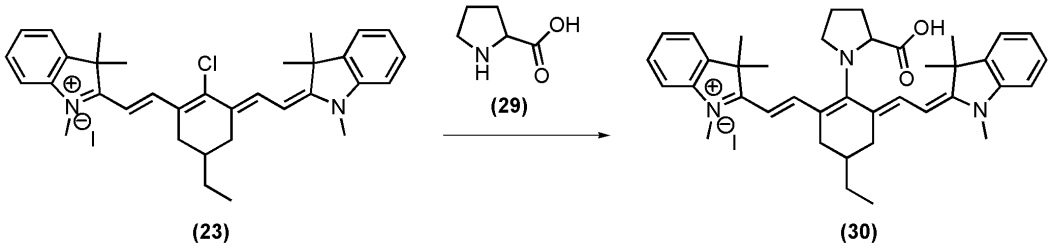
Figura 43. Espectro de absorção normalizado do Vis-NIR do composto **23** em acetonitrila (A) e espectro normalizado do composto **23** testado como sensor de aminoácidos em acetonitrila (B).

4.9. CICLIZAÇÃO INDUZIDA POR SOLVENTE

He e colaboradores descreveram uma interessante propriedade em heptameteno cianinas com substituintes funcionalizados com ácido carboxílico ou seus derivados, como amidas ou tióis, estrategicamente localizados na posição meso para modular a fluorescência no NIR. Através da variação do pH do meio a fluorescência poderia sofrer um mecanismo do tipo "on-off", no qual, ao ocorrer a ciclização da molécula, o efeito *"push-pull"* é perdido, apresentando quase nenhuma absorção ou fluorescência.[67]

Devido à similaridade da molécula sintetizada por He e colaboradores[67] com o composto **30**, sintetizado a partir da reação do composto **23** com a prolina (**29**), conforme é apresentado no

Esquema 7, foi realizado um estudo com o intuito de explorar a possibilidade da perda, ou não, de absorção ou fluorescência. Através da espectroscopia de absorção e emissão na região do Vis-NIR foi avaliado o comportamento da molécula através da influência dos diferentes solventes orgânicos (**Figura 44**).



Esquema 7. Composto **23** utilizado como sonda de aminoácido na presença do composto **29**.

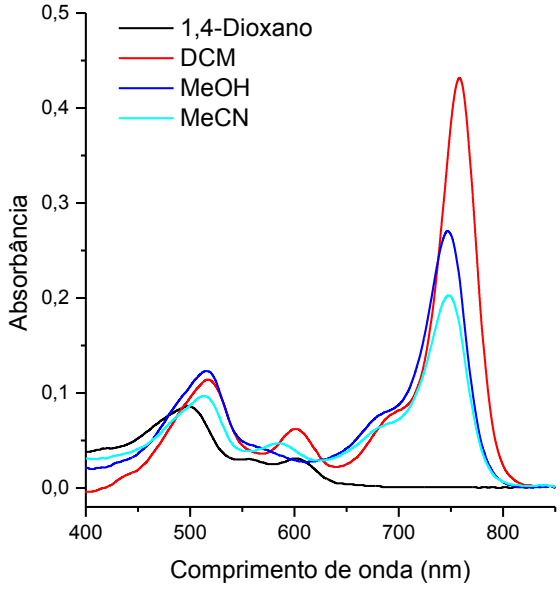
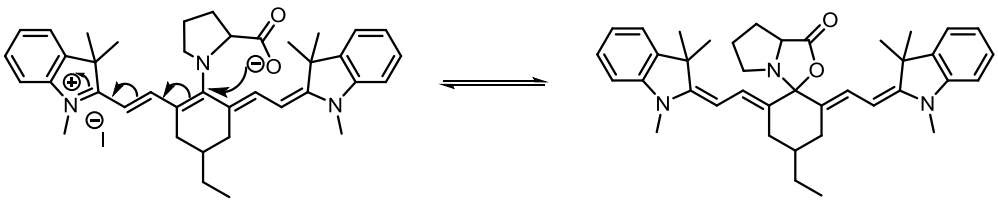


Figura 44. Espectro de absorção de UV na região do Vis-NIR do composto **30**.

A partir do espectro de absorção de UV na região do Vis-NIR obtido, é possível observar que o máximo de absorção centrado em aproximadamente 750 nm foi totalmente suprimido na presença de 1,4-dioxano. Interessantemente, a supressão do máximo de absorção ocorreu na presença de solvente apolar aprótico, mas exclusivamente na presença de 1,4-dioxano. O comportamento da perda total da coloração também é descrito na literatura para a Rodamina B, no entanto, na presença de solventes polares apróticos como DMF e DMSO.[68] Dessa forma, é acreditado que a molécula possui interações específicas com o solvente 1,4-dioxano e, na presença do mesmo, ocorre o favorecimento da ciclização na molécula de forma que a coloração

é totalmente perdida em decorrência da perda da conjugação na molécula, conforme é apresentado no **Esquema 8**.[67,68]



Esquema 8. Proposta de formação de anel de 5 membros do composto **30** na presença de 1,4-dioxano.

Os espectros de emissão do composto **30** são apresentados nas **Figuras 45** e **46**. A partir da excitação da banda de absorção utilizando comprimentos de onda em torno de 750 nm, apenas uma banda de emissão é observada. Os diferentes solventes orgânicos apresentam o mesmo comportamento, com exceção do 1,4-dioxano, que não apresenta nenhuma emissão de fluorescência. Este resultado está de acordo com o esperado, a partir dos resultados prévios de absorção de UV-Vis.

Por outro lado, ao excitar a banda de absorção mais intensa na presença de 1,4-dioxano, centrada aproximadamente em 500 nm, a molécula apresentou comportamento semelhante na presença de solventes como o diclorometano e acetonitrila, solvente apolar aprótico e solvente polar aprótico, respectivamente, com deslocamento de Stokes em torno de 30 nm. Já na presença de metanol apresentou um deslocamento de Stokes mais significativo de 89 nm, indicando interações especificas de ligações de hidrogênio e deslocando, portanto, a banda de emissão para regiões de menores energias (**Tabela A3**).[30]

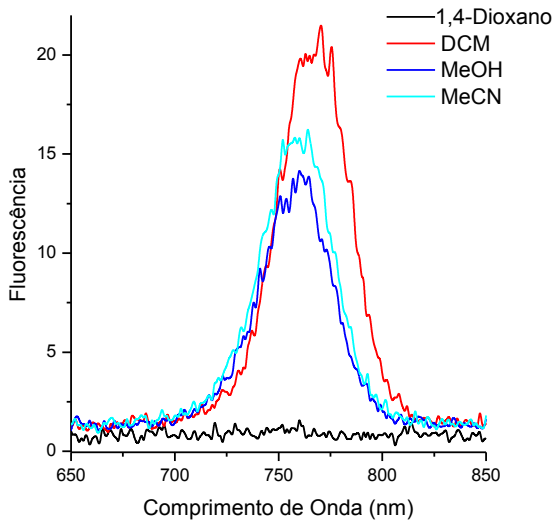


Figura 45. Espectro de emissão de fluorescência na região do Vis-NIR da banda responsável pelo máximo de absorção do composto **30** em solução. (λ_{EXC}=750 nm)

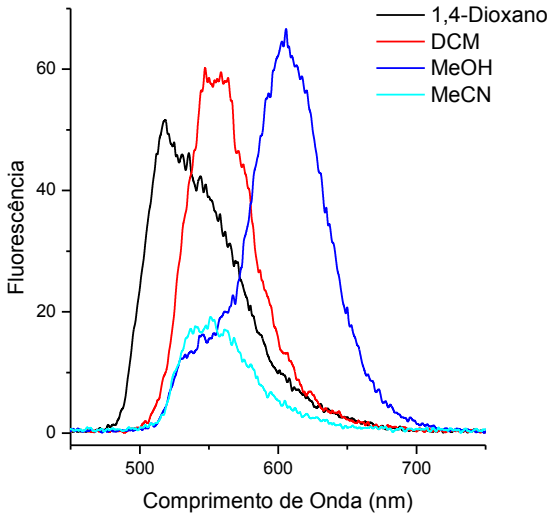


Figura 46. Espectro de emissão de fluorescência na região do Vis-NIR do composto **30** em solução. (λ_{EXC}=500 nm)

4.10. AVALIAÇÃO DOS COMPOSTOS SINTETIZADOS COMO POTENCIAIS MARCADORES CELULARES

Moléculas que apresentam auto absorção de fluorescência minimizada e, consequentemente um grande deslocamento de Stokes, oferecem vantagens nas suas aplicabilidades, em especial em aplicações biológicas.[69,70] Particularmente, a utilização de heptameteno cianinas como marcadores celulares vem ganhando destaque, sobretudo pela

habilidade de preferencial acumulação em células cancerosas. Assim, o desenvolvimento da técnica de bioimageamento celular é um método não invasivo que vem mostrando sua eficácia, principalmente, devido à diferenciação celular, entre células cancerosas e células normais, e também devido à possibilidade de diagnóstico precoce aumentando as chances de sucesso no tratamento de câncer.[39,43,47]

Dessa forma, com o objetivo de avaliar a eficácia dos compostos **1** e **23** como marcadores celulares de células cancerosas, foi realizado um teste em colaboração com a professora Dinara Jaqueline Moura do Laboratório de Genética Toxicológica da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA). O teste foi executado com modelo experimental em células multiformes de glioblastoma T89G *in vitro* e *in vivo*, conforme é apresentado nas **Figuras 47** e **A31**. O composto **23** não apresentou resposta de marcação celular *in vitro* ou *in vivo* (**Figura A31**). Já o composto **1**, mostrou-se eficiente na marcação celular tanto *in vitro,* dentro do período de 24 h, como *in vivo*, não apresentando marcação preferencial em alguma estrutura na célula cancerosa e, sim, apresentando uma distribuição homogênea no citoplasma. Assim, os resultados mostraram-se promissores, especialmente pelo composto **1** não apresentar mudanças significativas de fluorescência no teste realizado *in vitro* dentro do período de incubação de 24 horas. Assim, a partir dos resultados obtidos do teste realizado *in vivo* a molécula mostrou-se promissora principalmente por se tratar do ambiente celular natural do corpo humano.

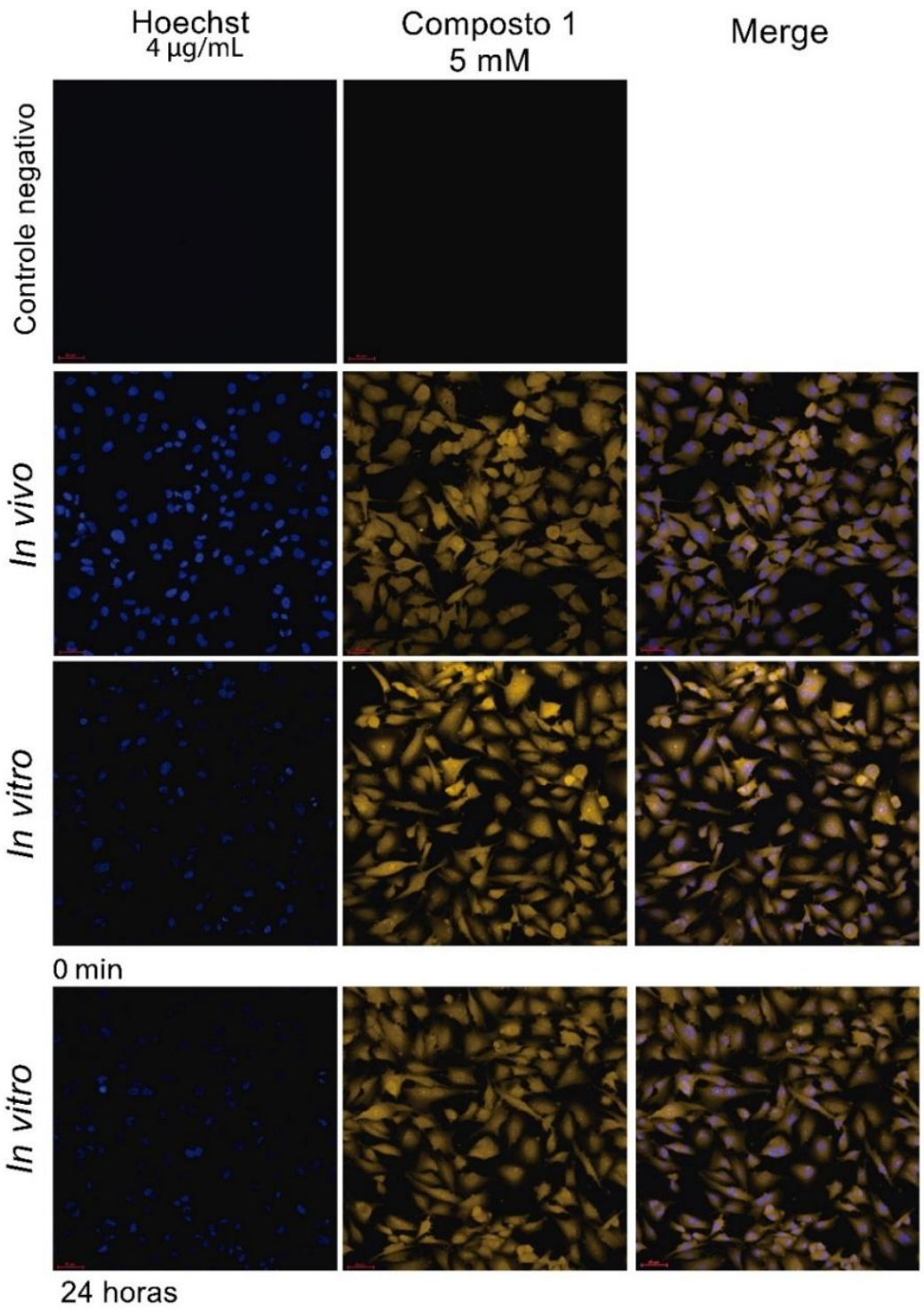


Figura 47. Bioimageamento do composto **1** *in vivo* e *in vitro*.

4. CONCLUSÃO

No presente trabalho, foi estudada a síntese de heptameteno cianinas substituídas na posição meso (compostos **1** e **2**). Os compostos foram obtidos com bons rendimentos, os quais variaram entre 75-78%, e apresentaram comportamento fotofísico na região do UV-Vis, estudado através de espectroscopia de absorção e emissão na região do Vis-NIR em solventes com diferentes polaridades.

A partir do estudo fotofísico, foi possível observar que os compostos não apresentam a formação de agregados H ou J, independentemente da polaridade do solvente ou, ainda, pela indução da formação de agregados pelo meio. É observado que, de forma geral, existe uma tendência solvatocrômica conforme é aumentada a polaridade do solvente, sendo um solvatocromismo positivo e interações específicas com 1,4-dioxano e, ainda, em solventes polares próticos, como em metanol e em etanol, apresentam mudança significativa nos máximos de absorção.

O estudo através da espectroscopia de emissão em solventes com diferentes polaridades mostrou a possível existência de transferência de carga intramolecular no estado excitado. A presença de duas bandas de emissão, uma referente ao estado localmente excitado e a outra referente à transferência de carga intramolecular mostraram-se dependente da polaridade do solvente e devido a isso, foi realizado o estudo Lippert-Mataga. A relação Lippert-Mataga do momento de dipolo no estado fundamental e no estado excitado do composto **2**, manifestou-se, de forma clara, ser maior no estado fundamental. Dessa forma, os compostos foram avaliados para a potencial aplicação como sensores ópticos para a adulteração do etanol com metanol. Tendo em vista a variação dos máximos de absorção na presença de etanol e de metanol (7 nm), os compostos mostraram-se potenciais para a aplicação dos mesmos como corantes marcadores no controle de adulteração.

Além disso, o composto **23** mostrou-se eficiente para identificar os aminoácidos, apresentando perfis das bandas de absorção bastante distintos quando o mesmo se encontra na presença dos diferentes aminoácidos. Em adição, a utilização do composto **1** como marcador celular de células cancerosas mostrou-se satisfatória tanto para testes *in vitro* como *in vivo*, não apresentando nenhuma marcação preferencial na estrutura celular, mas marcando a célula de forma geral.

5. PERSPECTIVAS

Pretende-se realizar estudos sobre a aplicação do composto **23** como sonda para aminoácidos através da quantificação dos diferentes aminoácidos em solução. Para tal, pretende-se aperfeiçoar os limites de detecção e metodologias de identificação destas espécies em solução. Ainda, para melhor entender o efeito do solvente no comportamento fotofísico do composto **30**, pretende-se investigar mais detalhadamente a sua ciclização induzida por solventes na presença de 1,4-dioxano e acetonitrila, bem como o estudo da possível reversão do processo da ciclização. Pretende-se ainda realizar medidas de emissão de fluorescência resolvidas no tempo para poder quantificar o equilíbrio existente entre as espécies aberta e fechada (spiro).

7. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

7.1. MATERIAIS E MÉTODOS

Para a realização desse trabalho foram utilizados os seguintes reagentes: indol, iodometano, iodobutano, cloreto de fosforila, etil-ciclohexanona, anilina, pirrolidina, trietilamina. Os solventes utilizados foram 1,4-dioxano, acetato de etila, acetonitrila, ácido clorídrico, diclorometano, dimetilformamida, etanol, hexano, metanol, tolueno. Para purificação por cromatografia em coluna foi utilizado Sílica gel 60 (70-230 mesh) como fase estacionária. A cromatografia em camada delgada (CCD) foi realizada utilizando placas de alumínio com 0,2 mm de sílica gel.

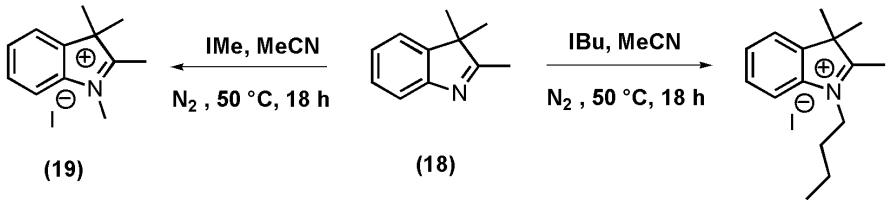
Os espectros de RMN de ^{1}H e ^{13}C foram obtidos de espectrômetros Varian VNMRS operando em frequências de 300 MHz e 400 MHz, 75 MHz e 100 MHz respectivamente, em tubos de 5 mm de diâmetro interno e utilizando clorofórmio ($CDCl_3$) ou dimetilsulfóxido (DMSO-d_6) como solventes. Os deslocamentos químicos (δ) estão relacionados em partes por milhão (ppm) em relação ao tetrametilsilano (TMS) utilizado como padrão interno para os espectros de hidrogênio, ao $CDCl_3$ e ao DMSO-d_6, colocando entre parênteses a multiplicidade (s = singleto, d = dupleto, t = tripleto, dd = duplo dupleto, m = multipleto), o número de hidrogênios deduzido da integral relativa e a constante de acoplamento (J) em Hertz (Hz).

Os espectros no infravermelho por transformada de Fourier (IV) foram obtidos em um espectrômetro Alpha P da Bruker. Os espectros foram obtidos no modo ATR utilizando um cristal de seleneto de zinco (ZnSe).

Os pontos de fusão das moléculas foram obtidos utilizando um microscópio ótico Olympus BX41 acoplado a um forno Mettler Toledo FP-90 F 982 T com temperatura controlada.

As medidas de espectroscopia de absorção na região do UV-Vis foram obtidas em um espectrômetro Shimadzu UV-2450. As medidas de emissão de fluorescência foram obtidas em um espectrofluorímetro Shimadzu RF-5301PC. As medidas de absorção e emissão foram realizadas à temperatura ambiente em cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico e soluções de solventes de grau espectroscópico. Todos os experimentos foram realizados a 25°C utilizando soluções de concentrações entre 10^{-5} - 10^{-6} M.

7.2. ALQUILAÇÃO DE INDÓIS



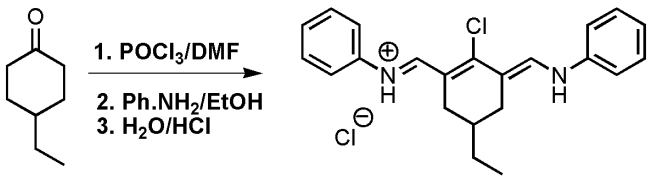
(19) (18) (20)

Em um balão schlenk de fundo redondo foram adicionados 10 mL de acetonitrila, previamente saturada com nitrogênio por 15 min. Então o indol (**18**) (1,9 mmol) foi adicionado sob agitação seguido da adição do haleto de alquila de interesse (5,7 mmol). A reação foi deixada por 18 h sob agitação em atmosfera de nitrogênio e foi conduzida na temperatura de 50 °C. Após o término da reação, o bruto reacional foi vertido em 50 mL de acetato de etila e deixado em agitação e aquecimento por 30 min, decorrido esse tempo o sobrenadante foi removido. Novamente, ao bruto reacional é vertido 30 mL de acetato de etila e deixado em agitação e aquecimento por 30 min e, então, o sobrenadante é removido. Esse processo é repetido por mais uma vez. O sólido (**19-20**) obtido foi filtrado e seco.

Composto 19: Sólido Claro. P.F.: 240°C. Rendimento: 70%. RMN de ^{1}H (DMSO-d_6, 400 MHz): δ (ppm) 7,91 (m, 1H); 7,83 (m, 1H); 7,62 (m, 2H); 3,98 (s, 3H); 2,78 (s, 3H); 1,52 (s, 6H).

Composto 20: Sólido Claro. P.F.: 130-134°C. Rendimento: 70%. RMN de ^{1}H ($CDCl_3$, 400 MHz): δ (ppm) 7,69 (m, 1H); 7,59 (m, 3H); 4,70 (t, 2H, J=8,0 Hz); 3,14 (s, 3H); 1,95 (m, 2H); 1,67 (s, 6H); 1,51 (m, 2H); 1,02 (t, 3H, J=8,0 Hz).

7.3. SÍNTESE DE SAL PENTAMETÍNICO



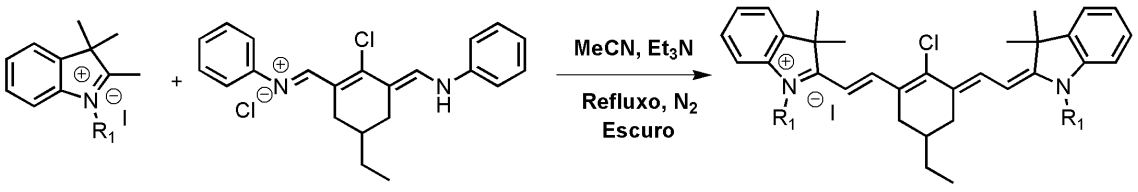
(21) (22)

Em banho de gelo, em um balão de fundo redondo o $POCl_3$ (22 mmol) é adicionado gota a gota em DMF (31 mmol) e deixado sob agitação por 30 min. Decorridos 30 min, a etil-cicloexanona (**21**) (9,6 mmol) foi adicionada e a temperatura foi elevada à 100 °C e foi deixado sob agitação por 2 h. Então a reação foi levada a temperatura ambiente e uma solução anilina/etanol (1:1 (v/v) 6 mL) foi adicionada e a reação foi mantida a temperatura ambiente por 1 h. Após esse período, o bruto reacional foi vertido em uma solução de H_2O gelada e 20 mL HCl (10:1 v/v). A reação foi deixada em repouso em temperatura ambiente por 15 h. Então o sólido

foi filtrado, lavado com H_2O e recristalizado com tolueno. O sólido obtido (**22**) foi filtrado e seco, sendo utilizado para a próxima etapa.

Composto 22: Sólido violeta. P.F.: 214 - 216°C. Rendimento: 60%. RMN de ^1H (DMSO-d_6, 400 MHz): δ (ppm) 11,36 (s, 2H); 8,55 (s, 2H); 7,62 (d, 4H, J=8,0 Hz); 7,47 (t, 4H, J=8,0 Hz); 7,28 (m, 2H); 3,08 (m, 2H); 2,20 (m, 2H); 1,67 (s, 1H); 1,50 (m, 2H); 1,07 (t, 3H, J=8,0 Hz).

7.4. SÍNTESE DE HEPTAMETENO CIANINAS



(19-20) **(22)** **(23-24)**

R_1 = Metil Butil **R_1= Metil Butil**

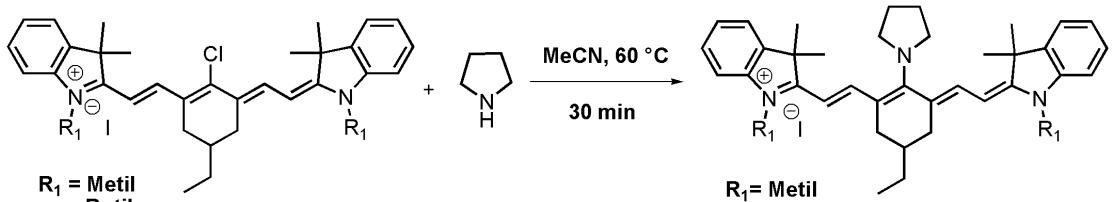
Em um balão âmbar de fundo redondo foi adicionado 20 mL de acetonitrila previamente seca e saturada com N_2 por 15 min. Decorrido este tempo, o sal pentametínico (**22**) (0,5 mmol) foi adicionado, na temperatura de refluxo. Em um segundo balão foi preparada a solução com acetonitrila (5 mL), trietilamina (1,5 mmol) e o respectivo indol (**19-20**) (1,5 mmol), preparado anteriormente, e deixado sob agitação em temperatura ambiente, por 5 min. Na sequência, a solução do segundo balão é vertido no primeiro e então a reação é deixada sob agitação em temperatura de refluxo e atmosfera de nitrogênio por 18 h. A reação foi acompanhada por cromatografia em camada delgada, com eluente diclorometano/metanol (9:1 v/v). Após completada a reação, a acetonitrila foi evaporada em rota evaporador e ao bruto reacional é adicionado 2 mL de metanol para solubilização. Então, o bruto reacional é vertido em uma solução de 100 mL acetato de etila/hexano (1:1) e colocado em banho de ultrassom. Após 12 h o sólido é filtrado. Este processo foi repetido 4 vezes. O sólido obtido (**23-24**) foi filtrado e seco.

Composto 23: Sólido verde. P.F.: 215 - 220°C. Rendimento: 60%. RMN de ^1H ($CDCl_3$, 400 MHz): δ (ppm) 8,38 (d, 2H, J=12,0 Hz); 7,40 (m, 4H); 7,27 (m, 2H); 7,22 (d, 2H, J=8,0 Hz); 6,16 (d, 2H, J=12,0 Hz); 3,75 (s, 6H); 2,92 (dd, 2H, J=16,0; 4,0 Hz); 2,26 (m, 2H); 1,74 (s, 12H); 1,60 (m, 2H); 1,08 (t, 3H, J=8,0 Hz). RMN de ^{13}C ($CDCl_3$, 100 MHz): δ (ppm) 173,0; 150,8; 144,6; 142,7; 140,9; 128,9; 127,1; 125,5; 122,2; 110,9; 101,4; 49,3; 33,7; 32,6; 32,2; 28,2; 28,1; 11,7.

Composto 24: Sólido verde. P.F.: 217 - 224°C. Rendimento: 63%. RMN de ^1H ($CDCl_3$, 400 MHz): δ (ppm) 8,36 (d, 2H, J=12,0 Hz); 7,41 (m, 4H); 7,25 (m, 4 H); 6,19 (d, 2H, J=12,0 Hz); 4,20 (t, 4H, J=8,0 Hz); 2,89 (dd, 2H, J=16,0; 4,0 Hz); 2,25 (m, 2H); 1,86 (m, 5H); 1,73 (s, 12H); 1,60 (m, 2H); 1,51 (m, 4H); 1,05 (m, 9H). RMN de ^{13}C ($CDCl_3$, 100 MHz): δ (ppm) 172,4; 150,5;

144,4; 142,2; 141,0; 128,9; 126,6; 125,4; 122,3; 111,1; 101,1; 49,4; 44,8; 33,7; 32,1; 29,5; 28,2; 20,4; 13,9; 11,8.

7.5. SÍNTESE DAS HEPTAMETENO CIANINAS SUBSTITUÍDAS NA POSIÇÃO MESO



(23-24) (25) (1-2)

Em um balão de fundo redondo, foram adicionados 2 mL de acetonitrila, na temperatura de 60 °C seguida da adição da cianina anteriormente sintetizada (**23-24**) (7,8 x 10^{-2} mmol). Então a pirrolidina (**25**) (24,4 mmol) é adicionada. A reação foi acompanhada por cromatografia em camada delgada com o eluente acetato de etila/diclorometano/metanol (4,5:4,5:1). Após o término, a reação foi levada à secura e o bruto reacional foi purificado por cromatografia em coluna utilizando acetato de etila/diclorometano/metanol (4,5:4,5:1) como eluente. O sólido obtido apresentou rendimento de 75-78%.

Composto 1: Sólido violeta. P.F.: 95-100°C. Rendimento: 78%. FITR: 2910, 1538, 1476, 1195. RMN de ^{1}H (DMSO-d_6, 300 MHz): δ (ppm) 7,37 (d, 2H, J=6,0 Hz); 7,23 (t, 2H, J=9,0 Hz); 7,14 (d, 2H, J=12,0 Hz); 7,01 (d, 2H, J=6,0 Hz); 6,95 (t, 2H, J=9,0 Hz); 5,42 (d, 2H, J=6,0 Hz); 4,02 (m, 4H); 3,31 (s, 6H); 2,78 (d, 2H, J= 15,0 Hz); 2,15 (m, 2H); 1,98 (m, 4H); 1,55 (s, 6H); 1,51 (s, 6H); 1,45 (m, 2H); 1,00 (t, 3H, J=9,0 Hz). RMN de ^{13}C (DMSO-d_6, 75 MHz): δ (ppm) 173,5; 164,3; 144,4; 139,5; 133,9; 128,4; 122,3; 121,6; 108,3; 92,2; 55,5; 46,6; 34,2; 29,6; 28,6; 28,2; 24,2; 12,2. HRMS (ESI-qTOF) m/z: $[M+H]^+$ calculado para $C_{38}H_{48}N_3$: 546.3841; encontrado: 546.3843.

Composto 2: Sólido violeta. P.F.: 114-115°C. Rendimento: 75%. FITR: 2913, 1536,1455, 1180. RMN de ^{1}H (DMSO-d_6, 400 MHz): δ (ppm) 7,37 (d, 2H, J=8,0 Hz), 7,22 (m, 2H), 7,14 (d, 2H, J=12,0 Hz), 7,00 (d, 2H, J=8,0 Hz), 6,95 (t, 2H, J=4,0 Hz), 5,48 (d, 2H, J=12,0 Hz), 4,03 (m, 4H), 3,83 (m, 4H), 2,76 (d, 2H, J=16,0 Hz), 2,15 (m, 2H), 1,99 (m, 4H), 1,63 (m, 5H), 1,55 (s, 6H), 1,51 (s, 6H), 1,43 (m, 2H), 1,35 (m, 4H), 0,98 (t, 3H, J=8,0 Hz), 0,93 (t, 6H, J=8,0 Hz). RMN de ^{13}C (DMSO-d_6, 100 MHz): δ (ppm) 172,9; 171,9; 162,9; 143,4; 139,1; 133,5; 127,9; 121,9; 121,1; 120,4; 107,9; 91,7; 55,1; 46,2; 33,7; 33,5; 29,1; 28,3; 27,9; 27,6; 23,7; 19,6; 13,7; 11,6. HRMS (ESI-qTOF) m/z: $[M+H]^+$ calculado para $C_{44}H_{60}N_3$: 630.4771; encontrado: 630.4782.

7.6. ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE ALTA RESOLUÇÃO (HRMS)

A espectrometria de massas de alta resolução (HRMS-ESI) foi realizada em um Bruker Modelo Impact II por inserção direta da amostra em uma taxa de gás de 4 $L \cdot min^{-1}$ com as seguintes condições: calibração com Formato de sódio, voltagem do capilar 4500 V. Os espectros foram obtidos para uma razão m/z de 50-1200.

7.7. SONDA PARA AMINOÁCIDOS

Em um balão âmbar de fundo redondo o composto **23** foi solubilizado em dimetilformamida (DMF). Em um segundo balão, 2 equivalentes do aminoácido de interesse (fenilalanina, triptofano, glicina ou prolina) foi solubilizado em DMF, água e, após, foi adicionado trieltilamina, então foram juntadas as duas frações. O teste foi realizado na temperatura de 85 °C e acompanhado por cromatografia em camada delgada com eluente diclorometano/metanol (9:1 v/v), com tempo de duração variando entre 30 min e 4 h, de acordo com o aminoácido utilizado.

7.8. BIOIMAGEAMENTO

7.8.1. CULTURA DE CÉLULAS

As células multiformes de glioblastoma T89G foram adquiridas pela *American Type Culture Collection*® (ATCC). As células foram cultivadas em Dulbecco e modificadas em meio Eagle (Gibco™ DMEM, Life Technology, NY, USA), suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado pelo calor (Gibco™ FBS, Life Technology, NY, USA), penicilina 100 unidades.mL^{-1} e estreptomicina 100 g.mL^{-1}, à 37°C em atmosfera umidificada com 5% de CO_2.

7.8.2. COMPOSTOS FLUORESCENTES

As soluções estoque dos compostos fluorescentes **1** e **23** foram solubilizadas em etanol a 5mM. Todas as soluções foram agitadas em vórtex por 1 min e sonicadas por 30 min.

7.8.3. FLUORESCÊNCIA EM CÉLULAS *IN VITRO*

Para a análise de fluorescência das sondas, as células foram cultivadas em 96 placas de poço e fixadas em paraformaldeído (3,7%), lavadas com PBS, permeabilizadas em Triton X-100 (0,01%). Em seguida, as células foram lavadas com PBS e incubadas com as sondas dos compostos **1** e **23** em concentrações de soluções estoque (30 min, 37°C). Os núcleos foram contrastados com Hoechst (4 µg.mL^{-1} - 10 min). Finalmente as células foram fotografadas no analisador INCell 2200 (GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ, USA).

7.8.4. FLUORESCÊNCIA EM CÉLULAS *IN VIVO*

Para a análise de fluorescência das sondas, as células cultivadas em 96 placas de poço foram lavadas com PBS e incubadas com as sondas dos compostos **1** e **23** em concentrações de solução estoque em concentrações de soluções estoque (30 min, 37°C). Os núcleos foram contrastados com Hoechst (4 $\mu g \cdot mL^{-1}$ - 10 min). Finalmente as células foram fotografadas no analisador INCell 2200 (GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ, USA).

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Mishra, A.; Behera, R. K.; Behera, P. K.; Mishra, B. K.; Behera, G. B. *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 1973.
2. Reichardt, C. *J. Phys. Org. Chem.* **1995**, *8*, 761.
3. Pascal, S.; Haefele, A.; Monnereau, C.; Charaf-Eddin, A.; Jacquemin, D.; Le Guennic, B.; Andraud, C.; Maury, O. *J. Phys. Chem. A* **2014**, *118* (23), 4038.
4. Ikeda, H.; Sakai, T.; Kawasaki, K. *Chem. Phys. Lett.* **1991**, *179* (5), 551.
5. Sun, W.; Guo, S.; Hu, C.; Fan, J.; Peng, X. *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 7768.
6. Puyol, M.; Encinas, C.; Rivera, L.; Miltsov, S.; Alonso, *J. Dyes and Pigments.* **2007**, *73*, 383.
7. Duarte, R. C. *Síntese de novas heptameteno cianinas: estudo e aplicação de suas propriedades fotofisícas e fotoeletroquímicas*. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal do Rio Grande Do Sul, Porto Alegre, **2017**.
8. Yang, X.; Shi, C.; Tong, R.; Qian, W.; Zhau, H. E. et al. *Clin Cancer Res.* **2010**, *16*, 2833.
9. Luo, S.; Tan, X.; Fang, S.; Wang, Y.; Liu, T.; Wang, X.; Yuan, Y.; Sun, H.; Qi, Q.; Shi, C. *Adv. Funct. Mater.* **2016**, *26*, 2826.
10. Yuan, L.; Lin, W.; Zheng, K.; He, L.; Huang, W. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 622.
11. Bouit, P. A.; Aronica, C.; Toupet, L.; Guennic, B. Le; Andraud, C.; Maury, O. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132 (12)*, 4328.
12. Li, Z.; Zhao, P.; Tofighi, S.; Sharma, R.; Ensley, T. R.; Jang, S. H.; Hagan, D. J.; Van Stryland, E. W.; Jen, A. K. Y. *J. Phys. Chem. C* **2016**, *120* (28), 15378.
13. Mishra, A.; Behera, R. K.; Behera, P. K.; Mishra, B. K.; Behera, G. B. *Chem. Rev.* **2000**, *100* (6), 1973.
14. Bricks, J. L.; Kachkovskii, A. D.; Slominskii, Y. L.; Gerasov, A. O.; Popov, S. V. *Dye. Pigment.* **2015**, *121*, 238.
15. Strekowski, L.; Lipowska, M.; Patonay, G. *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 4578.
16. Gragg, J. L. *Synthesis of near-infrared heptamethine cyanine dyes*. 2010, 132 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Georgia State University, Atlanta, **2010**.
17. He, L.; Lin, W.; Xu, Q.; Ren, M.; Wei, H.; Wang, J. *Chem. Sci.* **2015**, *6*, 4530.
18. Valeur, B. *Molecular Fluorescence Principles and Applications*; 3. Ed. Wiley-VCH. **2001**.
19. Reichardt, C. *Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry*; 3. Ed. Wiley-VCH, **2003**.

20. Rouessac, F.; Rouessac, A. *Chemical Analysis: Modern Instrumentation Methods and Techniques*. 2. ed. Inglaterra: Wiley, **2007**.
21. Cowan, D. O.; Drisko, R. L. *Elements of Organic Photochemistry*. 1. Ed. Estados Unidos: Plenum Press, **1976**.
22. Dähne, L.; Reck, G. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 690.
23. Vus, K.; Tarabara, U.; Kurutos, A.; Ryzhova, O.; Gorbenko, G.; Trusova, V.; Gadjev, N.; Deligeorgiev, T. *Mol. BioSyst.* **2017**, *13* (5), 970.
24. Behera, G. B.; Behera, P. K.; Mishra, B. K. *J. Surf. Sci. Technol.* **2007**, *23* (1–2), 1.
25. Chakraborty, S.; Debnath, P.; Dey, D.; Bhattacharjee, D.; Hussain, S. A. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **2014**, *293*, 57.
26. Bricks, J. L.; Slominskii, Y. L.; Panas, I. D.; Demchenko, A. P. *Methods Appl. Fluoresc.* **2018**, *6*, 1.
27. Egorov, VV. *R. Soc. Open Sci.* **2017**, *4*,160550.
28. Würthner, F.; Kaiser, T. E.; Saha-Möller, C. R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 3376.
29. Mishra, A.; Chaterjee, S.; Krishnamoorthy, G. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **2013**, *260*, 50.
30. Lakowicz, J. R. *Principals of Fluorescence Spectroscopy*; 3. Ed. Springer, **2006**.
31. Yoshihara, T.; Druzhinin, S. I.; Zachariasse, K. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 8535.
32. Bhasikuttan, A. C.; Palit, D. K.; Sapre, A. V.; Mittal, J. P. *Chem. Phys. Lett*. **2000**, *316*, 67.
33. Yang, J.; He, Q.; Lin H.; Bai F. *Anal. Sci.* **2001**, *17*, 203.
34. Singh, M. K.; Pal, H.; Bhasikuttan, A. C.; Sapre, A. V. *Photochem. Photobiol.* **1998**, *68*, 32.
35. Nikolai, V. T. *Optical Spectroscopy: Methods and Instrumentations*, Elsevier Science, 1st edn (June 20, **2006**), p.115.
36. Bhasikuttan, A. C.; Palit, D. K.; Sapre, A. V.; Mittal, J. P. *Chem. Phys. Lett.* **2000**, *316*, 67.
37. Lippert, E.; Lüder, W.; Moll, F.; Nägele, W.; Boss, H.; Prigge, H.; Seinbold-Blankenstein, I. *Angew. Chemie.* **1961**, *73*, 695.
38. Grabowski, Z. R.; Rotkiewicz, K. W. *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 3899.
39. Owens, E. A.; Henary, M.; Fakhri, G. E.; Choi, H. S. *Acc. Chem. Res.* **2016**, *49*, 1731.
40. Becker, A.; Hessenius, C.; Licha, K.; Ebert, B.; Sukowski, U.; Semmler, W.; Wiedenmann, B.; Grötzinger, C. *Nature Biotech.* **2001**, *19*, 327.

41. Rao, J., Dragulescu-Andrasi, A., Yao, H. *Curr Opin Biotechnol.* **2007**, *18* (1), 17.
42. Yoshino, F.; Amano, T.; Zou, Y.; Xu, J.; Kimura, F.; Furusho, Y.; Chano, T.; Murakami, T.; Zhao, L.; Komatsu, N. *Small* **2019**, 1901930.
43. Thomas, R. G.; Jeong, Y. Y. *Chonnam Med. J.* **2017**, *53*, 83.
44. Zhang, C.; Liu, T.; Su, Y.; Luo, S.; Zhu, Y.; Tan, X.; Fan, S.; Zhang, L.; Zhou, Y.; Cheng, T.; Shi, C. *Biomaterials* **2010**, *31*, 6612.
45. Guan, Y.; Zhang, Y.; Xiao, L.; Li, J.; Wang, J.; Chordia, M. D.; Liu, Z.; Chung, L. W. K.; Yue, W.; Pan, D. *Mol. Pharmaceutics* **2017**, *14*, 1.
46. Zhang, X.; He, N.; Huang, Y.; Yu, F.; Li, B.; Lv. C.; Chen, L. *Sensors & Actuators: B. Chemical* **2019**, *282*, 69.
47. Pan, G.; Jia, H.; Zhu, Y.; Sun, W.; Cheng, X.; Wu, F. *ACS Appl. Nano Mater.* **2018**, *1*, 2885.
48. Shi, Q. Q.; Sun, R.; Ge, F. J.; Xu, Q. F.; Li, N. J.; Lu, J. M. *Dyes Pigm.* **2012**, *93*, 1506.
49. Menéndez, G. O.; Eva Pichel, M.; Spagnuolo, C. C.; Jares-Erijman, E. A. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2013**, *12* (2), 236.
50. Fernando, N. T. *Novel near-infrared cyanine dyes for fluorescence imaging in biological systems*. Chemistry Dissertations, Georgia State University, Atlanta, **2011**.
51. Turro, N. J.; Scaiano, J. C.; Ramamurthy, V. *Principles of Molecular Photochemistry: An Introduction*, University Science Book, First Edition, University Science Books, **2008**.
52. Eisfeld, A.; Briggs, J. S. *Chem. Phys. Lett.* **2007**, *446*, 354.
53. Pronkin, P. G.; Tatikolov, A. L. *Spectrochim. Acta A* **2018**, *202*, 269.
54. Smallwood, I. M. *Handbook of organic solvent properties.* First Edition. London: ARNOLD, **1996**.
55. Peng, X.; Song, F.; Lu, E.; Wang, Y.; Zhou, W.; Fan, J.; Gao, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 4170.
56. Bertolino, C. A.; Caputo, G.; Barolo, C.; Viscardi, G.; Coluccia, S. *J. Fluoresc.* **2006**, 221.
57. Talikolov, A. S.; Panova, I. G. *High Energy Chem.* **2014**, *48*, 87.
58. Saleh, M. I.; Panas, I. D.; Frenzel, F.; Würth, C.; Rühle, B.; Slominskii, Y. L.; Demchenko, A.; Resch-Genger, U. *Methods Appl. Fluoresc.* **2019**, *7*, 014003.
59. Gayton, J.; Autry, S. A.; Meador, W.; Parkin, S. R.; Hill, G. A. Jr.; Hammer, N. I.; Delcamp, J. H. *J. Org. Chem.* **2019**, *84*, 687.

60. Abdelbar, M. F.; El-Sheshtawy, H. S.; Shoueir, K. R.; El- Mehasseb, I.; Ebeid, E. M.; El-Kemary, M. *RSC Adv.* **2018**, *8*, 24617.
61. Rosch, U.; Yao, S.; Wortmann, R.; Wurthner, F. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 7026.
62. Zhang, Z.; Achilefu, S. *Org. Lett.* **2004**, *6* (12), 2067.
63. Dahiya P.; Choudhury S. D.; Maity D.K.; Mukherjee T.; Pal H. *Spectrochim. Acta Part A*, **2008**, *69*, 134.
64. Trindade, M. A. G.; Stradiotto, N. R; Zanoni, M. V. B. *Química Nova* **2011**, *34* (10), 1683.
65. Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis; Resolução ANP nº 696 de 31 de agosto de 2017, disponível em www.anp.gov.br, http://www.anp.gov.br/biocombustiveis/etanol. Acessado em novembro de 2019.
66. BVS Atenção Primária em Saúde. O que é fenilcetonúria? Disponível em: https://aps.bvs.br/aps/o-que-e-fenilcetonuria/. Acessado em novembro de 2019.
67. He, L.; Lin, W.; Xu, Q.; Ren, M.; Wei, H.; Wang, J. *Chem. Sci.* **2015**, *6*, 4530.
68. Peretz, R. P.; Muszkat, K. A. *J. Phys. Chem.* **1979**, *83*, 350.
69. Lavis, L. D.; Raines, R. T. *ACS Chem. Biol.* **2008**, *3*, 142.
70. Lavis, L. D.; Raines, R. T. *ACS Chem. Biol.* **2014**, *9*, 855.

ANEXOS

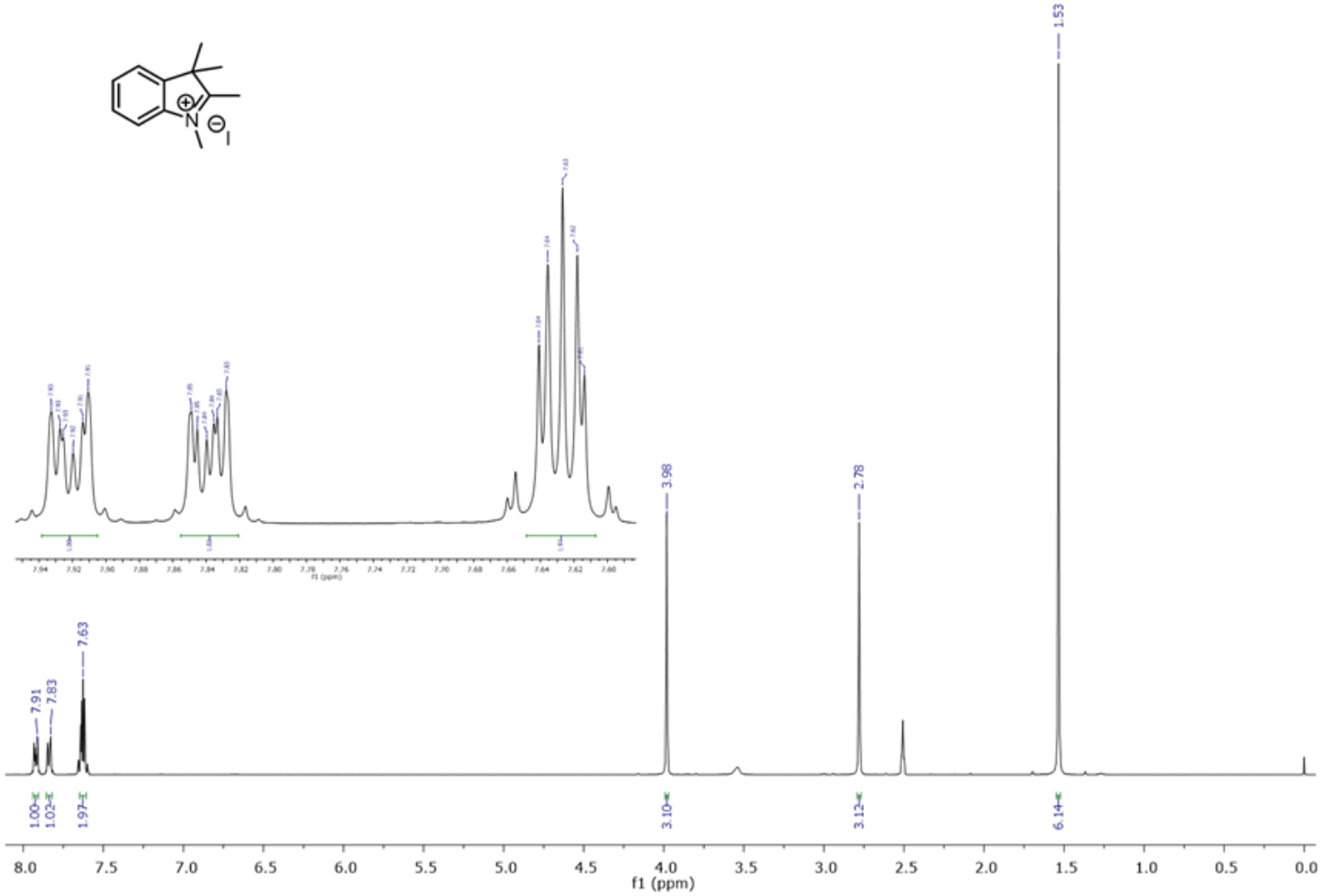


Figura A1. Espectro de RMN de ^{1}H do composto **19** em DMSO-d_6 (400 MHz).

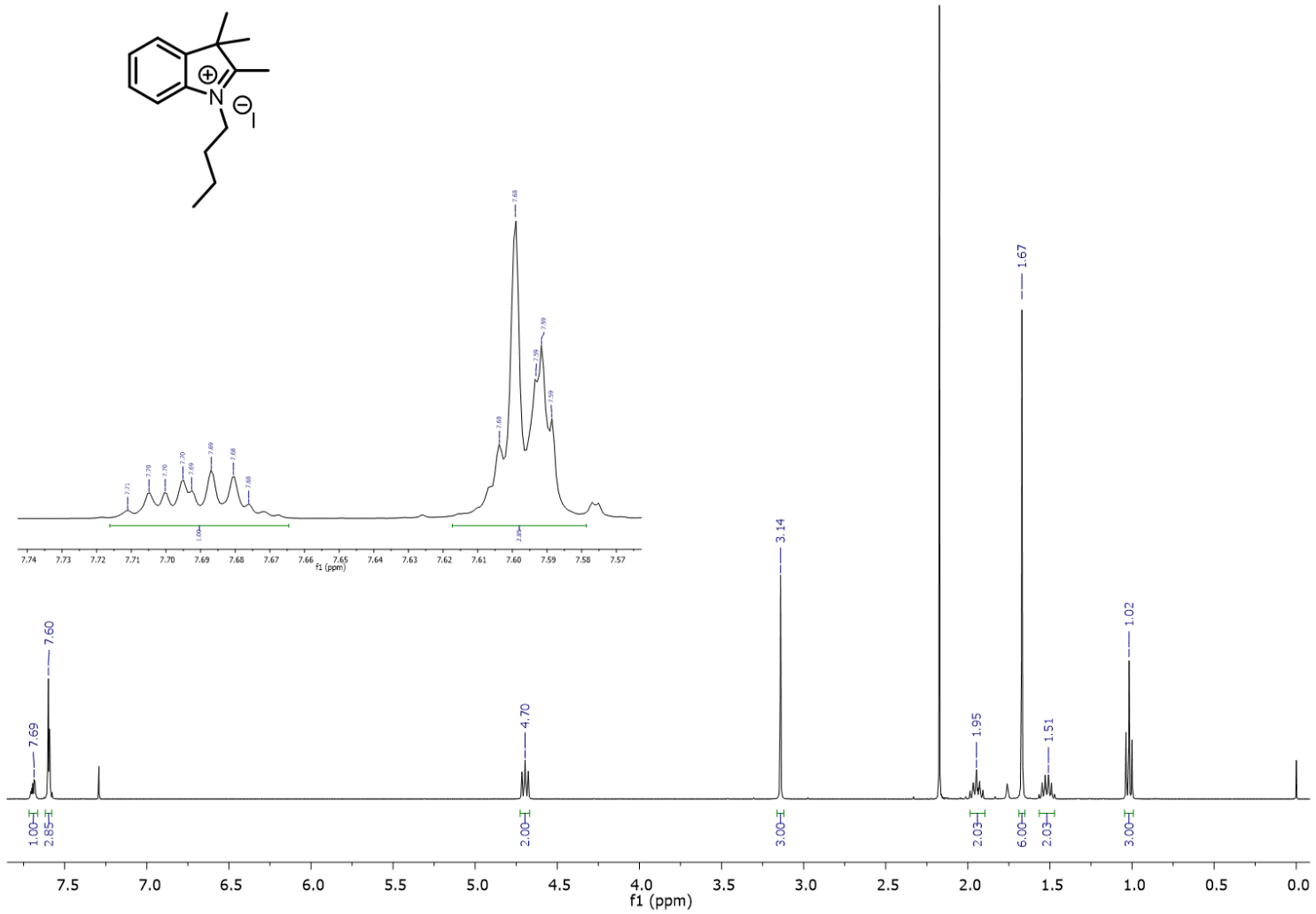


Figura A2. Espectro de RMN de ^{1}H do composto **20** em $CDCl_3$ (400 MHz).

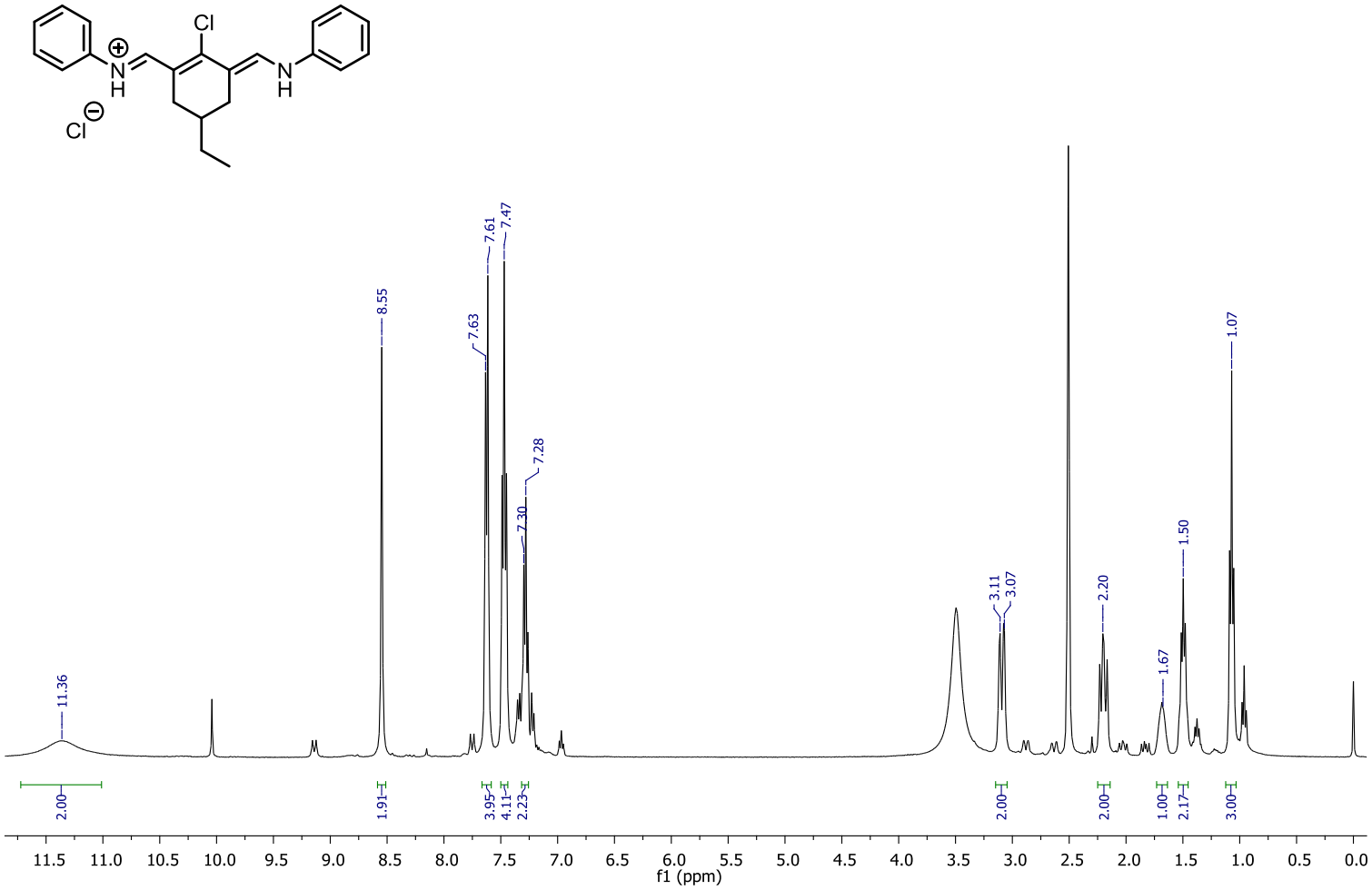


Figura A3. Espectro de RMN de ^{1}H do composto **22** em DMSO-d_6 (400 MHz).

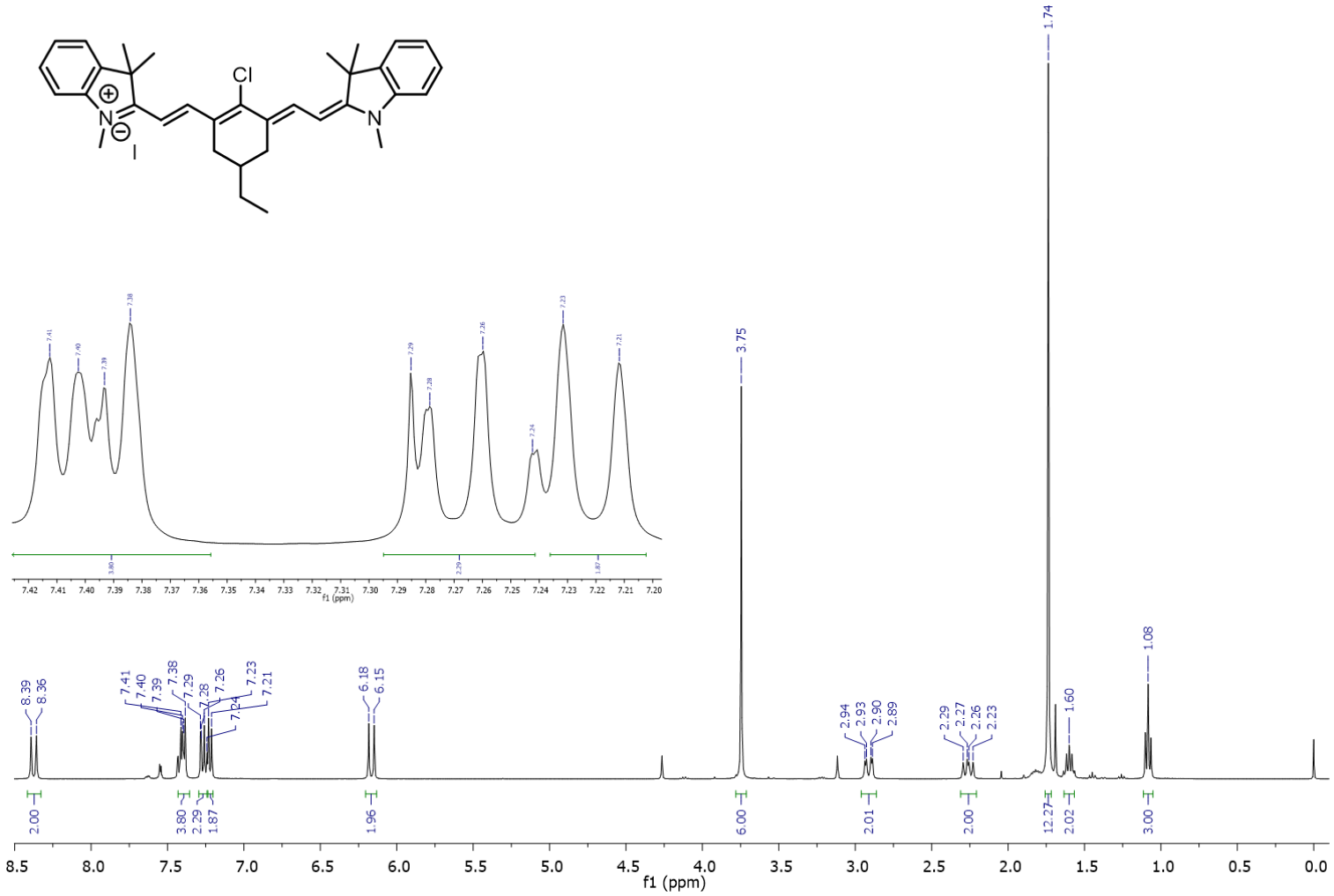


Figura A4. Espectro de RMN de ^{1}H do composto **23** em $CDCl_3$ (400 MHz).

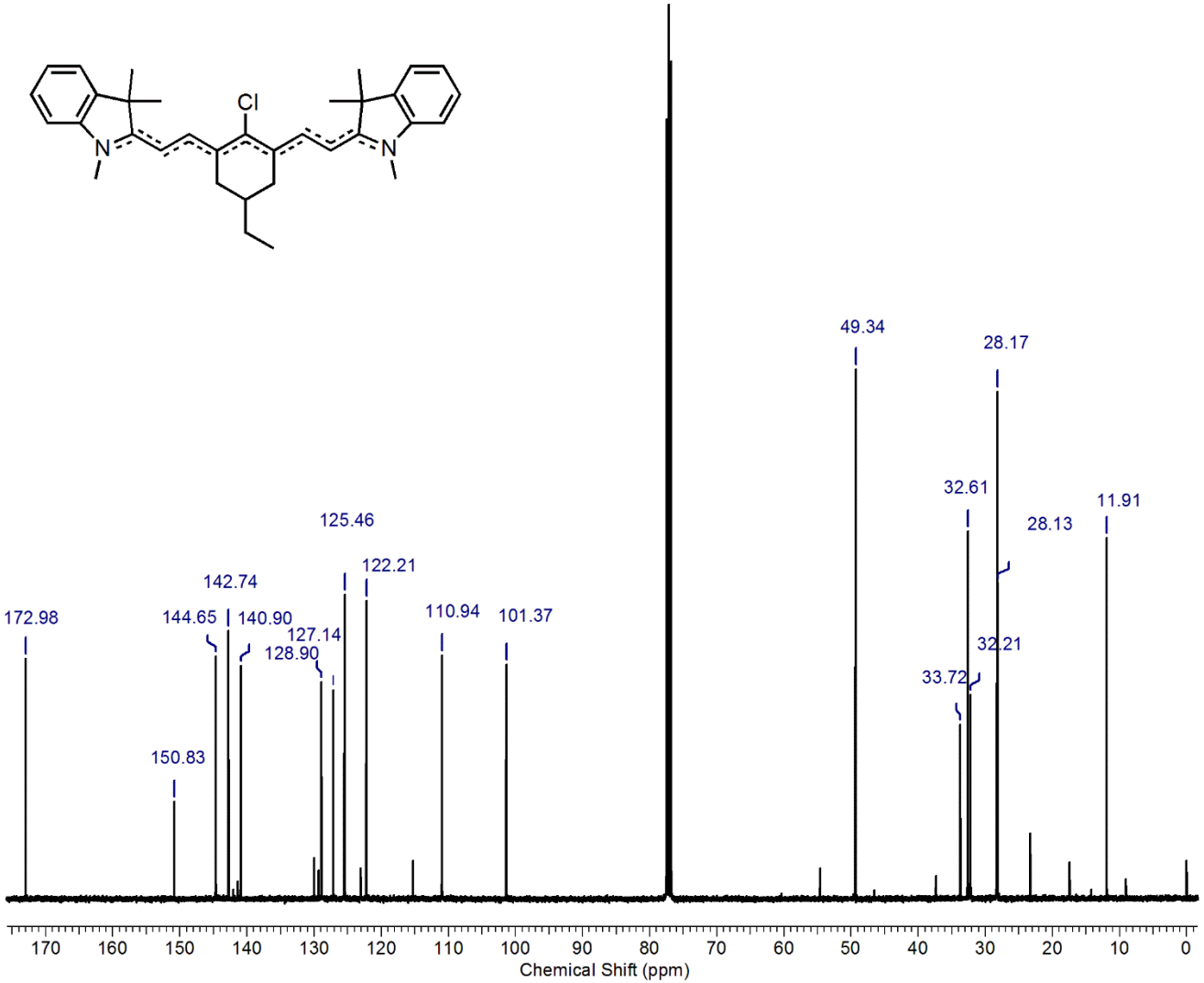


Figura A5. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **23** em $CDCl_3$ (100 MHz).

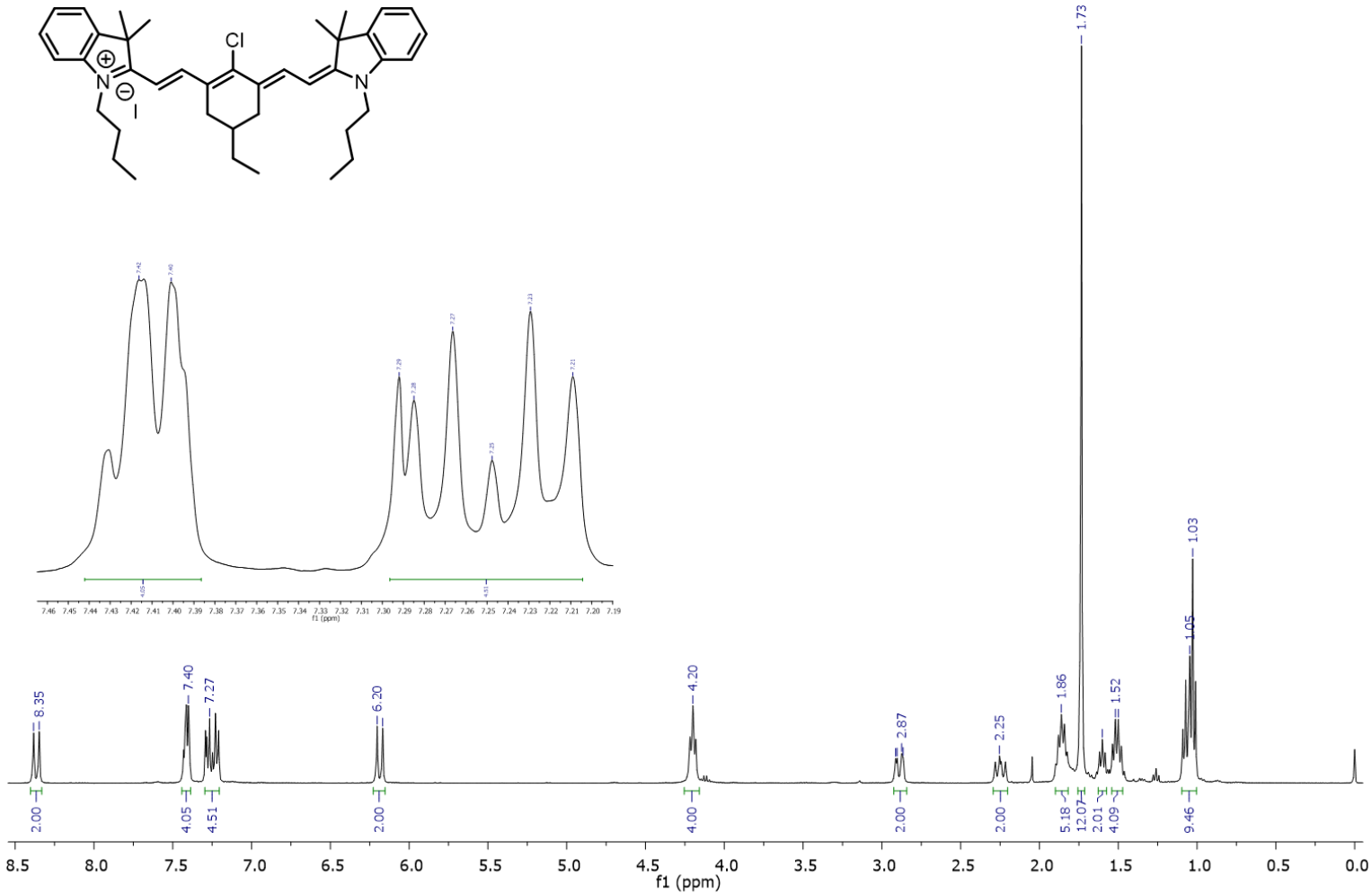


Figura A6. Espectro de RMN de ^{1}H do composto **24** em $CDCl_3$ (400 MHz).

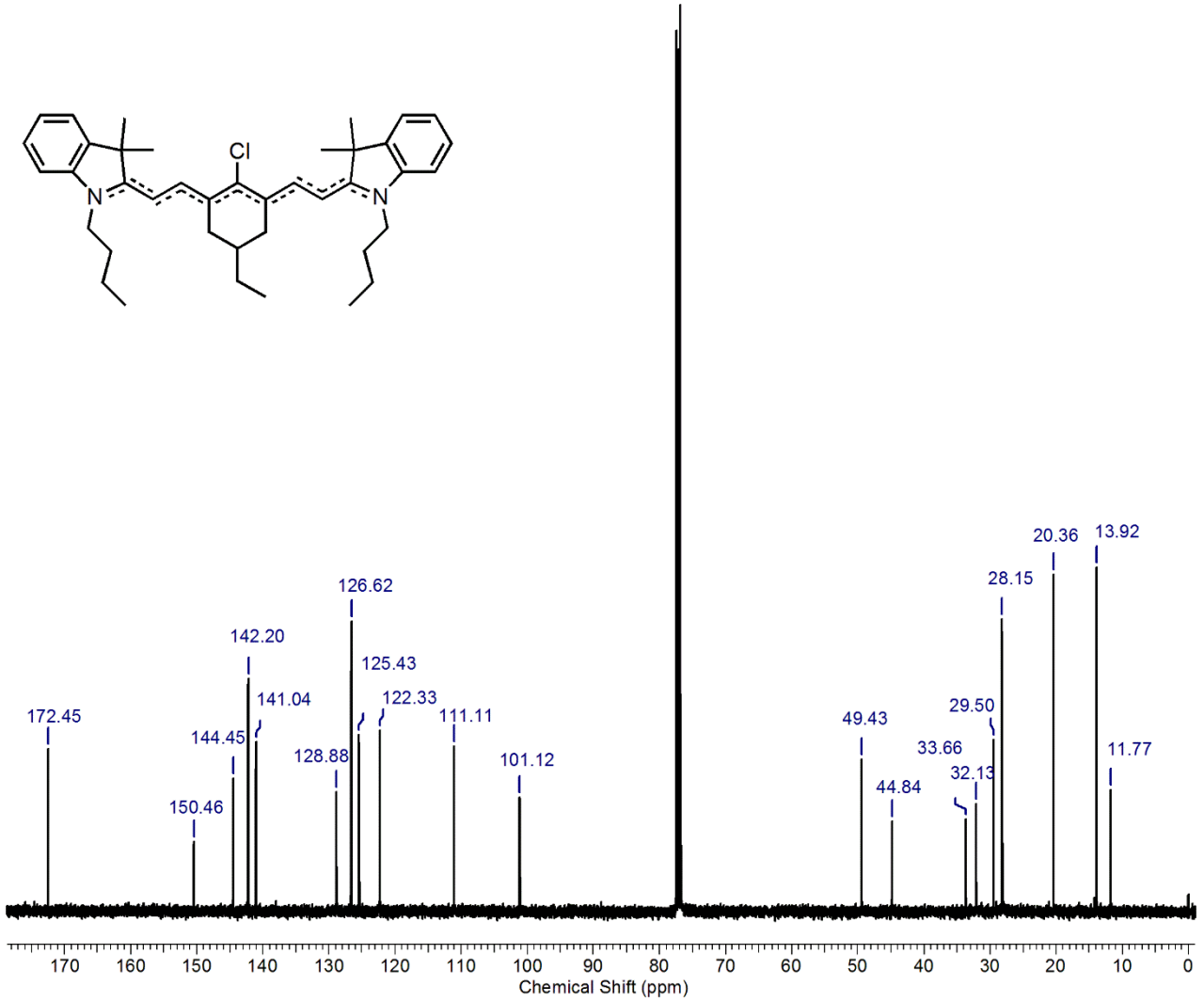


Figura A7. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **24** em $CDCl_3$ (100 MHz).

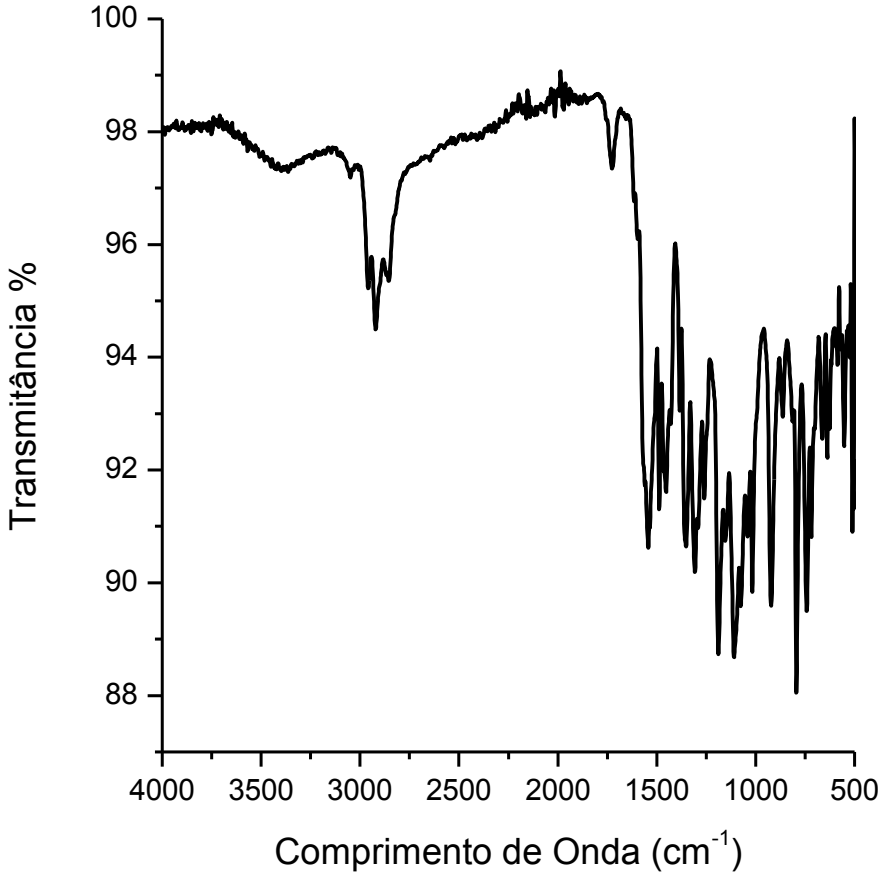


Figura A8. Espectro de infravermelho (Modo ATR) do composto **1**.

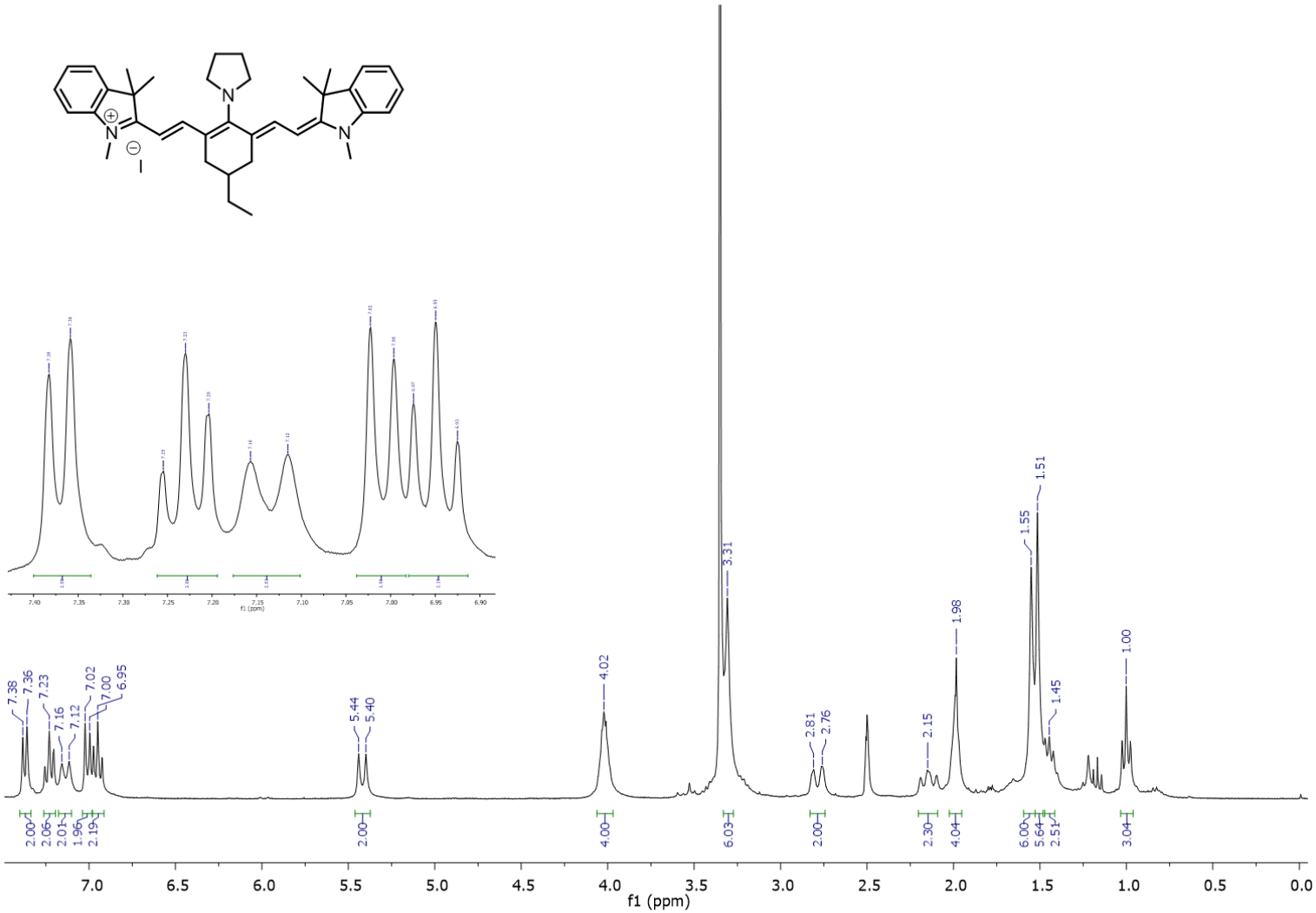


Figura A9. Espectro de RMN de ^{1}H do composto **1** em DMSO-d_6 (300 MHz).

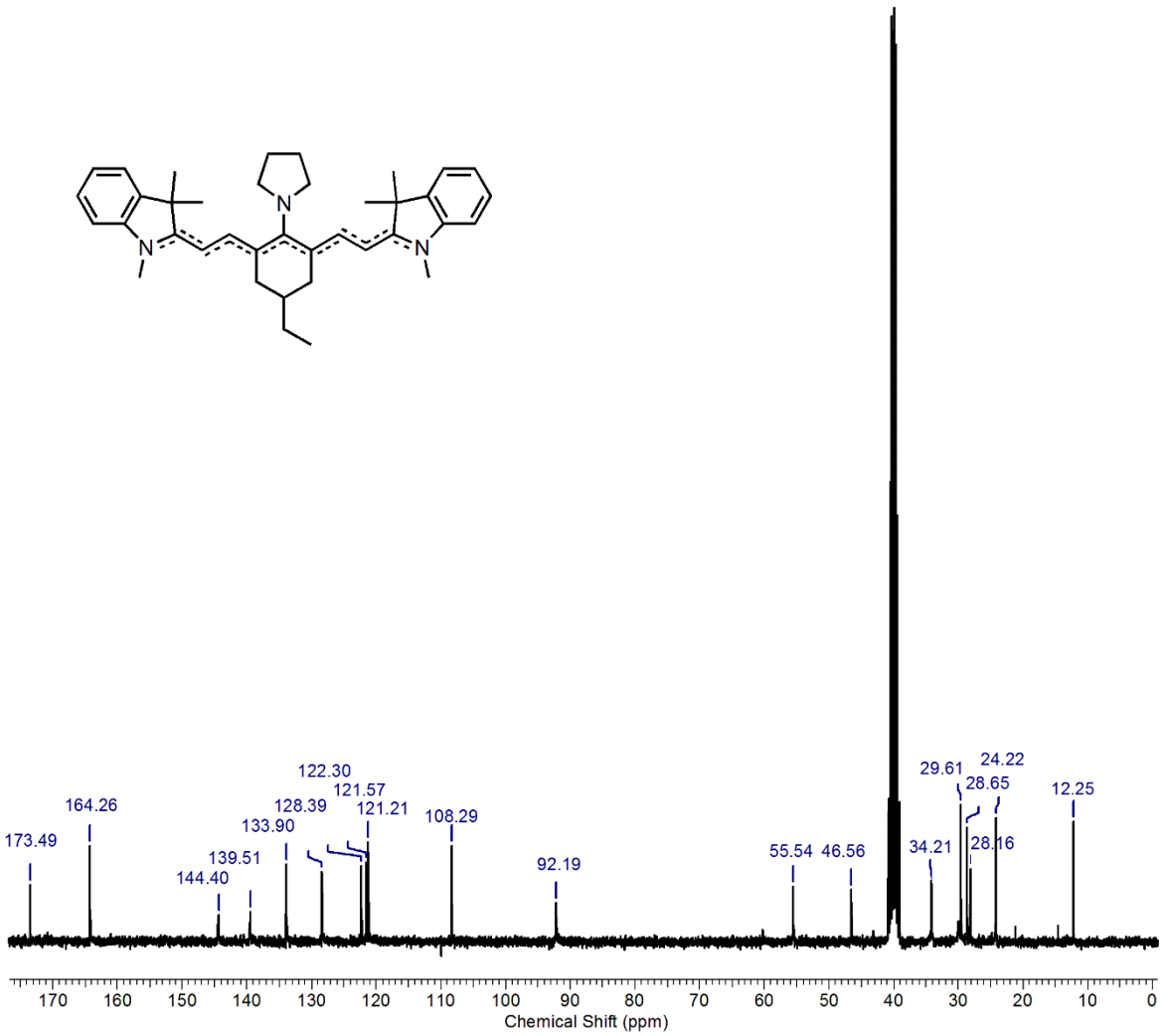
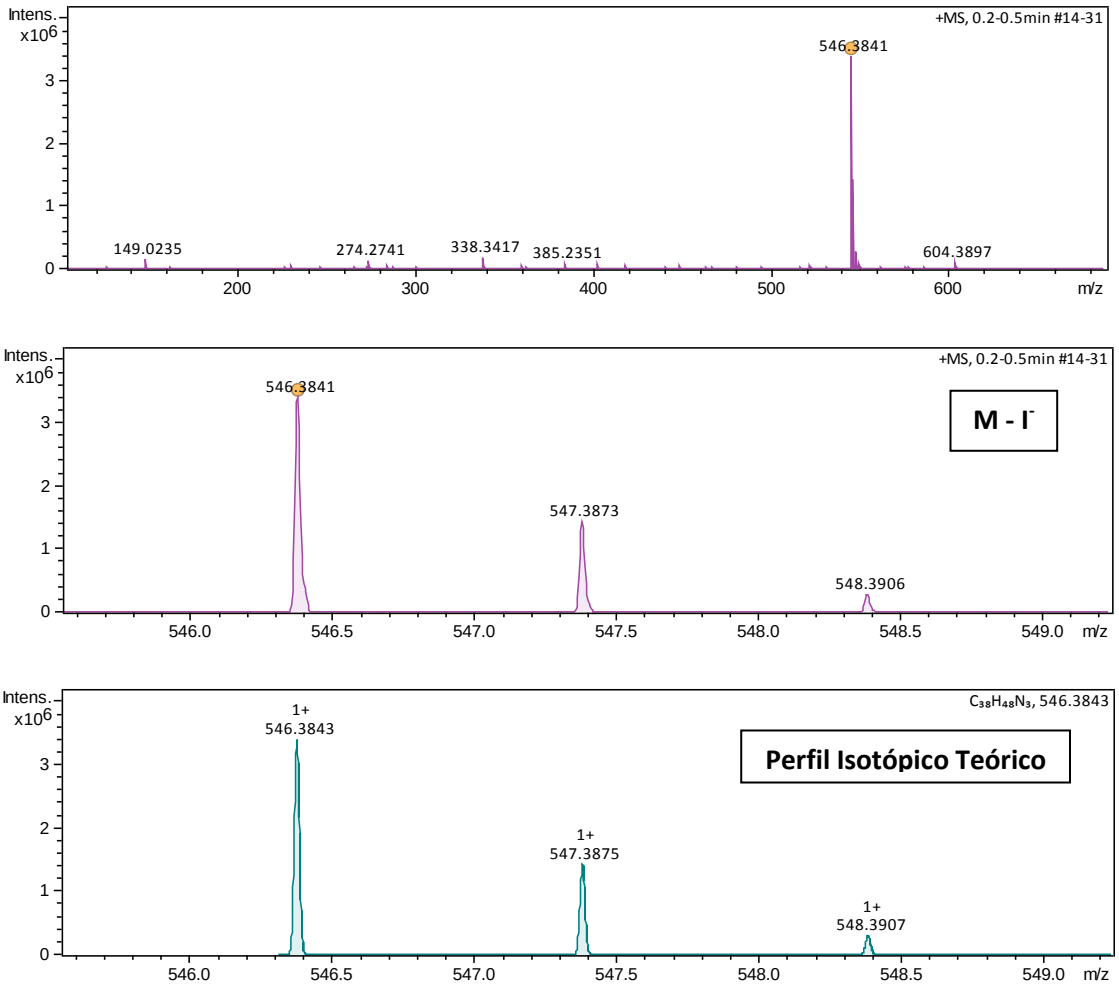


Figura A10. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **1** em DMSO-d_6 (75 MHz).



Meas. m/z	Ion Formula	m/z	err [ppm]	mSigma	rdb	e¯ Conf	N-Rule
546,3841	C38H48N3	546,3843	0.3	2.2	16.5	even	ok

Figura A11. Espectro de HRMS do composto **1**.

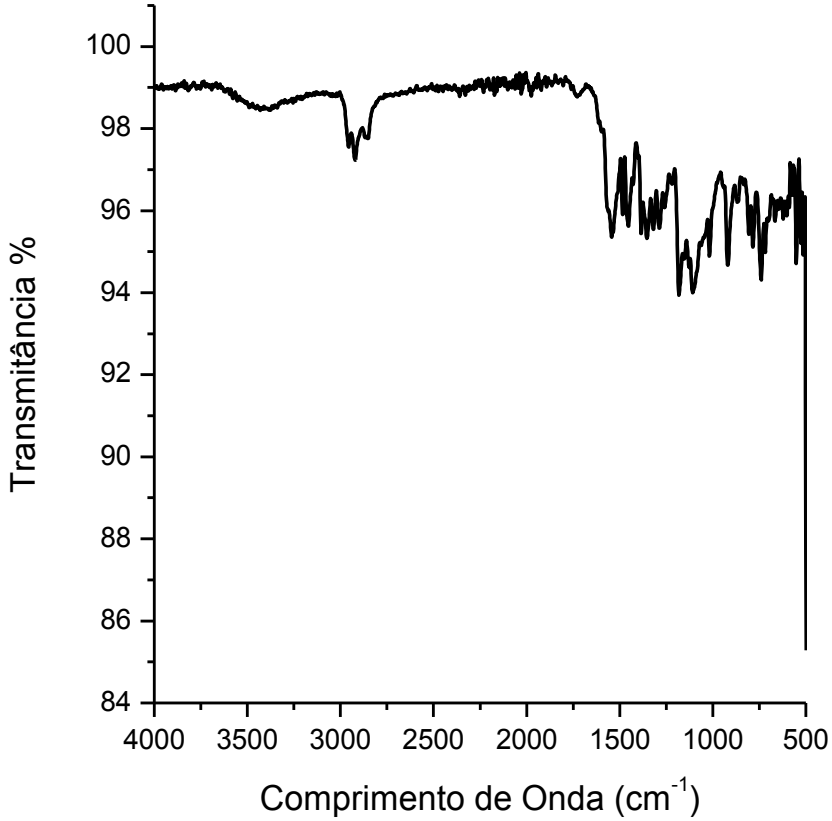


Figura A12. Espectro de infravermelho (Modo ATR) do composto **2**.

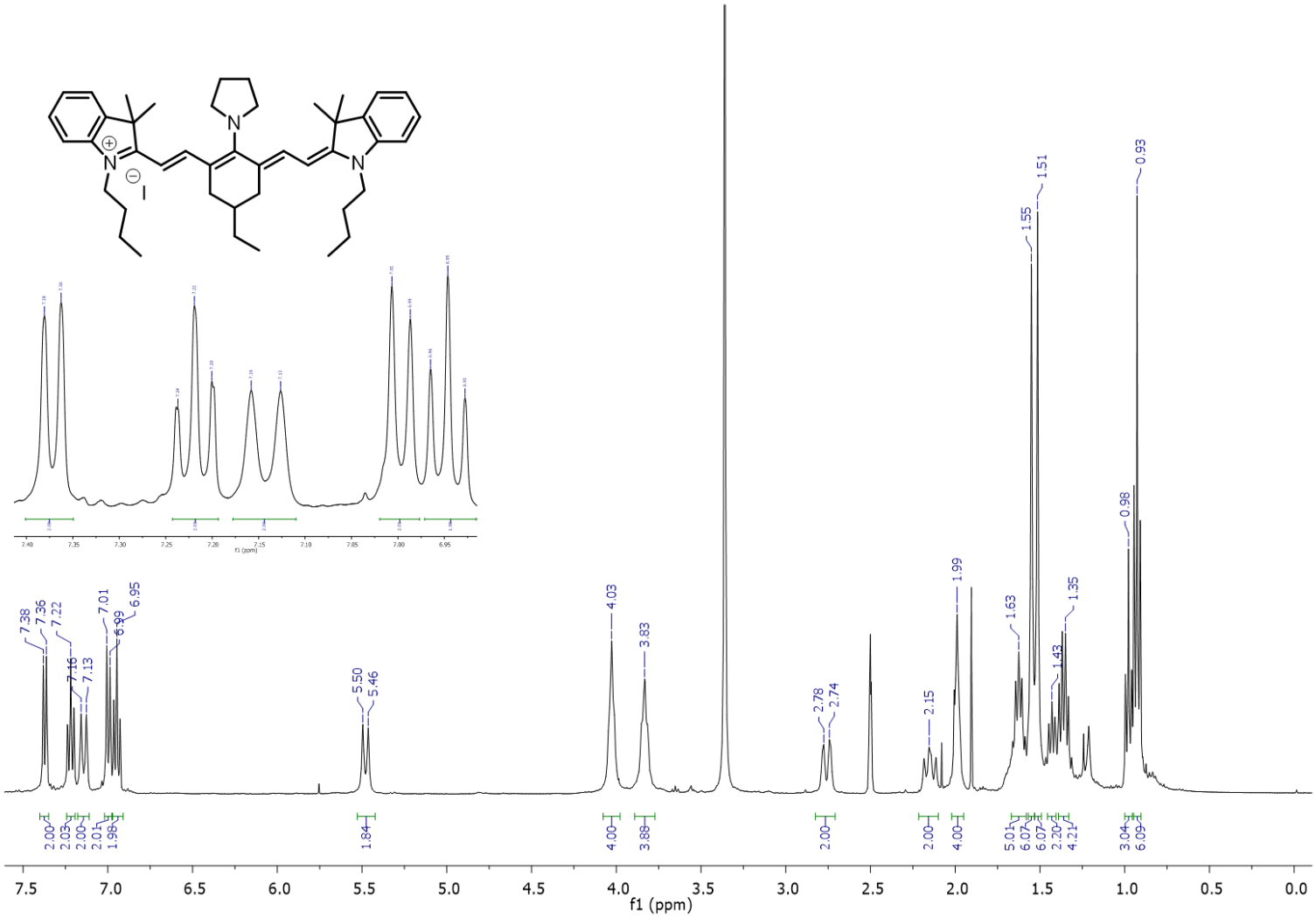


Figura A13. Espectro de RMN de ^{1}H do composto **2** em DMSO-d_6 (400 MHz).

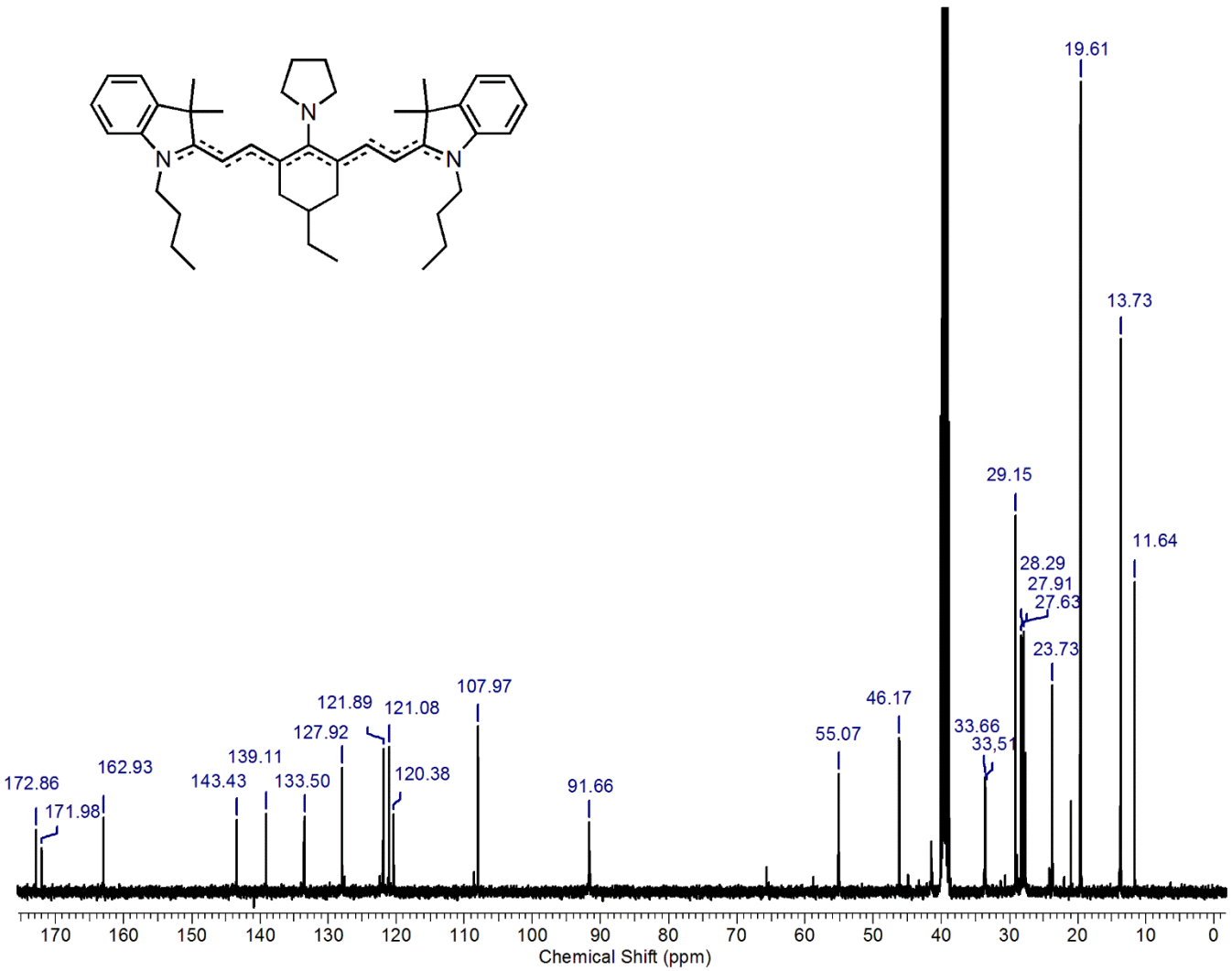


Figura A14. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **2** em DMSO-d_6 (100 MHz).

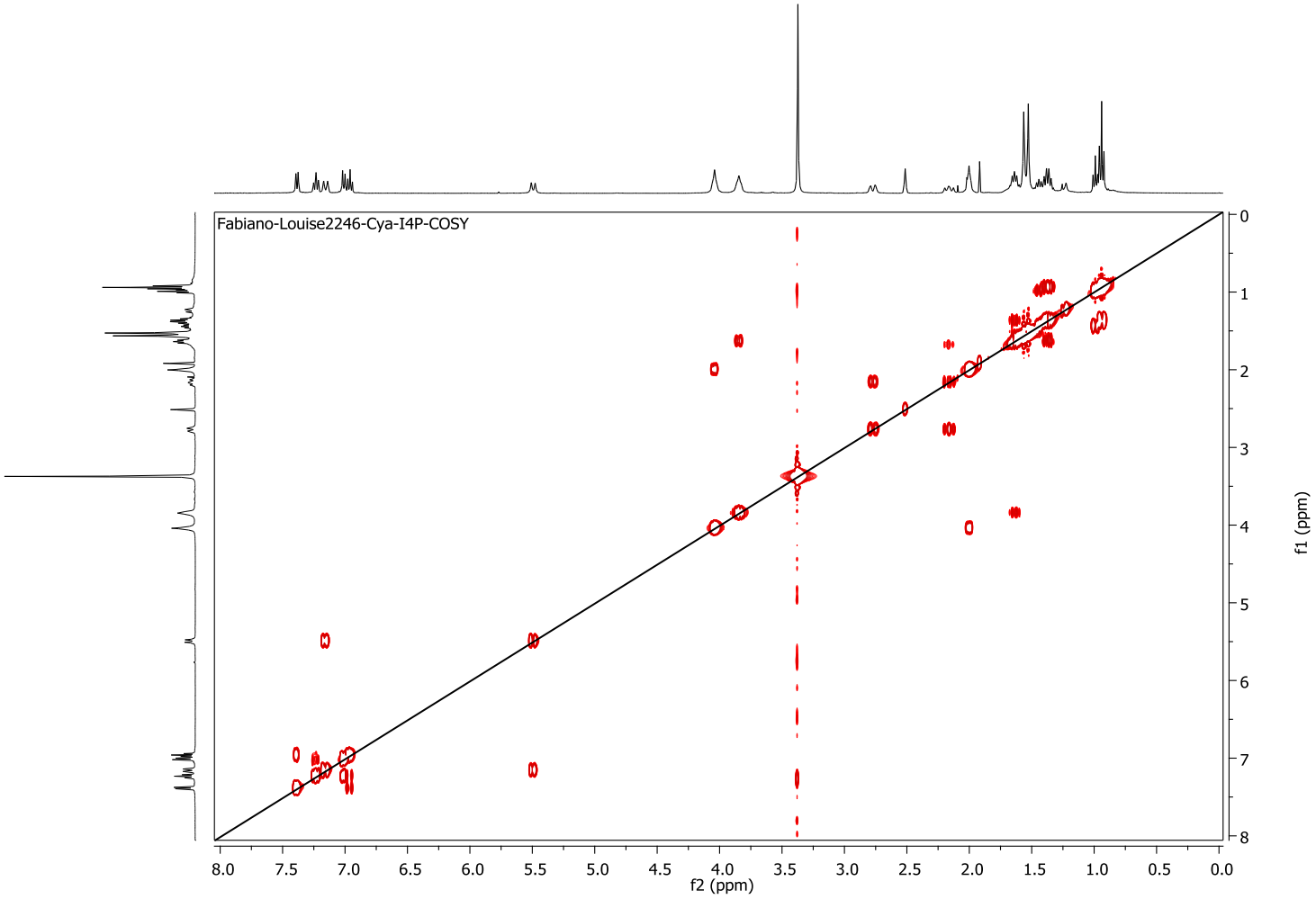
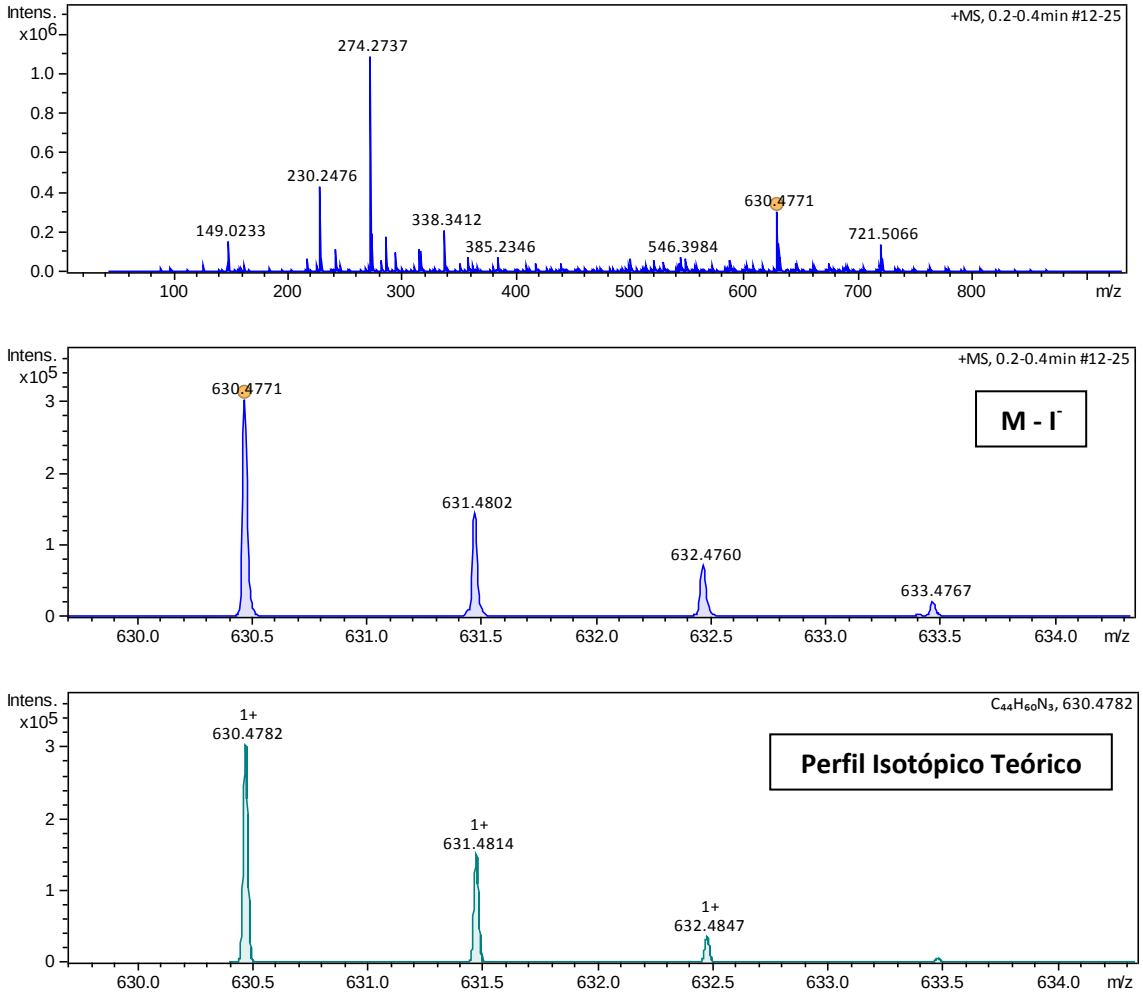


Figura A15. Espectro de RMN COSY do composto **2** em DMSO-d_6.



Meas. m/z	Ion Formula	m/z	err [ppm]	mSigma	rdb	e⁻ Conf	N-Rule
630,4771	C44H60N3	630,4782	1.8	60.5	16.5	even	ok

Figura A16. Espectro de HRMS do composto **2**.

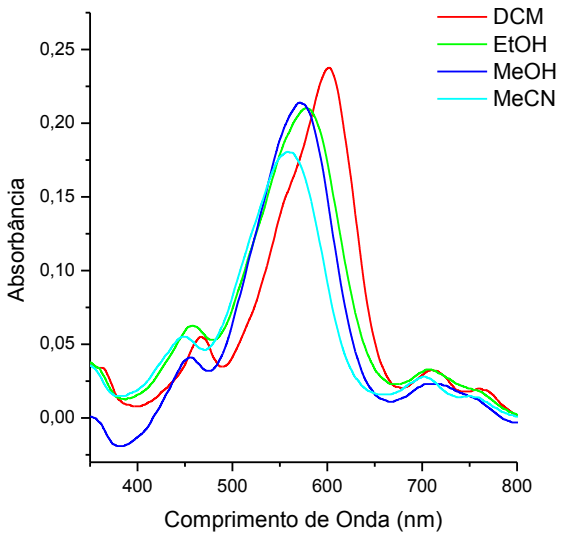


Figura A17. Espectro de absorção de UV na região do Vis-NIR do composto **1**.

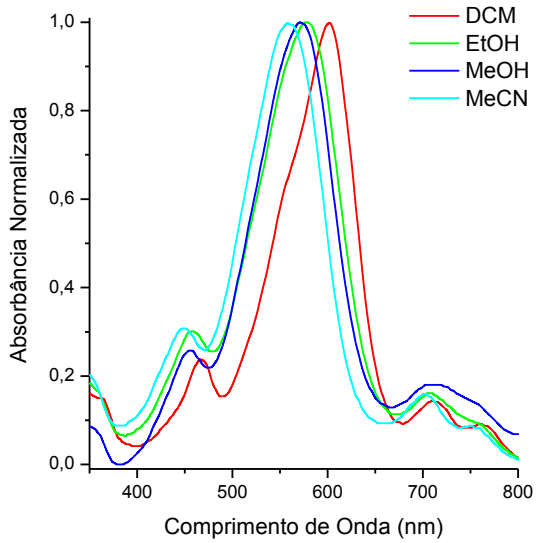


Figura A18. Espectro de absorção normalizado de UV da região do Vis-NIR do composto **1**.

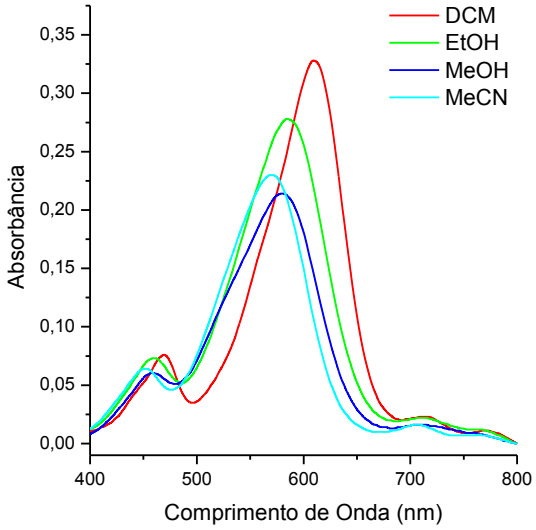


Figura A19. Espectro de absorção de UV na região do Vis-NIR do composto **2**.

Tabela A1. Dados fotofísicos dos compostos **1** e **2** em solução, onde λ_{ABS} é o comprimento de onda de absorção, dados em nanômetros (nm), ε é o coeficiente de absortividade molar (10^4 x $M^{-1} \cdot cm^{-1}$), f_e é a força de oscilador, k_e^0 é a constante de taxa radioativa (10^8 s^{-1}), τ^0 é o tempo de vida útil radioativa (ns).

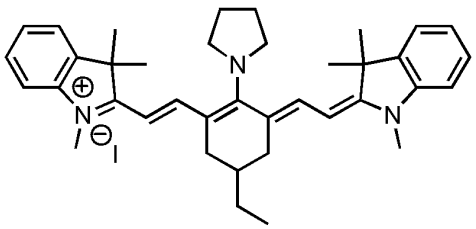
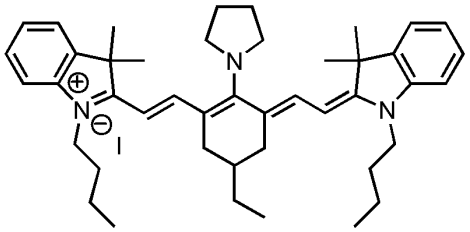
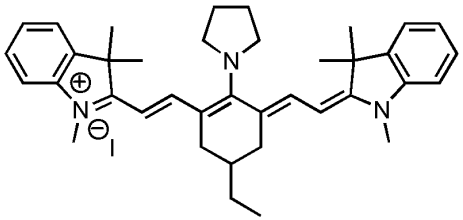
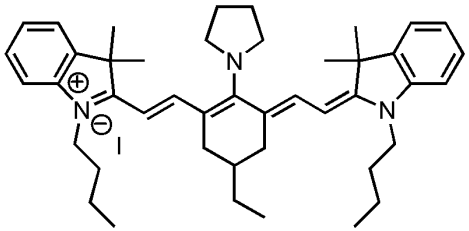
Composto	Solvente	λ_{ABS}	ε	f_e	k_e^0	τ^0
 **(1)**	Diclorometano	468	1.10	0.108	0.49	2.021
	Etanol	459	1.25	0.165	0.78	1.280
	Metanol	457	0.82	0.099	0.47	2.107
	Acetonitrila	450	1.10	0.152	0.75	1.328
 **(2)**	Diclorometano	470	1.50	0.203	0.92	1.087
	Etanol	461	1.46	0.169	0.80	1.255
	Metanol	457	1.21	0.189	0.90	1.105
	Acetonitrila	452	1.28	0.189	0.92	1.081

Tabela A2. Dados fotofísicos dos compostos **1** e **2** em solução, onde λ_{ABS} é o comprimento de onda de absorção, dados em nanômetros (nm), ε é o coeficiente de absortividade molar (10^3 x $M^{-1} \cdot cm^{-1}$), f_e é a força de oscilador, k_e^0 é a constante de taxa radioativa (10^6 s^{-1}), τ^0 é o tempo de vida útil radioativa (ns).

Composto	Solvente	λ_{ABS}	ε	f_e	k_e^0	τ^0
 (1)	Diclorometano	712	6.44	0.043	8.49	11.785
	Etanol	708	6.52	0.047	9.36	10.685
	Metanol	703	4.66	0.031	6.29	15.906
	Acetonitrila	712	5.45	0.035	6.89	14.513
 (2)	Diclorometano	715	4.68	0.032	6.26	15.965
	Etanol	714	4.35	0.034	6.71	14.902
	Metanol	713	3.38	0.027	5.23	19.136
	Acetonitrila	708	3.14	0.021	4.17	23.974

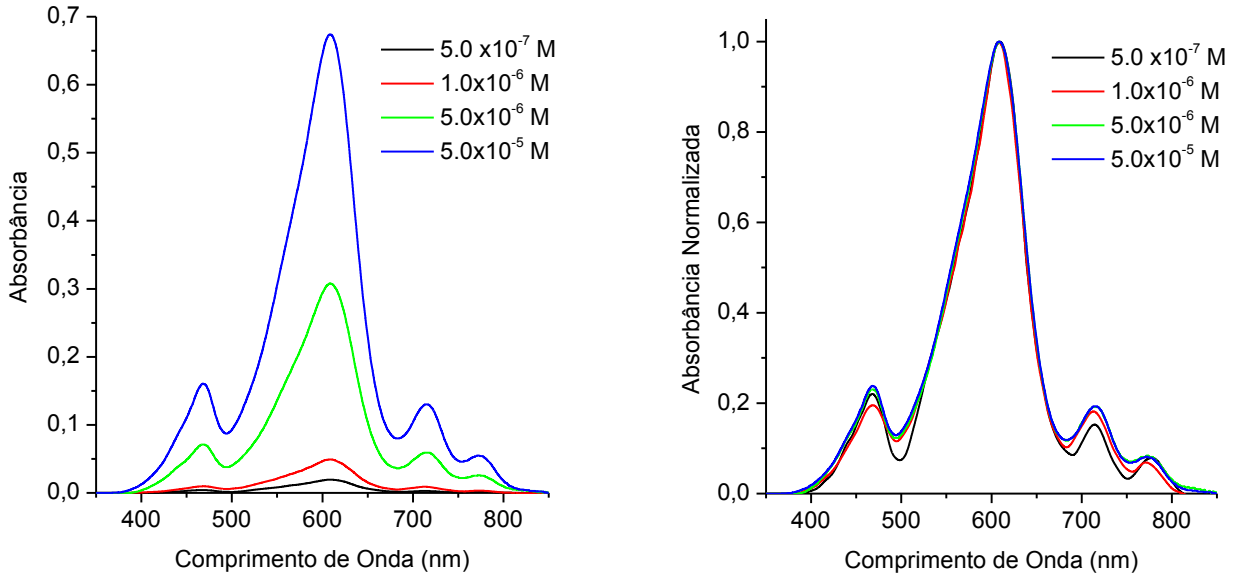


Figura A20. Espectro de absorção de UV na região do Vis-NIR do composto **2** em função da variação da concentração da solução em diclorometano (esquerda) e seu respectivo espectro normalizado (direita).

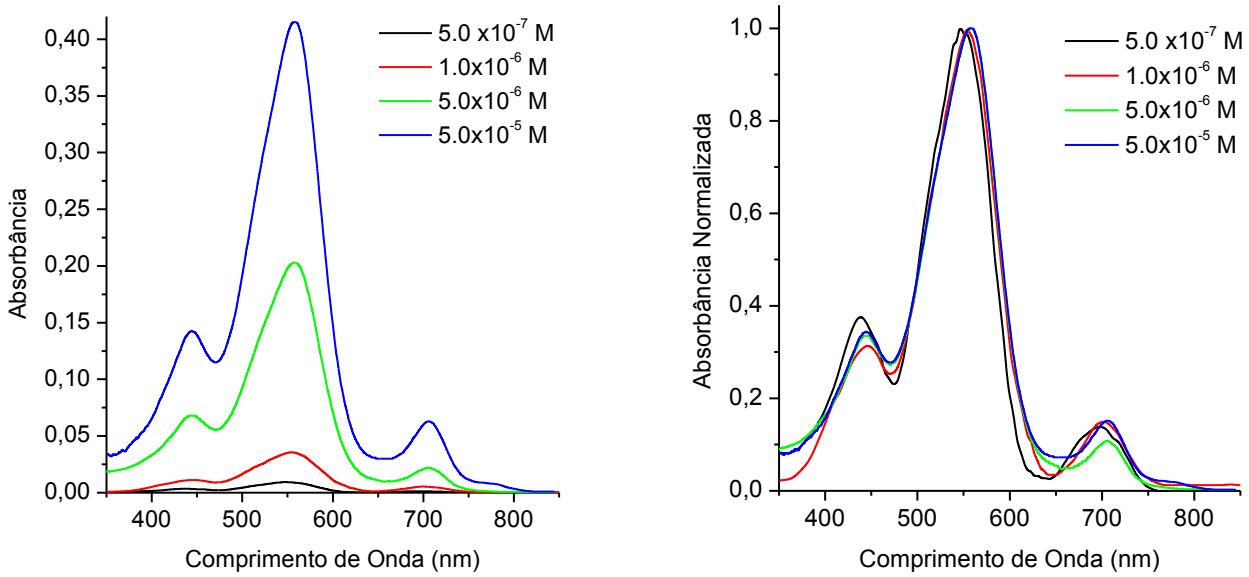


Figura A21. Espectro de absorção de UV na região do Vis-NIR do composto **2** em função da variação da concentração da solução em 1,4-Dioxano (esquerda) e seu respectivo espectro normalizado (direita).

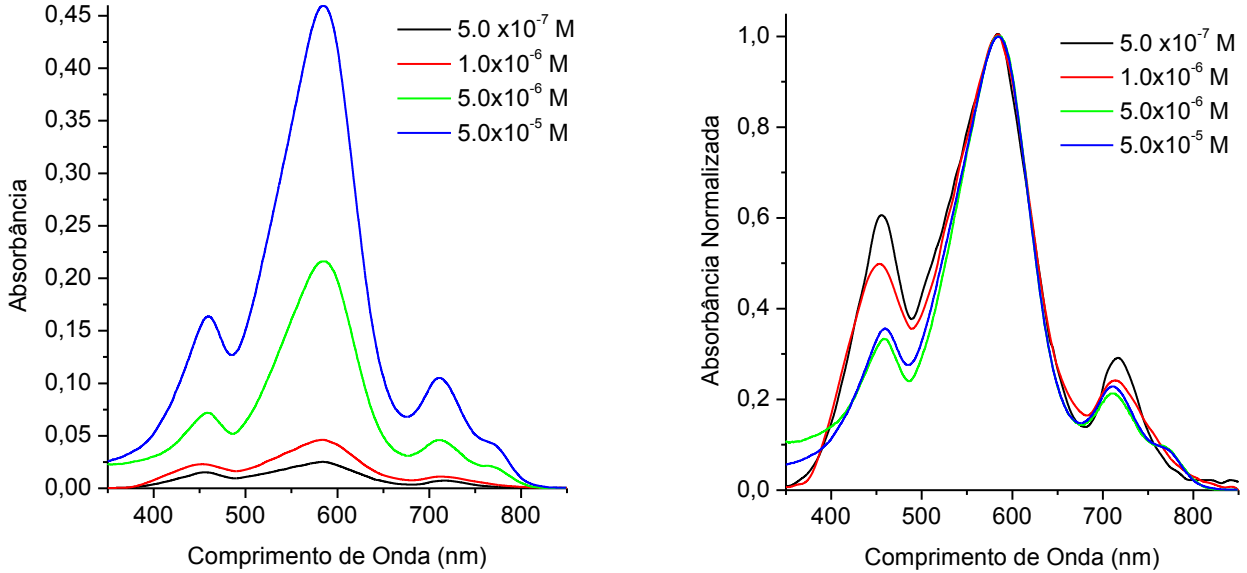


Figura A22. Espectro de absorção de UV na região do Vis-NIR do composto **2** em função da variação da concentração da solução em etanol (esquerda) e seu respectivo espectro normalizado (direita).

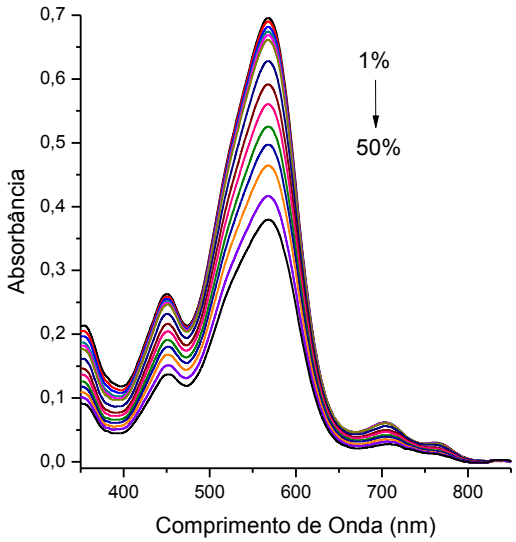


Figura A23. Espectro de absorção de UV na região do Vis-NIR do composto **2** em acetonitrila (~10^{-5} M) em diferentes proporções de água (1%-50%).

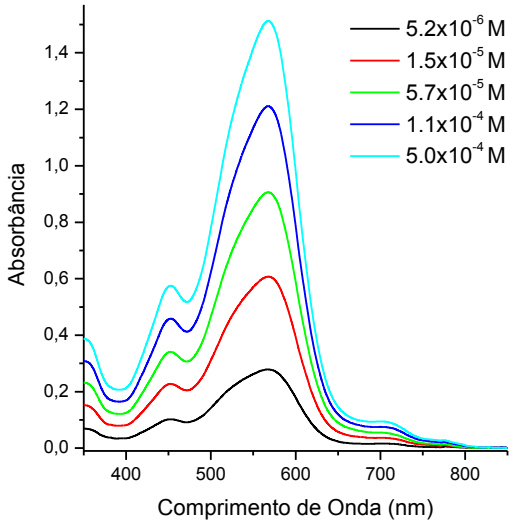


Figura A24. Espectro de absorção de UV na região do Vis-NIR do composto **2** em acetonitrila:água (1:1) (~10^{-5} M) em diferentes concentrações do corante.

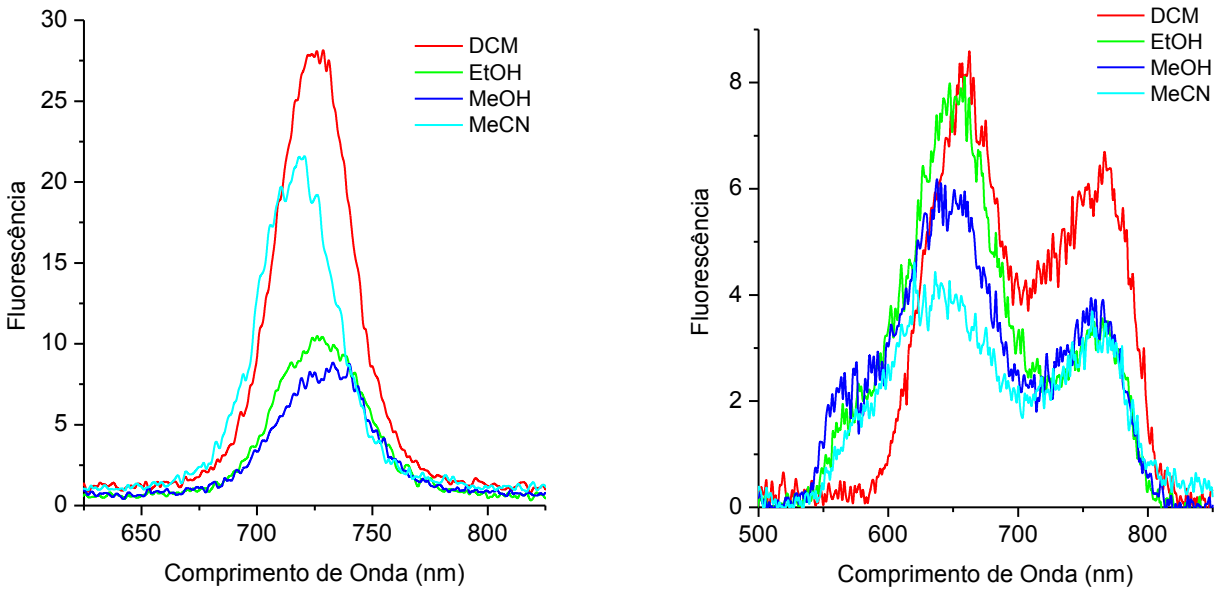


Figura A25. Espectro de emissão de fluorescência na região do Vis-NIR do composto **1**. λ_{EXC} = 703-712 nm (Figura da esquerda) e λ_{EXC} = 559-602 nm (Figura da direita).

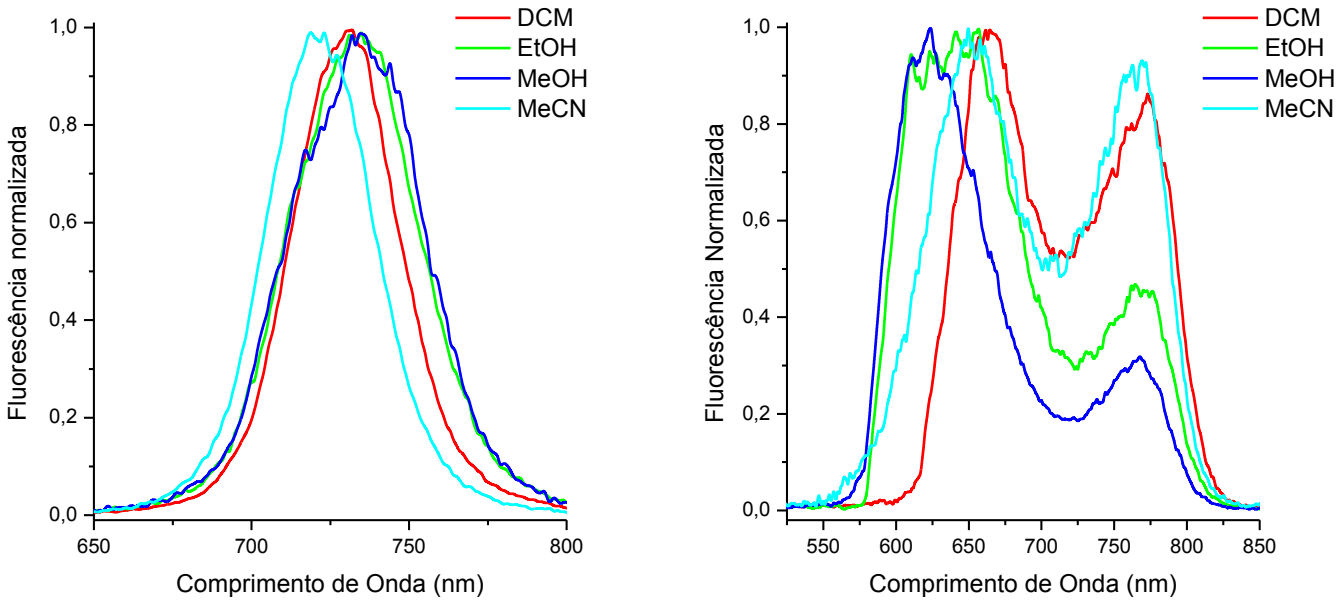


Figura A26. Espectro de emissão de fluorescência normalizada na região do Vis-NIR do composto **2**. λ_{EXC} = 708-711 nm (Figura da esquerda) e λ_{EXC} = 570-611 nm (Figura da direita).

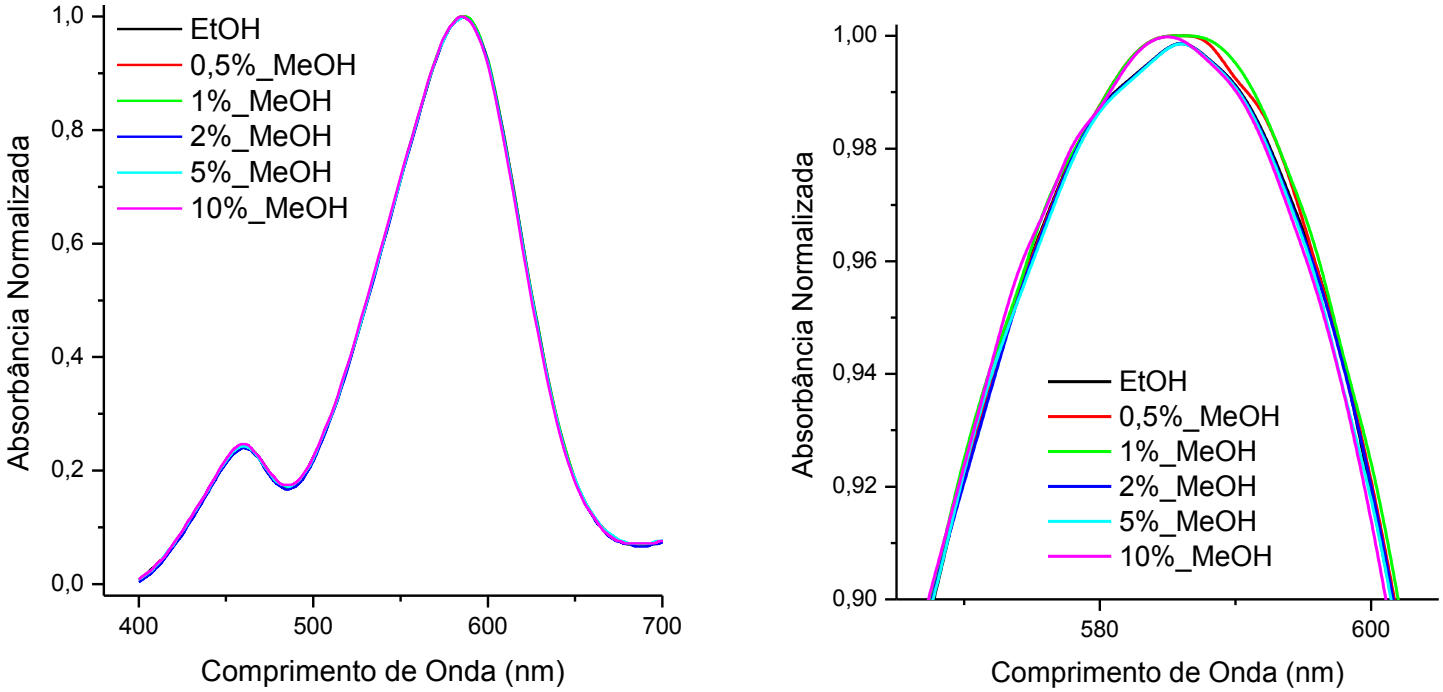


Figura A27. Espectro de absorção normalizado de UV na região do Vis-NIR do corante marcador **2** em soluções mais diluídas de metanol (esquerda) e região do máximo de absorção ampliada (direita).

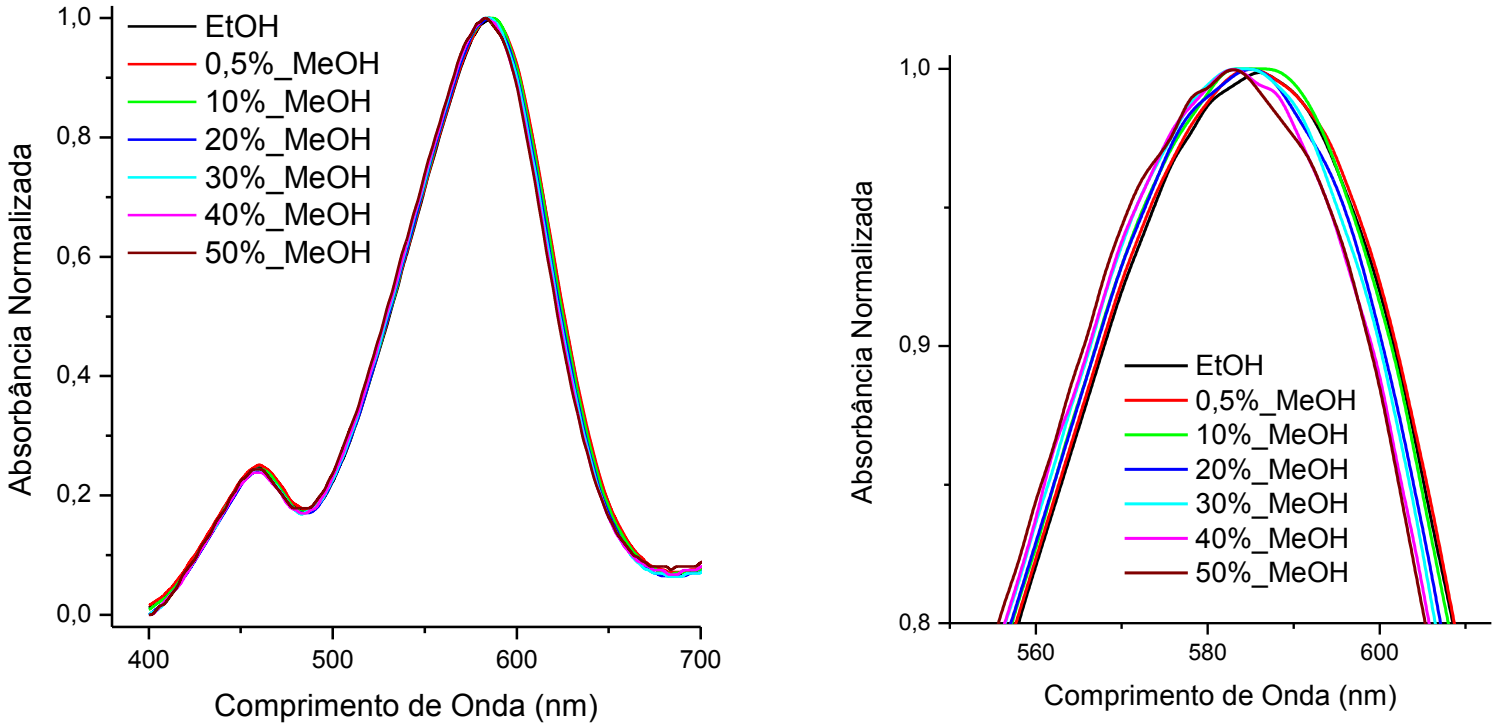


Figura A28. Espectro de absorção normalizado de UV na região do Vis-NIR do corante marcador **2** em soluções mais concentradas de metanol (esquerda) e região do máximo de absorção ampliada (direita).

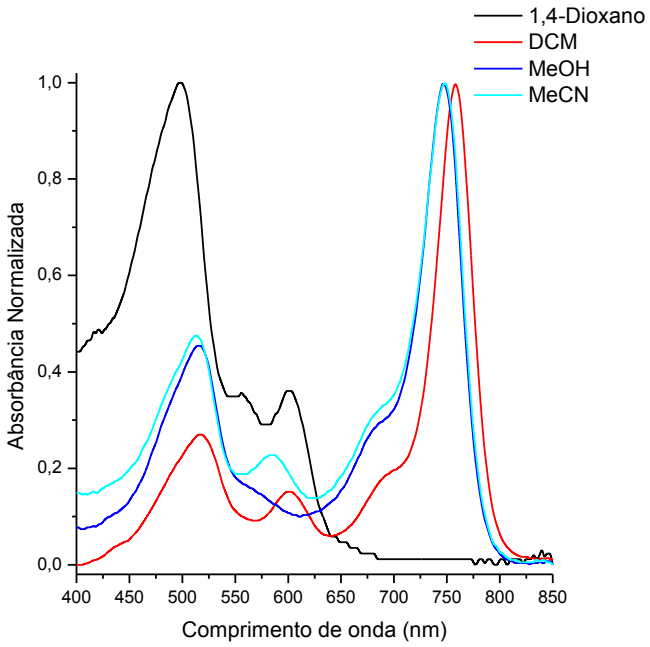


Figura A29. Espectro de absorção normalizado de UV na região do Vis-NIR do composto **30**.

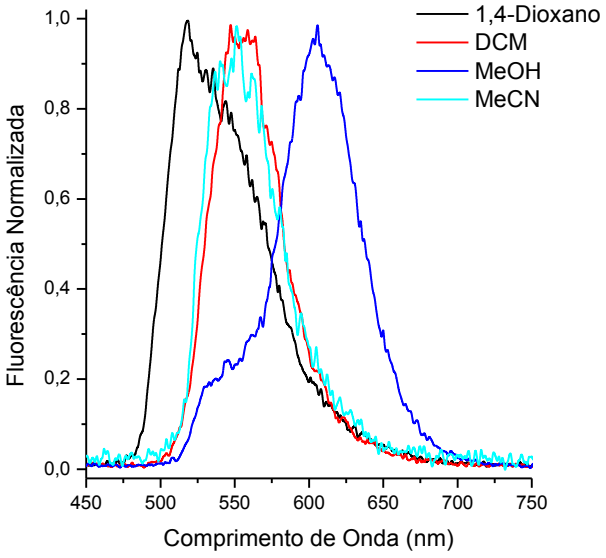
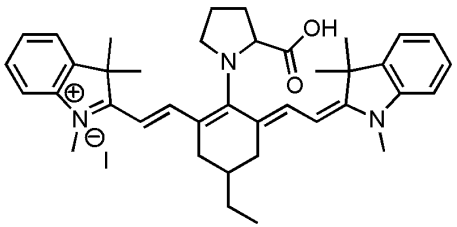


Figura A30. Espectro de emissão de fluorescência normalizado na região do Vis-NIR do composto **30** (λ_{EXC}=500 nm).

Tabela A3. Dados fotofísicos do composto **30** em solução, onde λ_{ABS} é o comprimento de onda de absorção e λ_{EM} é o comprimento de onda de emissão, dados em nanômetros (nm) e $\Delta\lambda_{ST}$ é o valor do deslocamento de Stokes (nm).

Composto	Solvente	λ_{ABS}	λ_{EM}	$\Delta\lambda_{ST}$	λ_{ABS}	λ_{EM}	$\Delta\lambda_{ST}$
 **(30)**	1,4-Dioxano	-	-	-	498	518	20
	Diclorometano	758	768	10	517	556	39
	Metanol	746	759	13	516	605	89
	Acetonitrila	747	758	11	513	551	38

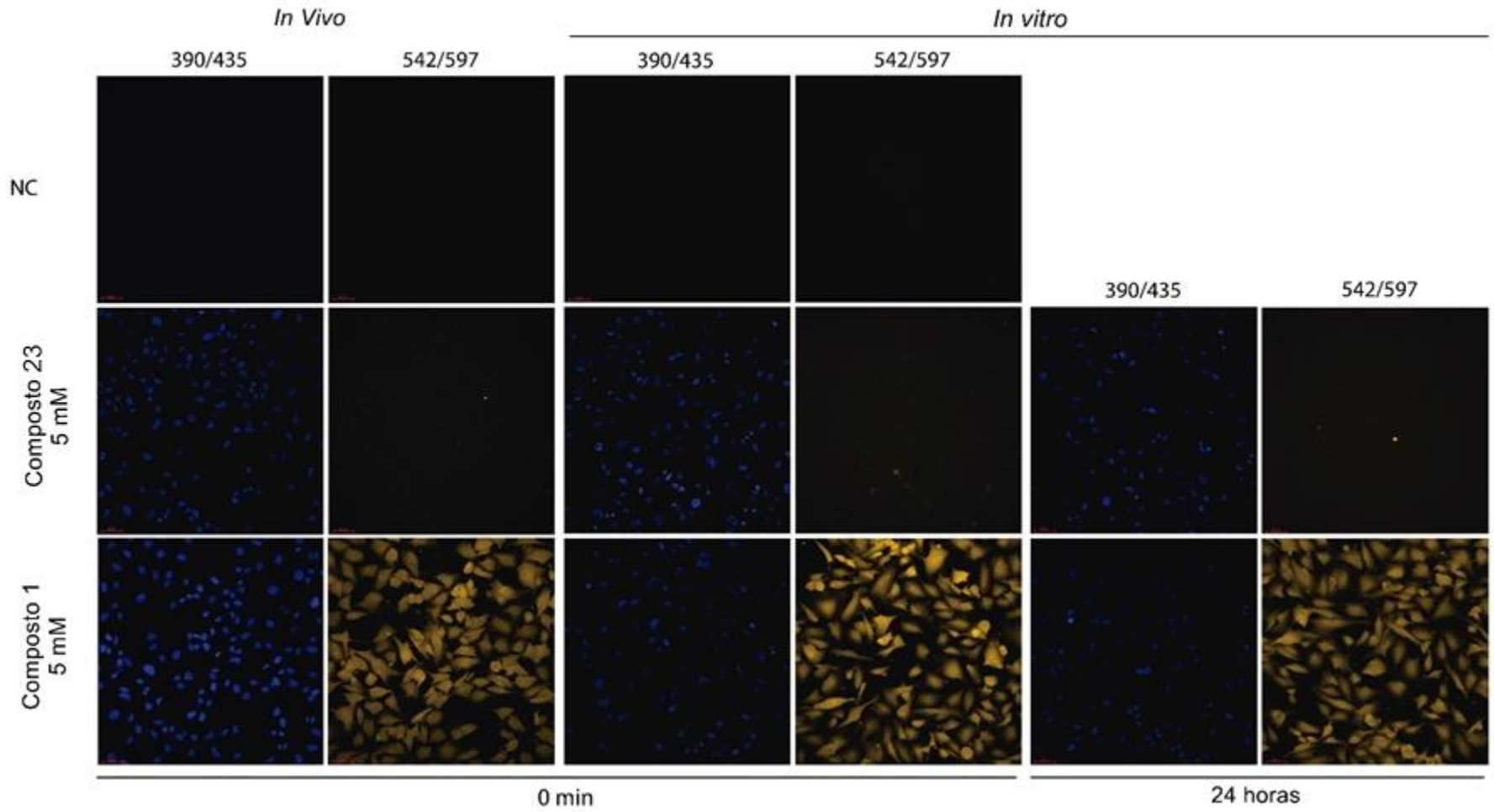


Figura A31. Bioimageamento *in vivo* e *in vitro* do composto **23** e do composto **1**.

ANEXOS

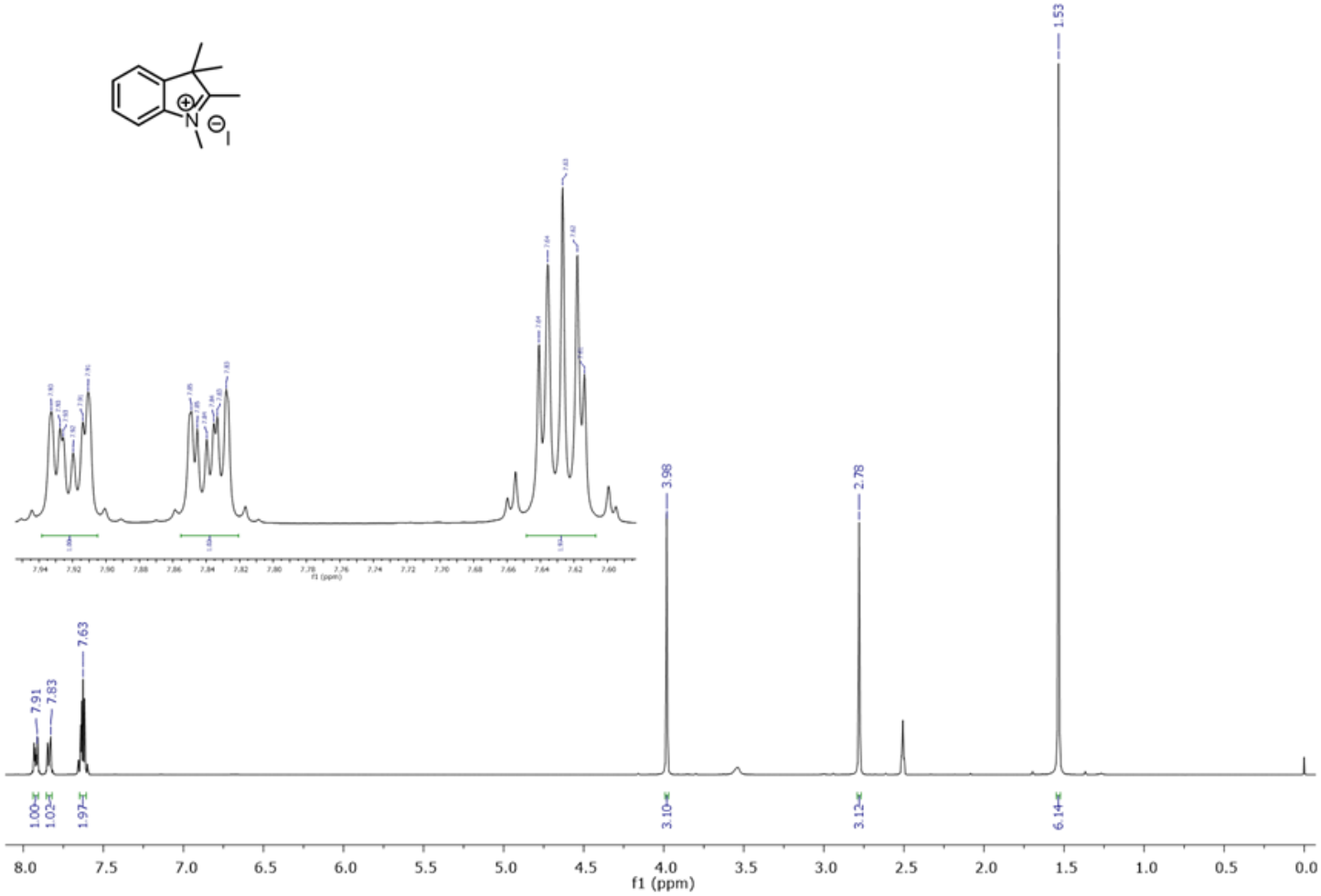


Figura A1. Espectro de RMN de ^{1}H do composto **19** em DMSO-d_6 (400 MHz).

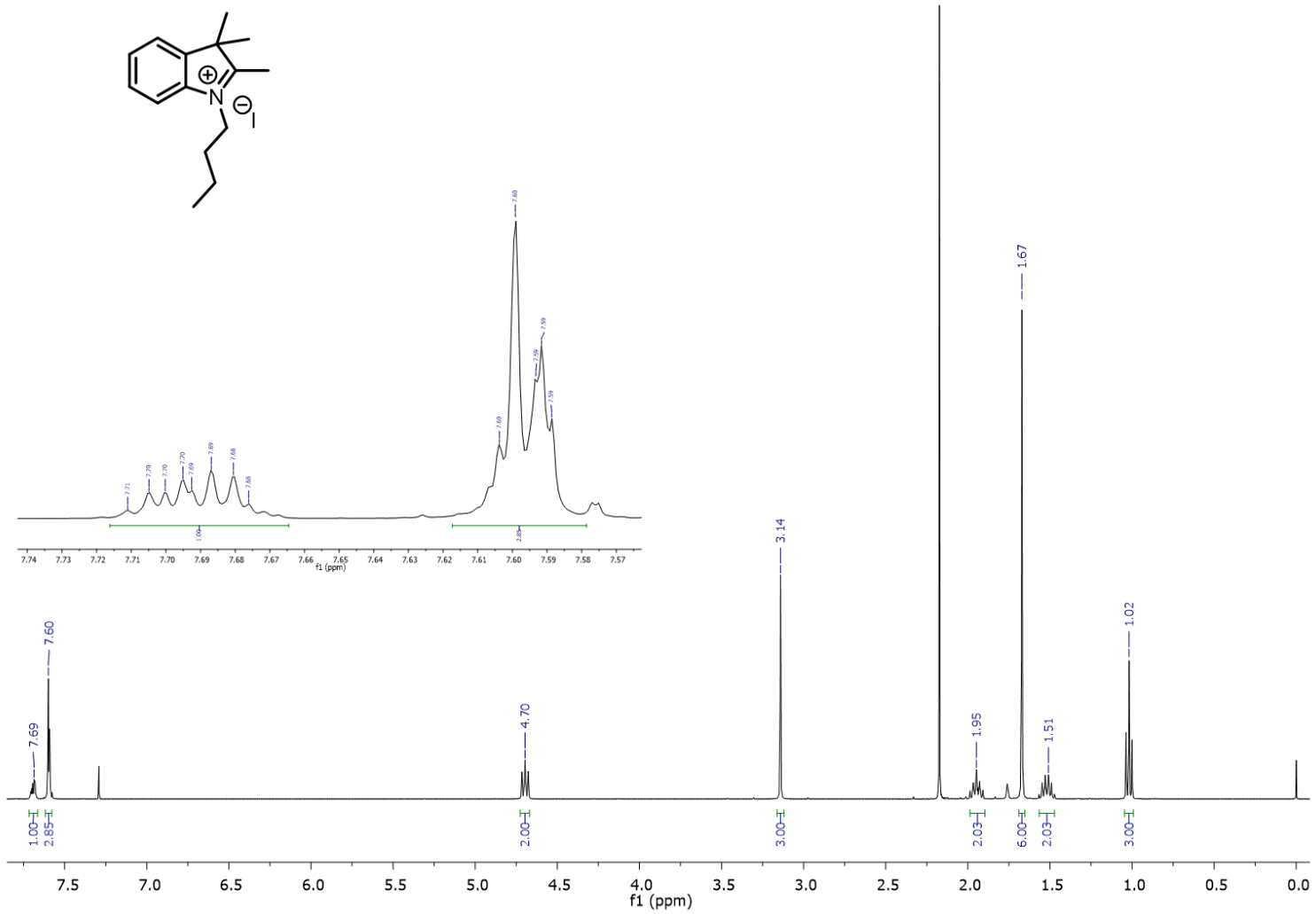


Figura A2. Espectro de RMN de ^{1}H do composto **20** em $CDCl_3$ (400 MHz).

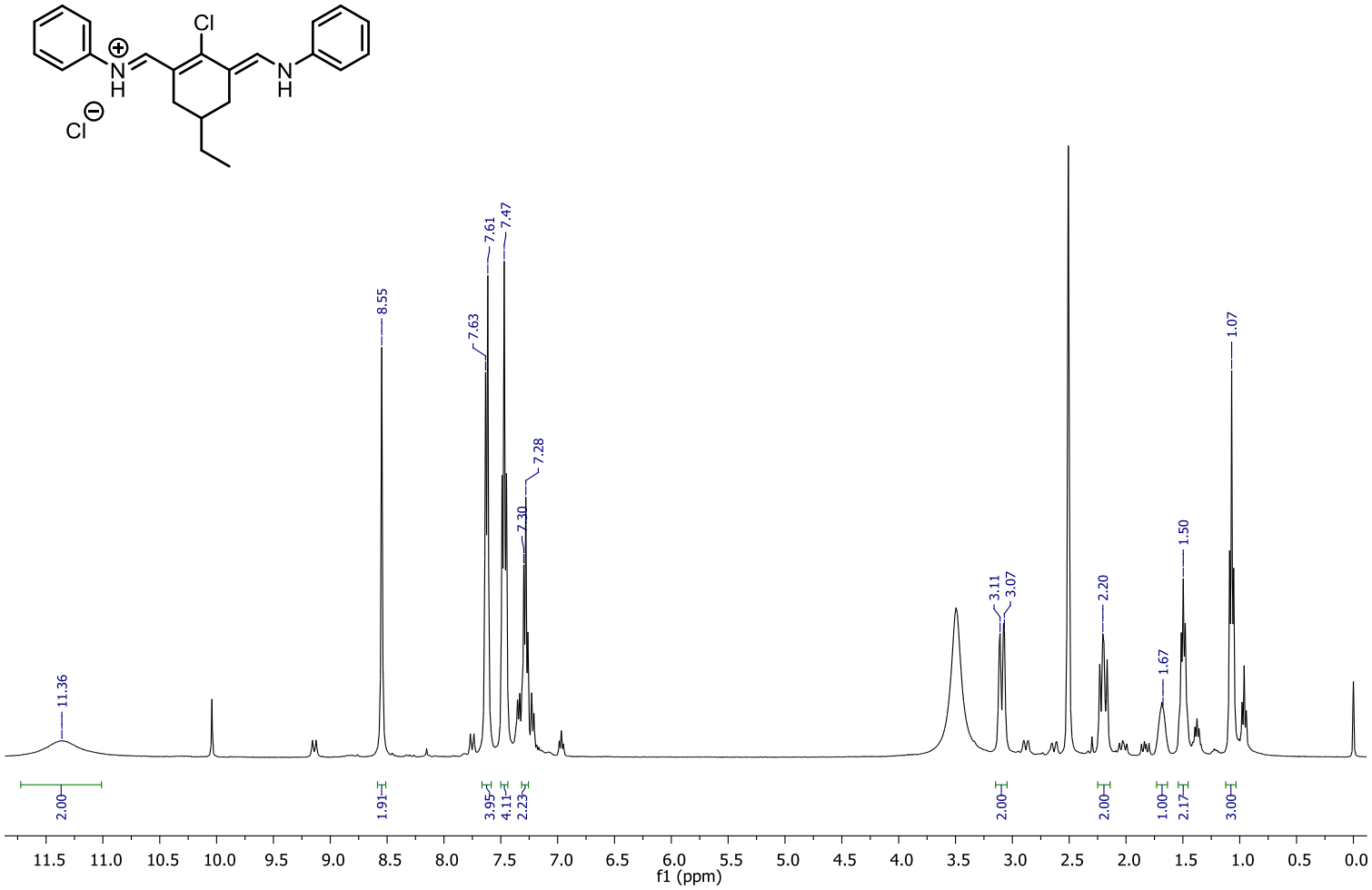


Figura A3. Espectro de RMN de ^{1}H do composto **22** em DMSO-d_6 (400 MHz).

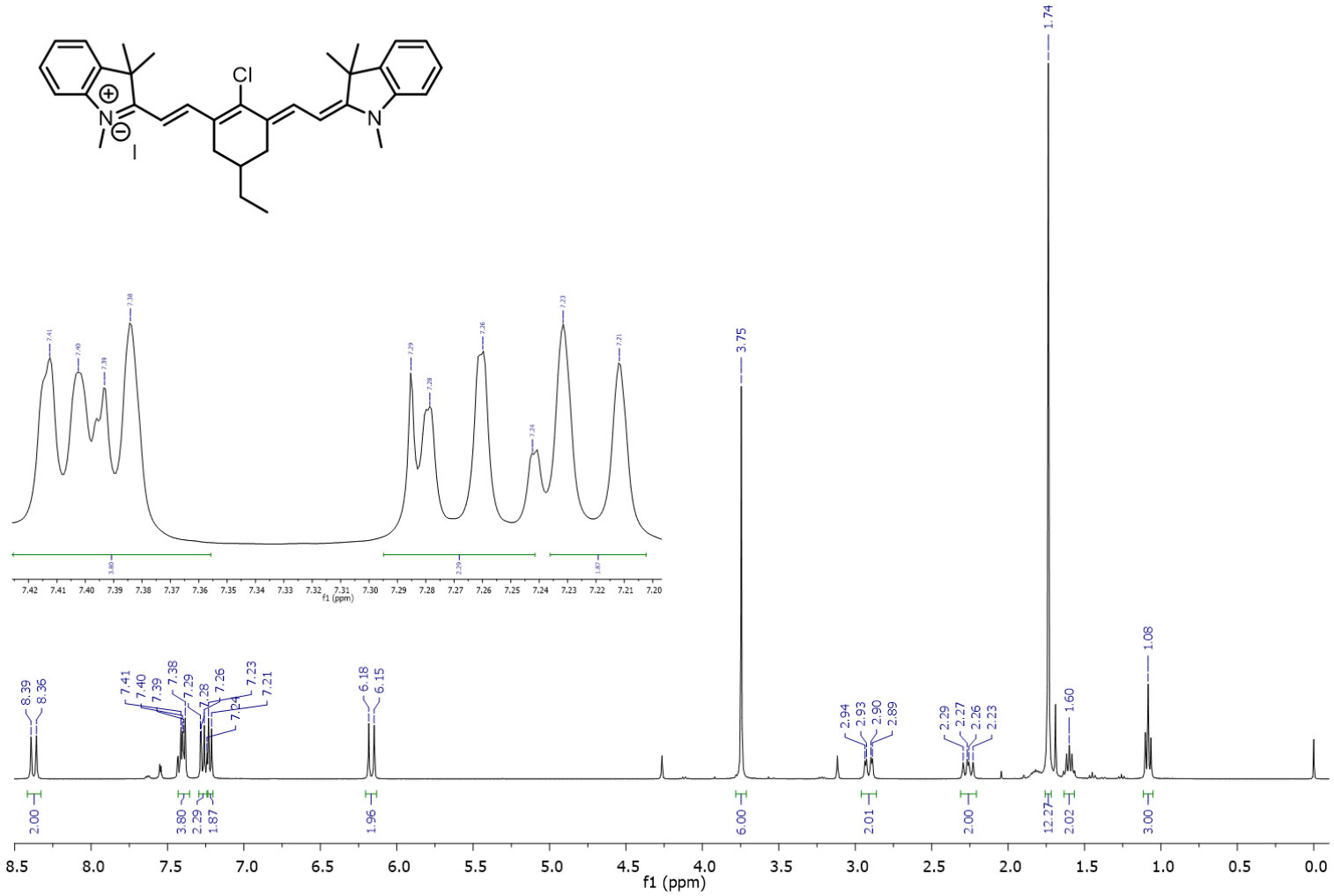


Figura A4. Espectro de RMN de ^{1}H do composto **23** em $CDCl_3$ (400 MHz).

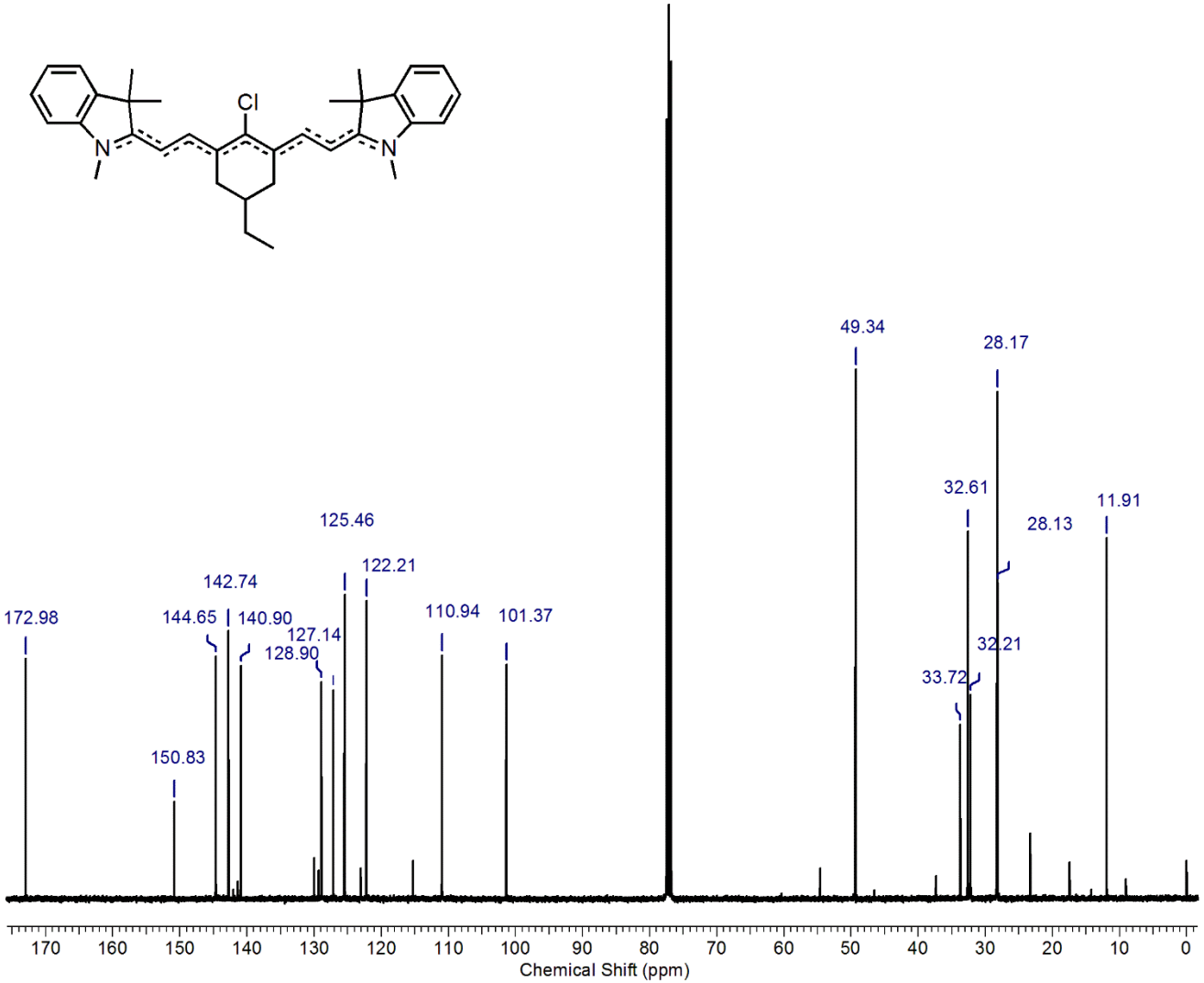


Figura A5. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **23** em $CDCl_3$ (100 MHz).

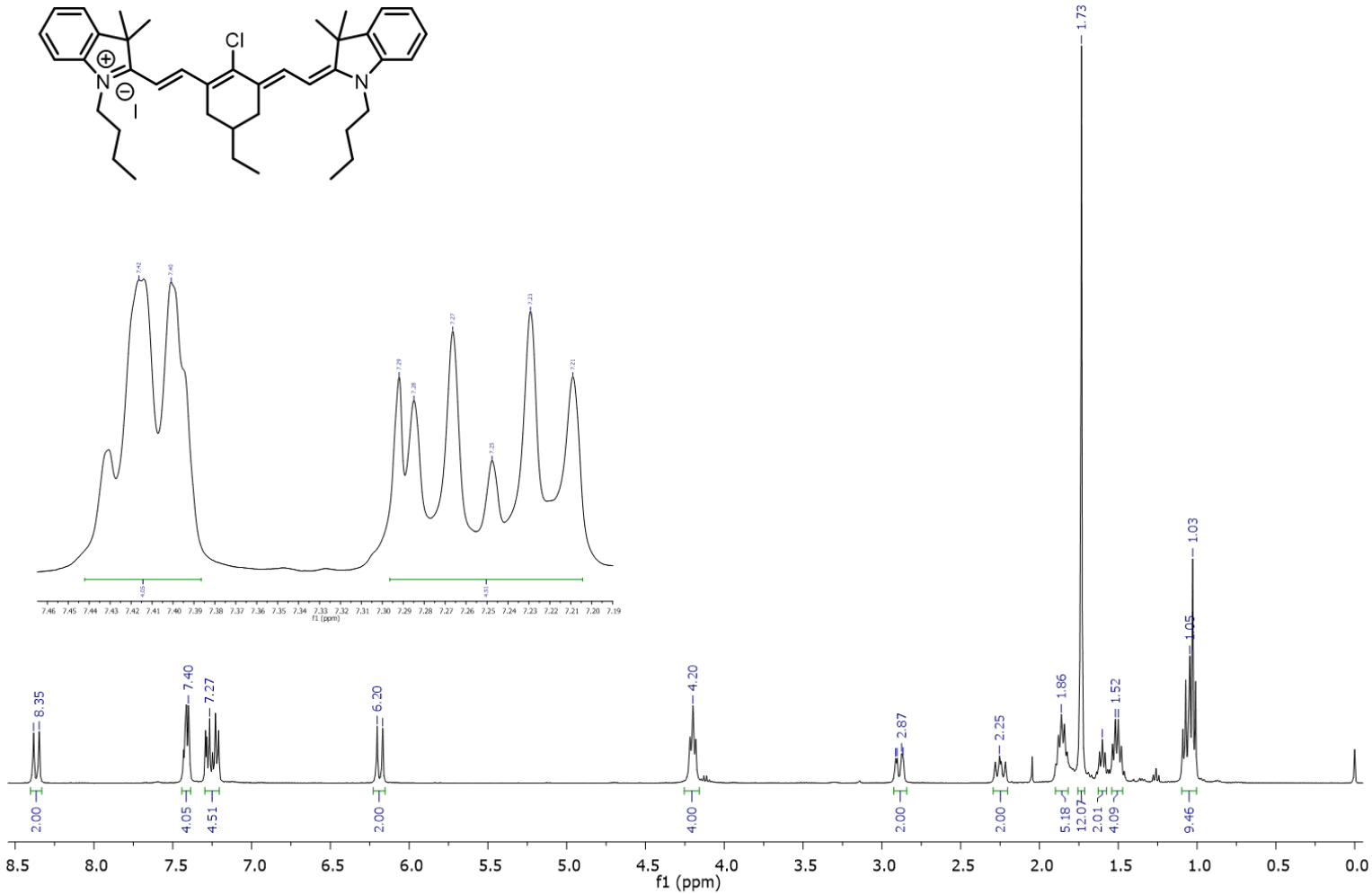


Figura A6. Espectro de RMN de ^{1}H do composto **24** em $CDCl_3$ (400 MHz).

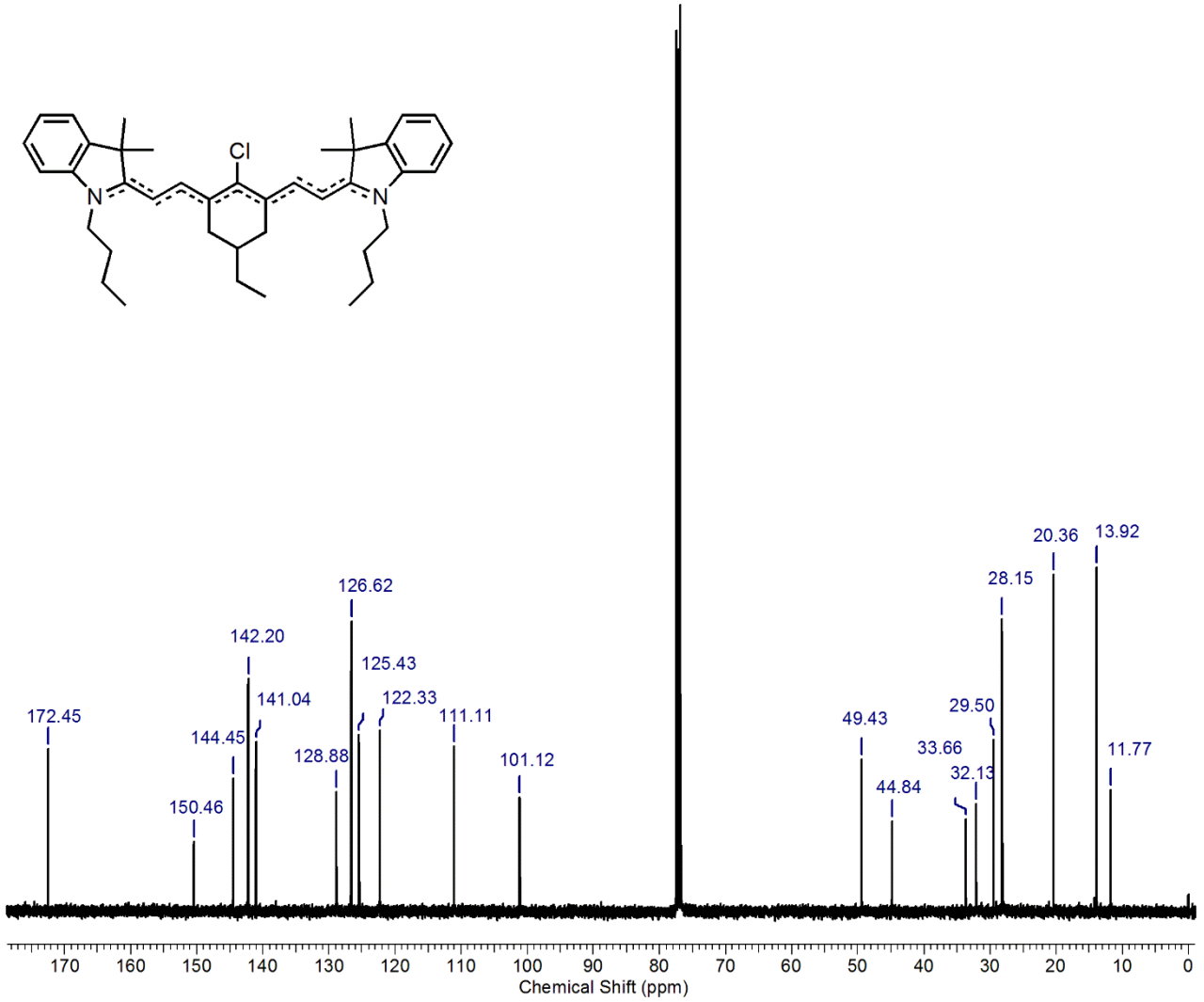


Figura A7. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **24** em $CDCl_3$ (100 MHz).

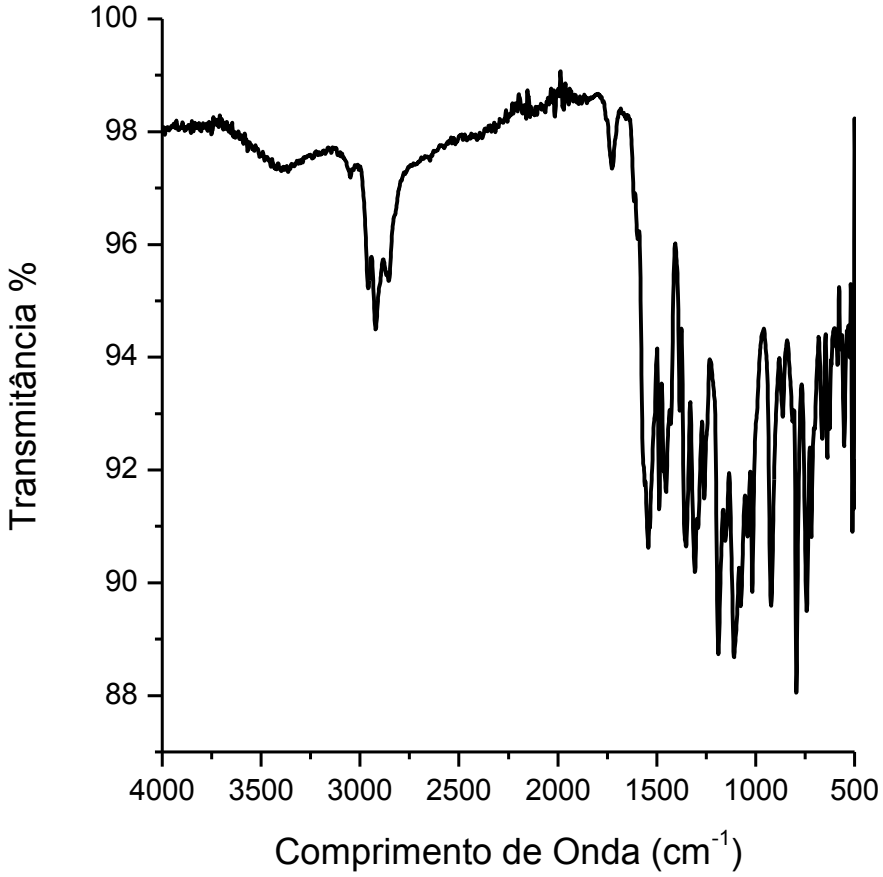


Figura A8. Espectro de infravermelho (Modo ATR) do composto **1**.

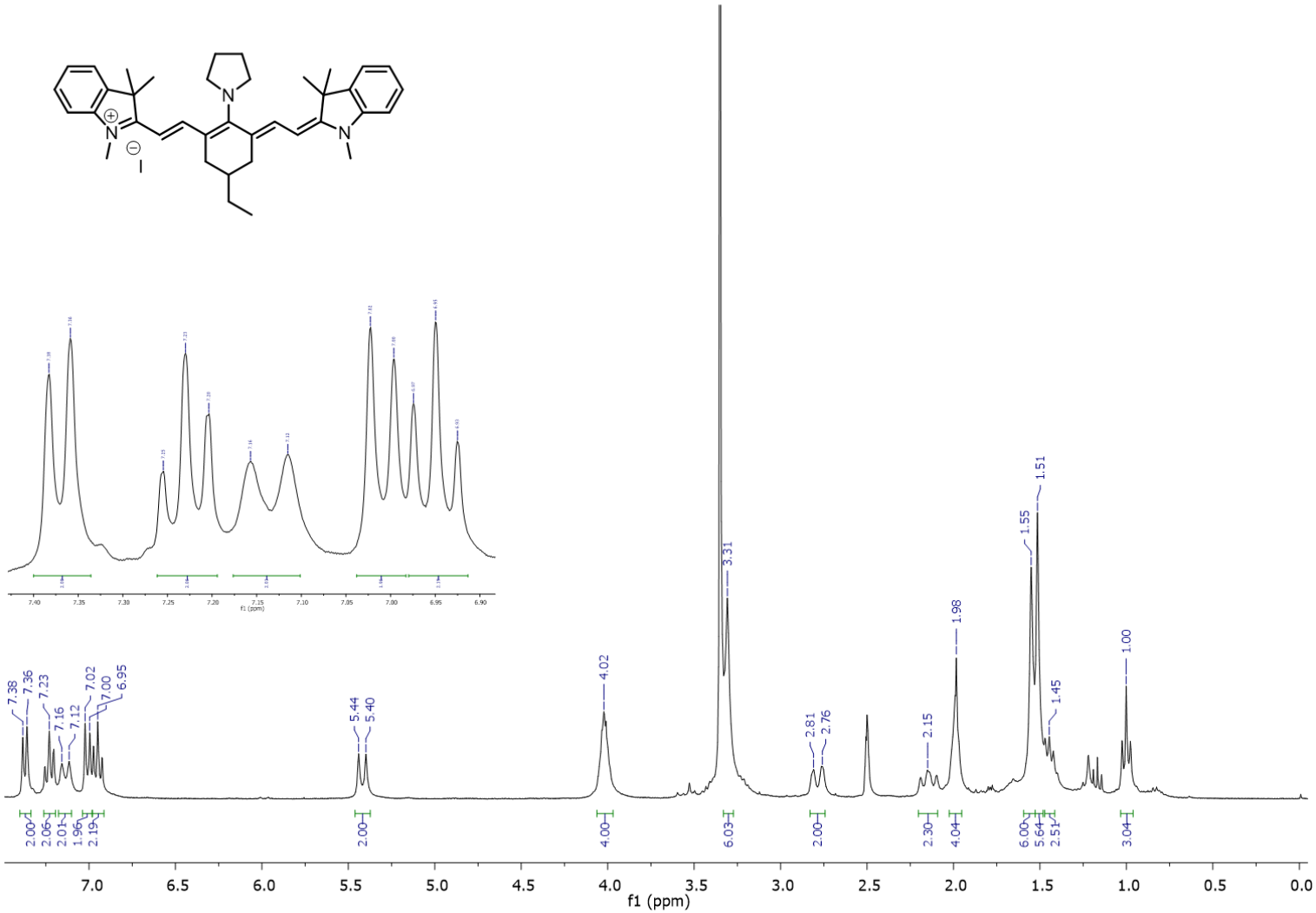


Figura A9. Espectro de RMN de ^{1}H do composto **1** em DMSO-d_6 (300 MHz).

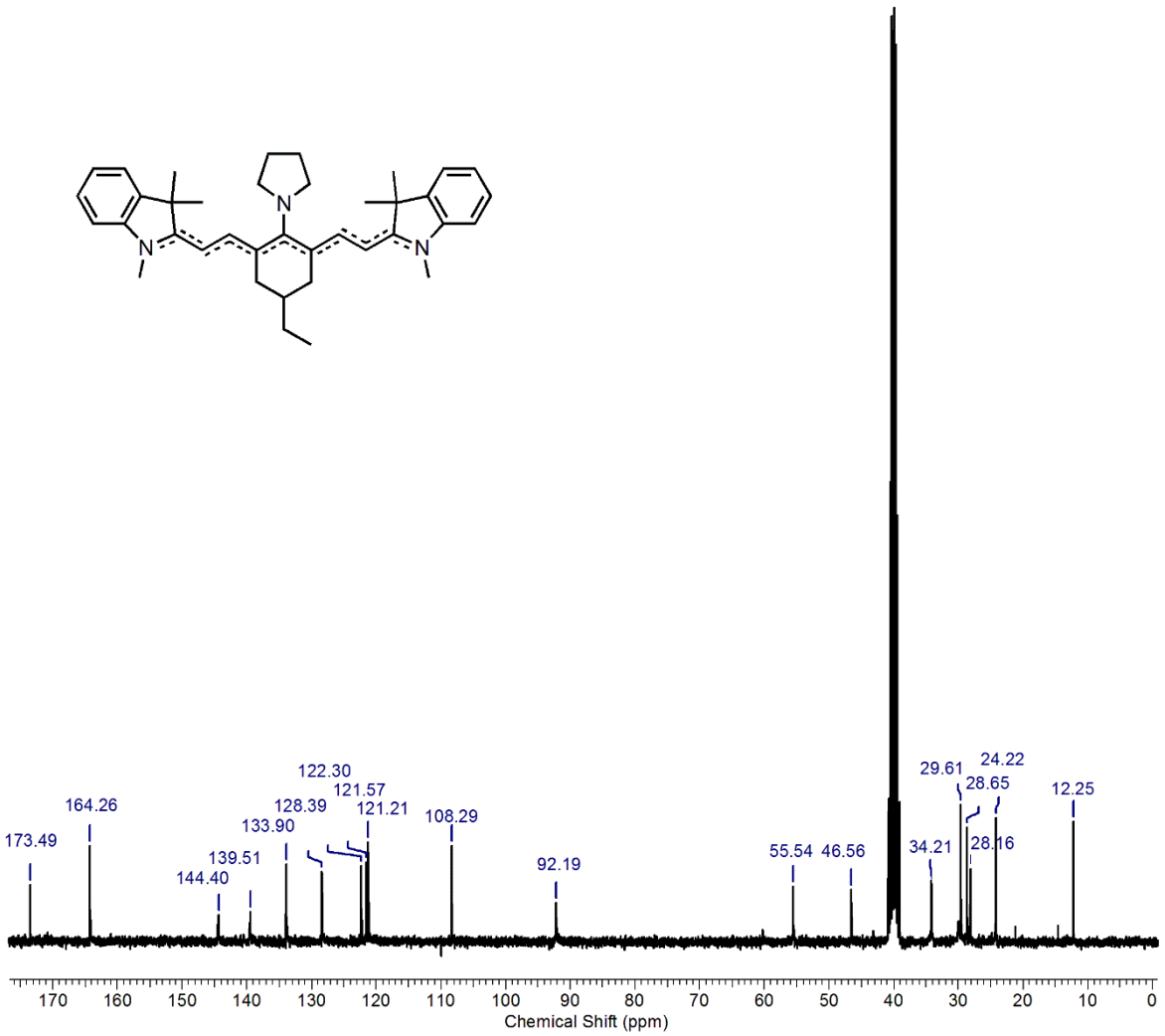
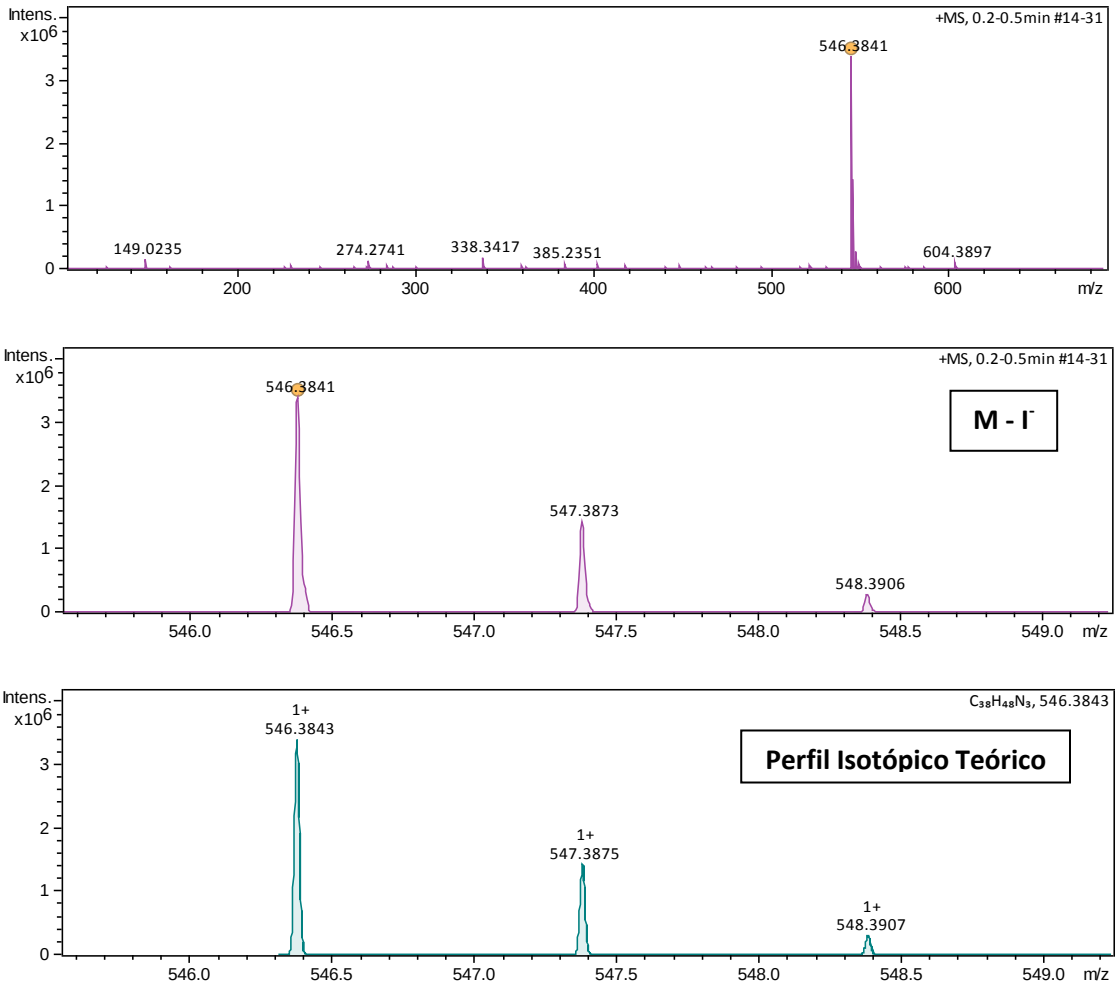


Figura A10. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **1** em DMSO-d_6 (75 MHz).



Meas. m/z	Ion Formula	m/z	err [ppm]	mSigma	rdb	e¯ Conf	N-Rule
546,3841	C38H48N3	546,3843	0.3	2.2	16.5	even	ok

Figura A11. Espectro de HRMS do composto **1**.

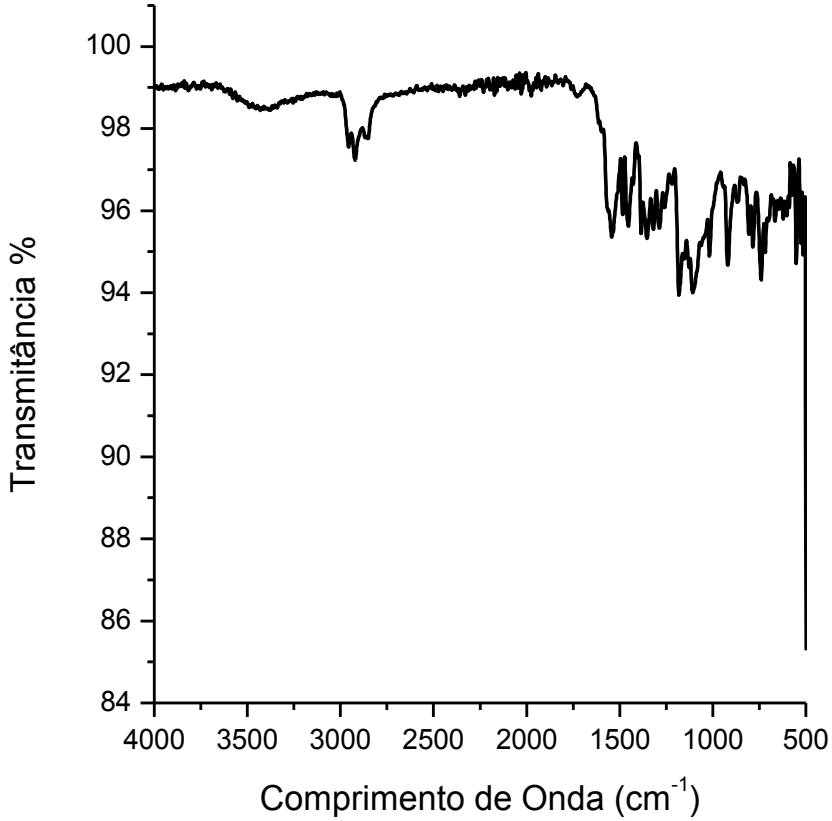


Figura A12. Espectro de infravermelho (Modo ATR) do composto **2**.

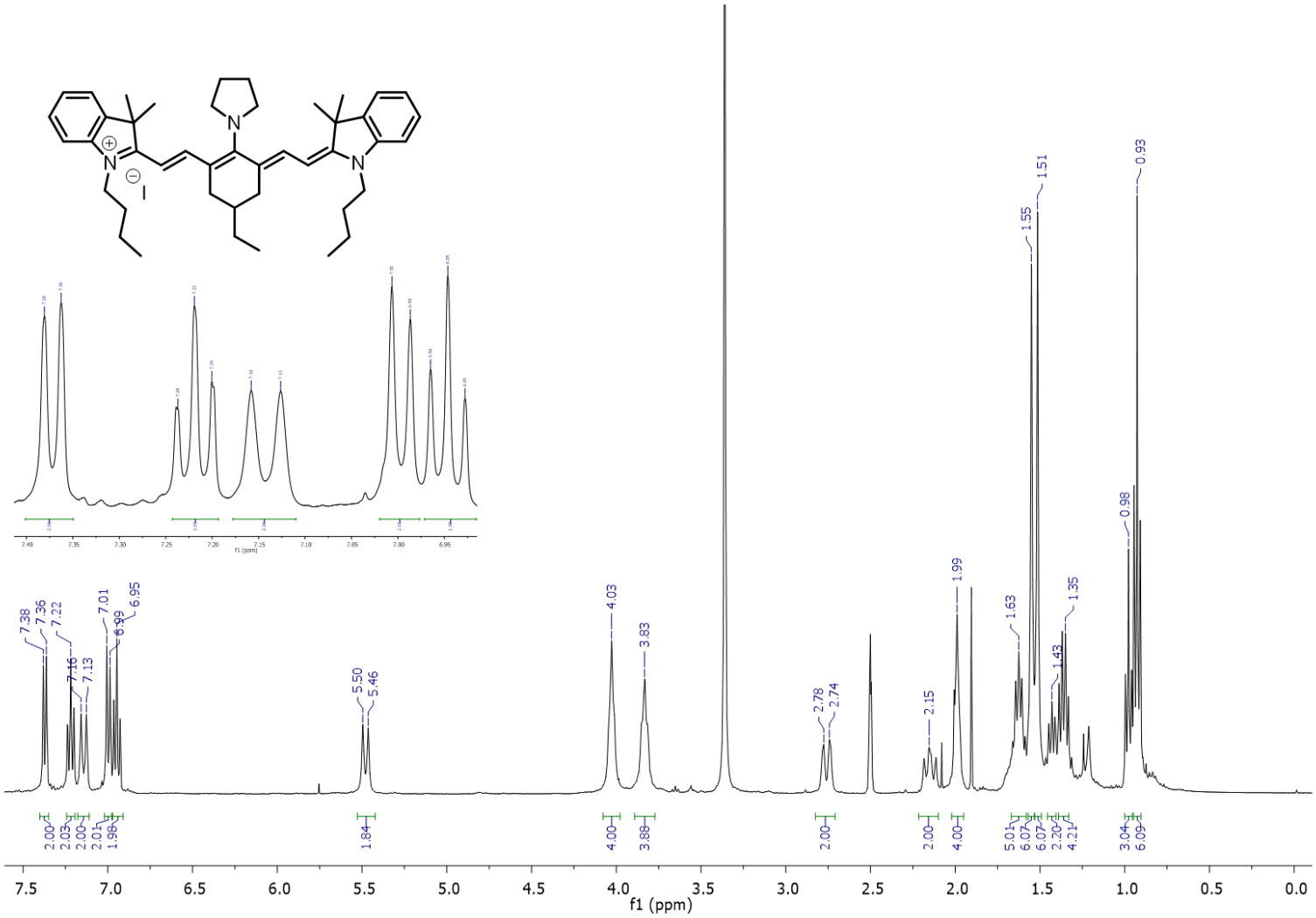


Figura A13. Espectro de RMN de ^{1}H do composto **2** em DMSO-d_6 (400 MHz).

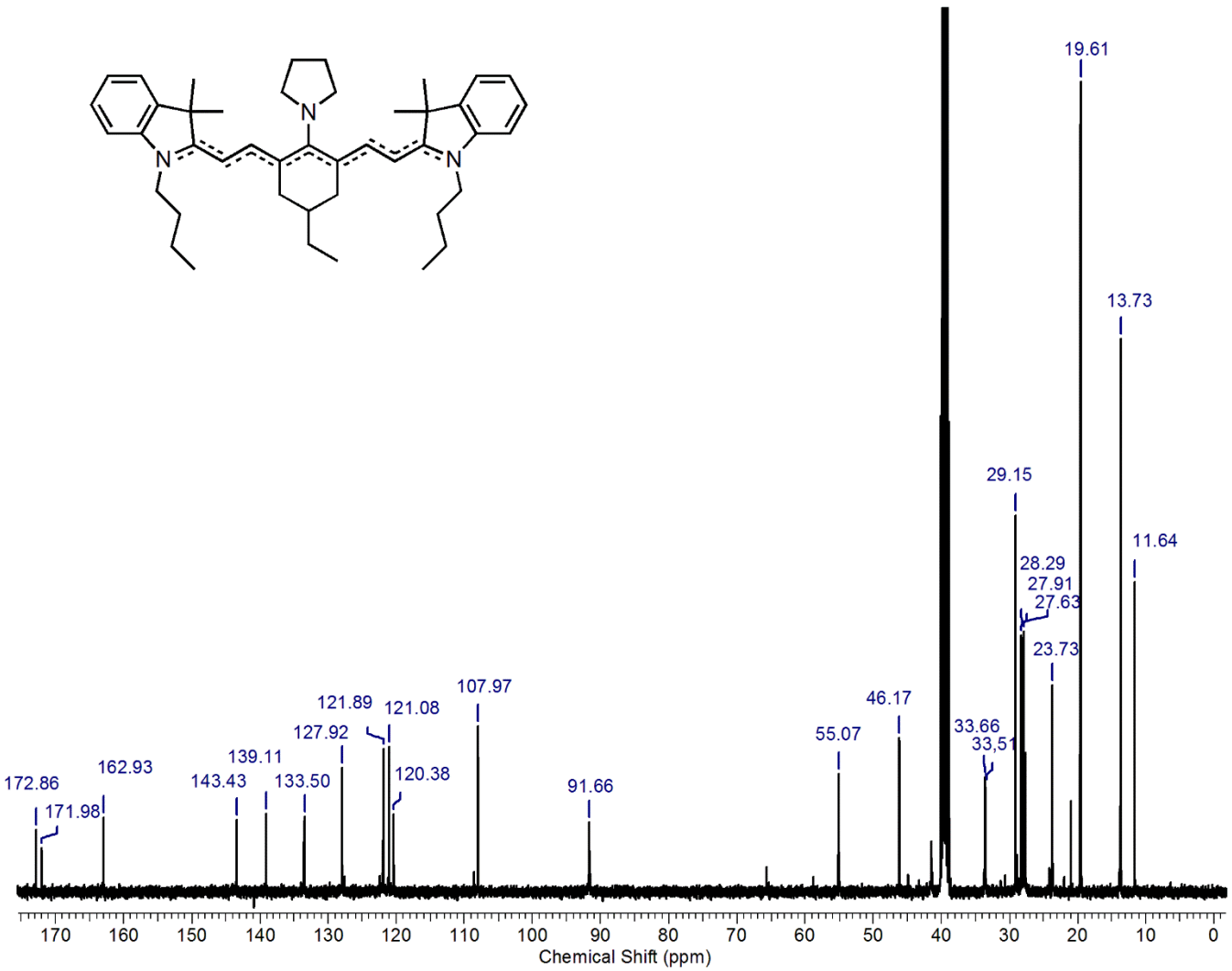


Figura A14. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **2** em DMSO-d_6 (100 MHz).

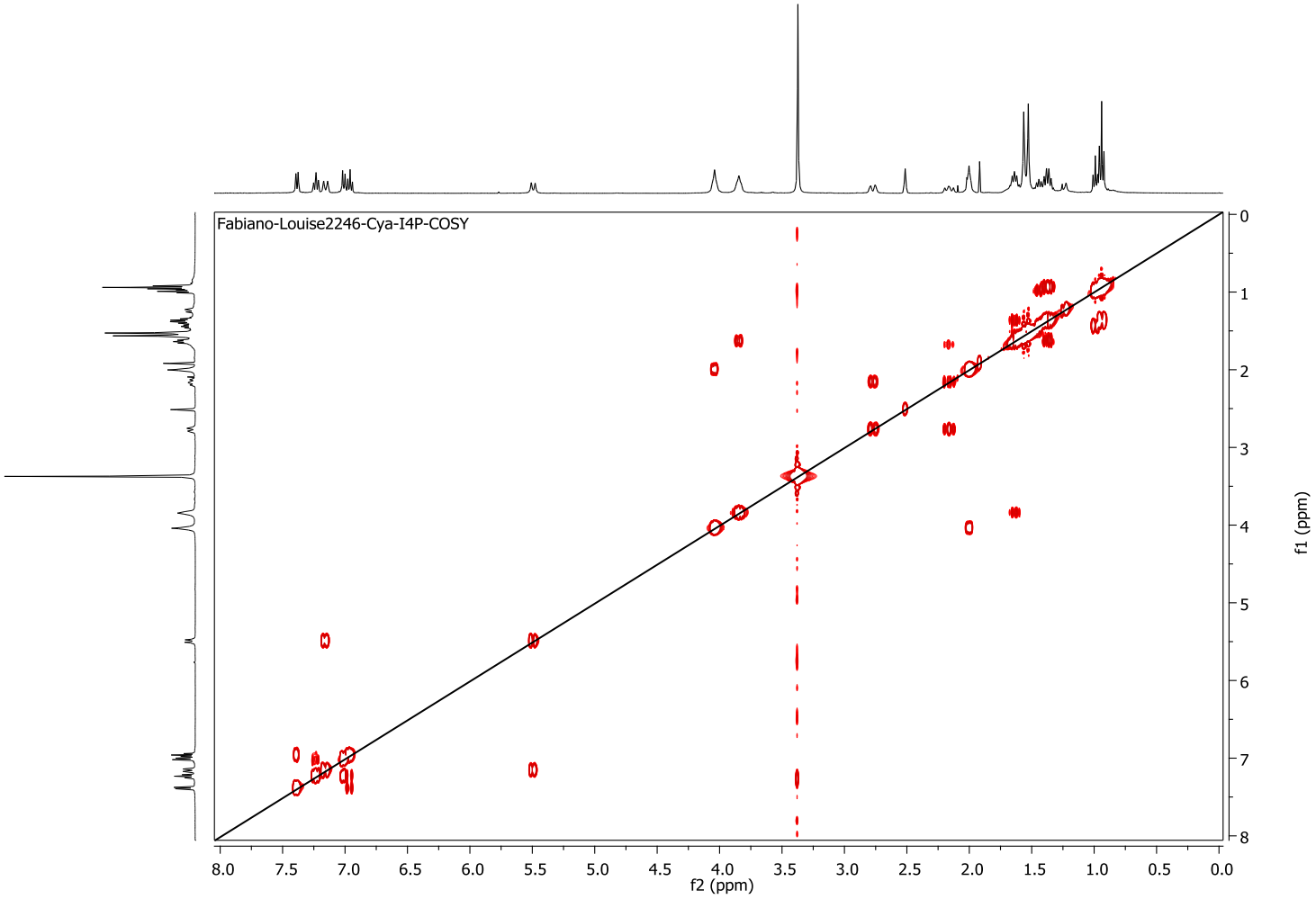
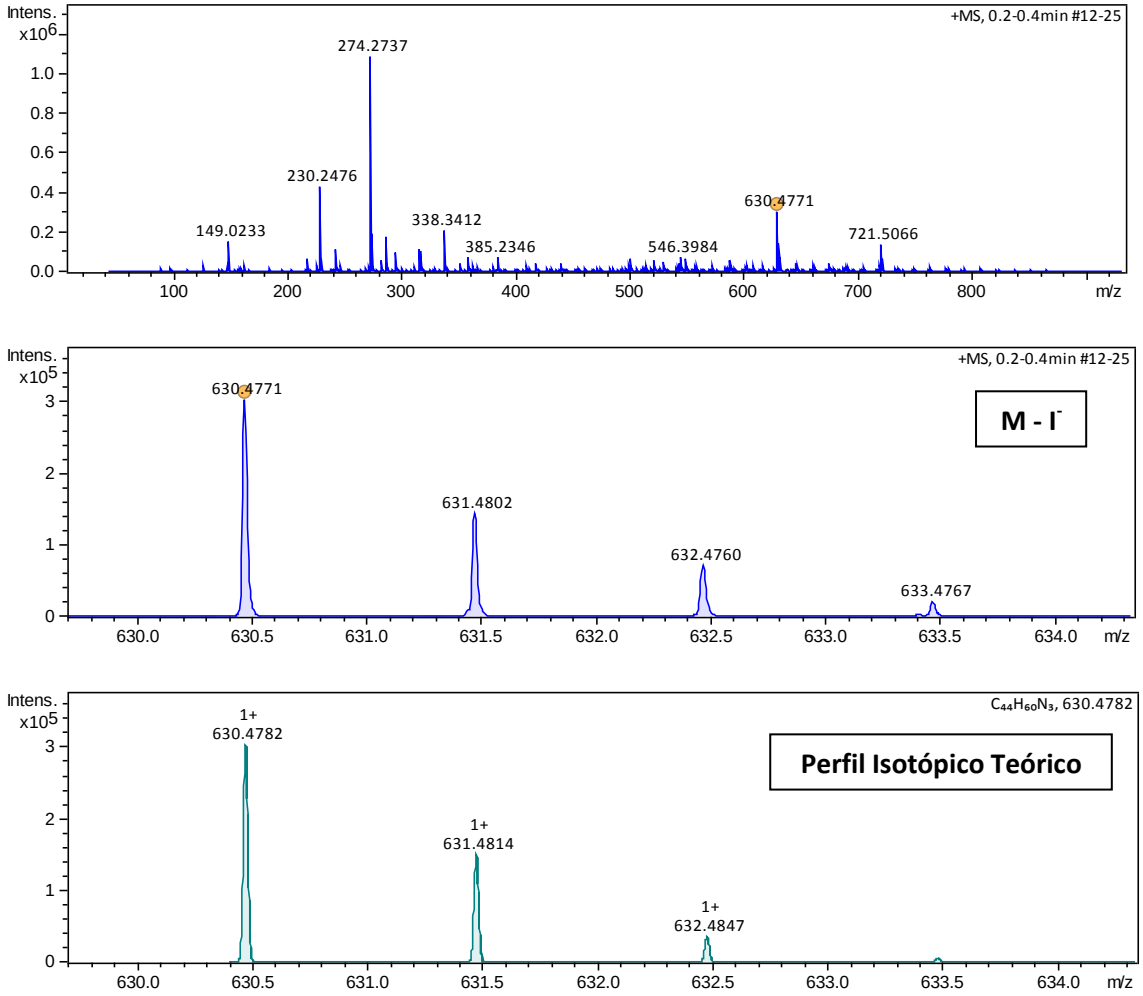


Figura A15. Espectro de RMN COSY do composto **2** em DMSO-d_6.



Meas. m/z	Ion Formula	m/z	err [ppm]	mSigma	rdb	e⁻ Conf	N-Rule
630,4771	C44H60N3	630,4782	1.8	60.5	16.5	even	ok

Figura A16. Espectro de HRMS do composto **2**.

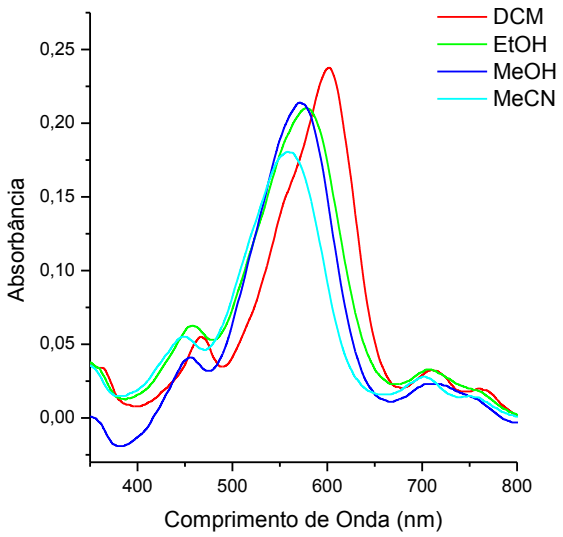


Figura A17. Espectro de absorção de UV na região do Vis-NIR do composto **1**.

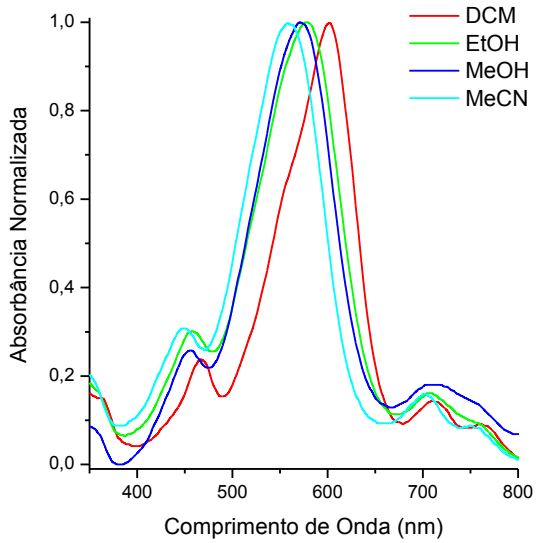


Figura A18. Espectro de absorção normalizado de UV da região do Vis-NIR do composto **1**.

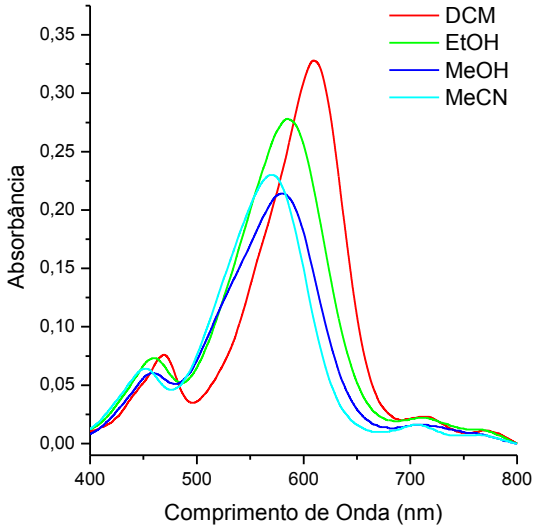


Figura A19. Espectro de absorção de UV na região do Vis-NIR do composto **2**.

Tabela A1. Dados fotofísicos dos compostos **1** e **2** em solução, onde λ_{ABS} é o comprimento de onda de absorção, dados em nanômetros (nm), ε é o coeficiente de absortividade molar (10^4 x $M^{-1} \cdot cm^{-1}$), f_e é a força de oscilador, k_e^0 é a constante de taxa radioativa (10^8 s^{-1}), τ^0 é o tempo de vida útil radioativa (ns).

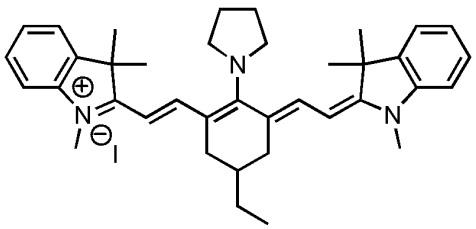
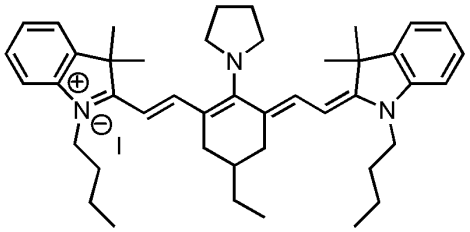
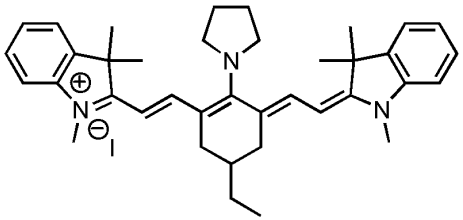
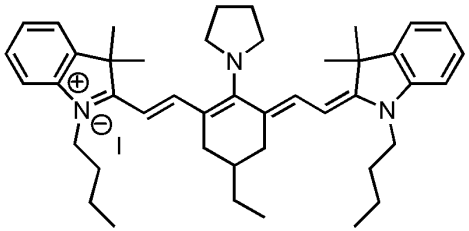
Composto	Solvente	λ_{ABS}	ε	f_e	k_e^0	τ^0
 **(1)**	Diclorometano	468	1.10	0.108	0.49	2.021
	Etanol	459	1.25	0.165	0.78	1.280
	Metanol	457	0.82	0.099	0.47	2.107
	Acetonitrila	450	1.10	0.152	0.75	1.328
 **(2)**	Diclorometano	470	1.50	0.203	0.92	1.087
	Etanol	461	1.46	0.169	0.80	1.255
	Metanol	457	1.21	0.189	0.90	1.105
	Acetonitrila	452	1.28	0.189	0.92	1.081

Tabela A2. Dados fotofísicos dos compostos **1** e **2** em solução, onde λ_{ABS} é o comprimento de onda de absorção, dados em nanômetros (nm), ε é o coeficiente de absortividade molar (10^3 x $M^{-1} \cdot cm^{-1}$), f_e é a força de oscilador, k_e^0 é a constante de taxa radioativa (10^6 s^{-1}), τ^0 é o tempo de vida útil radioativa (ns).

Composto	Solvente	λ_{ABS}	ε	f_e	k_e^0	τ^0
 (1)	Diclorometano	712	6.44	0.043	8.49	11.785
	Etanol	708	6.52	0.047	9.36	10.685
	Metanol	703	4.66	0.031	6.29	15.906
	Acetonitrila	712	5.45	0.035	6.89	14.513
 (2)	Diclorometano	715	4.68	0.032	6.26	15.965
	Etanol	714	4.35	0.034	6.71	14.902
	Metanol	713	3.38	0.027	5.23	19.136
	Acetonitrila	708	3.14	0.021	4.17	23.974

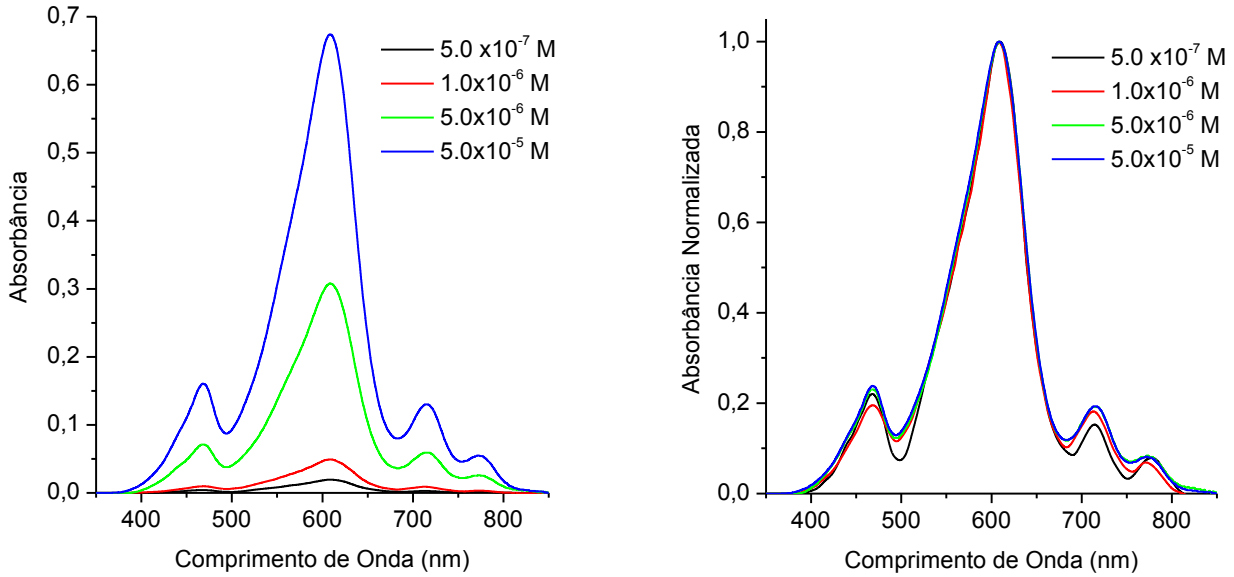


Figura A20. Espectro de absorção de UV na região do Vis-NIR do composto **2** em função da variação da concentração da solução em diclorometano (esquerda) e seu respectivo espectro normalizado (direita).

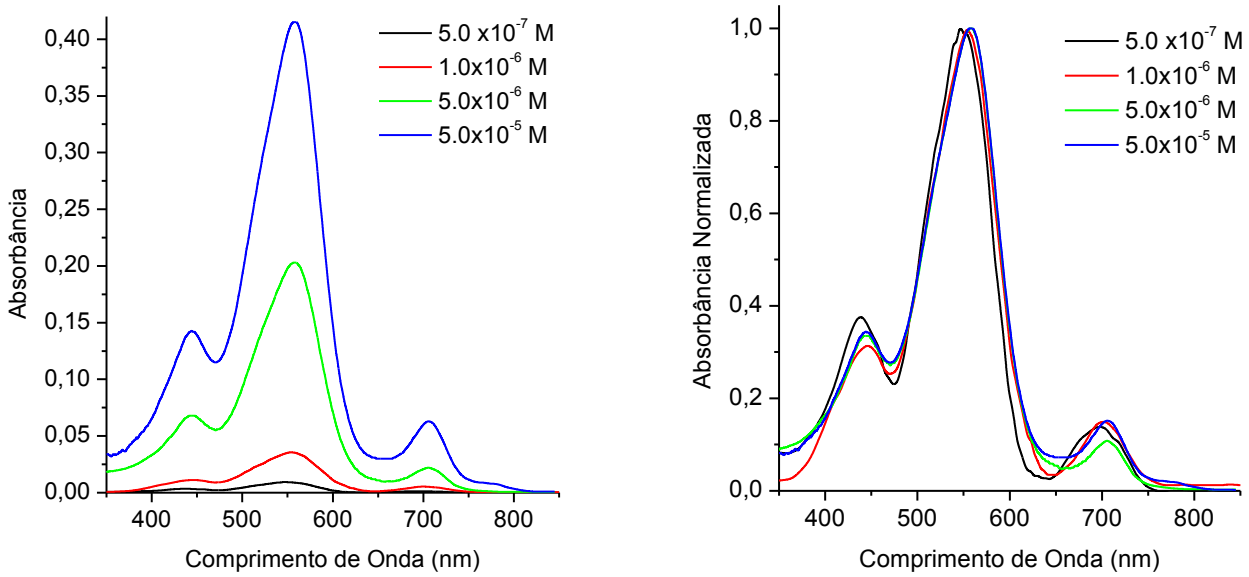


Figura A21. Espectro de absorção de UV na região do Vis-NIR do composto **2** em função da variação da concentração da solução em 1,4-Dioxano (esquerda) e seu respectivo espectro normalizado (direita).

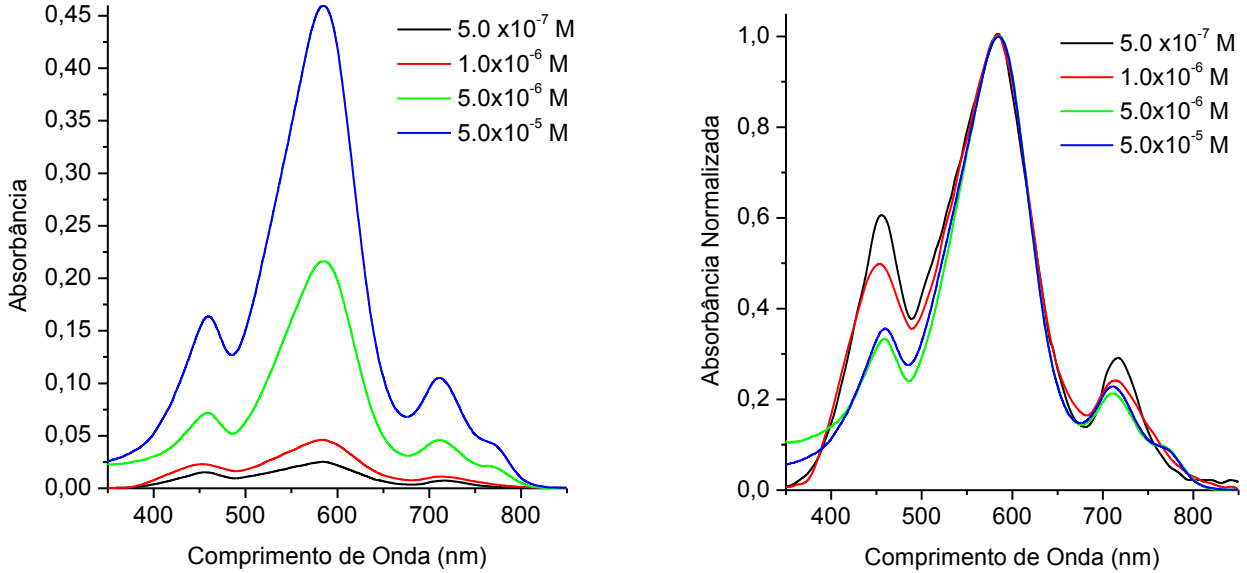


Figura A22. Espectro de absorção de UV na região do Vis-NIR do composto **2** em função da variação da concentração da solução em etanol (esquerda) e seu respectivo espectro normalizado (direita).

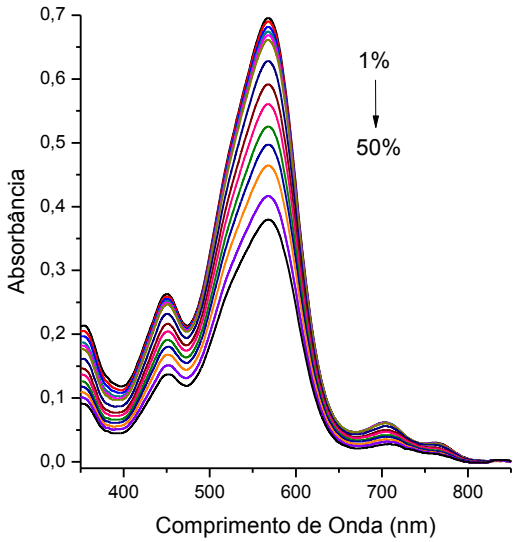


Figura A23. Espectro de absorção de UV na região do Vis-NIR do composto **2** em acetonitrila (~10^{-5} M) em diferentes proporções de água (1%-50%).

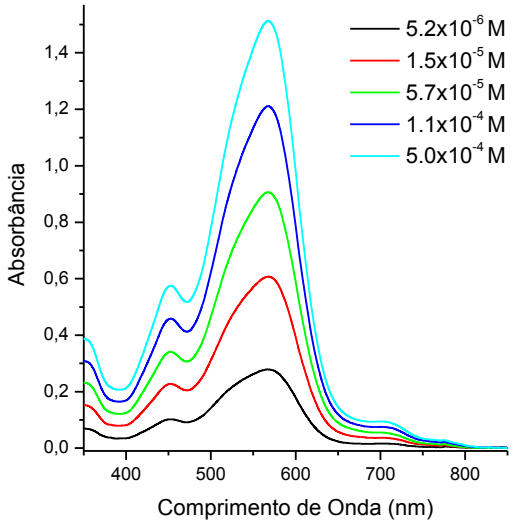


Figura A24. Espectro de absorção de UV na região do Vis-NIR do composto **2** em acetonitrila:água (1:1) (~10^{-5} M) em diferentes concentrações do corante.

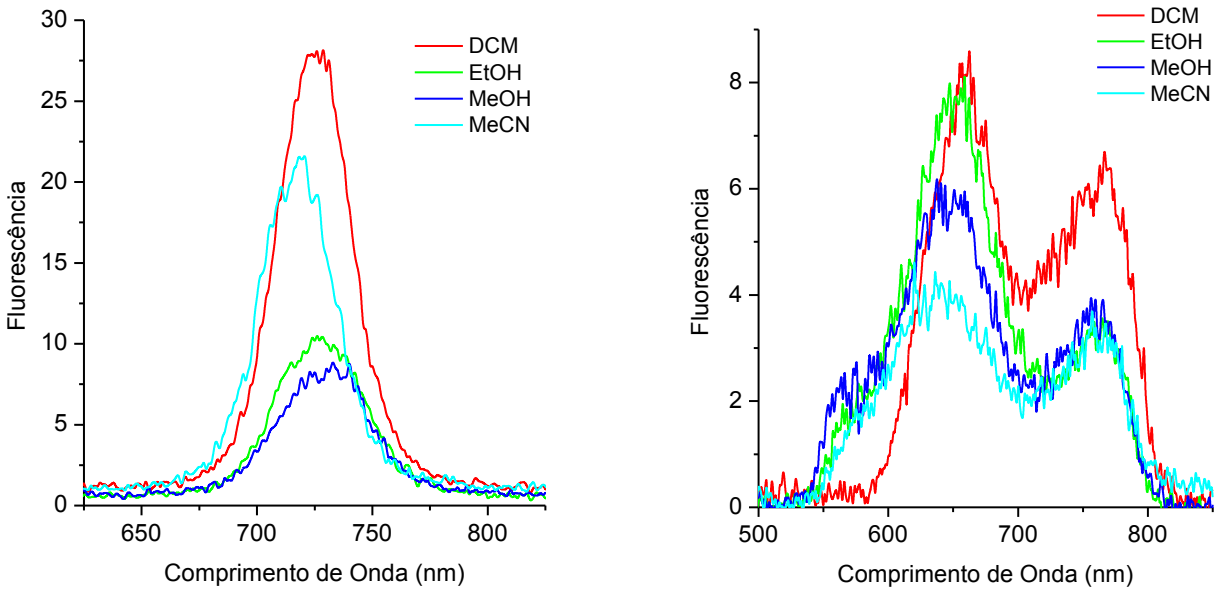


Figura A25. Espectro de emissão de fluorescência na região do Vis-NIR do composto **1**. λ_{EXC} = 703-712 nm (Figura da esquerda) e λ_{EXC} = 559-602 nm (Figura da direita).

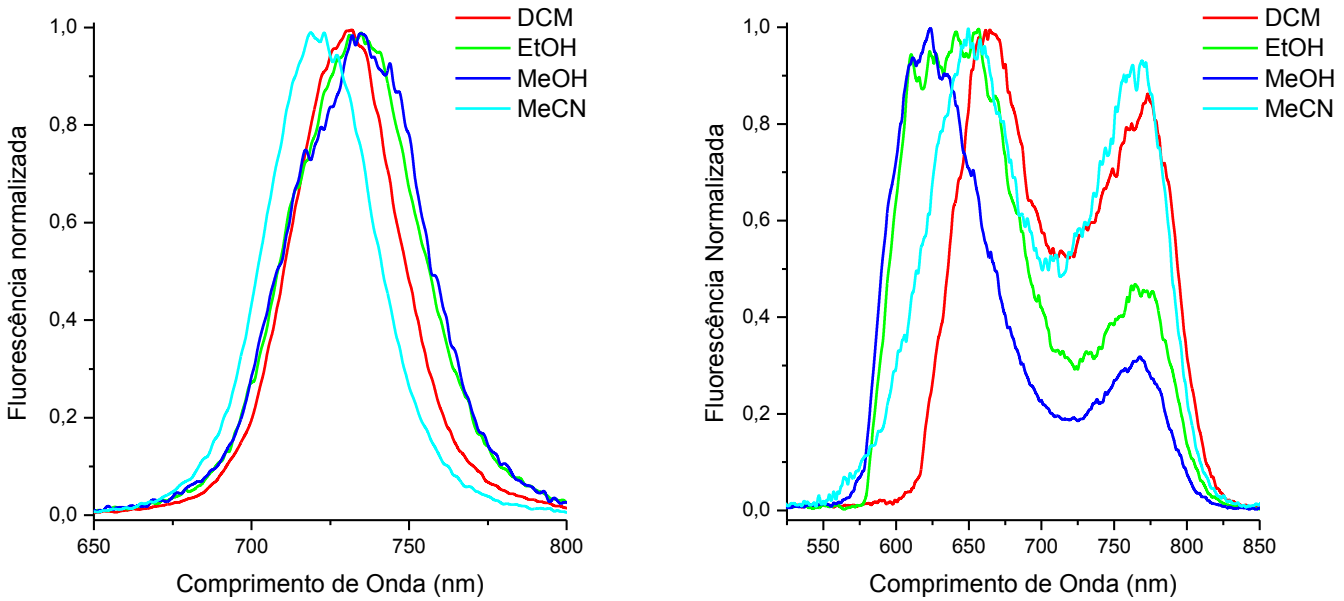


Figura A26. Espectro de emissão de fluorescência normalizada na região do Vis-NIR do composto **2**. λ_{EXC} = 708-711 nm (Figura da esquerda) e λ_{EXC} = 570-611 nm (Figura da direita).

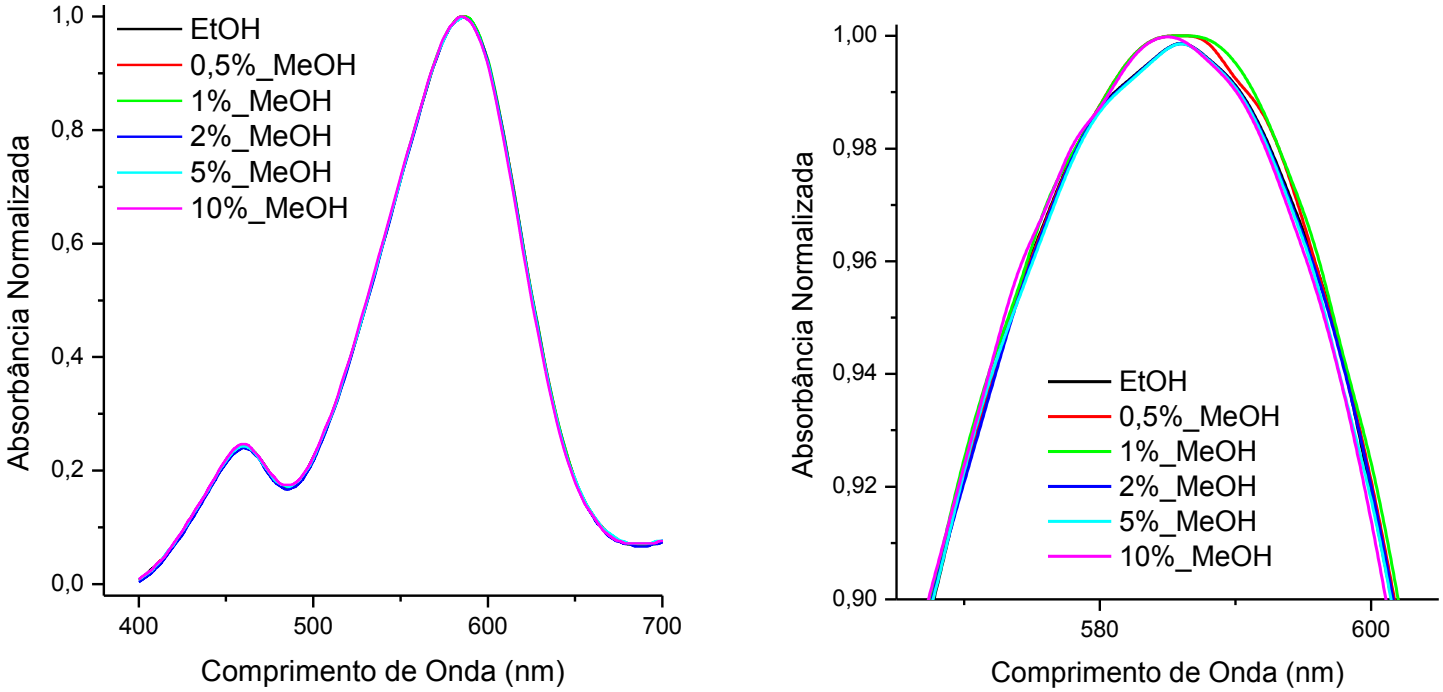


Figura A27. Espectro de absorção normalizado de UV na região do Vis-NIR do corante marcador **2** em soluções mais diluídas de metanol (esquerda) e região do máximo de absorção ampliada (direita).

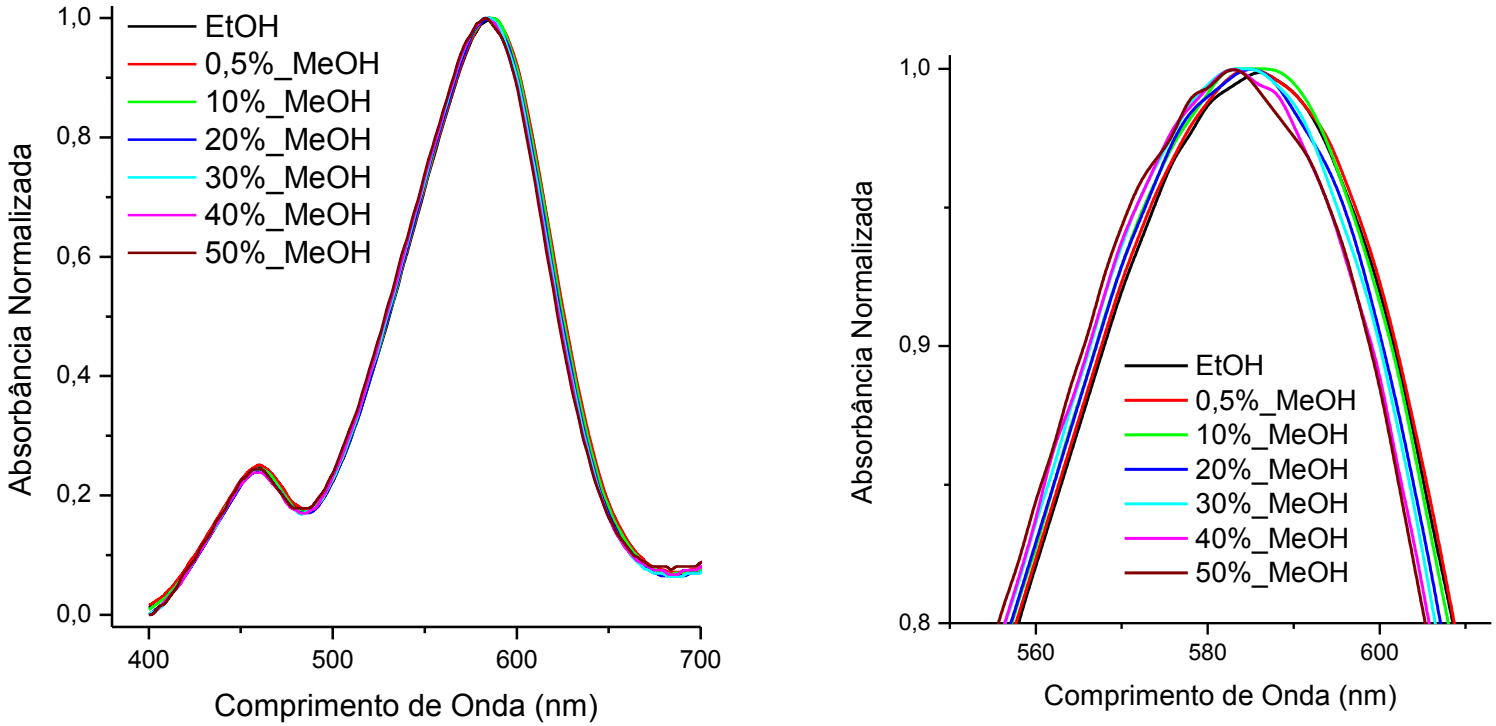


Figura A28. Espectro de absorção normalizado de UV na região do Vis-NIR do corante marcador **2** em soluções mais concentradas de metanol (esquerda) e região do máximo de absorção ampliada (direita).

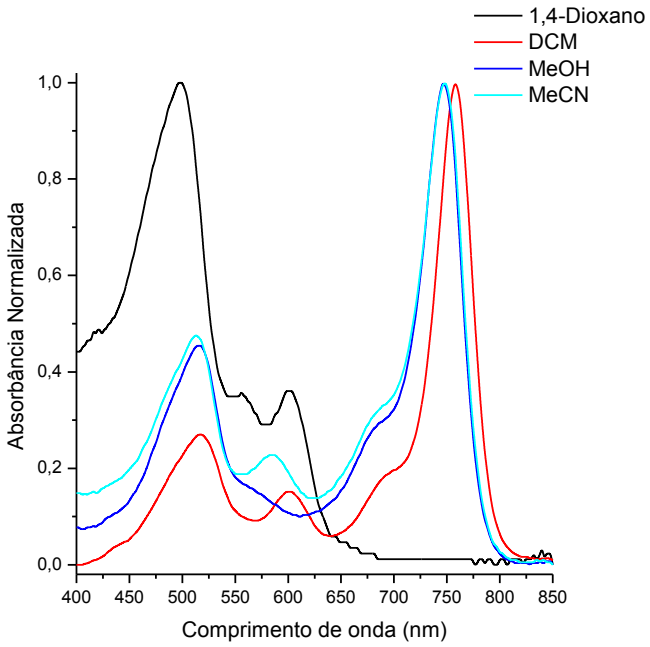


Figura A29. Espectro de absorção normalizado de UV na região do Vis-NIR do composto **30**.

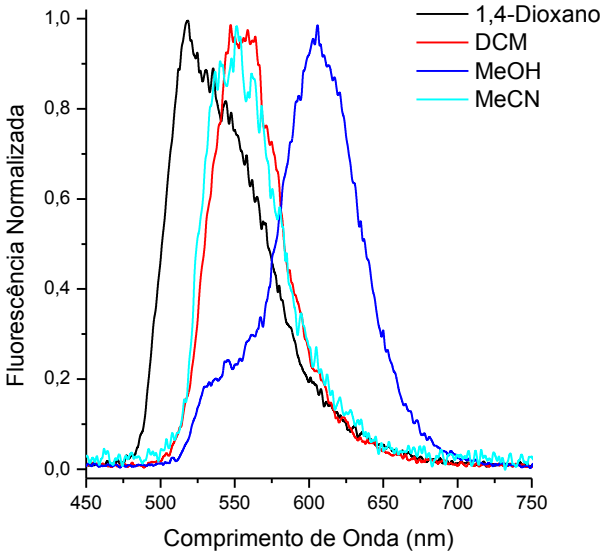
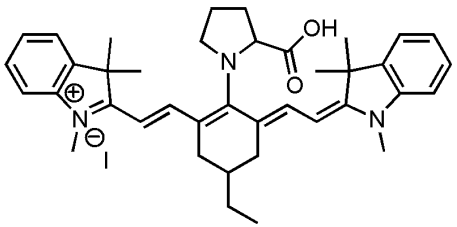


Figura A30. Espectro de emissão de fluorescência normalizado na região do Vis-NIR do composto **30** (λ_{EXC}=500 nm).

Tabela A3. Dados fotofísicos do composto **30** em solução, onde λ_{ABS} é o comprimento de onda de absorção e λ_{EM} é o comprimento de onda de emissão, dados em nanômetros (nm) e $\Delta\lambda_{ST}$ é o valor do deslocamento de Stokes (nm).

Composto	Solvente	λ_{ABS}	λ_{EM}	$\Delta\lambda_{ST}$	λ_{ABS}	λ_{EM}	$\Delta\lambda_{ST}$
 **(30)**	1,4-Dioxano	-	-	-	498	518	20
	Diclorometano	758	768	10	517	556	39
	Metanol	746	759	13	516	605	89
	Acetonitrila	747	758	11	513	551	38

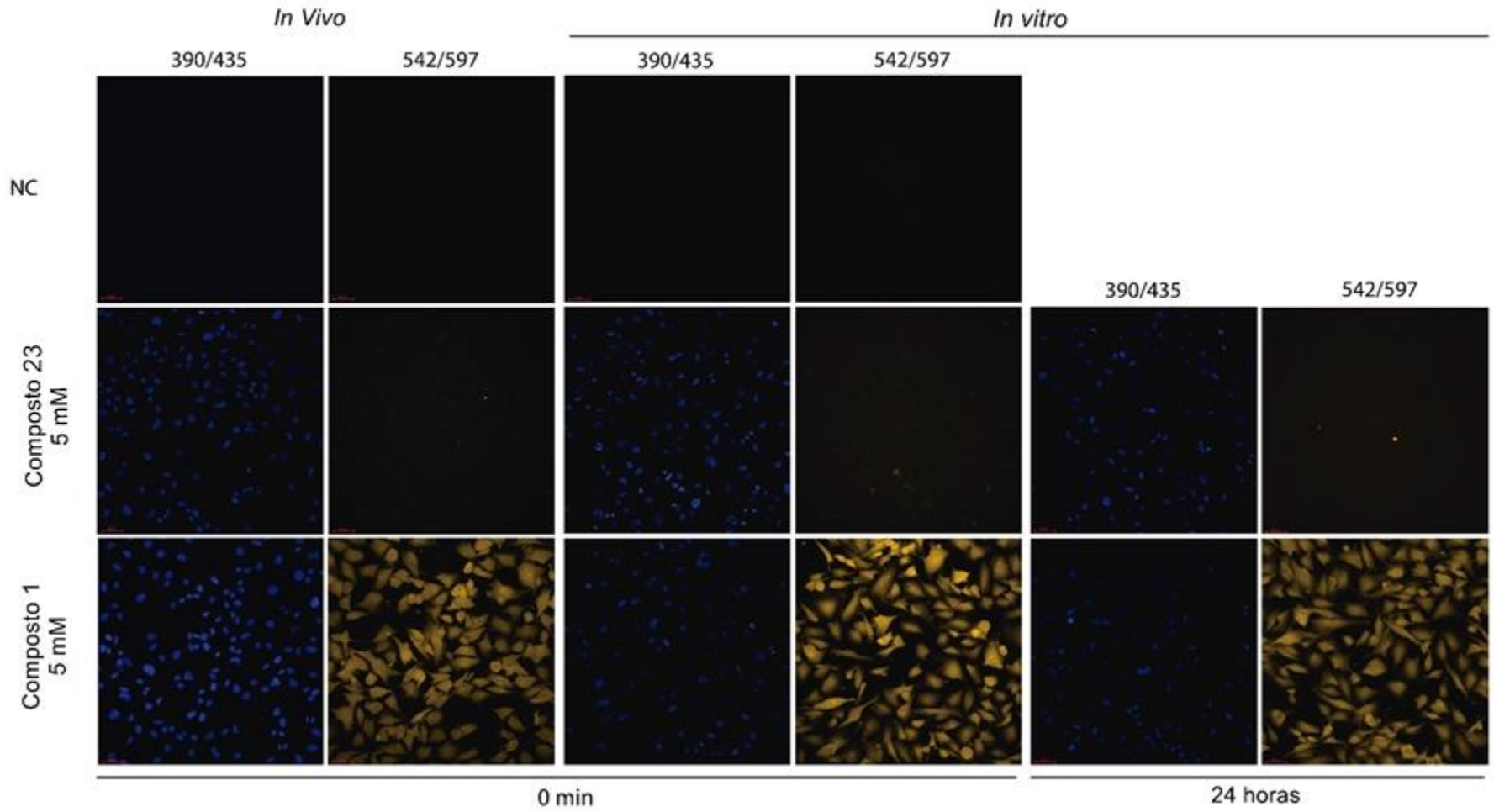


Figura A31. Bioimageamento *in vivo* e *in vitro* do composto **23** e do composto **1**.