

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

M.Sc. Marluza Pereira de Abreu Górga

**SÍNTESE E ESTUDO DAS PROPRIEDADES FOTOFÍSICAS DE
ESTREPTOCIANINAS ALTAMENTE CONJUGADAS**

Orientadora
Professora Dra. Leandra Franciscato Campo

Porto Alegre, Junho 2019

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

M.Sc. Marluza Pereira de Abreu Górga

**SÍNTESE E ESTUDO DAS PROPRIEDADES FOTOFÍSICAS DE
ESTREPTOCIANINAS ALTAMENTE CONJUGADAS**

Tese apresentada como requisito parcial para a
obtenção do grau de Doutor em Química

Orientadora
Professora Dra. Leandra Franciscato Campo

Porto Alegre, Junho 2019

A presente tese foi realizada inteiramente pelo autor, exceto as colaborações as quais serão devidamente citadas nos agradecimentos, no período entre maio de 2014 a junho de 2019, no Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul sob Orientação da Professora Doutora Leandra Franciscato Campo. A tese foi julgada adequada para a obtenção do título de Doutor em Química pela seguinte banca examinadora:

Comissão Examinadora:

Profa. Dra. Dione Silva Correa

Prof. Dr. Fabiano da Silveira Santos

Prof. Dr. Marco Antônio Ceschi

Prof.a Dra. Fernanda Poletto

Prof. Dra. Leandra Campo

M.Sc. Marluza Pereira de Abreu

Górga

Discente

Agradecimentos

À professora Leandra Campo pela orientação;

Aos colegas de laboratório pelo apoio e coleguismo no dia-a-dia;

Aos colegas da CORSAN, pelo incentivo e apoio;

Aos meus pais, pela dedicação, compreensão e amor;

Ao meu esposo, pelo amor incondicional;

À CAPES, pelo incentivo financeiro, fundamental para o desenvolvimento do trabalho.

Sumário

Lista de Figuras.....	xiii
Lista de Esquemas.....	xxv
Lista de Tabelas.....	xxvii
Abreviaturas e Símbolos.....	xxix
Resumo.....	xxxí
Abstract.....	xxxiii
1. Introdução.....	1
2. Objetivos.....	11
2.1. Objetivo Geral.....	11
2.2. Objetivos Específicos.....	11
3. Revisão Bibliográfica.....	13
3.1. Síntese das estreptocianinas.....	13
3.2. Formilação via Reagente de Vilsmeier-Haack.....	18
3.3. Síntese de Benzazóis.....	20
3.4. Espectroscopias de Absorção e Emissão.....	21
3.4.1. Efeitos que alteram as propriedades fotofísicas.....	24
3.5. Sondas ESIPT.....	26
3.6. Propriedades Espectroscópicas de Agregados Moleculares.....	28
3.6.1. Modelo Monômero-Dímero [132,133]:.....	34
3.6.2. Modelo Isodésmico ou K Igual [131–133]:.....	36
3.6.3. Modelo Isodésmico Modificado ou K ₂ -K [131–133]:.....	38
3.7. Sensores Fluorescentes.....	40
3.8. Sondas de Proteínas.....	44
4. Resultados e Discussão.....	53

4.1. Síntese das Estreptocianinas.....	53
4.2. Caracterização Fotofísica	75
4.2.1. Estreptocianinas contendo núcleo benzoxazol	75
4.2.2. Estreptocianinas contendo núcleo benzotiazol	97
4.2.3. Estreptocianina contendo núcleo benzimidazol	115
4.2.4. A emissão ESIPT na estreptocianina 27	121
4.2.5. Absorção no estado sólido das estreptocianinas 19-27	122
4.3. Caracterização dos agregados em etanol	124
4.4. Complexação com Proteína BSA	129
4.5. Sensores de pH.....	143
5. Parte Experimental.....	157
5.1. Materiais e Equipamentos.....	157
5.2. Síntese dos heterociclos 2-(5'-amino-2'-hidroxifenil)benzazóis.....	157
5.2.1. 2-(5'-amino-2'-hidroxifenil)benzoxazol (86).....	158
5.2.2. 2-(5'-amino-2'-hidroxifenil)benzotiazol (87).....	158
5.2.3. 2-(5'-amino-2'-hidroxifenil)benzimidazol (88).....	159
5.3. Síntese das Estreptocianinas 19 – 27	159
5.3.1. Estreptocianina bis-(benzoxazolil-hidroxifenilamino) (19).....	160
5.3.2. Metilestreptocianina bis-(benzoxazolil-hidroxifenilamino) (20)...	160
5.3.3. Etilestreptocianina bis-(benzoxazolil-hidroxifenilamino) (21)	161
5.3.4. Tercbutilestreptocianina bis-(benzoxazolil-hidroxifenilamino) (22)	161
5.3.5. Estreptocianina bis-(benzotiazolil-hidroxifenilamino) (23).....	162
5.3.6. Metilestreptocianina bis-(benzotiazolil-hidroxifenilamino) (24)...	162
5.3.7. Etilestreptocianina bis-(benzoxazolil-hidroxifenilamino) (25)	163
5.3.8. Tercbutilestreptocianina bis-(benzoxazolil-hidroxifenilamino) (26)	164

5.3.9. Estreptocianina bis-(benzimidazolil-hidroxifenilamino) (27)	164
5.4. Caracterização Fotofísica.....	165
5.5. Estudo de Agregados.....	165
5.6. Estudo da Interação com BSA	165
5.7. Estudo de pH	166
6. Considerações Finais.....	167
Referências	169
Anexos	188

Lista de Figuras

- Figura 1:** Ilustração da origem da palavra fluorescência, criada por Stokes. Baseado em [3] 1
- Figura 2:** Primeira cianina obtida por Williams, também conhecida por PIC (do inglês *pseudoisocyanine chloride*).[8]..... 2
- Figura 3:** Diferentes tipos de corantes polimetínicos: as estreptocianinas que possuem cadeia aberta; as hemicianinas onde uma das extremidades é de cadeia fechada; e as cianinas contendo duas extremidades de cadeia fechada. Baseado em [14]. 2
- Figura 4:** Exemplos de corantes polimetínicos do tipo esquaraínas **2** e **3** e cianinas **4**. [15] 3
- Figura 5:** Cianinas comerciais contendo diferentes tamanhos da cadeia polimetínica, bem como diferentes núcleos indólicos nas extremidades. Abaixo são os espectros de absorção (A) e emissão de fluorescência (B), bem como o deslocamento batocrômico observado em decorrência do aumento da conjugação.[28] 4
- Figura 6:** Análise de dados obtida pela plataforma Scopus mostrando o número de publicações por ano, a partir de 1960, com paravras chave *Cyanine* para o gráfico superior e *Streptocyanine* para o gráfico inferior. Busca realizada em 5 de maio de 2019..... 6
- Figura 7:** Exemplos de estruturas que fazem transferência protônica intramolecular no estado excitado - ESIPT. 7
- Figura 8:** Corantes contendo ESIPT com emissão na região do vermelho. [53–55] 8
- Figura 9:** Estreptocianinas desenvolvidas no presente trabalho, contendo em suas extremidades núcleos derivados de benzazóis. 9
- Figura 10:** Diagrama de Perrin-Jablonski ilustrando os processos radiativos e não-radiativos bem como as posições relativas dos espectros de absorção,

fluorescência e fosforescência. As linhas contínuas e pontilhadas representam processos radiativos, e as linhas onduladas representam os processos não radiativos. Baseado em [81]. 22

Figura 11: Esquema representativo acerca das denominações empregadas para descrever mudanças de intensidade e de deslocamento ao longo dos espectros. 23

Figura 12: Efeitos de orientação eletrônica e relaxação do solvente, considerando os momentos de dipolo do estado fundamental (μ_F) e do estado excitado (μ_G) da molécula, com diferentes respostas em termos de energia, conforme solvatação da molécula frente às características do solvente. Baseado em [77]. 26

Figura 13: Mecanismo de absorção de fótons para 2-(benzoxazol-2-il)fenol **75a**, bem como as possíveis emissões de fluorescência, tanto da forma Enol* quanto da forma Ceto* (**75b**). À direita um possível espectro de emissão com as formas Enol* e Ceto* 27

Figura 14: Esquema de arranjo espacial para agregados *H* (esquerda) e agregados *J* (direita), bem como suas diferenças energéticas entre estados fundamental e excitado, comparadas com o monômero (centro). Baseado em [119]. 30

Figura 15: Diagrama de níveis de energia para a estrutura monomérica e seus agregados, com diferentes ângulos de deslizamento (α), com representação esquemática de agregados de cianinas. Baseado em [119] 31

Figura 16: Diagramas de energia para formação de agregados considerando rotação torcional das estruturas: na esquerda o ângulo θ varia de 0 a 90°, indicando variações energéticas espectrais para a formação de agregados *H*; e à direita, com ângulos de deslizamento diferentes de 90°, indicando diferentes níveis de energia resultantes, conforme as resultantes do momento de dipolo dos agregados formados. Baseado em [119,123]. 32

Figura 17: Esquemas representativos dos tipos de polimerização supramolecular. Acima o modelo isodésmico, onde cada equilíbrio é

representado por uma constante de equilíbrio K de igual valor. Abaixo, o modelo cooperativo ou anti-cooperativo, onde a auto-organização é dada por duas distintas constantes de equilíbrio: a constante de dimerização K_2 e a constante de nucleação K . Baseado em [131]..... 34

Figura 18: Gráfico relacionando concentração de monômero e concentração total das espécies para diferentes valores de p , conforme modelo isodésmico modificado. 40

Figura 19: Esquema relacionando a emissão de fluorescência com diversos parâmetros capazes de influenciar na emissão de fluorescência. 41

Figura 20: Esquemática mostrando as formas de operação de sensores fluorescentes. Baseado em [144]. 42

Figura 21: Exemplos de cianinas e seus diferentes pH ou pK_a 43

Figura 22: Estruturas de ressonância da fluoresceína diacetato **81** (FDA F1303) e seus espectros de absorção (A) e emissão (B) variando o pH ; e em (C) estruturas do SNARF **82** e seu uso em imageamento celular em neutrófilos humanos (D).[147]..... 44

Figura 23: Exemplos de cianinas com grupos succinimidil éter para ligação covalente com aminas presentes em proteínas. [19] 46

Figura 24: Fotos das estreptocianinas **20** e **26**, apresentando coloração azul a verde iridescentes. 55

Figura 25: Espectro de 1H -RMN e de ^{13}C -RMN (APT) em TFA-*d* para **86**. 58

Figura 26: Espectro de 1H -RMN (400 MHz) em TFA-*d* para **19**. 59

Figura 27: Espectro de ^{13}C -RMN (APT – 75,4 MHz) em TFA-*d* para **19**. 59

Figura 28: Espectro de 1H -RMN (400 MHz) em TFA-*d* para **20**. 60

Figura 29: Espectro de ^{13}C -RMN (APT - 100 MHz) em TFA-*d* para **20**. 61

Figura 30: Espectro de 1H -RMN (400 MHz) em TFA-*d* para **21**. 62

Figura 31: Espectro de ^{13}C -RMN (75,4 MHz) em TFA- <i>d</i> para 21	62
Figura 32: Espectro de ^1H -RMN (400 MHz) em TFA- <i>d</i> para 22	63
Figura 33: Espectro de ^{13}C -RMN (100 MHz) em TFA- <i>d</i> para 22	64
Figura 34: Espectro de ^1H -RMN (400 MHz) e de ^{13}C -RMN (APT - 100 MHz) em TFA- <i>d</i> para 87	65
Figura 35: Espectro de ^1H -RMN (400 MHz) em TFA- <i>d</i> para 23	66
Figura 36: Espectro de ^{13}C -RMN (APT – 75,4 MHz) em TFA- <i>d</i> para 23	66
Figura 37: Espectro de ^1H -RMN (400 MHz) em TFA- <i>d</i> para 24	67
Figura 38: Espectro de ^{13}C -RMN (75,4 MHz) em TFA- <i>d</i> para 24	67
Figura 39: Espectro de ^1H -RMN (400 MHz) em TFA- <i>d</i> para 25	68
Figura 40: Espectro de ^{13}C -RMN (100 MHz) em TFA- <i>d</i> para 25	69
Figura 41: Espectro de ^1H -RMN (400 MHz) em TFA- <i>d</i> para 26	70
Figura 42: Espectro de ^{13}C -RMN (ATF - 100 MHz) em TFA- <i>d</i> para 26	70
Figura 43: Espectro de ^1H -RMN (400 MHz) e de ^{13}C -RMN (100 MHz) em DMSO- <i>d</i> ₆ para 88	71
Figura 44: Espectro de ^1H -RMN (400 MHz) em DMSO- <i>d</i> ₆ para 27	72
Figura 45: Espectro de ^{13}C -RMN (75,4 MHz) em DMSO- <i>d</i> ₆ para 27	73
Figura 46: Espectros de absorção (esquerda) e de emissão de fluorescência (direita) para 19 (10 $\mu\text{mol/L}$) em DMSO, DMF, acetato de etila e dioxano.....	76
Figura 47: Espectros de absorção com estudo de diluição para 19 em etanol (A), acetonitrila (B) e CHCl_3 (C).	78
Figura 48: Espectros de emissão de fluorescência para 19 (10 $\mu\text{mol/L}$) em etanol, acetonitrila e clorofórmio associados à banda monomérica (esquerda) e à banda de agregados <i>J</i> (direita).....	79

Figura 49: Espectros de absorção para 20 (A) em AcOEt, DMF e DMSO, e as curvas se superfície relacionando os comprimentos de onda de emissão com os comprimentos de onda de excitação em AcOEt (B) e DMSO (C), todos em concentração de 10 μ M.	80
Figura 50: Processos de absorção e emissão possíveis e observados para as estreptocianinas.	81
Figura 51: Espectros de absorção para os solventes em que houve formação de agregados de 20 em dioxano (A) e acetonitrila (B).	82
Figura 52: Espectros de absorção para os solventes etanol (A) e clorofórmio (B) com formação de agregados de 20	83
Figura 53: Curvas de superfície de emissão de fluorescência com os respectivos espectros de absorção à esquerda, para 20 em presença de agregados para dioxano (A) e acetonitrila (B), com concentrações de 25 μ M.	84
Figura 54: Curvas de superfície de emissão de fluorescência com os respectivos espectros de absorção à esquerda, para 20 em presença de agregados para etanol (A) e clorofórmio (B), com concentrações de 25 μ M.	85
Figura 55: Espectros de absorção para 21 (A) em acetato de etila e DMF, e curva se superfície da emissão de fluorescência em acetato de etila (B) e DMF (C).	86
Figura 56: Espectros de absorção de 21 , em solventes que formaram agregados: (A) dioxano, (B) DMSO e (C) MeCN, em diversas concentrações.	87
Figura 57: Espectros de absorção de 21 , em solventes que formaram agregados: (A) etanol e (B) clorofórmio, em diversas concentrações.	88
Figura 58: Curvas de superfície de emissão de fluorescência com os respectivos espectros de absorção à esquerda, para 21 em solventes em que houve formação de agregados: (A) dioxano, (B) DMSO e (C) acetonitrila, em concentrações de 25 μ M.	89
Figura 59: Curvas de superfície de emissão de fluorescência com os respectivos	

espectros de absorção à esquerda, para 21 em solventes em que houve formação de agregados: (A) etanol e (B) clorofórmio, em concentrações de 25 μM	90
Figura 60: Espectros de absorção para 22 (A) em DMF e DMSO, e curva se superfície da emissão de fluorescência em DMF (B) e DMSO (C).	91
Figura 61: Espectros de absorção nos solventes em que houve formação de agregados de 22 : (A) dioxano e (B) acetato de etila.	92
Figura 62: Espectros de absorção nos solventes em que houve formação de agregados de 22 : (A) acetonitrila, (B) etanol e (C) clorofórmio.	93
Figura 63: Curvas de superfície de emissão de fluorescência com os respectivos espectros de absorção à esquerda, para 22 , em solventes em que houve formação de agregados: (A) dioxano e (B) acetato de etila.	94
Figura 64: Curvas de superfície de emissão de fluorescência com os respectivos espectros de absorção à esquerda, para 22 em solventes em que houve formação de agregados: (A) acetonitrila, (B) etanol e (C) clorofórmio.	95
Figura 65: Espectros de absorção (esquerda) e emissão de fluorescência (direita) para 23 (10 $\mu\text{mol/L}$) em DMSO e DMF com concentração de 10 $\mu\text{mol/L}$ e acetonitrila e dioxano com concentrações desconhecidas.....	97
Figura 66: Espectros de absorção (A) para 23 em etanol e espectros de emissão de fluorescência (B) (10 $\mu\text{mol/L}$) associados às bandas de monômero e agregado.	98
Figura 67: Espectro de absorção para 24 (direita) em DMF, e curva se superfície da emissão de fluorescência em DMF (direita).	99
Figura 68: Espectros de absorção para os solventes em que houve formação de agregados de 24 : (A) dioxano, (B) DMSO e (C) acetonitrila.	100
Figura 69: Espectros de absorção para os solventes em que houve formação de agregados de 24 : etanol (A) e clorofórmio (B).....	101

Figura 70: Curvas de superfície de emissão de fluorescência com os respectivos espectros de absorção à esquerda, para 24 em solventes em que houve formação de agregados: (A) dioxano, (B) DMSO e (C) acetonitrila.....	102
Figura 71: Curvas de superfície de emissão de fluorescência com os respectivos espectros de absorção à esquerda, para 24 em solventes em que houve formação de agregados: (A) etanol e (B) clorofórmio.....	103
Figura 72: Espectros de absorção para 25 (A) em acetato de etila e DMF, e curva se superfície da emissão de fluorescência em acetato de etila (B) e DMF (C).	104
Figura 73: Espectros de absorção para os solventes em que houve formação de agregados de 25 : (A) dioxano, (B) DMSO e (C) acetonitrila.	105
Figura 74: Espectros de absorção para os solventes em que houve formação de agregados de 25 : (A) etanol e (B) clorofórmio.....	106
Figura 75: Curvas de superfície de emissão de fluorescência com os respectivos espectros de absorção à esquerda, para 25 em solventes em que houve formação de agregados: (A) dioxano, (B) DMSO e (C) acetonitrila.....	107
Figura 76: Curvas de superfície de emissão de fluorescência com os respectivos espectros de absorção à esquerda, para 25 em solventes em que houve formação de agregados: (A) etanol e (B) clorofórmio.....	108
Figura 77: Espectro de absorção para 26 (esquerda) em, e curva se superfície da emissão de fluorescência em DMF (direita).	108
Figura 78: Espectros de absorção para os solventes em que houve formação de agregados de 26 : (A) dioxano e (B) acetato de etila.	109
Figura 79: Espectros de absorção para os solventes em que houve formação de agregados de 26 : (A) DMSO e (B) acetonitrila.....	110
Figura 80: Espectros de absorção para os solventes em que houve formação de agregados de 26 : (A) etanol e (B) clorofórmio.....	111

Figura 81: Curvas de superfície de emissão de fluorescência com os respectivos espectros de absorção à esquerda, para 26 em solventes em que houve formação de agregados: (A) dioxano, (B) acetato de etila e (C) DMSO.....	112
Figura 82: Curvas de superfície de emissão de fluorescência com os respectivos espectros de absorção à esquerda, para 26 em solventes em que houve formação de agregados: (A) acetonitrila, (B) etanol e (C) clorofórmio.	113
Figura 83: Espectros de absorção (esquerda) e de emissão de fluorescência (direita) para 27 em dioxano (preto) e DMF (azul) com concentração de 10 $\mu\text{mol/L}$	115
Figura 84: Espectros de absorção para 27 em (A) DMSO e (B) etanol.....	116
Figura 85: Espectros de emissão de fluorescência para 27 (25 $\mu\text{mol/L}$) relacionados à banda monomérica (esquerda) e à banda de agregados <i>J</i> (direita).	117
Figura 86: Espectros de absorção (A) e emissão de fluorescência (B) com variação de temperatura para 27 , e na direita, superior a relação temperatura e intensidade de fluorescência.	118
Figura 87: Emissão ESIPT em etanol para 27 , com excitação em 355 nm...	121
Figura 88: Espectros de absorção por reflectância difusa (DRUV) para as estreptocianinas 19 a 27	122
Figura 89: Espectros de absorção por reflectância difusa (DRUV) para as estreptocianinas em filme.....	123
Figura 90: Espectros de absorção em etanol variando a concentração para as estreptocianinas 19 (A), 20 (B), 21 (C) e 22 (D).	125
Figura 91: Espectros de absorção em etanol variando a concentração para as estreptocianinas 23 (A), 24 (B), 25 (C) e 26 (D).	125
Figura 92: Resultados experimentais obtidos no gráfico acima para os derivados de oxigênio, e no gráfico abaixo, para os derivados de enxofre, em pontos,	

apresentados juntamente com os dados teóricos para diferentes valores de ρ , em linha contínua..... 127

Figura 93: Espectros de absorção para BSA (preto - inferior) e BSA+estreptocianina (demais espectros): **19 (A)**, **20 (B)**, **21 (C)** e **22 (D)**. Todos os espectros com concentração de BSA constante (10 μM) e concentração de corante variando de 2 a 80 μM 130

Figura 94: Espectros de absorção para BSA (preto - inferior) e BSA+estreptocianina: **23 (A)**, **24 (B)**, **25 (C)** e **26 (D)**. Todos os espectros com concentração de BSA constante (10 μM) e concentração de corante variando de 2 a 80 μM 131

Figura 95: Espectros de absorção para BSA (preto) e BSA+estreptocianina **27**. Todos os espectros com concentração de BSA constante (10 μM) e concentração de corante variando de 2 a 80 μM 131

Figura 96: Espectros de emissão de fluorescência da BSA, com excitação em 280 nm e concentração de 10 μM de BSA, e os comparativos com adição dos corantes **19 (A)**, **20 (B)**, **21 (C)** e **22 (D)**, bem como o gráfico no anexo superior, relacionando as intensidades de fluorescência com a concentração de supressor experimentais (preto) e corrigidos (vermelho). 132

Figura 97: Espectros de emissão de fluorescência da BSA, com excitação em 280 nm e concentração de 10 μM de BSA, e os comparativos com adição dos corantes **23 (A)**, **24 (B)**, **25 (C)** e **26 (D)**, bem como os gráficos no anexo superior, relacionando as intensidades de fluorescência com a concentração de supressor experimentais (preto) e corrigidos (vermelho). 133

Figura 98: Espectros de emissão de fluorescência da BSA, com excitação em 280 nm e concentração de 10 μM de BSA, e os comparativos com adição do corante **27**, bem como os gráficos no anexo superior relacionando as intensidades de fluorescência com a concentração de supressor experimentais (preto) e corrigidos (vermelho). 133

Figura 99: Gráficos para obtenção da constante de ligação e número de moléculas que interagem num sítio da proteína, em (A) as estreptocianinas

contendo núcleo benzoxazol, em (B) núcleo benzotiazol e em (C) núcleo benzimidazol.	134
Figura 100: Gráficos seguindo equação de Stern-Volmer para sistemas com supressão dinâmica: estreptocianinas contendo núcleo (A) benzoxazol, (B) benzotiazol e (C) benzimidazol.	136
Figura 101: Gráficos com os resultados de [estreptocianina] <i>versus</i> K_{ap} , lineares: estreptocianinas contendo núcleo (A) benzoxazol, (B) benzotiazol e (C) benzimidazol.	137
Figura 102: Gráficos relacionando F_0/F com [estreptocianina] e os ajustes não lineares, seguindo a equação que contém fator que determina a esfera efetiva de supressão estática: estreptocianinas contendo núcleo (A) benzoxazol, (B) benzotiazol e (C) benzimidazol.	138
Figura 103: Espectros de fluorescência sincronizada com $\Delta\lambda = 15$ nm (tirosina) à esquerda (19 (A1), 20 (B1), 21 (C1) e 22 (D1)) e $\Delta\lambda = 60$ nm à direita (triptofano) (19 (A2), 20 (B2), 21 (C2) e 22 (D2)).	141
Figura 104: Espectros de fluorescência sincronizada com $\Delta\lambda = 15$ nm (tirosina) à esquerda (23 (A1), 24 (B1), 25 (C1) e 26 (D1)) e $\Delta\lambda = 60$ nm à direita (triptofano) (23 (A2), 24 (B2), 25 (C2) e 26 (D2)).	142
Figura 105: Espectros de fluorescência sincronizada com $\Delta\lambda = 15$ nm (tirosina) (A1) e $\Delta\lambda = 60$ nm (triptofano) (A2), para 27	143
Figura 106: Espectros de absorção para 19 (A) e 20 (B), variando o pH.	144
Figura 107: Espectros de absorção para 21 (A) e 22 (B), variando o pH.	145
Figura 108: Espectros de absorção de 23 (A), 24 (B), variando o pH.	146
Figura 109: Espectros de absorção de 25 (A), 26 (B), variando o pH.	147
Figura 110: Espectros de absorção para 27 em diversos pHs.	148
Figura 111: Proposta com possíveis estruturas, com variação do pH, para 19	149

Figura 112: Imagens da coloração das soluções com a variação do pH, da esquerda para a direita, do pH mais ácido ao mais básico analisado para as estruturas 23, 24, 25 e 26	149
Figura 113: Espectros de emissão com excitação em 340 nm para as estruturas 19 e 20	150
Figura 114: Espectros de emissão com excitação em 340 nm para as estruturas 21 e 22	151
Figura 115: Espectros de emissão com excitação em 340 nm para as estruturas 23 e 24	152
Figura 116: Espectros de emissão com excitação em 340 nm para as estruturas 25 e 26	153
Figura 117: Espectros de emissão com excitação em 340 nm para a estrutura 27	154
Figura 118: Curvas da variação de intensidade de fluorescência relacionadas com o pH para a obtenção do pK_a , para 19, 20, 21 e 22 no gráfico (A), para 23, 24, 25 e 26 no gráfico (B) e para 27 no gráfico (C).	155
Figura 119: Esquema da variação de emissão de fluorescência, conforme variação do pH para os derivados oxigenados 19, 20, 21 e 22	156

Lista de Esquemas

Esquema 1: Rota de obtenção de estreptocianinas a partir de acetaldeídos glucônicos.[57]	13
Esquema 2: Estrutura da estreptocianina 33 , empregada como intermediária na obtenção de cianinas.	14
Esquema 3: Estreptocianinas 35 obtidas a partir de tris(dialquilamino)arsenos e sais de pirílio.[64]	14
Esquema 4: Obtenção de estreptocianinas 37 a partir de ariletanonas.[65] ...	15
Esquema 5: Estreptocianinas de cadeia heptametínica (38 a 42) obtidas através da substituição do acetato de 37b por diversas aminas.[66].....	15
Esquema 6: Estreptocianinas (45 a 47) obtidas a partir da cadeia polimetínica 44 .[67]	16
Esquema 7: Estreptocianinas 48a a 48h contendo cadeia cíclica em sua porção polimetínica bem como a substituição do cloro por morfolina em 48d levando à estreptocianina 49 .[68]	17
Esquema 8: Estreptocianinas 50a a 50o com atividade antiplasmodial. [69]..	18
Esquema 9: Mecanismo de obtenção do reagente de Vilsmeier-Haack 59 .[72]	19
Esquema 10: Exemplos de diferentes formulações com o emprego do reagente de Vilsmeier-Haack frente a cetonas.[70].....	20
Esquema 11: Esquema geral de obtenção de benzazóis a partir de ácidos ou aldeídos.....	21
Esquema 12: Representação esquemática do fluoróforo sendo excitado e da possível relaxação via forma radiativa ou não-radiativa, representada por k_m , ou através da formação de “produtos” e supressão de fluorescência, através de k_q . Baseado em [165].	47

Esquema 13: Esquema de obtenção dos 2-(5'-amino-2'-hidroxifenil)benzazóis 86 a 88.	53
Esquema 14: Mecanismo de obtenção do 2-(5'-amino-2'-hidroxifenil)benzoxazol 86. Baseado em [177].	54
Esquema 15: Estreptocianinas 19 a 27 sintetizadas a partir dos aminobenzazóis 86-88.	55
Esquema 16: Mecanismo de formilação da cicloexanona 94a. Baseado em [178].	56
Esquema 17: Mecanismo proposto para a formação da estreptocianina 19...	57

Lista de Tabelas

Tabela I: Principais bandas dos espectros de infravermelho para as estreptocianinas	74
Tabela II: Pontos de fusão obtidos para as estreptocianinas 19-27	75
Tabela III: Dados obtidos para as estreptocianinas 19-22 para monômeros e agregados. Comprimentos de onda do máximo de absorção (λ_{abs}), coeficientes de absortividade molar (ϵ , $10^3 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$), comprimentos de onda do máximo de emissão (λ_{em}) e o deslocamento de Stokes (Δ_{ST}).....	96
Tabela IV: Resultados fotofísicos dos derivados de enxofre, com valores de máximos de absorção monoméricos, de agregados <i>J</i> e <i>H</i> (λ_{absmon} , λ_{absJ} e λ_{absH} em nm), coeficientes de absortividade molar (ϵ em $10^3 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) e máximos de emissão monoméricos, dos agregados <i>J</i> e deslocamentos de Stokes (λ_{emmon} , λ_{emJ} , Δ_{STmon} e Δ_{STJ} e em nm).....	114
Tabela V: Resultados fotofísicos obtidos para 27 , com valores de máximos de absorção monoméricos, de agregados <i>J</i> e <i>H</i> (λ_{absmon} , λ_{absJ} e λ_{absH} em nm), coeficientes de absortividade molar (ϵ em $10^3 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) e máximos de emissão monoméricos, dos agregados <i>J</i> e deslocamentos de Stokes (λ_{emmon} , λ_{emJ} , Δ_{STmon} e Δ_{STJ} e em nm).	119
Tabela VI: Dados coletados a partir dos espectros de absorção em etanol para as estreptocianinas: os valores de ϵ_{mon} , os valores de K e ρ , obtidos a partir dos dados experimentais ajustados à equação do modelo isodésmico modificado, bem como o valor de K_2 obtido a partir da definição de ρ e os valores de ΔG tanto para a formação de agregados maiores quanto para a formação de dímeros.	128
Tabela VII: Parâmetros de ligação e energia de Gibbs entre as estreptocianinas e BSA.	135
Tabela VIII: Dados experimentais coletados a partir das equações de reta para a equação considerando supressão dinâmica e esfera efetiva de supressão estática.....	140

Tabela IX: Relação dos pK_a encontrados. 155

Abreviaturas e Símbolos

ESIPT – do inglês *excited state intramolecular proton transfer*, que significa transferência protônica intramolecular no estado excitado.

BSA – do inglês *bovine serum albumin*, que significa albumina do soro bovino

PPE – polifosfato de éster

APF – ácido polifosfórico

ϵ – coeficiente de absorvidade molar

Φ_F – rendimento quântico de fluorescência

A_P – absorção para o padrão

A_A – absorção para a amostra

μ_F – momento de dipolo no estado fundamental

μ_E – momento de dipolo no estado excitado

ICT – do inglês *intramolecular charge transfer*, que significa transferência de carga intramolecular

TFA – ácido trifluoroacético

DMSO – dimetilsulfóxido

RMN – ressonância magnética nuclear

δ – deslocamento químico apresentado nos espectros de RMN, em ppm (partes por milhão)

TMS - tetrametilsilano

DIOX – 1,4-dioxano

AcOEt – acetato de etila

DMF –dimetilformamida

MeCN – acetonitrila

EtOH – etanol

ρ – constante para determinar a facilidade de formação de dímeros

c_T – concentração total de monômeros e agregados em solução

c_1 – concentração de monômeros em solução

K – constante de formação de agregados maiores que dímeros

K_2 – constante de formação de dímeros

R^2 – coeficiente de determinação

PBS – tampão fosfato salino

K_b – constante de ligação corante-proteína

m – número de moléculas que interagem com cada sítio da proteína

K_D ou K_{SV} – constante de supressão de fluorescência dinâmica

K_E – constante de supressão de fluorescência estática

K_q – constante de supressão

Resumo

Estreptocianinas são uma classe de corantes pouco investigadas na literatura. Cianinas com grande conjugação, possuem inúmeras publicações, e têm suas características e propriedades bem definidas na literatura. Estruturas contendo transferência protônica no estado excitado, fenômeno conhecido como ESIPT (do inglês *Excited State Proton Transfer*), possuem suas propriedades bem definidas, e em especial, suas propriedades fotofísicas, onde a dupla emissão de fluorescência é a principal característica. Das estruturas contendo ESIPT apresentadas na literatura, poucas apresentam grande conjugação. Dessa forma, esse trabalho objetivou sintetizar novas estreptocianinas contendo em sua estrutura, núcleos capazes de realizar ESIPT. Essas estruturas tiveram suas propriedades fotofísicas investigadas através de técnicas de espectroscopia de absorção e emissão de fótons. Observou-se que, em alguns solventes, houve formação de agregados. O processo ESIPT foi identificado para uma situação de diluição. Para compreender os agregados formados, estudos em etanol foram realizados e identificou-se a tendência de formar agregados maiores que dímeros. Além disso, investigações da interferência das estreptocianinas como supressores de fluorescência de BSA (albumina sérica bovina) foram realizadas. Foi observado que essas estruturas suprimem a emissão de fluorescência da proteína, atuando nos resíduos de triptofano, através de supressão estática. Além disso, verificou-se que as estreptocianinas podem ser utilizadas como sensores de pH. Observou-se a propriedade de sensor fluorimétrico, com emissão de fluorescência apenas em pH básico. Além disso, observou-se a propriedade de sensor colorimétrico, onde as soluções possuem coloração rosa a lilás em pH ácido, enquanto que em pH neutro e básico, a coloração amarela. Sendo assim, esse trabalho contribui de forma significativa na compreensão de processos fotofísicos mais complexos e traz um apanhado de informações inéditas sobre as estreptocianinas, suas propriedades e possíveis aplicações.

Abstract

Streptocyanines are a class of cyanine dyes with low number of publications on the literature. Cyanines with high conjugation have numerous publications, and have their characteristics and properties well defined. Structures containing proton transfer in the excited state, known as ESIPT (excited state proton transfer), have their properties well defined, and especially their photophysical properties, where the double emission of fluorescence is the main characteristic. Considering the structures containing ESIPT presented in the literature, few of them have great conjugation. Thus, this work aimed to synthesize new streptocyanines containing in their structure, the possibility of performing ESIPT. These structures had their photophysical properties investigated through absorption spectroscopy and photon emission techniques. It was observed that in some solvents aggregates were formed. The ESIPT process was identified for a dilution situation, whose fluorescence emission profile is characteristic of a portion of the molecule who performs ESIPT. To investigate the aggregates, studies of streptocyanines in ethanol were performed, and the tendency to form aggregates larger than dimers were identified. In addition, investigations of the performance of streptocyanines as suppressors of BSA (bovine serum albumin) fluorescence were performed. These structures suppressed the fluorescence emission of BSA, acting on the tryptophan residues, by means of static suppression. Moreover, it has been found that streptocyanines can be used as pH sensors. The fluorimetric sensor property was observed, with fluorescence emissions only at basic pHs, as well as the property of a colorimetric sensor, where the solutions have pink to lilac coloration at acidic pHs, while at neutral and basic pHs the yellow coloration were predominant. Thus, this work contributes significantly to understand the complex photophysical processes, and brings a collection of unpublished information on streptococyanines, their properties and possible applications.

1. Introdução

Os corantes luminescentes vêm chamando a atenção da ciência há muito tempo. No século XV, os conceitos de corantes luminescentes eram confundidos com o fenômeno de incandescência. Considera-se a fluorescência como sendo um fenômeno de luminescência (do latim *lumen* – luz). Esse fenômeno foi inicialmente introduzido em 1888 por Eilhardt Wiedemann, onde descreveu como sendo todos os fenômenos de luz que não são apenas condicionados pelo aumento da temperatura, sendo assim considerada uma luz fria, havendo assim a primeira distinção entre incandescência e luminescência.[1] Apenas no século XX, com o surgimento da teoria quântica, pôde-se realmente compreender o fenômeno de luminescência com mais clareza.

A luminescência é a emissão espontânea de luz de espécies eletronicamente ou vibracionalmente excitadas. Os compostos que emitem luminescência podem ser classificados como inorgânicos, organometálicos ou orgânicos. Os compostos considerados luminescentes são excitados através da absorção de fótons (luz) e podem ser fluorescentes ou fosforescentes.[2] O termo fluorescência foi cunhado por Stokes em seu trabalho onde comparou o fenômeno com o ocorrido na fluorita, a opalescência (cor e reflexos irizados, característicos da opala, uma pedra preciosa), utilizando o fluoro (de fluorita) + scência (de opalescência). Uma ilustração da origem da palavra está descrita na Figura 1.[3]

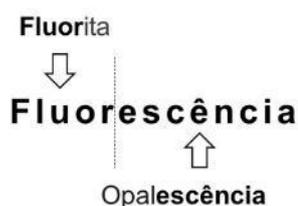


Figura 1: Ilustração da origem da palavra fluorescência, criada por Stokes. Baseado em [3]

Entre diversas classes de corantes, as cianinas têm se destacado em decorrência de suas propriedades bastante interessantes.[4–7] O estudo dessa classe iniciou-se em 1856, quando Williams obteve a cianina azul, através do tratamento da quinolina com iodeto de amila, seguido de amônia, levando à

estrutura **1** apresentada na Figura 2.[8] Essa síntese abriu caminho para a investigação de uma nova classe de corantes com propriedades iridescentes de coloração azul a verde escura.[5,9–12]

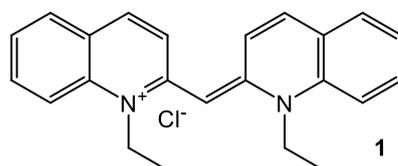


Figura 2: Primeira cianina obtida por Williams, também conhecida por PIC (do inglês *pseudoisocyanine chloride*).[8]

Atualmente, os corantes do tipo cianinas, que também são conhecidos como corantes polimetínicos, são classificados de acordo com os seus substituintes doadores de elétrons. Conforme Figura 3, essas estruturas caracterizam-se por uma cadeia polimetínica interligada por heteroátomos, sendo esses, nitrogênio, oxigênio entre outros.[13] Quando a ligação entre o heteroátomo e a cadeia polimetínica é do tipo aberta em ambas as extremidades, denominam-se estreptocianinas. Para o caso onde há uma cadeia fechada em uma das extremidades, essas são denominadas hemicianinas, enquanto que para as estruturas contendo cadeia fechada em ambas as extremidades, classificam-se como cianinas.[14]

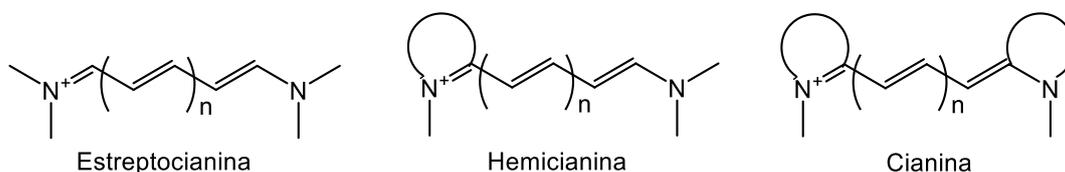


Figura 3: Diferentes tipos de corantes polimetínicos: as estreptocianinas que possuem cadeia aberta; as hemicianinas onde uma das extremidades é de cadeia fechada; e as cianinas contendo duas extremidades de cadeia fechada. Baseado em [14].

A Figura 4 mostra exemplos de corantes polimetínicos. Dentre eles, temos as esquaraínas (**2** e **3**), que se caracterizam por possuir em seu centro

polimetínico um núcleo esquárico, estrutura cíclica de 4 carbonos. Essas estruturas são do tipo zwitteriônicas, ou seja, possuem carga positiva e negativa conjugada.[15,16] Esse perfil estrutural leva a importantes características como alta conjugação, bons coeficientes de absorvidade molar e possuem deslocamento dos espectros conforme os substituintes, tanto no núcleo esquárico, quanto nos substituintes doadores de elétrons. Além disso, os substituintes alquílicos presentes no núcleo indólico são capazes de determinar propriedades como solubilidade e interações específicas. [17–22] De forma análoga, porém não sendo consideradas estruturas zwitteriônicas, temos as cianinas (4). Essas estruturas possuem diferentes deslocamentos espectrais conforme o tamanho da cadeia polimetínica e seus substituintes indólicos, assim como nas esquarainas. [23–26]

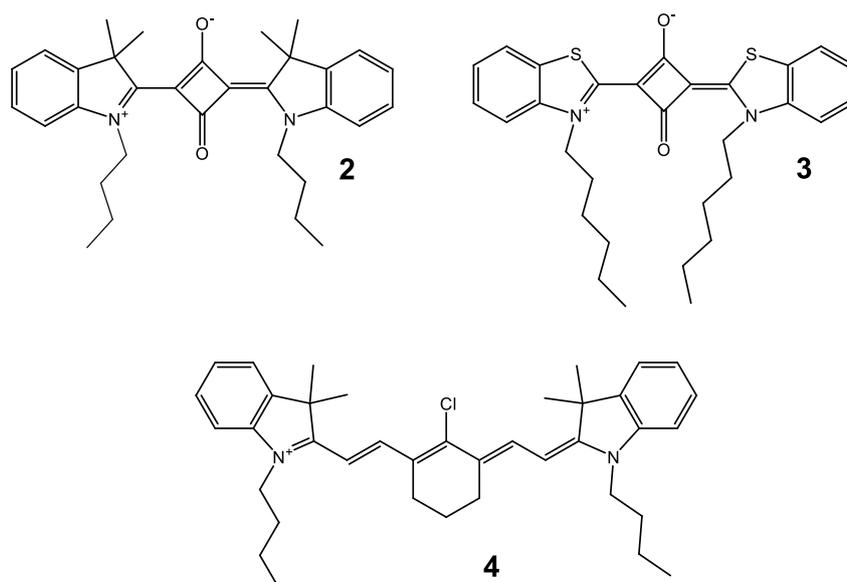


Figura 4: Exemplos de corantes polimetínicos do tipo esquarainas 2 e 3 e cianinas 4.[15]

O tamanho da cadeia polimetínica influencia diretamente nos comprimentos de onda de absorção e emissão desses corantes. Quanto maior a cadeia e mais deslocalizados os elétrons, maior é o deslocamento batocrômico (para maiores comprimentos de onda) dos espectros de absorção e emissão. Além disso, as cianinas possuem altos coeficientes de absorvidade molar.[27]

As cianinas ilustradas na Figura 5 são comercializadas pela Lumiprobe® como ligantes de proteínas, DNA, oligonucleotídeos, peptídeos, anticorpos, entre outros. É possível observar o deslocamento batocrômico nos espectros de absorção e emissão com o aumento da cadeia polimetínica e com o aumento da conjugação no núcleo indólico.[28]

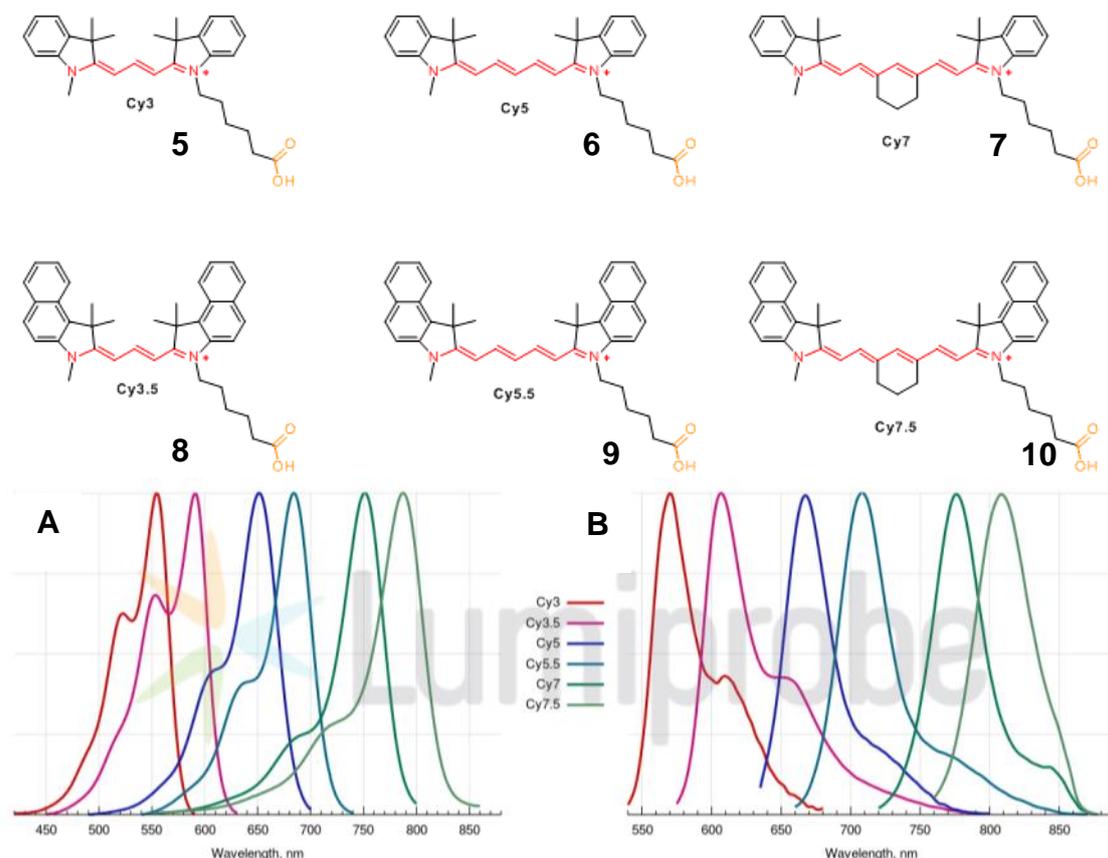


Figura 5: Cianinas comerciais contendo diferentes tamanhos da cadeia polimetínica, bem como diferentes núcleos indólicos nas extremidades. Abaixo são os espectros de absorção (A) e emissão de fluorescência (B), bem como o deslocamento batocrômico observado em decorrência do aumento da conjugação.[28]

Além disso, uma outra característica importante das cianinas é que elas podem formar agregados moleculares dependendo do pH, da sua estrutura e da polaridade do meio, resultando em diferentes características espectrais quando comparados com as suas formas monoméricas.[29–31] Isso faz com que os agregados atuem como espécies distintas das suas estruturas monoméricas, quando favorecidos. A formação de agregados característica das cianinas faz

com que elas sejam usadas como sensores da proteína sérica bovina (BSA). As interações entre a BSA e as cianinas desfavorece a formação de agregados que absorvem e emitem em diferentes comprimentos de onda, atuando assim como sensores ópticos de proteínas.[15]

As cianinas também são empregadas em células fotovoltaicas. A sua capacidade de absorver fótons e promover elétrons ao estado excitado gera um movimento de elétrons em um circuito, e por conseguinte a geração de energia. [32–36] Como outro exemplo em que esses corantes podem ser usados, tem-se os diodos orgânicos emissores de luz (OLED). Através de uma corrente elétrica aplicada, seus elétrons são excitados e seu decaimento promove emissão de luz em diferentes comprimentos de onda.[37]

Uma aplicação importante destes corantes está na sua utilização em terapia fotodinâmica.[38–41] A terapia fotodinâmica é empregada para aniquilação de células tumorais, tipicamente em tecidos superficiais onde a presença do corante no local afetado, com excitação através de luz, leva à formação de oxigênio singleto, que ocorre graças a uma reação no estado excitado entre as cianinas e o oxigênio presente nas células. Por tratar-se de uma estrutura extremamente tóxica às células, o oxigênio singleto acaba aniquilando as células tumorais com bons resultados.[39,42,43] Esses corantes também vêm sendo empregados como sensores de íons, sendo através de complexação ou por modificação de propriedades através da variação do pH.[44]

Em termos de produção científica, comparando-se os corantes do tipo cianinas e estreptocianinas, observa-se que as cianinas têm um campo muito mais desenvolvido do que as estreptocianinas. O número de publicações acerca das estreptocianinas no decorrer do tempo é significativamente baixo, o que indica que estes corantes ainda podem ser mais explorados. O exemplo disso é ilustrado na Figura 8, que mostra o número de publicações referentes as cianinas e as estreptocianinas no decorrer dos anos. Observa-se um crescimento exponencial para as cianinas, enquanto que para as estreptocianinas um número de publicações praticamente contínuo e baixo no decorrer dos anos.

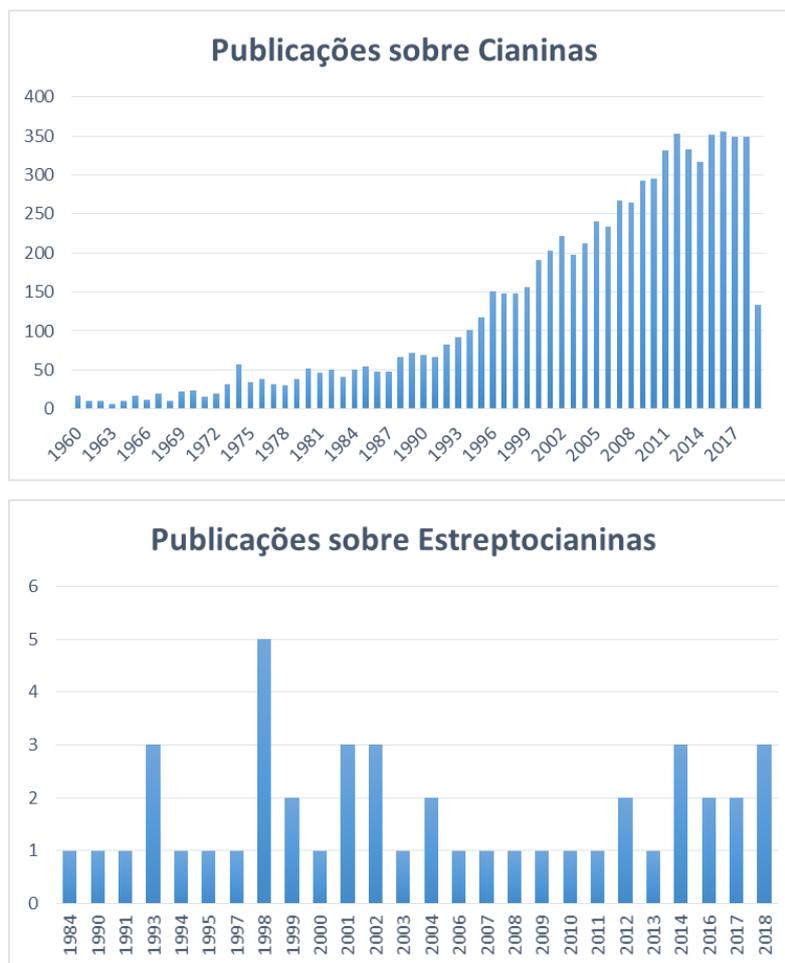


Figura 6: Análise de dados obtida pela plataforma Scopus mostrando o número de publicações por ano, a partir de 1960, com paravras chave *Cyanine* para o gráfico superior e *Streptocyanine* para o gráfico inferior. Busca realizada em 5 de maio de 2019.

O termo ESIPT (do inglês *excited state intramolecular proton transfer*) se trata de uma transferência protônica intramolecular provocada pela absorção de luz que ocorre somente no estado excitado.[45] Para que uma molécula emita luz por ESIPT, ela deve ter um sítio ácido - capaz de doar prótons - e um sítio básico - capaz de receber prótons.[46] A transferência protônica é favorecida pelo aumento do momento de dipolo da molécula no estado excitado. A modificação que ocorre no estado excitado permite a formação de uma espécie molecular diferente no estado excitado e, por conseguinte, uma estrutura com diferentes propriedades fotofísicas.[47] O equilíbrio que envolve as espécies no estado fundamental e excitado depende de diferentes parâmetros tais como a

polaridade do meio, a viscosidade, pH, etc; o que torna estas moléculas sondas muito versáteis em uma grande variedade de sistemas.[48–52]

Moléculas emissivas por ESIPT são amplamente estudadas na literatura, seja com o objetivo de estudar o fenômeno em si, bem como nas suas diversas aplicações. A Figura 7 ilustra algumas estruturas que fazem ESIPT.

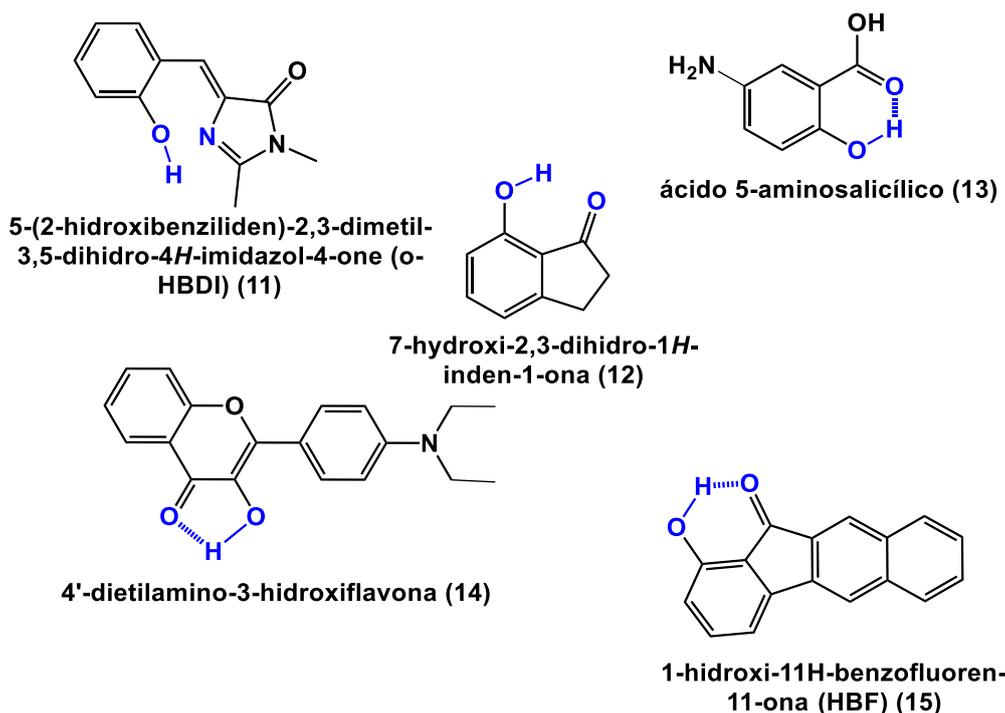


Figura 7: Exemplos de estruturas que fazem transferência protônica intramolecular no estado excitado - ESIPT.

Existem poucos exemplos na literatura de corantes que apresentam emissão na região do vermelho devido ao mecanismo ESIPT. Alguns exemplos (Figura 8) apresentam seus espectros deslocados em decorrência da formação de complexos com metais, como na estrutura **16** complexada com zinco através da estrutura que promove ESIPT [53], de reatividade frente a funções específicas, no caso a estrutura **17**, que tem sua conjugação modificada frente ao íon sulfônico ou ao peróxido de hidrogênio, variando seus comprimentos de absorção e emissão de fótons [54] ou através da conjugação aumentada em função da existência de ESIPT, em **18** [55].

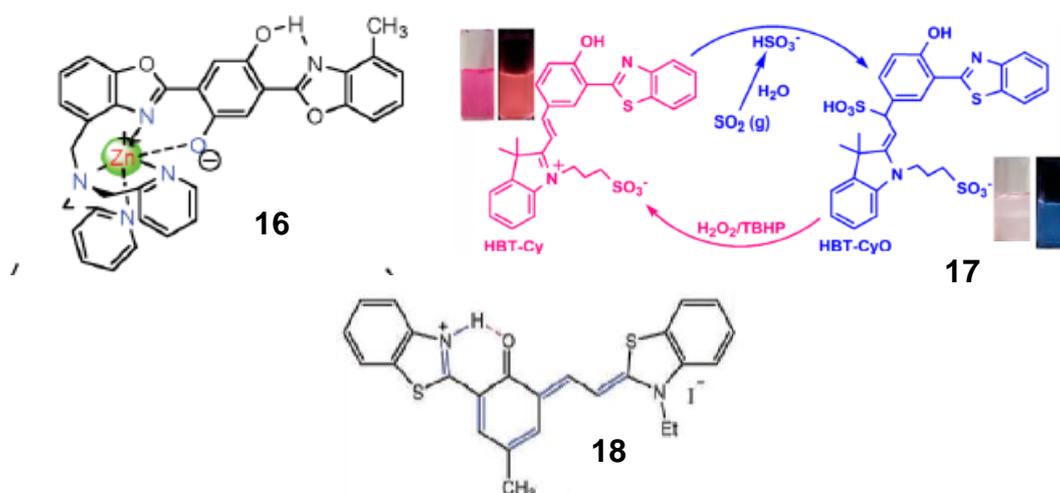
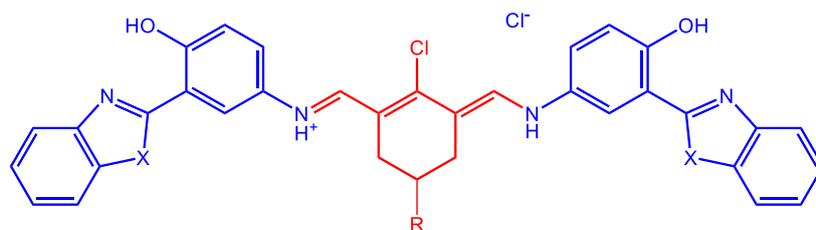


Figura 8: Corantes contendo ES IPT com emissão na região do vermelho. [53–55]

A motivação deste trabalho foi obter e investigar as propriedades fotofísicas de novas estreptocianinas contendo em sua estrutura um núcleo capaz de realizar ES IPT (Figura 9). Existem poucos trabalhos na literatura que apresentam a combinação de ambas as classes de corantes (estreptocianinas e ES IPT) em uma única estrutura.

Estas estruturas são classificadas como estreptocianinas, e possuem dois heterociclos emissivos por ES IPT - azóis - unidos por uma cadeia polimetínica. Com isso, buscou-se unir as características fotofísicas de corantes ES IPT com as de corantes polimetínicos.



X=O, R = H (19), X=O, R = Me (20)
 X=O, R = Et (21) X=O, R = tBu (22)
 X=S, R = H (23), X=S, R = Me (24)
 X=S, R = Et (25) X=S, R = tBu (26)
 X=NH, R = H (27)

Figura 9: Estreptocianinas desenvolvidas no presente trabalho, contendo em suas extremidades núcleos derivados de benzazóis.

Dessa forma, o presente trabalho traz uma investigação das características fotofísicas das novas estreptocianinas e suas possíveis aplicações, como continuidade do trabalho de Dissertação de Mestrado desenvolvido pelo mesmo grupo de pesquisa.[56] Para isso, apresentamos a sua síntese e caracterização fotofísica, a formação de agregados em diferentes solventes, as interações com a proteína BSA e sensores fluorimétricos e colorimétricos de pH.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

O objetivo desse trabalho foi sintetizar e investigar as características fotofísicas de novos corantes da classe das estreptocianinas contendo em sua estrutura heterociclos emissivos por ES IPT.

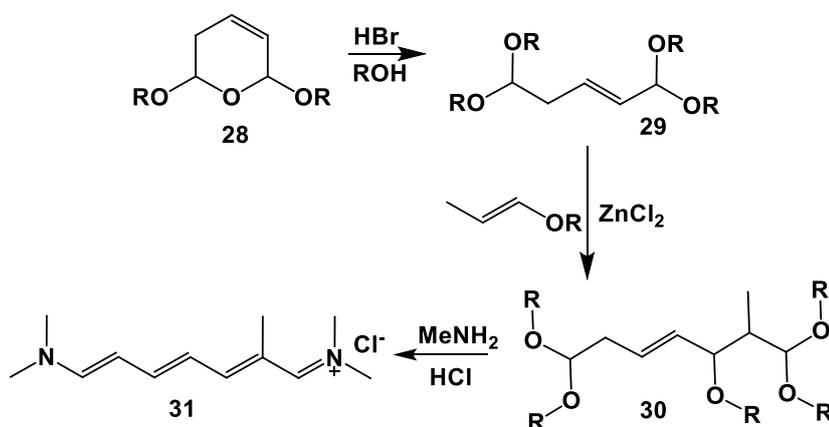
2.2. Objetivos Específicos

- *Sintetizar estreptocianinas fluorescentes por ES IPT:* Através da formação *in situ* de sais de imínio a partir do reagente de Vilsmeier-Haack, e da inserção de derivados de 2-(5'-amino-2'-hidroxifenil)benzazóis.
- *Caracterização fotofísica das estreptocianinas:* Para avaliar de que forma o aumento na conjugação eletrônica afeta as propriedades fotofísicas de corantes, utilizar as espectroscopias de absorção e emissão de fluorescência, investigando a formação de agregados. Juntamente com a espectroscopia de Uv-Vis, aplicar o modelo isodésmico modificado para estabelecer os valores das constantes de agregação K das estreptocianinas em etanol.
- *Interações das estreptocianinas com BSA:* Investigar as interações entre proteína-estreptocianinas aplicando-se as equações lineares e não lineares para aprofundar-se no tipo de interação predominante.
- *Sensores de pH:* Através das espectroscopias de absorção e emissão de fluorescência investigar o uso das estreptocianinas como sensores de pH.

3. Revisão Bibliográfica

3.1. Síntese das estreptocianinas

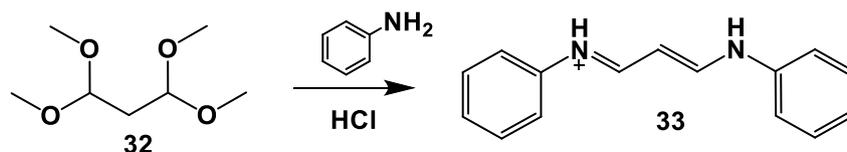
Em 1969, Makin e colaboradores descreveram um método de síntese de sais polimetínicos de cadeia longa, mais especificamente de estreptocianinas. Os autores mostraram que, através da reação de derivados de piranos **28** com álcool em presença de HBr, é possível a obtenção do éter **29**. A condensação de **29** com éteres alquil vinílicos leva a obtenção de **30**, que em presença de aminas secundárias ou primárias, no caso do exemplo metilamina, em meio ácido, leva a formação da estreptocianina **31**. [57] Através desse método, estreptocianinas contendo diversos tamanhos como por exemplo 3, 5 e 7 carbonos na cadeia polimetínica, a partir de diversas aminas, têm sido obtidas na literatura. O esquema de síntese está ilustrado no Esquema 1:



Esquema 1: Rota de obtenção de estreptocianinas a partir de acetaldeídos glucônicos.[57]

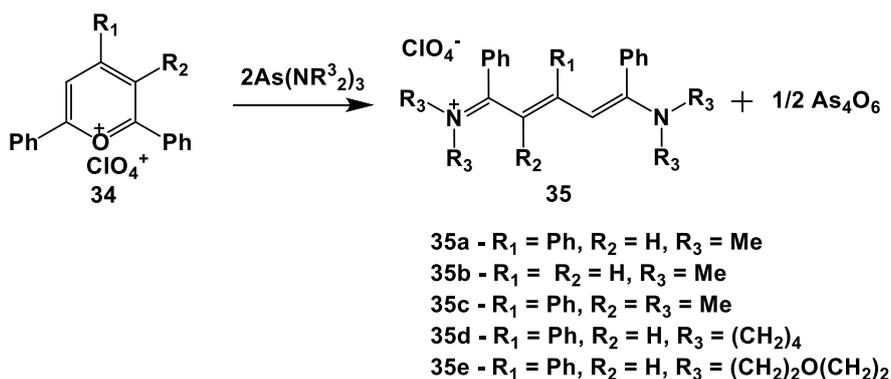
Em especial, a estrutura derivada da anilina **33** (Esquema 2) é largamente apresentada em artigos.[58–63] Ela é obtida através do 1,1,3,3,-tetrametoxipropano **32**, em meio ácido em presença de anilina. No entanto, sua investigação em termos de caracterização e propriedades fotofísicas não é objeto de estudo nas referências uma vez que esses compostos são utilizados como precursores na síntese de cianinas, a partir da reação das estreptocianinas

com sais indólicos ou quinolínicos quaternários.



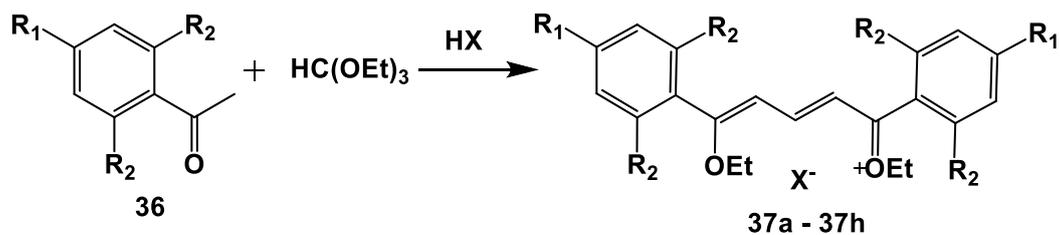
Esquema 2: Estrutura da estreptocianina **33**, empregada como intermediária na obtenção de cianinas.

Em 1991, Madaule e colaboradores apresentaram as estreptocianinas ilustradas no esquema 3. Os autores usaram um método sintético a partir de tris(dialquilamino)arsenos com sais de pirílio **34**, obtendo assim as estreptocianinas **35a** a **35e**,[64] conforme Esquema 3:



Esquema 3: Estreptocianinas **35** obtidas a partir de tris(dialquilamino)arsenos e sais de pirílio.[64]

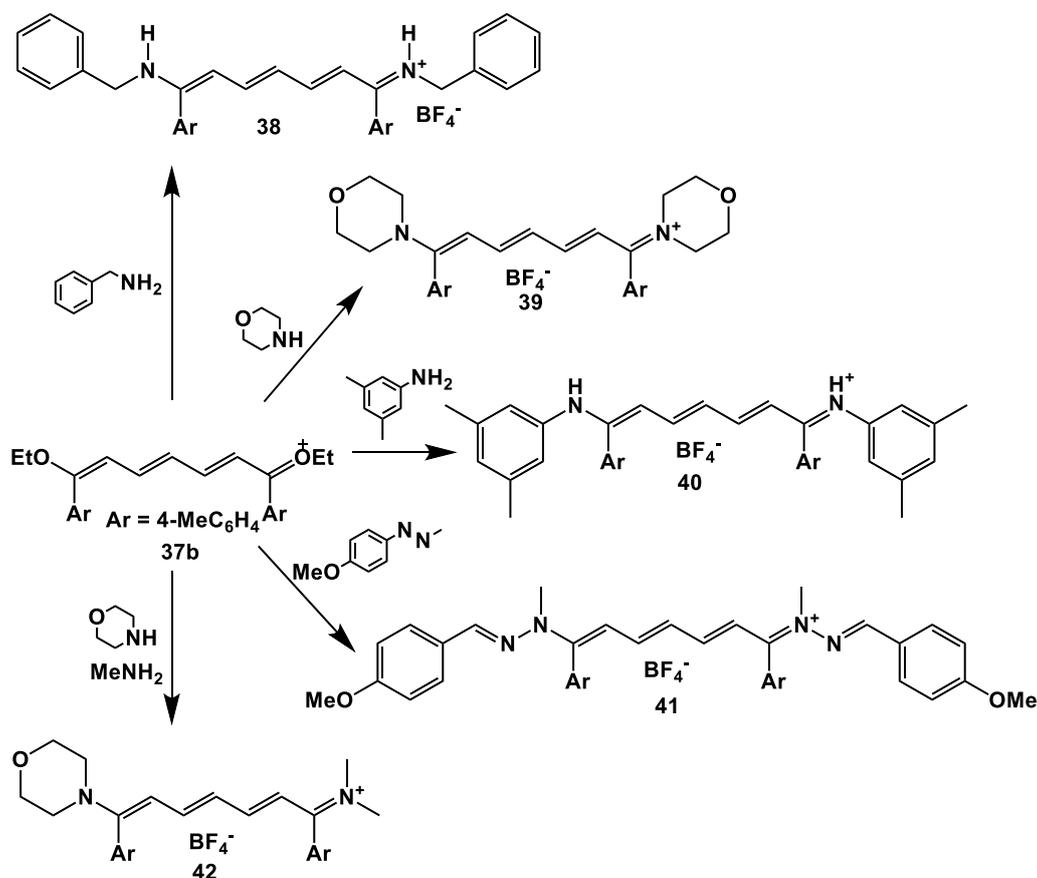
Através desse método, algumas limitações foram observadas: pode-se utilizar apenas sais de pirílio 2,6-aryl substituídos; Tris(dialquilamino)arsenos e estilbenos geram apenas estreptocianinas simétricas; e apenas uma pequena variedade de tris(dialquilamino)arsenos e estilbenos estão disponíveis. Dessa forma, uma rota sintética foi proposta utilizando diversas ariletanonas (**36**) e trietoximetano. Essa rota ocorre em meio ácido, utilizando ácidos como HClO_4 e HBF_4 , conforme esquema a seguir, obtendo assim diferentes estreptocianinas (**37a – 37h**).[65]



	37A	37B	37B'	37C	37C'	37D	37E	37F	37G	37H
R ₁	H	Me	Me	OMe	OMe	NHAc	Me	I	F	CN
R ₂	H	H	H	H	H	H	Me	H	H	H
X	ClO ₄	ClO ₄	BF ₄	ClO ₄	BF ₄	ClO ₄	ClO ₄	BF ₄	ClO ₄	ClO ₄

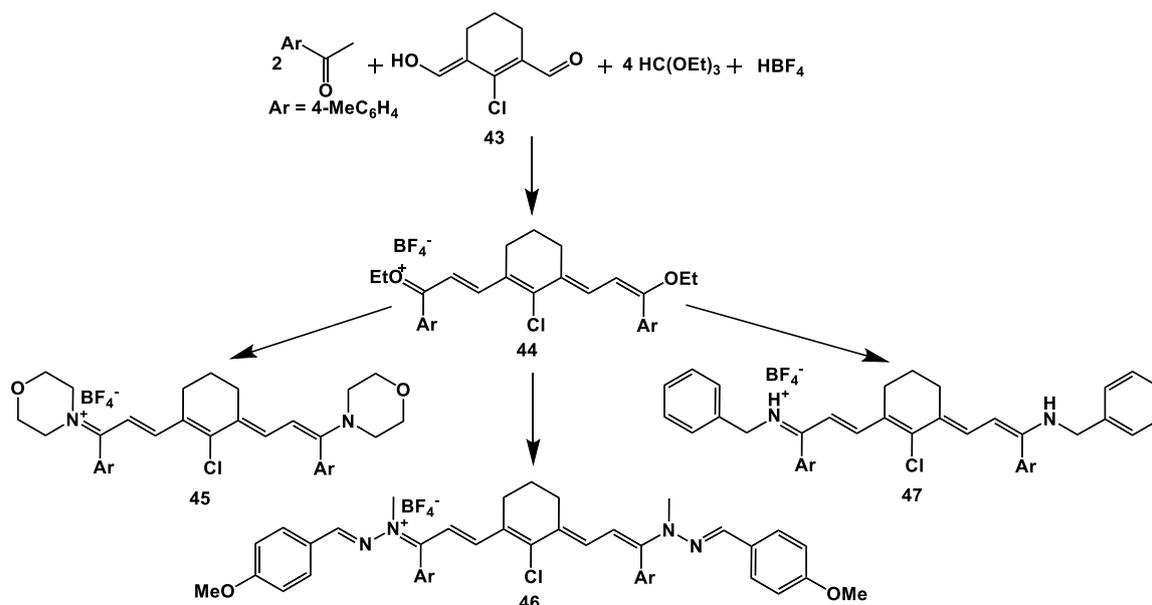
Esquema 4: Obtenção de estreptocianinas **37** a partir de ariletanonas.[65]

Em 2003, o mesmo grupo apresentou a síntese de estreptocianinas contendo cadeia heptametínica (7 carbonos) (**38** a **42**), a partir de estruturas derivadas de **37b** e aminas,[66] conforme ilustrado no Esquema 5:



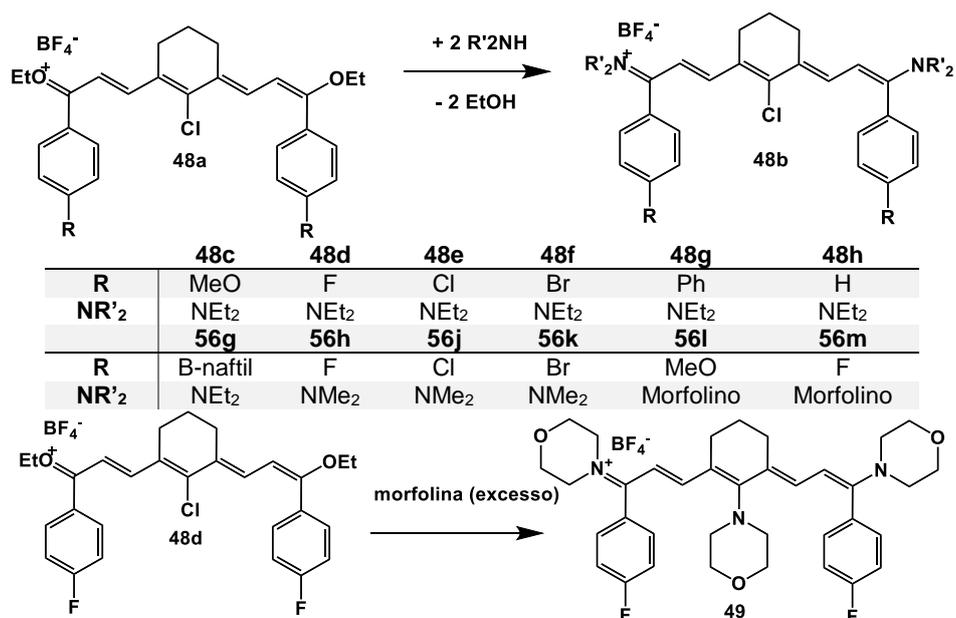
Esquema 5: Estreptocianinas de cadeia heptametínica (**38** a **42**) obtidas através da substituição do acetato de **37b** por diversas aminas.[66]

Seguindo a mesma linha de raciocínio, Corinne Payastre e colaboradores publicaram em 2004 um trabalho semelhante, porém utilizando cadeia polimetínica **44**, levando a diferentes estreptocianinas em presença de etanol e de diferentes aminas (**45 a 47**),[67] conforme representado no Esquema 6:



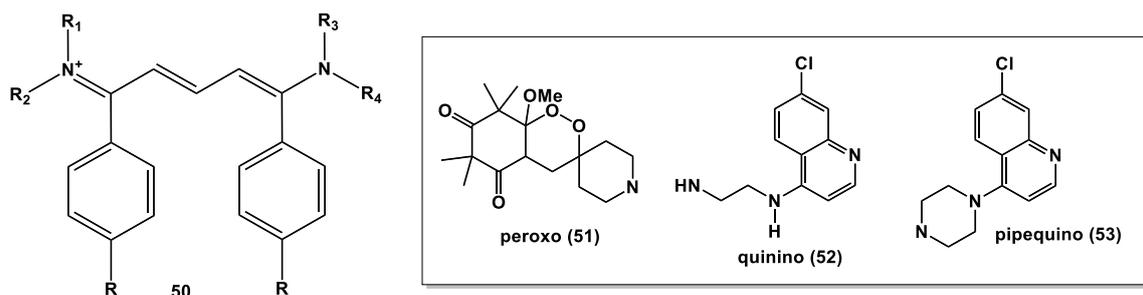
Esquema 6: Estreptocianinas (**45 a 47**) obtidas a partir da cadeia polimetínica **44**. [67]

Já em 2007, o mesmo grupo de pesquisa publicou um artigo onde apresentou novas estreptocianinas contendo cadeia cíclica em sua porção polimetínica (Esquema 7). Além disso, os autores mostraram que foi possível a substituição do cloro na posição central da cadeia polimetínica (*meso*) com excesso de morfolina. [68]



Esquema 7: Estreptocianinas **48a** a **48h** contendo cadeia cíclica em sua porção polimetínica bem como a substituição do cloro por morfolina em **48d** levando à estreptocianina **49**. [68]

Já em 2011, Payrastre e colaboradores obtiveram estreptocianinas com substituintes contendo atividade antiplasmoidal (**50a** a **50o**), com potencial uso para combater a malária, inserindo peróxidos bicíclicos peroxo, quinino e pipequino [69]:



	NR ₁ R ₂	NR ₃ R ₄	R
50A	NEt ₂	peroxo	Me
50B	NEt ₂	peroxo	F
50C	morfolino	peroxo	F
50D	peroxo	peroxo	F
50E	NEt ₂	OEt	F
50F	morfolino	OEt	Me
50G	NEt ₂	quino	F
50H	morfolino	quino	F
50I	quino	quino	F
50J	NEt ₂	pipequino	F
50K	Morfolino	Pipequino	F
50L	Pipequino	Pipequino	F
50M	Morfolino	Morfolino	F
50N	NEt ₂	NEt ₂	Me
50O	NEt ₂	NEt ₂	F

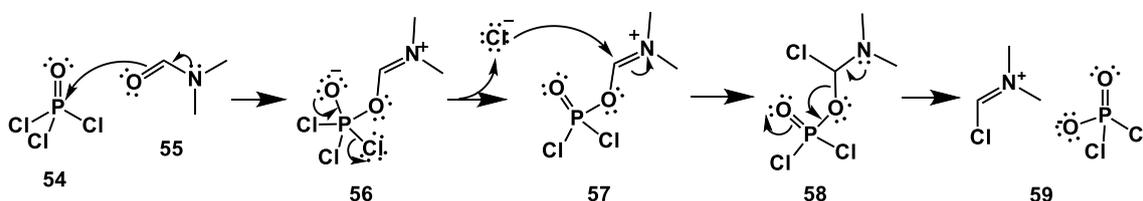
Esquema 8: Estreptocianinas **50a** a **50o** com atividade antiplasmodial. [69]

De forma geral, observa-se que a síntese de estreptocianinas resume-se a poucas referências, bem como a restritos grupos de pesquisa. Uma rota bastante usual envolve uso de cetonas cíclicas e o reagente de Vilsmeier-Haack, que permite a dupla formilação do anel, e conseguinte obtenção dessa classe de corantes. Essa rota sintética, largamente empregada na obtenção de cianinas.

3.2. Formilação via Reagente de Vilsmeier-Haack

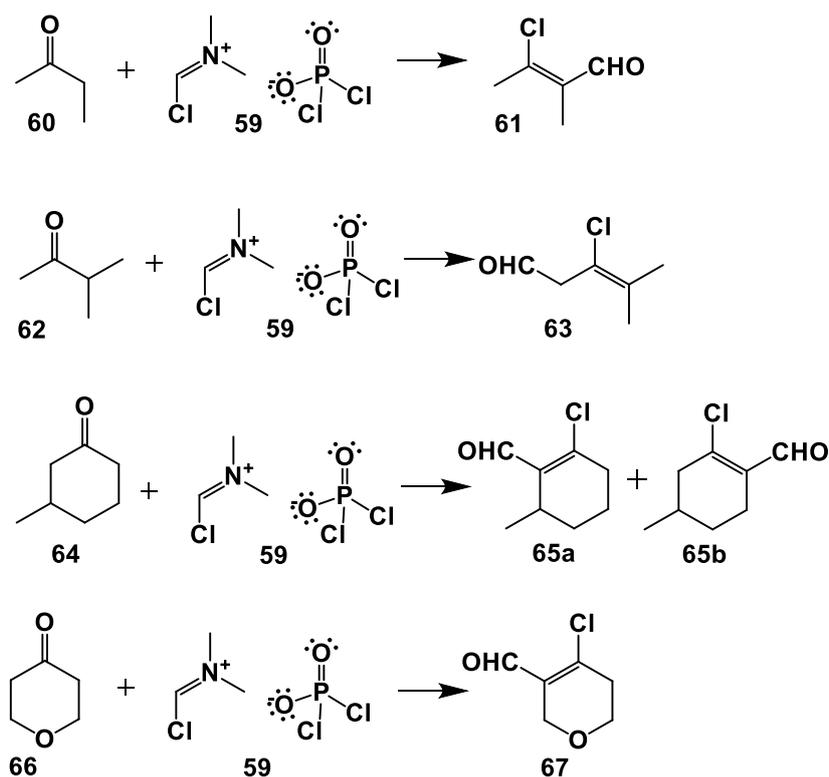
A reação de Vilsmeier-Haack trata-se de uma importante rota sintética de obtenção de sais de halometilímínio, adutos também conhecidos como reagentes de Vilsmeier-Haack.[70] Esses sais, por sua vez, se destacam uma já

que são eletrófilos fracos capazes de reagir com substratos aromáticos, olefínicos ou 1,3-dienos, levando à formação de aldeídos aromáticos ou aldeídos α,β -insaturados. A obtenção do reagente de Vilsmeier-Haack requer o tratamento de uma amida dissustituída, tipicamente *N,N*-dimetilformamida (DMF), com um haleto ácido – a exemplo cloreto de fosforila (POCl_3), cloreto de carbonila (COCl_2), cloreto de tionila (SOCl_2), cloreto de oxalila ($(\text{COCl})_2$) e brometo de fosforila (POBr_3). O aduto formado nessa reação pode ser preparado *in situ* ou isolado. A amida dissustituída é requerida em níveis catalíticos, e ambos ácido ou amida podem ser usados como solvente da reação. O esquema 9 apresenta o mecanismo de obtenção do sal de halometilímínio mais comumente utilizado, obtido através da reação de DMF **55** com POCl_3 **54**. Em um primeiro momento, o par de elétrons da carbonila do DMF ataca o fósforo do cloreto de fosforila, seguido de um rearranjo de elétrons, e liberação do cloreto (**56**). O cloreto, por sua vez, ataca o carbono sp^2 do intermediário **57**, que através de um rearranjo de cargas leva à formação do cloreto de β -fosforilímínio **59**, reagente de Vilsmeier-Haack.[71]



Esquema 9: Mecanismo de obtenção do reagente de Vilsmeier-Haack **59**. [72]

O reagente de Vilsmeier-Haack reage com substratos aromáticos, olefínicos ou 1,3-dienos ricos em elétrons, gerando aldeídos aromáticos ou α,β -insaturados clorados. O Esquema 10 ilustra alguns exemplos de produtos formados a partir de cetonas frente ao reagente de Vilsmeier-Haack:

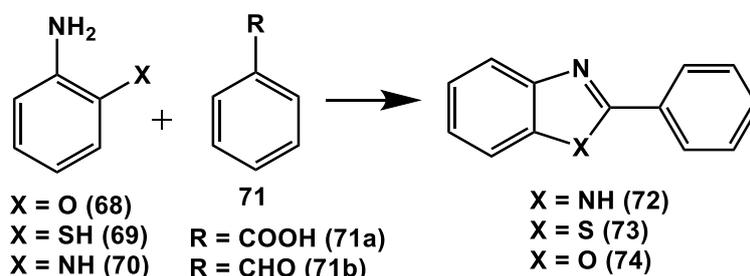


Esquema 10: Exemplos de diferentes formulações com o emprego do reagente de Vilsmeier-Haack frente a cetonas.[70]

3.3. Síntese de Benzazóis

A metodologia utilizando ácido polifosfórico (APF) e análogos (polifosfato de éster – PPE) [73], sob elevadas temperaturas, para a síntese de benzazóis vem sendo empregada há muito tempo.[74,75] Essa metodologia leva à condensação de um ácido aromático com um o orto-aminofenol associado. Outras metodologias utilizando aldeído ao invés do ácido vêm sendo bastante disseminadas uma vez que não requerem altas temperaturas e possuem o tempo de reação reduzido, quando comparadas com as rotas utilizando APF. Isso favorece a formação de compostos mais complexos. Essa rota utiliza ciclização oxidativa de bases de Schiff fenólicas com uma grande variedade de agentes oxidantes, como por exemplo $Mn(OAc)_3$, $ThClO_4$, NiO_2 , $ZrOCl_2 \cdot 8H_2O$, $Pb(OAc)_4$, $BaMnO_4$, $SnCl_2$, entre outros.[76] O esquema 11 ilustra algumas possibilidades de formação de indóis do tipo benzoxazol **72**, contendo oxigênio, benzotiazol **73**, contendo enxofre e benzimidazol **74**, contendo nitrogênio como

heteroátomo.



Esquema 11: Esquema geral de obtenção de benzazóis a partir de ácidos ou aldeídos.

3.4. Espectroscopias de Absorção e Emissão

A luminescência pode ser descrita como a emissão de radiação espontânea de espécies eletronicamente ou vibracionalmente excitadas.[77] Considerando que a excitação ocorre através da absorção de luz, essa é classificada como fotoluminescência. Para que se compreenda os processos subsequentes à absorção de fótons, torna-se adequado o uso do diagrama de Perrin-Jablonski, ilustrado na Figura 10. Uma transição eletrônica molecular induzida por absorção de fótons consiste na passagem de elétrons de um estado eletrônico de mais baixa energia (estado fundamental) para um estado eletrônico excitado de maior energia. Essas transições eletrônicas ocorrem nas regiões do espectro eletromagnético do ultravioleta, visível, e infravermelho próximo.[3]

Após absorção de fótons, a relaxação dos elétrons ocorre através de processos não-radiativos ou radiativos, sendo esse último denominado por ocorrer emissão da radiação sob forma de luz, seja através de fluorescência ou fosforescência. Antes da emissão de fluorescência, deve-se considerar que dentro do mesmo nível de energia no estado excitado, pode ocorrer relaxação não-radiativa, denominada relaxação vibracional (Figura 10). Caso a energia fornecida seja grande o suficiente para a promoção do elétron a níveis de energia superiores ao excitado de menor energia, o decaimento desse nível para o S_1 é denominado de cruzamento intersistemas. Da mesma forma, essa transição

antecede a fosforescência, quando ocorre inversão de spin e o elétron passa do estado singleto excitado para o tripleto excitado. A emissão de fluorescência ocorre entre o estado singleto excitado e o estado singleto fundamental, enquanto que a emissão de fosforescência ocorre com a inversão de *spin* do elétron localizado no estado singleto excitado, sendo transferido para o tripleto excitado. Todos esses fenômenos mencionados encontram-se descritos na Figura 10. Um dos parâmetros empregados para que se avalie a diferença energética entre a absorção e emissão é denominado deslocamento de Stokes, representado por Δ_{ST} , e é definido como sendo a diferença entre os máximos de absorção e emissão.[78–80]

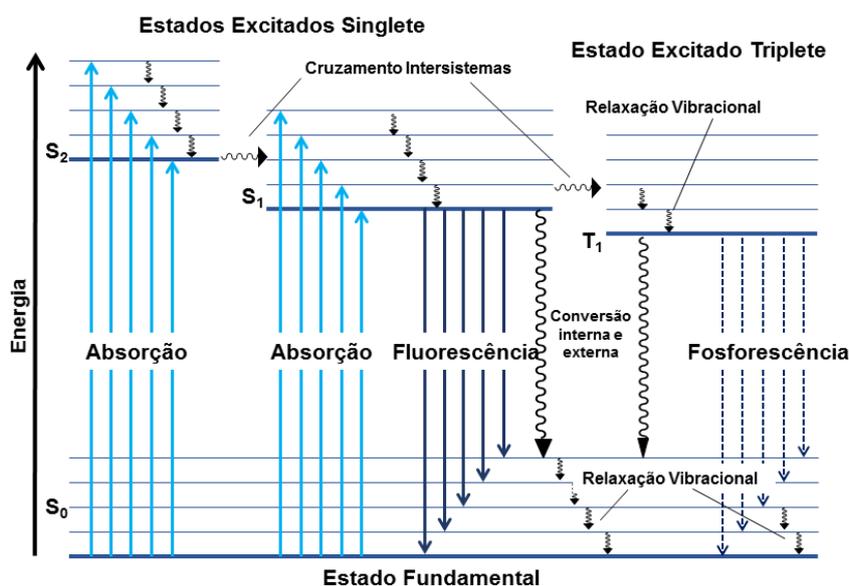


Figura 10: Diagrama de Perrin-Jablonski ilustrando os processos radiativos e não-radiativos bem como as posições relativas dos espectros de absorção, fluorescência e fosforescência. As linhas contínuas e pontilhadas representam processos radiativos, e as linhas onduladas representam os processos não radiativos. Baseado em [81].

A eficiência da absorção de luz em um dado comprimento de onda λ é dada pela absorbância ou pela transmitância. Um parâmetro que expressa a habilidade de dada molécula absorver luz em um determinado comprimento de onda é denominado coeficiente de absorvidade molar ϵ , e pode ser facilmente obtido através da Lei de Lambert-Beer, que considera a concentração da solução

c , o caminho óptico percorrido l , e a absorbância no comprimento de onda em estudo A , [78] Equação 1:

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot c \quad (1)$$

As alterações em um espectro de absorção podem se dar pelo deslocamento das bandas para maiores comprimentos de onda (batocrômico) ou para menores comprimentos de onda (hipsocrômico). Quando se descreve a intensidade dos espectros, denomina-se efeito hipercrômico o aumento da intensidade, enquanto que a redução da intensidade é denominada efeito hipocrômico. Esses efeitos estão ilustrados na Figura 11.

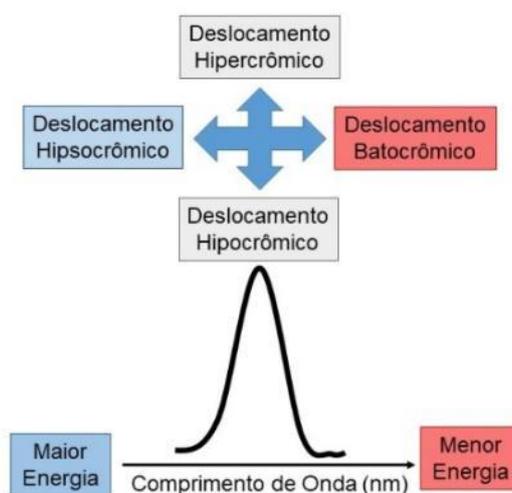


Figura 11: Esquema representativo acerca das denominações empregadas para descrever mudanças de intensidade e de deslocamento ao longo dos espectros.

A grande maioria dos compostos fluorescentes são aromáticos. O aumento da conjugação leva a um deslocamento batocrômico dos máximos de absorção e emissão, o que está relacionado a menor energia nas transições $\pi \rightarrow \pi^*$. A presença de heteroátomos aumenta a probabilidade de transições $n \rightarrow \pi^*$, as quais têm menores coeficientes de absorvidade molar do que as transições $\pi \rightarrow \pi^*$. [81–83]

Um parâmetro importante para investigar a respeito da eficiência de

emissão de fluorescência de dada molécula é conhecido como Rendimento Quântico de Fluorescência Relativo Φ_F , e é obtido experimentalmente, a partir da comparação com padrões existentes na literatura. A obtenção desse parâmetro dá-se através das medidas de absorção e emissão da solução diluída da espécie a ser investigada. A importância de ser uma solução diluída está associada à exclusão de fenômenos paralelos que possam existir em decorrência do aumento da concentração. A partir dos espectros obtidos, escolhe-se um corante como padrão para comparação, cujas absorção e emissão devem ter regiões espectrais semelhantes e rendimento quântico definido. Após obtenção dos espectros de absorção e emissão, tanto do padrão quanto da amostra, utiliza-se a Equação 2 para a obtenção do rendimento quântico de fluorescência relativo [84–87]:

$$\phi_F = \frac{A_P}{A_A} \cdot \frac{F_A}{F_P} \cdot \left(\frac{n_A}{n_P}\right)^2 \cdot \phi_P \quad (2)$$

Onde A é absorção no comprimento de onda usado para excitação tanto do padrão (P) quanto da amostra (A), F é a área da curva de emissão do padrão P e da amostra A , n é o índice de refração dos solventes utilizados e ϕ_P é o rendimento quântico do padrão.

3.4.1. Efeitos que alteram as propriedades fotofísicas

Muitos fatores são capazes de afetar tanto a absorção quanto a emissão de fótons de uma molécula, dentre eles a temperatura, a concentração, e o solvente.[83] Em geral, o aumento da temperatura leva a perdas de energia sob forma de calor (não-radiativa). Em decorrência disso, observa-se um decaimento da intensidade de emissão radiativa (fluorescência) com o aumento da temperatura.[88–90]

O incremento da concentração pode promover uma não-linearidade da Lei de Lambert-Beer, mesmo motivo que faz com que a emissão de fluorescência com o aumento da concentração não seja linear após uma concentração limite. As interações intermoleculares soluto-solvente afetam diretamente os espectros de absorção e emissão. Esse efeito é conhecido como solvatocromismo e está

fortemente ligado com a polaridade do solvente, bem como seu efeito sobre os momentos de dipolo da estrutura, tanto no seu estado fundamental quanto excitado.[91–94]

Para que se compreenda esse fenômeno, algumas observações se fazem necessárias. Sabe-se que a polaridade do cromóforo no estado fundamental e excitado são diferentes, conforme ilustra a Figura 12, onde o momento de dipolo do estado fundamental (μ_F) e excitado (μ_E) estão representados, bem como uma ilustração da solvatação decorrente desses momentos de dipolo. Dessa forma, solventes com diferentes polaridades possuem diferentes capacidades de estabilizar/solvatar essas estruturas tanto no estado fundamental quanto no estado excitado. Assim, quando uma molécula é excitada, seu momento de dipolo muda, uma relaxação do solvente ocorre, solvatando assim a estrutura, estabilizando-a energeticamente. Por consequência, diferenças energéticas são facilmente observadas entre os estados fundamental e excitado, com a variação do solvente. Experimentalmente, observa-se deslocamentos nos espectros de absorção e emissão de fluorescência, além de mudanças na forma, como alargamento ou estreitamento do espectro.[77]

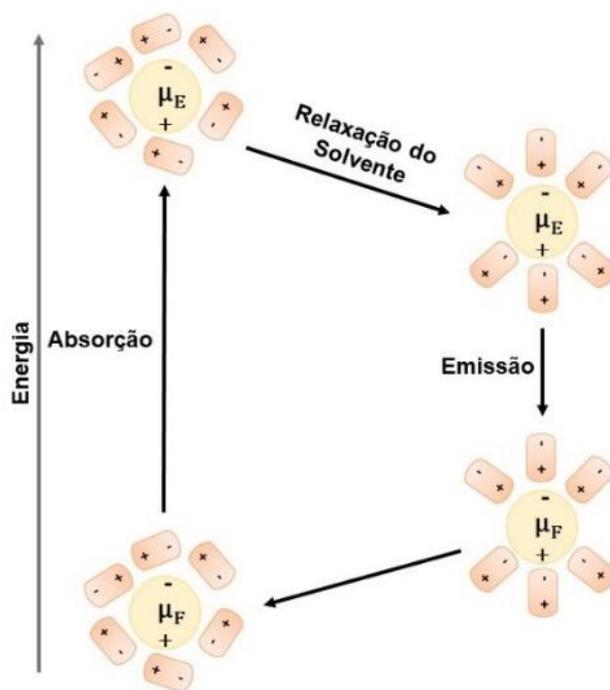


Figura 12: Efeitos de orientação eletrônica e relaxação do solvente, considerando os momentos de dipolo do estado fundamental (μ_F) e do estado excitado (μ_E) da molécula, com diferentes respostas em termos de energia, conforme solvatação da molécula frente às características do solvente. Baseado em [77].

3.5. Sondas ESIPT

A transferência protônica no estado excitado, conhecida do inglês como ESIPT (excited state intramolecular proton transfer), é um importante processo que ocorre em determinadas estruturas capazes de comportar geometricamente e energeticamente essa transferência.[45] Em decorrência desse fenômeno, importantes características espectrais são observadas, e por consequência, importantes aplicações a essas estruturas.[48,49,95,96] Dentre as inúmeras estruturas capazes de suportar esse processo, estão os heterociclos 2-hidroxfelilbenzazóis, que fazem parte do escopo desse trabalho.[50,97–99] Um diagrama de Jablonski simplificado, descrevendo o ciclo está apresentado na Figura 13 a seguir. Na figura, tem-se representado o heterociclo 2-hidroxfelilbenzoxazol em seu estado fundamental enol **75a**. Observa-se que quando uma energia ideal para que ocorra excitação da estrutura é fornecida, essa é promovida a um estado excitado representado por enol*. A partir daí duas

possibilidades são permitidas para a estrutura: a emissão de fluorescência da forma enol* ou a transferência protônica intramolecular no estado excitado. Quando ocorre essa última opção, a forma ceto* é formada, representada por **75b**. O decaimento radiativo via emissão de fluorescência leva à formação da forma ceto no estado fundamental, que por transferência de prótons retorna à sua forma enol. Experimentalmente, essa característica promove a essas estruturas a possibilidade de uma dupla emissão de fluorescência, uma mais energética (enol) e outra de menor energia (ceto), representadas na mesma figura à direita.[45]

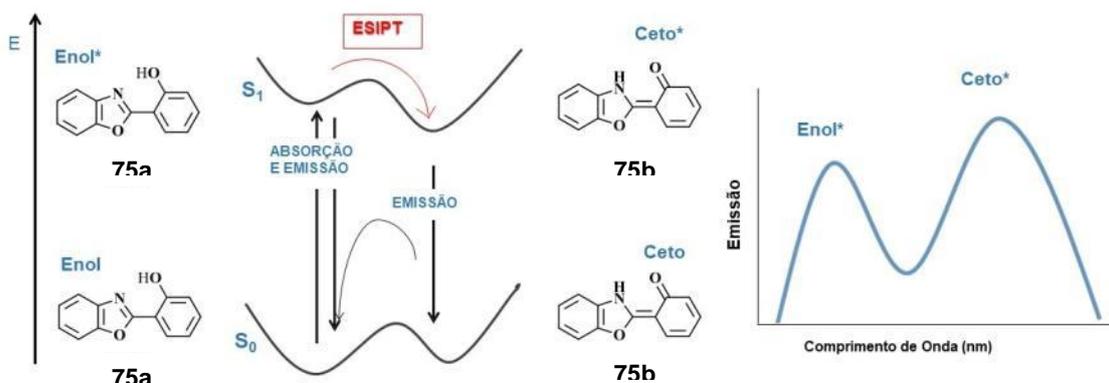


Figura 13: Mecanismo de absorção de fótons para 2-(benzoxazol-2-il)fenol **75a**, bem como as possíveis emissões de fluorescência, tanto da forma Enol* quanto da forma Ceto* (**75b**). À direita um possível espectro de emissão com as formas Enol* e Ceto*.

O processo de absorção de fótons, transferência de prótons no estado excitado e seu retorno ao estado fundamental com nova transferência de prótons trata-se de um ciclo reversível.[100] Esse fenômeno ocorre graças à presença de um grupo doador de elétrons e um receptor de elétrons, que tem suas acidez e basicidade modificados no estado excitado. Após a excitação, a redistribuição de carga eletrônica da molécula leva à uma maior acidez do grupo doador de elétrons e uma maior basicidade do grupo receptor de elétrons, ocasionando assim a transferência protônica.[46] Essa redistribuição de cargas não é o único fator capaz de promover essa transferência de prótons. Essa relocação da carga pode ser facilitada através de interações intermoleculares soluto-solvente, levando a efeitos solvatocrômicos importantes e diferentes comportamentos

espectrais recorrentes das diferentes polaridades do meio.[101–106] Essas estruturas possuem uma importante característica de promover grandes diferenças energéticas entre a absorção e emissão de fótons, levando a grandes deslocamentos de Stokes.[47]

Além desse fenômeno no estado excitado, a transferência de carga (do inglês intramolecular charge transfer – ICT) pode ocorrer no sistema. Esse fenômeno é observado quando, no estado excitado ocorre uma drástica mudança no momento de dipolo da molécula, levando a uma redistribuição de cargas e por consequência uma transferência da carga na molécula. O ICT pode ocorrer a partir do ESIPT, onde a transferência de prótons pode gerar um grande caráter de transferência de carga na molécula. Em termos práticos, o ICT é capaz de levar a dupla emissão de fluorescência, assim como o ESIPT, bem como grandes deslocamentos de Stokes. Na prática, derivados de heterociclos 2-hidroxifelilbenzazóis com diferentes substituintes em seus anéis mostraram-se capazes de promover a transferência de carga no estado excitado. Esse fato torna a discussão do ESIPT-ICT para heterociclos 2-hidroxifelilbenzazóis mais substituídos complexa.[105,106]

3.6. Propriedades Espectroscópicas de Agregados Moleculares

O estudo de agregados utilizando a espectroscopia no UV-visível tem sido utilizado como uma grande ferramenta para compreensão de efeitos solvofóbicos bem como de interações intermoleculares em dadas características de solvatação.[94,107–109] Estruturas com capacidade de formar agregados, possuem espectros diferenciados quando comparados com os espectros de suas estruturas na forma monomérica. Isso ocorre uma vez que as interações intermoleculares presentes nos agregados promovem propriedades distintas das monoméricas, conforme o empacotamento formado na agregação.[110–112]

A investigação dos agregados de cianinas deu-se início com Jelley e Scheibe que, independentemente, observaram uma anomalia nos espectros de absorção da cianina PIC em água.[113,114] Para solventes como etanol, o máximo de absorção era deslocado para comprimentos de onda de menor

energia. Para concentrações elevadas, esse sinal era novamente observado com aumento de sua intensidade. Além disso, altos valores de ϵ , bem como alta emissão de fluorescência com pequeno deslocamento de Stokes foi observada.[115] Seguidamente, com uma correta interpretação, Scheibe descreveu o fenômeno como uma dessolvatação da molécula com polimerização da mesma, com modificação espectral ocasionada pelo efeito das moléculas adjacentes. Além disso, observaram uma reversibilidade no fenômeno, através da variação de temperatura das soluções estudadas.[116]

Kasha foi um importante pesquisador capaz de desenvolver a teoria excitônica para dímeros agregados, uma importante teoria que explica a formação de agregados e seu comportamento espectral em decorrência de sua formação.[112,117,118] Embora toda a explanação seja voltada para dímeros, a forma mais simples de agregados, sua fundamentação pode ser ampliada para agregados maiores, como trímeros e oligômeros. Como essa aproximação considera a molécula como um dipolo pontual, e desconsidera interações dos vizinhos próximos para cálculos mais específicos é importante valer-se de modelos mais precisos. Para o caso do presente trabalho, as fundamentações da Teoria de Kasha são suficientes para a discussão dos resultados.[119,120]

Sob certas condições solvatocrômicas, o fluoróforo acaba interagindo preferencialmente entre si na solução, sob forma de agregados.[13] Essas interações decorrem de interações solvofóbicas com o solvente e levam a dois tipos de agregados, denominados *H* e *J* (de Jelley).[121] Essas duas diferentes classificações estão relacionadas com a energia apresentada pelos agregados, com relação à forma monomérica da estrutura. A Figura 14 ilustra as possibilidades descritas e associadas a possíveis modificações espectrais. A diferença entre esses agregados consiste no arranjo espacial dos momentos dipolar de transição da estrutura. Estruturas com momentos dipolares paralelos, têm suas energias do estado excitado aumentadas. Experimentalmente, isso leva a deslocamentos do espectro de absorção para menores comprimentos de onda (deslocamentos hipsocrômicos), e caracteriza agregados tipo *H*. Já para o caso em que os momentos dipolares de transição das estruturas possuem organização do tipo cabeça-cauda, tem-se uma redução da energia do estado excitado, promovendo uma menor energia de absorção, e experimentalmente,

um deslocamento para comprimentos de menor energia do espectro de absorção (deslocamentos batocrômicos).[112,121]

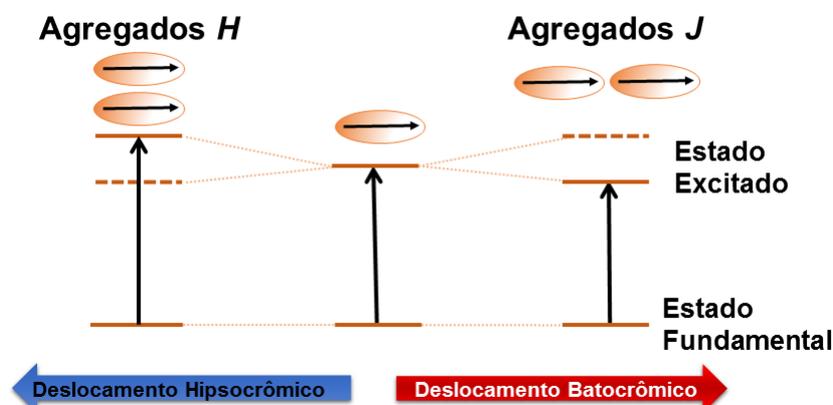


Figura 14: Esquema de arranjo espacial para agregados *H* (esquerda) e agregados *J* (direita), bem como suas diferenças energéticas entre estados fundamental e excitado, comparadas com o monômero (centro). Baseado em [119].

Observa-se que diferentes agregados *H* e *J* com diferentes ângulos entre os momentos dipolares de transição das estruturas e o eixo central da molécula (α ou ângulo de deslizamento) podem ser formados. Experimentalmente, essa diferença ocasiona um deslocamento distinto nos espectros de absorção para a banda associada aos agregados justamente pela variação energética que essas interações intermoleculares são capazes de ocasionar no momento de dipolo resultante do agregado formado. A Figura 15 esquematiza esse fenômeno embasado na teoria do exciton molecular.[112] Na figura é apresentado o diagrama de energia para o monômero, bem como para os dímeros.[122] O exemplo de diferentes ângulos de deslizamento α para uma representação esquemática de uma cianina ilustra os casos. Considerando o ângulo de 0° , temos a condição extrema para os agregados *J*. Ângulos entre 0 e $54,7^\circ$ são classificados como agregados *J*, com diferenças energéticas inferiores às do monômero. Acima disso, até o caso extremo de 90° , temos os agregados *H*, com uma energia superior à dos monômeros. A extensão dessa representação pode ser validada para agregados contendo mais que duas unidades, como trímeros e oligômeros.[119]

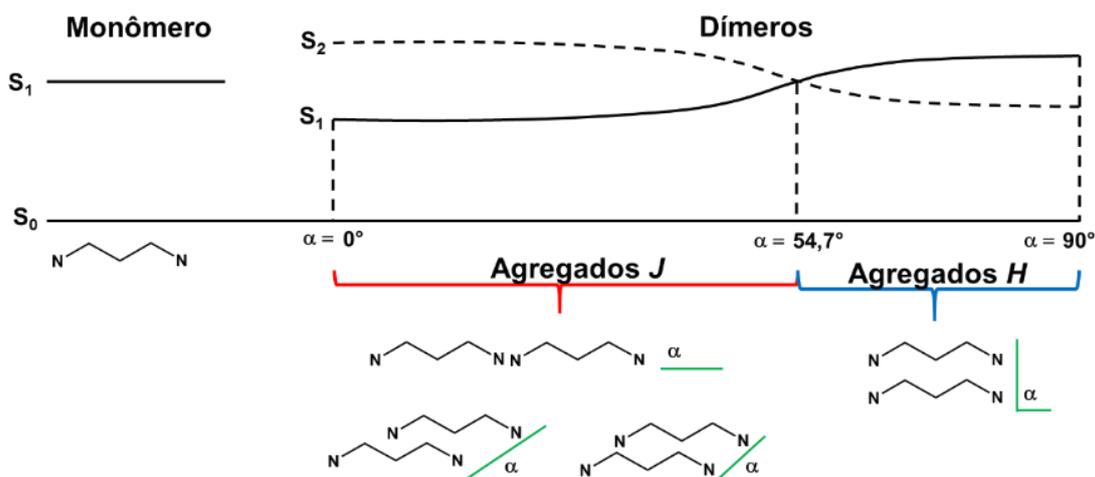


Figura 15: Diagrama de níveis de energia para a estrutura monomérica e seus agregados, com diferentes ângulos de deslizamento (α), com representação esquemática de agregados de cianinas. Baseado em [119]

Além desses possíveis arranjos dos agregados, é necessário considerar uma torção das moléculas. Para o caso mais simples, ilustrado na Figura 16, superior, tem-se as diferenças energéticas para uma torção sobre um dímero, cuja rotação ocorre em um eixo central da estrutura. Percebe-se que, quanto maior essa torção (θ), maior a energia, e agregados H com maior deslocamento hipsocrômico são observados. Para o caso de formação de agregados com torção, bem como ângulo de deslizamento diferente de 90° , tem-se a representação inferior na mesma figura. Observa-se que, conforme os momentos de dipolo resultantes, é possível a formação de agregados J e H.[119,123]

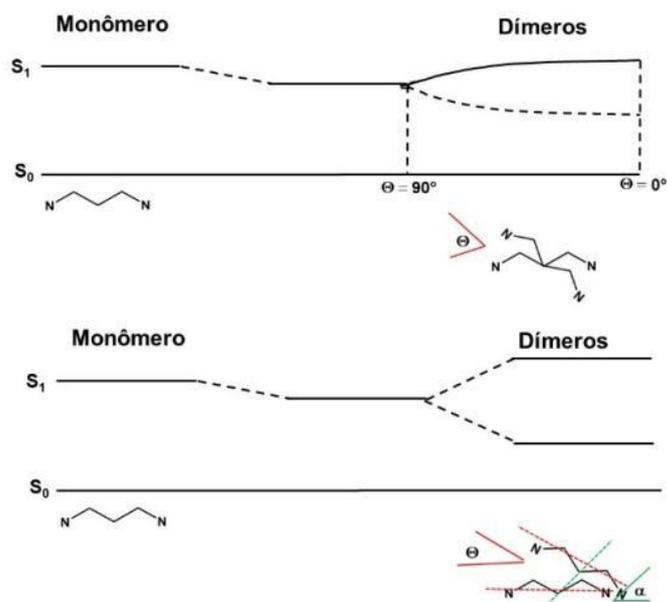


Figura 16: Diagramas de energia para formação de agregados considerando rotação torcional das estruturas: na esquerda o ângulo θ varia de 0 a 90° , indicando variações energéticas espectrais para a formação de agregados H; e à direita, com ângulos de deslizamento diferentes de 90° , indicando diferentes níveis de energia resultantes, conforme as resultantes do momento de dipolo dos agregados formados. Baseado em [119,123].

A importância do estudo de sistemas autoassociados, onde moléculas orgânicas se organizam formando agregados supramoleculares vêm sendo ratificada ao longo do tempo pela ciência.[124] A importância de moléculas individuais aglomerarem-se formando clusters ou agregados em decorrência de suas interações intermoleculares é um processo crucial para a existência da vida. A exemplo temos o sistema complexo de proteínas, as cadeias de DNA e RNA, aminoácidos, e muitos outros casos.[125] Mais recentemente, os agregados têm se mostrado interessantes na área de nanotecnologia, tecnologias fotoeletrônica e fotovoltaica.[124,126–129] A formação de agregados a partir de unidades moleculares é considerada um processo de

autoassociação. Uma das principais características em decorrência da formação dos agregados está nas características espectroscópicas únicas conferidas aos agregados, conforme sua estruturação, mostrando-se diferentes das estruturas monoméricas.[124]

A formação desses sistemas autoassociados requer uma interação moderadamente forte entre os monômeros, de caráter não covalente e reversível. Esse sistema envolve um complexo balanço entre as forças intermoleculares, levando em consideração repulsão eletrostática entre estruturas com similaridade de carga, atração entre íons carregados opostamente, forças de van der Waals, interações π , e ligação de hidrogênio. Os agregados são intimamente relacionados com a concentração e temperatura: altas concentrações levam a um aumento de formação de agregados em solução, enquanto que altas temperaturas levam a uma redução dos agregados na solução, característico de sistemas entrópicos.[130]

A formação de sistemas autoassociados pode ser descrita por diferentes mecanismos: o isodésmico, cooperativo ou anti-cooperativo. A Figura 17 ilustra esses tipos de auto-organização. Cada modelo descreve uma forma de crescimento de cadeia no processo que também é conhecido como polimerização. Para o caso do modelo isodésmico, o processo de polimerização caracteriza-se por ter apenas uma constante de polimerização, K , para cada etapa reversível do processo de organização. Os processos cooperativo e anti-cooperativo são caracterizados por um crescimento não linear, com uma constante de equilíbrio K_2 , seguida por uma nucleação, com outra constante de equilíbrio K , com $K \neq K_2$. A diferença entre os processos cooperativo e anti-cooperativo é obtida através da magnitude das constantes de equilíbrio: processos cooperativos caracterizam-se pela tendência de formarem agregados maiores, portanto $K_2 < K$; já os processos anti-cooperativos caracterizam-se por formarem presencialmente dímeros, ou seja, $K_2 > K$. Os processos cooperativos podem ser classificados conforme sua origem. Esses pode ocorrer em decorrência de efeitos eletrônicos, estruturais ou hidrofóbicos.[131]

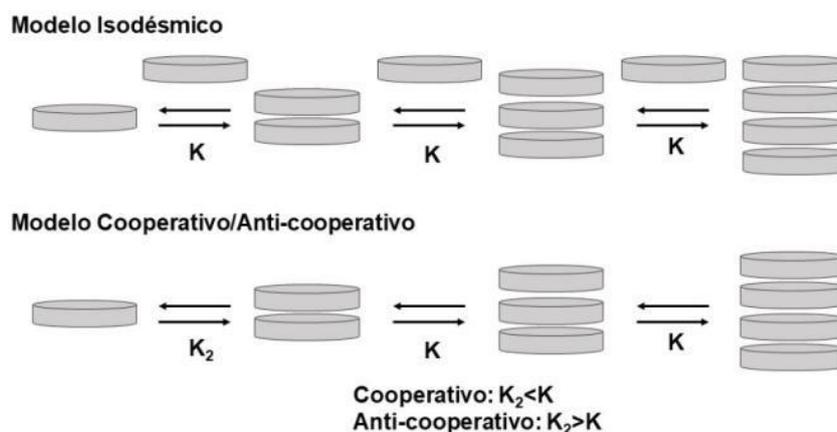


Figura 17: Esquemas representativos dos tipos de polimerização supramolecular. Acima o modelo isodésmico, onde cada equilíbrio é representado por uma constante de equilíbrio K de igual valor. Abaixo, o modelo cooperativo ou anti-cooperativo, onde a auto-organização é dada por duas distintas constantes de equilíbrio: a constante de dimerização K_2 e a constante de nucleação K . Baseado em [131]

Quando em solução, a formação de agregados- π pode ser descrita em termos de equilíbrio químico entre monômeros e agregados. Quando há mais de uma espécie de agregados, deve-se considerar múltiplos equilíbrios no sistema. Para tanto, diferentes modelos matemáticos vêm sendo utilizados para descrever esses agregados. Uma breve descrição dos modelos é apresentada a seguir.

3.6.1. Modelo Monômero-Dímero [132,133]:

Trata-se do modelo matemático mais simples. Nesse modelo, considera-se apenas a formação de dímeros no sistema, a partir das unidades monoméricas das estruturas em estudo. A formação dos dímeros pode ser representada pela equação de equilíbrio **3**:



Onde M representa a unidade monomérica e Agr representa os agregados formados sob forma de dímeros. A constante de dimerização para

esse sistema, representada por K_D , é dada por **4**, que se relaciona com a concentração de agregados (c_{Agr}) e com a concentração de monômeros (c_M^2), conforme **3**:

$$K_D = \frac{c_{Agr}}{c_M^2} \quad (4)$$

Considerando o sistema em equilíbrio, é possível descrever as frações molares das espécies – monômero (α_{mon}) e agregado (α_{agr}) – através de uma relação da concentração dessas com a concentração total das moléculas (c_T), conforme as equações **5** e **6** abaixo:

$$\alpha_{mon} = \frac{c_{mon}}{c_T} \quad (5)$$

$$\alpha_{agr} = 1 - \alpha_{mon} \quad (6)$$

Dessa forma, considerando exclusivamente a formação de dímeros como espécie de agregados no equilíbrio, pode-se considerar que a concentração total nada mais é que o dobro da concentração de agregados somado com a concentração de monômeros no sistema (equação **7**) Quando se evidencia essa equação em função de K_D (equação **4**), chega-se às equações descritas abaixo:

$$c_T = 2c_{agr} + c_{mon} \quad (7)$$

$$c_{mon} = \frac{-1 + \sqrt{8K_D c_T + 1}}{4K_D} \quad (8)$$

$$\alpha_{mon} = \frac{-1 + \sqrt{8K_D c_T + 1}}{4K_D c_T} \quad (9)$$

$$\alpha_{agr} = \frac{4K_D c_T + 1 - \sqrt{8K_D c_T + 1}}{4K_D c_T} \quad (10)$$

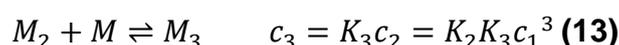
Outra consideração a ser feita é de que para esse perfil de agregados, os agregados π -faces podem ser definidos como:

$$\alpha_{\pi agr} = \frac{2c_{agr}}{2c_T} = 0,5(1 - \alpha_{mon}) = 0,5\alpha_{agr} \quad (11)$$

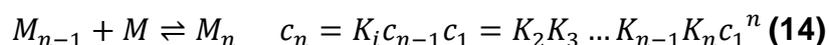
O modelo monômero-dímero foi empregado em inúmeros estudos sobre agregados na literatura, incluindo a formação de dímeros H de cianinas[30], em perileno bisimidas [134], merocianinas [135] e ftalocianinas [136].

3.6.2. Modelo Isodésmico ou K Igual [131–133]:

Dentre os modelos onde considera-se a formação de agregados maiores que dímeros, esse é o mais simples. Sua simplicidade matemática está no fato de assumir apenas um caráter dimensional para os agregados formados. A adição de um monômero a qualquer espécie de agregado possui a constante de Energia Livre de Gibbs igual. Sendo assim, o processo de formação de agregados isodésimicos pode ser representada da seguinte forma, com suas constantes de equilíbrio:



E para um sistema com n unidades nos agregados:



Onde $c_1, c_2, c_3, \dots, c_n$ são as concentrações molares dos monômeros, dímero, trímeros, etc, e K_2, K_3, \dots, K_n são as constantes de equilíbrio para a adição de um monômero à monômeros, dímeros, trímeros, etc. Para o Modelo Isodésmico, considera-se que:

$$K_1 = K_2 = K_3 = \dots = K_n \quad (15)$$

Dessa forma, para a concentração de n -meros c_n e concentração total c_T

tem-se:

$$c_n = K^{n-1}c_1^n \quad (16)$$

$$c_T = (c_1 + 2Kc_1^2 + 3K^2c_1^3 + \dots + nK^{n-1}c_1^n) \quad (17)$$

Considerando a expansão da série $1 + 2x + 3x^2 + \dots + nx^{n-1} = 1/(1-x)^2$ para $0 < x < 1$, obtém-se a equação abaixo para representação da concentração total:

$$c_T = \frac{c_1}{(1-Kc_1)^2} \quad (18)$$

Que resolvendo obtém-se:

$$c_1 = \frac{2Kc_T + 1 - \sqrt{4Kc_T + 1}}{2K^2c_T} \quad (19)$$

Com as mesmas considerações usadas no Modelo Monômero-Dímero (equações 5 e 6), obtém-se:

$$\alpha_{agr} = 1 - \frac{2Kc_T + 1 - \sqrt{4Kc_T + 1}}{2K^2c_T^2} \quad (20)$$

Para os agregados π -faces, tem-se que:

$$\alpha_{\pi agr} = \frac{2c_2 + 4c_3 + 6c_4 + \dots + (2n-2)c_n}{2c_T} \quad (21)$$

Ajustando a equação acima, e em função de K e c_T temos:

$$\alpha_{\pi agr} = Kc_1 = \frac{2Kc_T + 1 - \sqrt{4Kc_T + 1}}{2Kc_T} \quad (22)$$

O número do tamanho médio dos agregados ou a média do número de monômeros por agregados N pode ser calculada pela equação:

$$N = \frac{c_T}{c_N} = \frac{c_1 + 2c_2 + 3c_3 + \dots + nc_n}{c_1 + c_2 + c_3 + \dots + c_n} \quad (23)$$

Considerando a equação 7 e com a expansão da série $1 + 2x + 3x^2 + \dots + nx^n = 1/(1-x)$, c_N pode ser expresso como:

$$c_N = c_1(1 + Kc_1^2 + K^2c_1^3 + \dots + K^{n-1}c_1^{n-1}) = \frac{c_1}{(1-Kc_1)} \quad (24)$$

Considerando a equação 8, N pode ser calculado como:

$$N = \frac{c_T}{c_N} = \frac{c_T(1-Kc_1)}{c_1} = c_T \left[\frac{2K^2c_T^2}{c_T(2Kc_T+1-\sqrt{4Kc_T+1})} - K \right] = \frac{1+\sqrt{4Kc_T+1}}{2} \quad (25)$$

Além do mais, a média ponderal do tamanho de agregados N_p é dada como:

$$N_p = \frac{c_P}{c_T} = \frac{c_1 + 4c_2 + 9c_3 + \dots + n^2c_n}{c_1 + 2c_2 + 3c_3 + \dots + nc_n} \quad (26)$$

Colocando a equação acima em função de c_1 temos:

$$N_p = \frac{1+Kc_1}{1-Kc_1} = \sqrt{4Kc_T + 1} \quad (27)$$

O emprego do modelo isodésmico na literatura foi apresentado para perilenos [132,137] e bis(merocianinas) [138].

3.6.3. Modelo Isodésmico Modificado ou K_2 - K [131–133]:

Esse modelo trata-se de uma adaptação do modelo descrito acima, o isodésmico, justamente para ajustar os dados experimentais aos teóricos de forma mais precisa. Esse modelo considera que as interações π -face ocorrem de forma diferente quando monômeros interagem com monômeros e monômeros interagem com dímeros, em decorrência de diferenças estéricas na estrutura. Nesse caso, considera-se que $K_2 \neq K_3 = \dots = K_n = K$. Define-se a

constante $\rho = K_2/K$, e obtém-se a equação:

$$c_n = K_2 K^{n-2} c_1^n \quad \mathbf{28}$$

$$c_T = (1 - \rho)c_1 + \frac{\rho c_1}{(1 - Kc_1)^2} \quad \mathbf{29}$$

A Figura 18 mostra, a partir de dados teóricos, o perfil das curvas considerando diferentes valores de ρ , e por consequência, os perfis para diferentes tipos de interações. Nesse modelo, ρ indica o quão fácil ou difícil é a formação de dímeros, em comparação com as espécies poliméricas. Para sistemas onde $\rho \gg 1$, o processo é descrito como anti-cooperativo, ou seja, a constante de dimerização é muito maior do que a constante de agregação subsequente, e a formação de agregados mais extensos é suave. Quando $\rho \rightarrow \infty$, $K \approx 0$, ocorre uma tendência de aproximação à representação onde ocorre um equilíbrio monômero – dímero, indicando que a formação de dímeros é dominada na formação de agregados. Para $\rho = 0$, tem-se o processo não-cooperativo, tornando o modelo idêntico ao Isodésmico. Para $\rho \ll 1$, a equação descreve um processo cooperativo, onde o processo de nucleação é envolvido na formação de agregados. Considerando que $\rho = K_2/K$, com os valores de ρ e K obtidos é possível obter a constante de dimerização K_2 . [131]

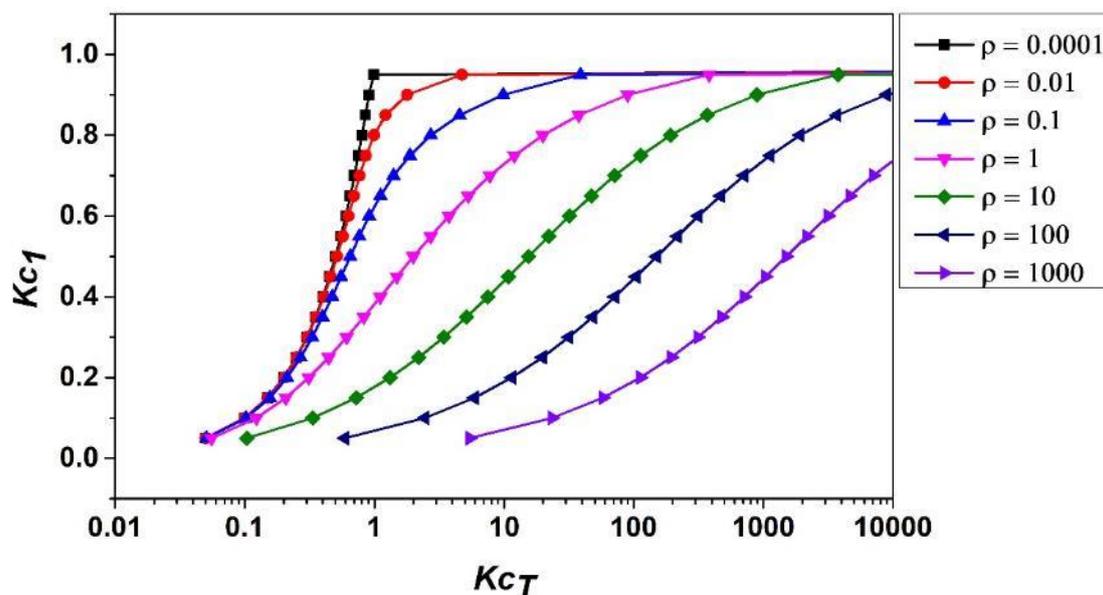


Figura 18: Gráfico relacionando concentração de monômero e concentração total das espécies para diferentes valores de ρ , conforme modelo isodésmico modificado.

O modelo isodésmico modificado foi empregado para estruturas como esquaraínas [139], perilenos [140] e bis(merocianinas) [138].

Além dos modelos descritos acima, outros modelos foram propostos, como a exemplo o K Atenuado e o Modelo Global, onde consideram-se outras constantes de dimerização e formação de agregados em decorrência de diferentes considerações acerca da formação dos agregados, mas não serão abordados no presente trabalho.[133,141,142].

3.7. Sensores Fluorescentes

Com relação ao processo de emissão de fótons via fluorescência, inúmeros parâmetros são capazes de influenciar em sua emissão, através de interações dos compostos em seu estado excitado com o ambiente próximo. Esses parâmetros são a polaridade do meio, existência de ligações de hidrogênio, pH, presença de íons, potencial elétrico aplicado no meio, pressão, viscosidade do meio, temperatura, presença de supressor. Essas interações são capazes de fornecer informações específicas para investigações sobre o

microambiente do composto, conforme ilustrado na Figura 19.[143]

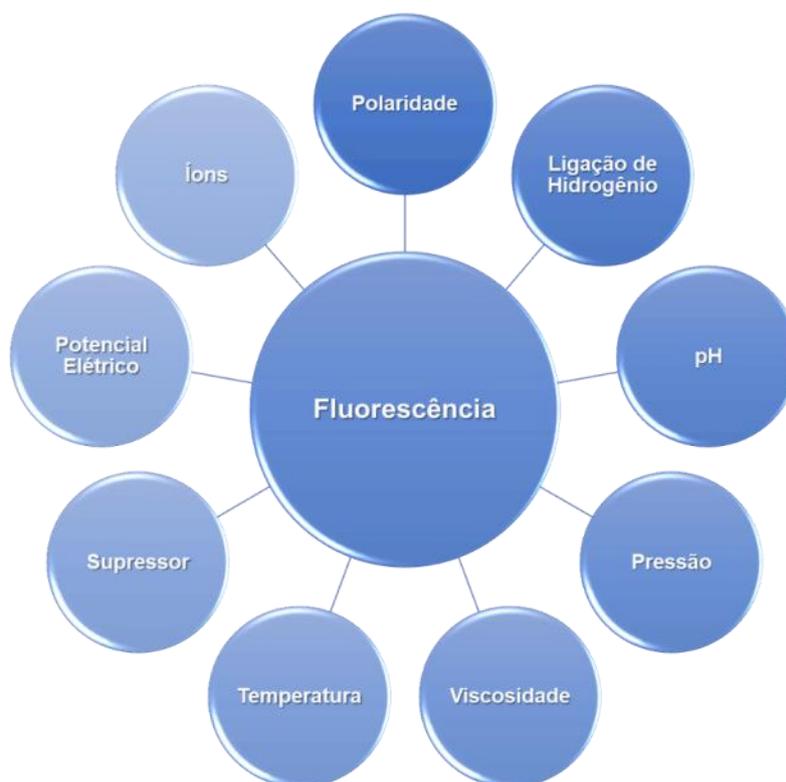


Figura 19: Esquema relacionando a emissão de fluorescência com diversos parâmetros capazes de influenciar na emissão de fluorescência.

O uso da fluorescência como ferramenta de detecção química vem sendo investigada, seja pela detecção de íons, mudanças de pH ou na detecção de analitos como aminas, aminoácidos, açúcares, tióis, etc. Entre as formas de operação dos sensores fluorescentes temos: a) reação reversível do analito com o fluoróforo, como por exemplo em sensores de pH e reações de protonação e desprotonação; b) ligação reversível do fluoróforo com um analito; c) substituição de um fluoróforo por um analito em um complexo, sendo uma estratégia de reconhecimento de unidades específicas e unidades sinalizadoras; d) supressão colisional de um fluoróforo por um analito; e) derivatização, onde uma reação irreversível entre um analito com um reagente levando a um composto fluorescente.[144] A Figura 20 esquematiza esses processos de uso da fluorescência como técnica de detecção química.

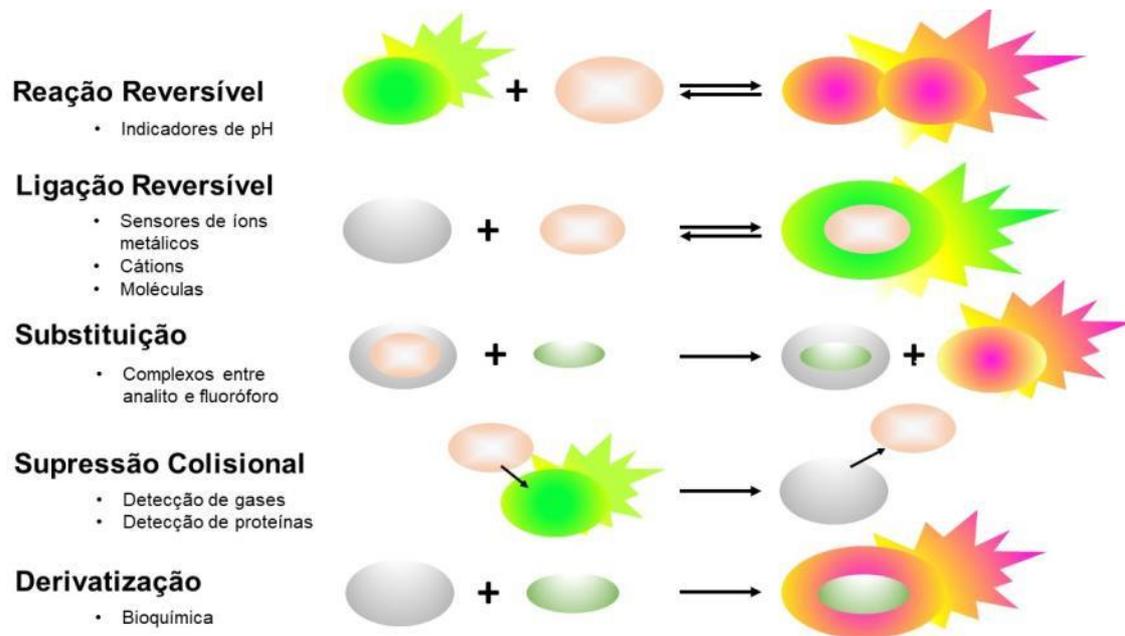


Figura 20: Esquemática mostrando as formas de operação de sensores fluorescentes. Baseado em [144].

As cianinas têm se mostrado bons indicadores de pH conforme a literatura.[58,145,146] A Figura 21 ilustra diferentes cianinas. Observa-se que dependendo de suas estruturas, diferentes pKas são observados (estruturas **76** a **79**), sendo que para a estrutura **80**, observa-se duas variações: uma para faixa ácida de pH com emissão de fluorescência no vermelho, e outra para faixas básicas de pH, com emissão de fluorescência verde.

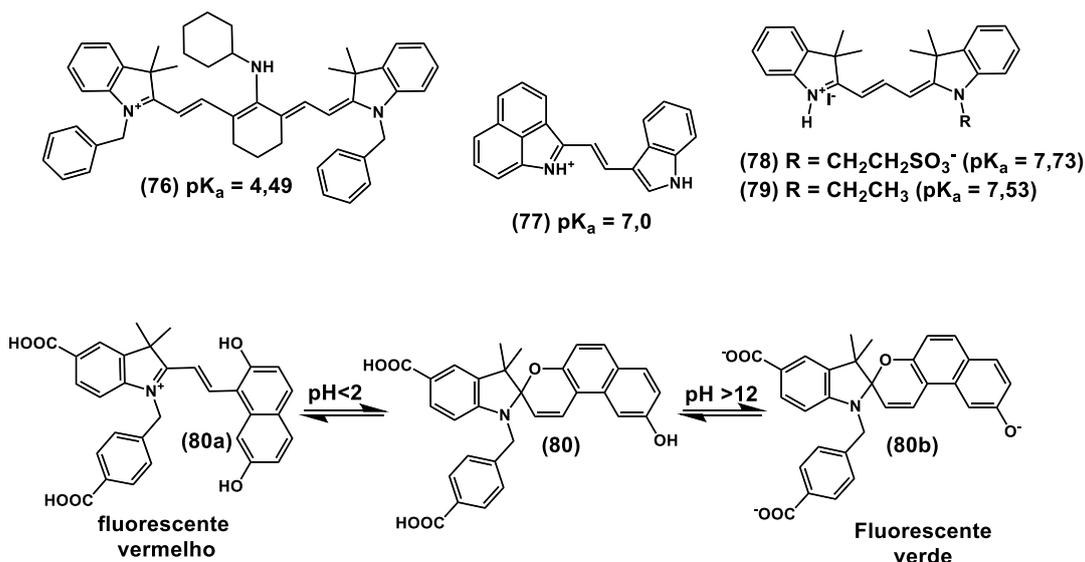


Figura 21: Exemplos de cianinas e seus diferentes pH ou pK_a .

Comercialmente existem diversas cianinas para imageamento celular. Conforme produtos fabricados pela Invitrogen, destacam-se o diacetato de fluoresceína **81**, na Figura 22 (FDA F1303), com diversas possibilidades de desprotonação/protonação da estrutura. O FDA tem sua absorção aumentada com o aumento do pH (Figura 22A), enquanto que seus espectros de emissão mostram um incremento de fluorescência com o aumento do pH (Figura 22B). Além disso, há o SNARF **82**, reativo com aminas e tióis, usado como sensor de pH e marcador celular, com monitoramento de pH por um longo período, contém clorometila em suas substituições 5 ou 6 (Figura 22C). Um exemplo de sua aplicação está no imageamento de neutrófilos humanos (Figura 22D).[147]

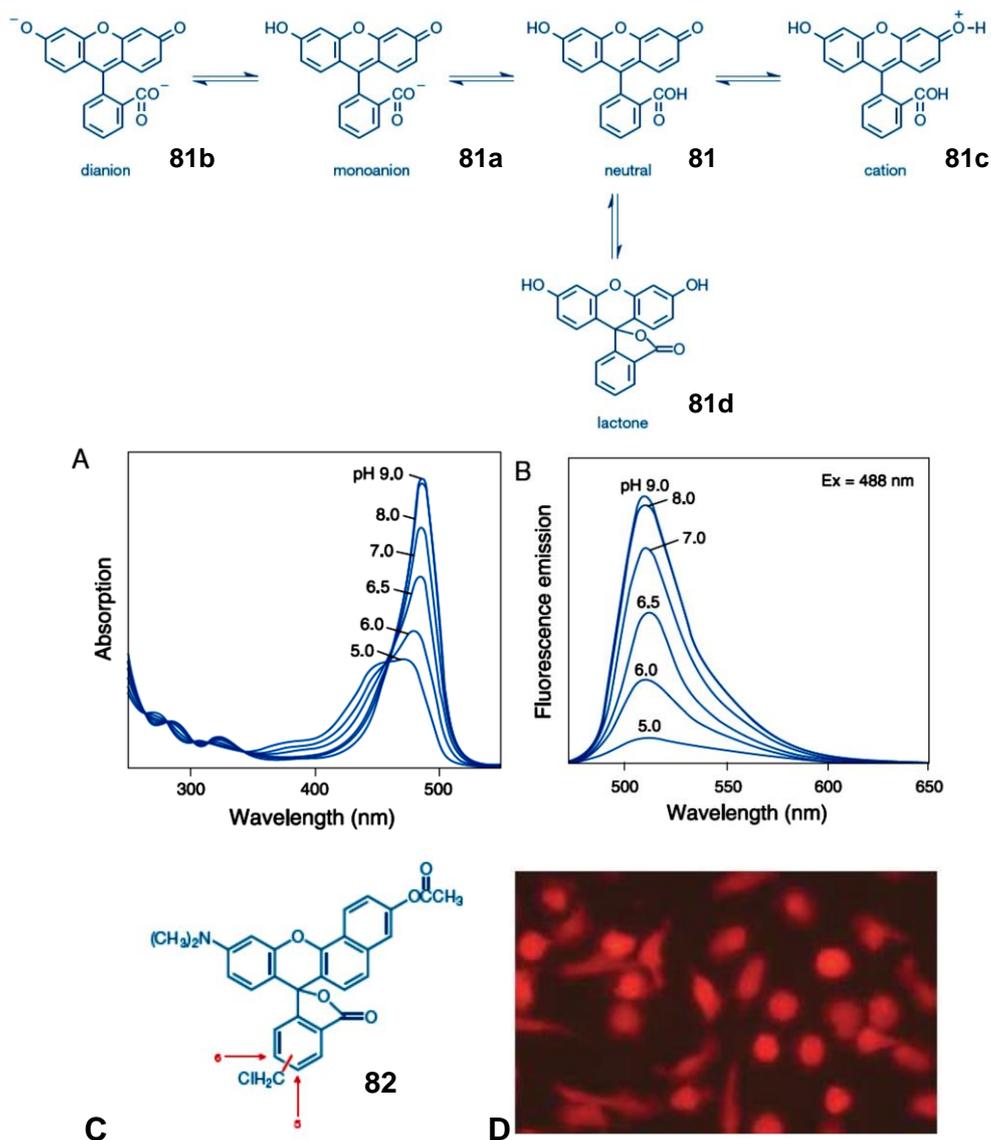


Figura 22: Estruturas de ressonância da fluoresceína diacetato **81** (FDA F1303) e seus espectros de absorção (A) e emissão (B) variando o pH; e em (C) estruturas do SNARF **82** e seu uso em imageamento celular em neutrófilos humanos (D).[147]

3.8. Sondas de Proteínas

Nas proteínas três aminoácidos são responsáveis pela sua fluorescência intrínseca: a fenilalanina, tirosina e triptofano. Esses aminoácidos são relativamente raros nas proteínas, e no caso o triptofano está presente em aproximadamente 1% em mol de uma estrutura proteica. Essa dominância da emissão de fluorescência é explicada pelo fato de que o triptofano absorve em

comprimentos de onda maiores e, a energia absorvida pela fenilalanina e tirosina acabam sendo transferidas para os resíduos de triptofano na mesma proteína. Suas emissões ocorrem aproximadamente em 282 nm para a fenilalanina, 303 nm para tirosina e 350 nm para triptofano. Para o triptofano observa-se uma grande sensibilidade ao ambiente local,[148] seja através de transições conformacionais, associações, ligações a substratos ou desnaturação proteica.[149]

A supressão da fluorescência de proteínas é observada através da adição de um supressor ao sistema.[150] Esse decréscimo pode estar associado a fenômenos como reações no estado excitado, rearranjos moleculares, transferência de energia, complexos formados no estado fundamental e supressão colisional, esse último, também conhecido como supressão dinâmica.[151,152] Tanto a supressão estática quanto a dinâmica requerem contato entre fluoróforo e supressor. Para a situação em que ocorre supressão colisional, o supressor precisa se difundir para o fluoróforo durante o tempo de vida do estado excitado. Para a supressão estática, um complexo é formado entre supressor e fluoróforo, sendo esse complexo não-fluorescente. A supressão de fluorescência do triptofano pode se dar através de adição de supressores externos ou até mesmo de grupos próximos da própria proteína.[151]

As albuminas séricas são as proteínas de maior abundância no plasma sanguíneo, além de exercerem importantes funções. São consideradas proteínas carreadoras, capazes de se ligarem a íons como K^+ , Na^+ e Ca^{2+} , ácidos graxos, hormônios, bilirrubina, tiroxina, fármacos. Dessa forma são responsáveis pela pressão osmótica, transporte de hormônios, controle de pH, entre outros. Na literatura, inúmeras investigações acerca das albuminas séricas bovina (BSA) e humana (HSA) vem sendo apresentadas.[153] O estudo de suas interações com estruturas fluorescentes ou não, e fármacos vem sendo bastante investigada, utilizando técnicas espectrofotométricas de absorção e emissão de fluorescência, principalmente. [154–157] Além disso, técnicas como dicroísmo circular, fluorescência sincronizada e tempo de vida também vem sendo empregadas.[158]

As cianinas em especial, possuem propriedades interessantes de absorção e emissão de fluorescência e suas características frente à BSA vem sendo apresentadas na literatura.[124,125,157] Tipicamente essas estruturas são insolúveis em água, e quando há formação de agregados do tipo J, sua emissão de fluorescência é bastante reduzida. Artigos têm mostrado uma importante característica desses corantes que, quando em presença de BSA possuem um acréscimo das intensidades de emissão de fluorescência em decorrência das interações favoráveis entre cianinas e BSA, desfavorecendo a presença de agregados no sistema.[15,16] Além disso, estudos envolvendo a ligação química de cianinas com proteínas, bem como o estudo apenas de interações através de ligações não-covalentes vêm sendo apresentados. A exemplo de cianinas, tem-se as que contêm o grupo succinimidil éter (Figura 23).[18,63,159–161] Essas são frequentemente utilizadas na detecção de proteínas, através de ligações covalentes com as amins das proteínas.

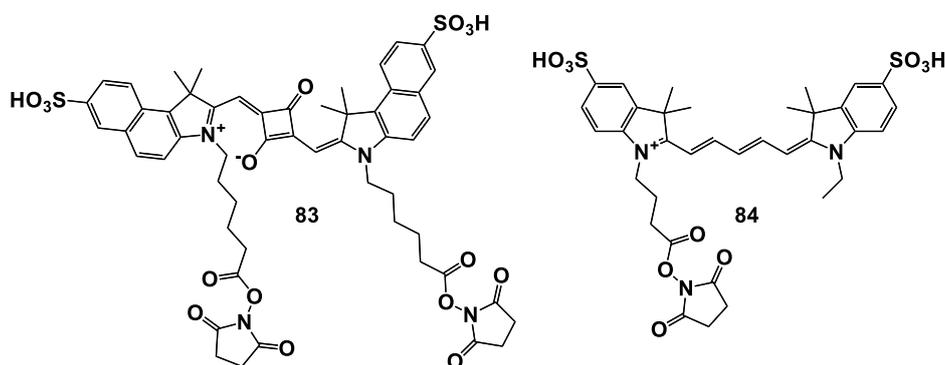
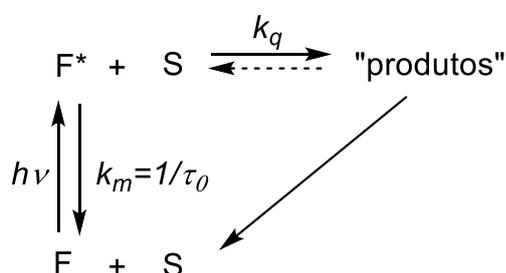


Figura 23: Exemplos de cianinas com grupos succinimidil éter para ligação covalente com amins presentes em proteínas. [19]

O estudo da associação de corantes com albuminas através de espectroscopia de emissão de fluorescência vem sendo largamente discutida. Trata-se de um método simples e rápido, onde é possível investigar as ligações não-covalentes entre a proteína e o soluto em estudo.[162] O processo fotofísico de supressão de fluorescência trata-se de um fenômeno de desativação da molécula de seu estado excitado, onde a presença de uma outra estrutura (supressor S), quando em contato com o fluoróforo em seu estado excitado (F*)

é capaz de promover desativação do estado excitado de forma não-radiativa. Esses fenômenos fotofísicos podem ser: colisão com átomo pesado, transferência de elétrons, formação de excímeros, formação de exciplexos, transferência de prótons ou transferência de energia.[163] O Esquema 12 ilustra esse fenômeno e suas constantes envolvidas. Quando o fluoróforo (F) é excitado (F*), em presença do supressor (S), esse pode ser desativado, representado pela constante K_M , que representa o somatório das constantes de desativação radiativos e não radiativos possíveis, ou pode formar “produtos” com uma constante k_q , que representa a constante observada do processo bimolecular, que leva à relaxação do fluoróforo F.[148,164]



Esquema 12: Representação esquemática do fluoróforo sendo excitado e da possível relaxação via forma radiativa ou não-radiativa, representada por k_m , ou através da formação de “produtos” e supressão de fluorescência, através de k_q . Baseado em [165].

A supressão de fluorescência do fluoróforo pode ocorrer de diferentes formas, dependendo da disponibilidade do supressor frente ao fluoróforo quando no estado excitado.[166] Em situações que há grande concentração de supressor S no sistema quando o fluoróforo encontra-se no estado excitado, existe uma grande probabilidade da distância para que ocorra a supressão de fluorescência seja efetiva. Isso leva à supressão chamada estática. Quando o supressor S se encontra em baixa concentração no momento em que o fluoróforo encontra-se no estado excitado, com uma distância adequada para que a supressão ocorra, o fenômeno é conhecido como supressão dinâmica, e pode ser influenciado por efeitos de difusão. Uma terceira possibilidade, conhecida como transferência de energia não-ressonante a longa distância, ocorre quando o supressor se encontra em baixas concentrações no sistema, e por questões de tempo de vida curto do fluoróforo ou do meio viscoso, a distância efetiva para

que ocorra a transferência de energia é grande.[77,167–169]

No que diz respeito à supressão de fluorescência de proteínas, a equação de Stern-Volmer (30) usada para supressão dinâmica, adéqua-se para muitos casos. A equação, onde F_0 e F são a fluorescência da proteína sem e com o supressor de concentração $[S]$ no sistema, respectivamente, nos fornece a constante k_{SV} , conhecida como constante de Stern-Volmer.[170] Essa constante nada mais é do que o produto entre o tempo de vida da proteína na ausência de supressor τ_0 , e a constante de velocidade k_q , que nada mais é do que a constante de supressão bimolecular (31).

$$\frac{F_0}{F} = 1 + k_{SV}[S] = \frac{\tau_0}{\tau} \quad (30)$$

$$k_{SV} = \tau_0 k_q \quad (31)$$

Experimentalmente, o gráfico seguindo a equação de Stern-Volmer nos fornece informações sobre o tipo de supressão bem como a capacidade de dado supressor suprimir a fluorescência da proteína.[152] Gráficos lineares nos dizem que a supressão decorrente da interação proteína e supressor é do tipo dinâmica. A inclinação da reta nos fornece o valor de k_{SV} para o sistema em questão.[150] Considerando que alguns sistemas experimentais não apresentam linearidade quando se utiliza a equação de Stern-Volmer, adaptações da equação foram realizadas para que se considerassem efeitos de supressão estáticos, que podem ocorrer concomitantemente com a supressão dinâmica, e são observados com um desvio crescente dos valores experimentais. Uma das possibilidades é incluir à equação de Stern-Volmer um termo linear que diz respeito aos efeitos de supressão estáticos, conforme a equação abaixo, onde K_D é a constante de supressão dinâmica (k_{SV}) e K_E é a constante de supressão estática [171].

$$\frac{F_0}{F} = (1 + K_D[S])(1 + K_E[S]) \quad (32)$$

Que também pode ser representada da seguinte forma:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + (K_D + K_E)[S] + K_D K_E [S]^2 \quad (33)$$

Considerando que para cada valor de fluorescência em dada

concentração de supressor existe uma constante aparente denominada K_{ap} , tem-se que:

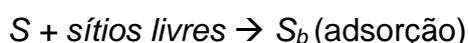
$$K_{ap} = \left[\frac{F_0}{F} - 1 \right] \frac{1}{[S]} = (K_D + K_E) + K_D K_E [S] \quad (34)$$

Onde, com base na equação 5, a partir de gráficos de K_{ap} versus $[S]$ é possível obter os valores de K_D+K_E e $K_D K_E$. Resolvendo o sistema é possível encontrar os valores de constante de supressão dinâmica e estática. Além disso, uma outra forma de considerar efeitos de supressão estática, é acrescentando à equação de Stern-Volmer um termo que leva em consideração o modelo de esfera efetiva de supressão [172,173]. Para isso, um fator $\exp(N_A V_S [S])$ é adicionado à equação:

$$\frac{F_0}{F} = (1 + K_{SV} [S]) \exp(V_S N_A [S]) \quad (35)$$

Onde na equação 35, V_S representa um elemento de volume ativo que cerca o fluoróforo excitado, onde a supressão é efetiva. Nesse volume, considera-se que o supressor esteja em contato com o cromóforo em questão. A partir desse volume é possível obter o raio da esfera de ativação, utilizando uma forma simples de volume de esfera, que nos diz a distância entre o fluoróforo e supressor em que a supressão seja efetiva [172].

Além dessas informações acerca dos fenômenos de supressão de fluorescência que podem ser obtidos através da análise de espectros de fluorescência da proteína em presença de supressor, uma análise acerca do fenômeno de adsorção e dessorção do supressor na proteína pode nos levar a informações de constante de ligação bem como o número de sítios equivalentes da proteína, ou o número de moléculas que interagem simultaneamente com cada sítio da proteína.[166] Assim, considerando um soluto (para o caso do presente trabalho, o supressor) interagindo com uma proteína, o processo de adsorção do soluto nos sítios livres da proteína pode ser representado pela equação:



Onde S é o soluto livre e S_b é o soluto ligado.

Cada molécula de proteína possui n sítios equivalentes e, quando em dada concentração de proteína P₀ uma certa concentração de soluto S₀ é adicionada, uma fração de sítios θ é ocupada. Considerando que não há mudanças conformacionais nesse processo, θ pode ser descrito como:

$$\theta = \frac{F^0 - F}{F^0 - F^\infty} \quad (38)$$

Onde F⁰ é a fluorescência da proteína sem o supressor/soluto, F é a fluorescência da proteína em dada concentração de soluto e F[∞] é a fluorescência da proteína saturada de soluto/supressor. Nesse processo, pode-se definir a constante de ligação K como:

$$K = \frac{k_+}{k_-} = \frac{[S_b]}{[S][\text{sítios livres}]} \quad (39)$$

Onde K é dada em termos de concentração de sítios livres da proteína. K é considerado como uma definição universal da constante de ligação e independe do número de sítios N da proteína.[174] Além disso, a constante de ligação pode ser expressa em termos de fração média de sítios de proteína ocupados por soluto (θ), onde,

$$[S_b] = \theta n[P^0] \quad (40)$$

$$[S] = [S^0] - \theta N[P^0] \quad (41)$$

$$[\text{sítios livres}] = (1 - \theta)N[P^0] \quad (42)$$

Assim, a equação pode ser reescrita como:

$$K = \frac{\theta}{([S^0] - \theta N[P^0])(1 - \theta)} \quad (43)$$

Rearranjando a equação, e considerando P⁰ constante, podemos defini-la da seguinte forma:

$$\frac{1}{(1 - \theta)P^0} = \frac{KS_0}{\theta P^0 - nK} \quad (44)$$

O logaritmo da equação nos fornece outras informações. Considerando que praticamente todas as moléculas de soluto no sistema estão interagindo com os sítios da proteína, e que F⁰ >> F[∞], a equação em função de θ se resume em:

$$\frac{\theta}{(1-\theta)} = K[S_0] \therefore \frac{F^0-F}{F} = K[S_0]^m \therefore \log \left[\frac{F^0-F}{F} \right] = \log K + m \cdot \log[S_0] \quad (45)$$

Onde m representa a ordem de reação. A sua forma logarítmica nos fornece o valor de K e m , onde m representa o número de moléculas S que interagem simultaneamente com cada sítio.

Para esses estudos é importante considerar o efeito do filtro interno. Esse efeito ocorre uma vez que ao sistema é adicionado um outro componente capaz de absorver no mesmo comprimento de onda em que a proteína absorve e emite.[175,176] Tal correção dá-se pela equação:

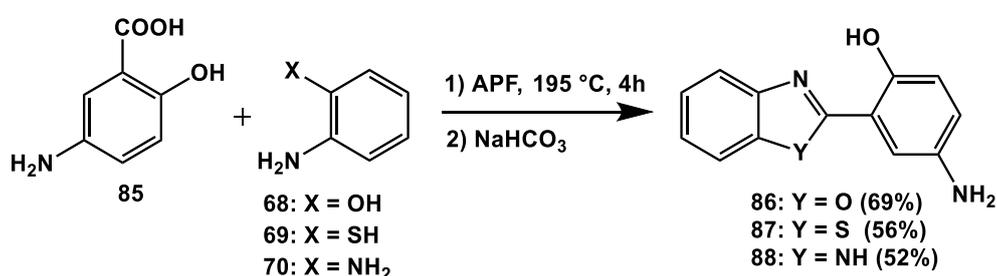
$$F_{corr} = F_{obs} 10^{(Abs\ exc + Abs\ em)/2} \quad (46)$$

Onde F_{corr} é a fluorescência corrigida, F_{obs} é a fluorescência medida, $Abs\ exc$ é a absorvância da proteína no comprimento de onda de excitação do soluto, e $Abs\ em$ é a absorvância da proteína no comprimento de onda de emissão do soluto.

4. Resultados e Discussão

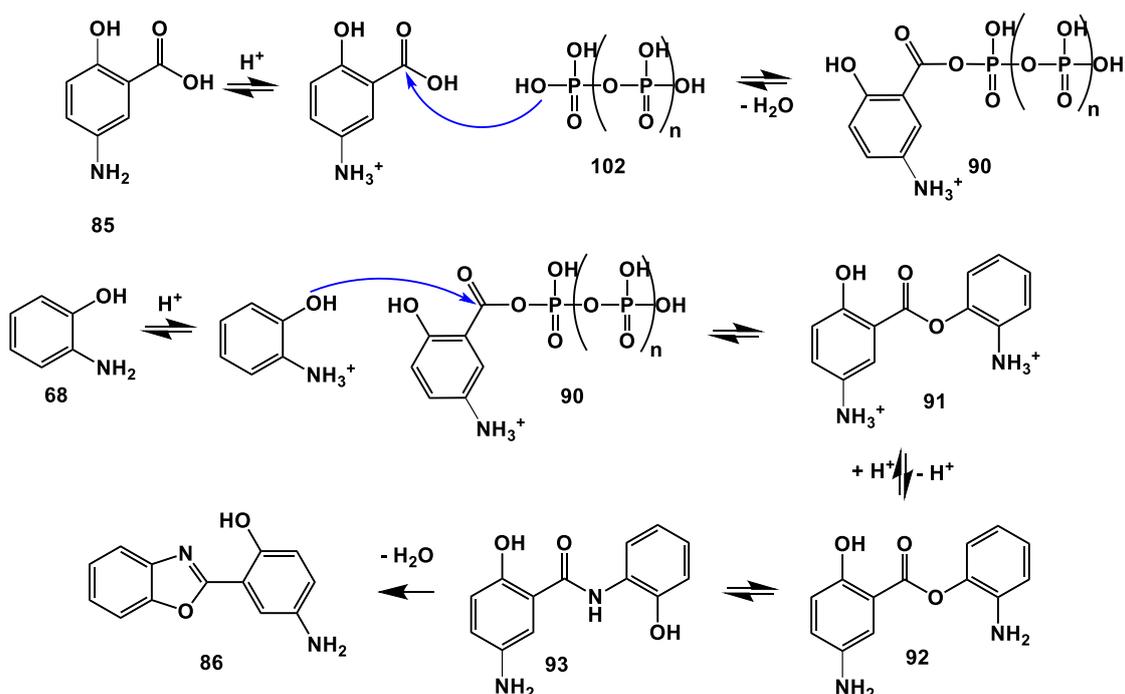
4.1. Síntese das Estreptocianinas

Para a obtenção das estreptocianinas, inicialmente sintetizou-se os precursores 2-(5'-amino-2'-hidroxifenil)benzazóis **86-88**, conforme o Esquema 13, através da reação de ciclização utilizando-se APF, entre o ácido 5-amino-2-hidroxibenzoico **85** e a anilina correspondente **68-70**.



Esquema 13: Esquema de obtenção dos 2-(5'-amino-2'-hidroxifenil)benzazóis **86** a **88**.

O Esquema 14 apresenta uma proposta para o mecanismo de síntese do 2-(5'-amino-2'-hidroxifenil)benzoxazol **86**. A síntese ocorre através da reação entre o ácido 5-amino-2-hidroxibenzoico **85**, que protonado sofre ataque na carbonila do grupo carboxila pelo ácido polifosfórico **89**, gerando **90**. Em decorrência do meio ácido, o *o*-aminofenol **68** é protonado e o par de elétrons do oxigênio fenólico ataca a carbonila de **90**, levando à estrutura **91**, que em equilíbrio, sofre migração acíclica (**93**) e cicliza, formando o 2-(5'-amino-2'-hidroxifenil)benzoxazol **86**. [177]

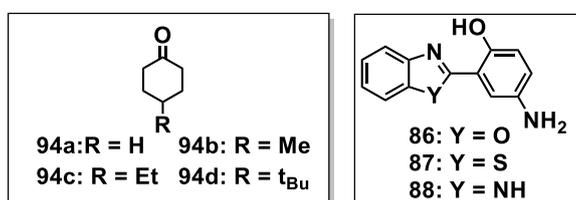
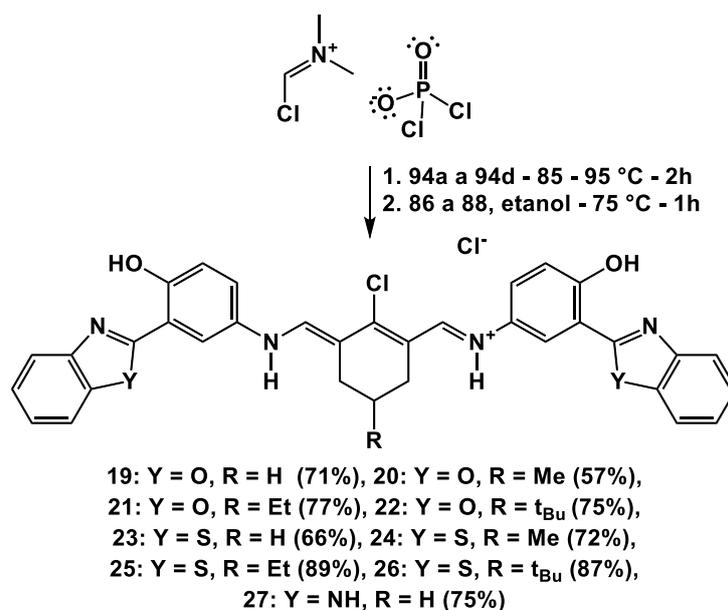


Esquema 14: Mecanismo de obtenção do 2-(5'-amino-2'-hidroxifenil)benzoxazol **86**.

Baseado em [177].

Com o uso dos 2-(5'-amino-2'-hidroxifenil)benzazóis **86** a **88**, obteve-se as estreptocianinas **19** a **27** apresentadas no Esquema 15. Para tanto, iniciou-se com a síntese do reagente de Vilsmeier-Haack utilizando POCl₃ e DMF. A seguir, adicionou-se a cicloexanona correspondente **94a** a **94d** para formilação. Na sequência, ocorreu a adição de **86-88** em etanol. O produto precipitou no meio, com coloração bastante intensa variando entre azul escuro e verde escuro iridescentes (Figura 24). A coloração dos sólidos finais, bem como a de iridescência é uma característica presente em corantes do tipo polimetínicos. As estreptocianinas foram purificadas com lavagem usando soxhlet e apresentaram bons rendimentos, acima de 57%.

Observou-se uma variação da solubilidade conforme o heteroátomo presente no heterociclo, bem como a natureza das cetonas utilizadas. Os derivados contendo oxigênio como heteroátomo apresentaram-se mais solúveis que os demais. Com relação à cetona, observou-se que derivados não substituídos apresentaram baixa solubilidade quando comparados com as cetonas substituídas. Dentre os substituídos, os que apresentaram etila como substituição R (Esquema15) mostraram-se os menos solúveis.



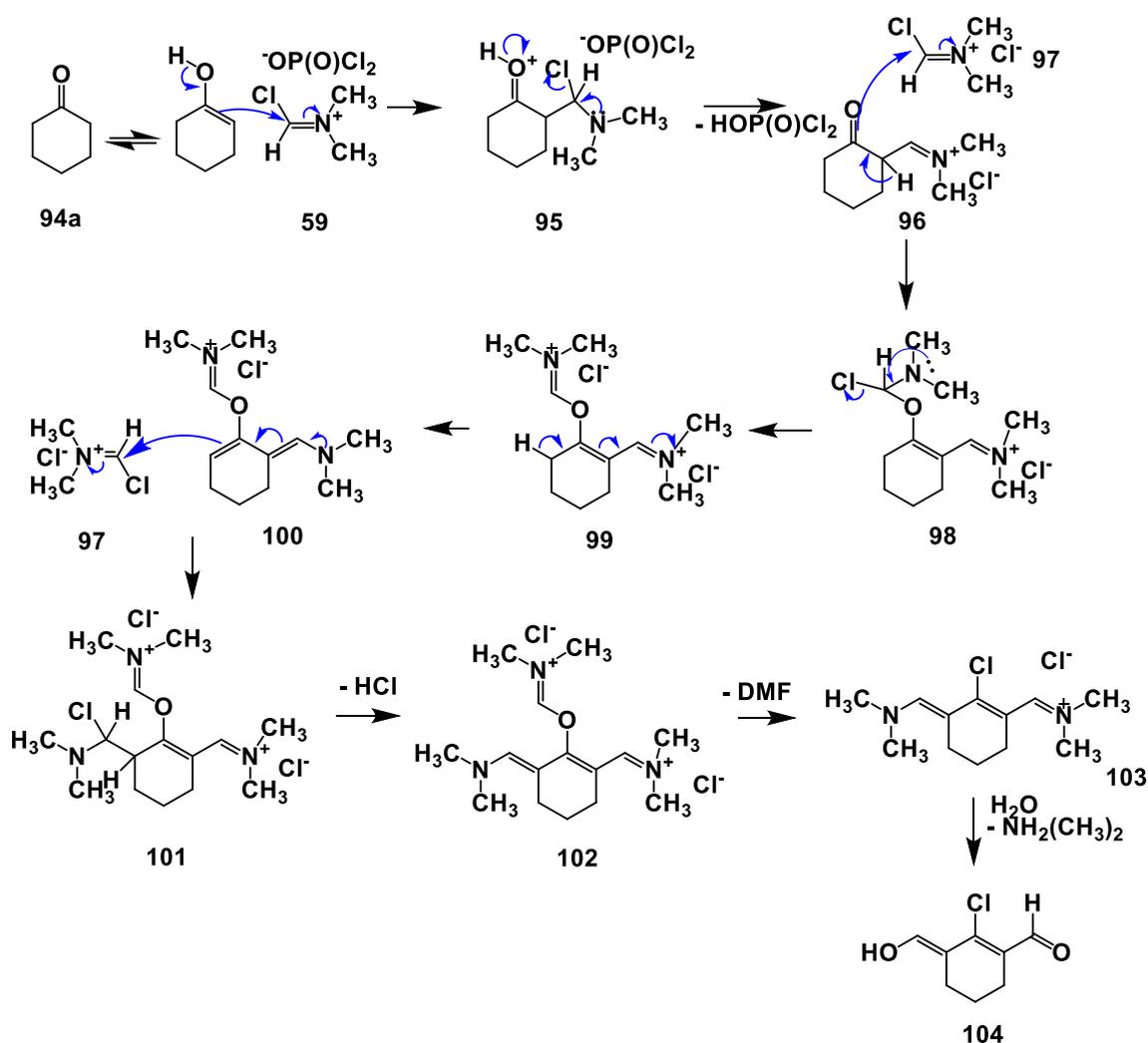
Esquema 15: Estreptocianinas **19** a **27** sintetizadas a partir dos aminobenzazóis **86-88**.



Figura 24: Fotos das estreptocianinas **20** e **26**, apresentando coloração azul a verde iridescentes.

A formilação das cetonas **94a-94d**, deu-se a partir do reagente de Vilsmeier-Haack. A reação ocorre através da adição de cloreto de fosforila em DMF, sob banho de gelo devido à reação exotérmica, seguido de agitação à temperatura ambiente. Ao reagente de Vilsmeier-Haack **59** adiciona-se a cetona correspondente **94a-94d** e a reação é mantida sob refluxo. O mecanismo está descrito no Esquema 16. A ciclohexanona **94a**, após um equilíbrio ceto-enol, tem

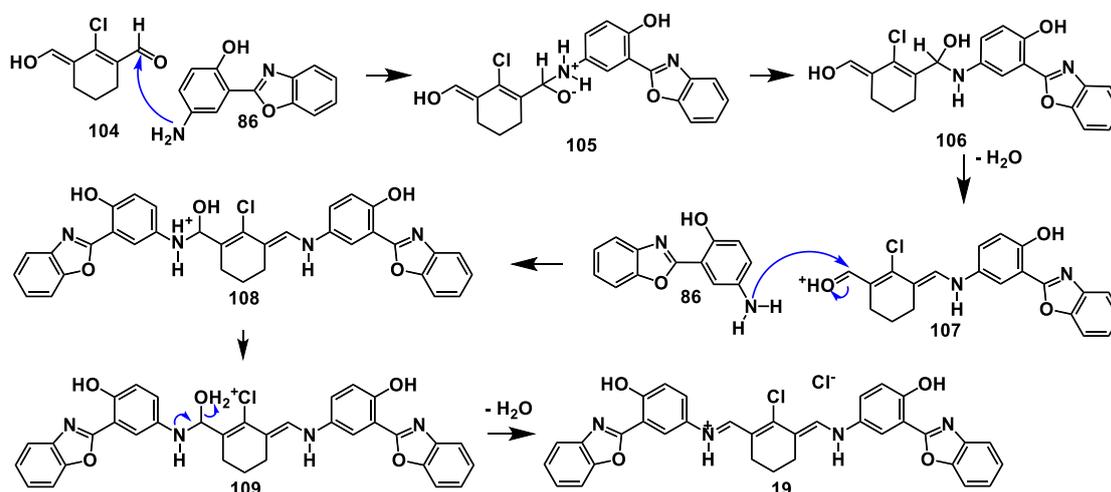
seu par de elétrons da dupla ligação da forma enol atacando o carbono do íon imínio do reagente de Vilsmeier-Haack **59**, formando o intermediário **95**. Seguidamente, a desprotonação de **95** e rearranjo leva ao intermediário **96**, que por sua vez, o par de elétrons da cetona ataca novamente o carbono do íon imínio de **97**, levando a **98**. Esse intermediário perde H^+ e Cl^- , levando a um rearranjo formando **99**. Esse último perde um próton e forma uma ligação sp^2 (**100**). Mais uma vez, o par de elétrons da dupla ligação ataca o carbono do íon imínio **95**, levando ao intermediário **101**. Através de um rearranjo que ocorre após o ataque do íon cloreto, forma-se **102**, que acaba liberando DMF e formando **103**. Esse, pode sofrer hidrólise liberando dimetilamina e formando o intermediário diformilado desejado **104**.



Esquema 16: Mecanismo de formilação da cicloexanona **94a**. Baseado em [178].

Devido à instabilidade de **104**, a formação da estreptocianina procede

seguidamente, com a adição da amina correspondente, que no caso do Esquema 17, exemplifica o mecanismo para 2-(5'-amino-2'-hidroxifenil)benzoxazol **86** para a obtenção da estreptocianina **19**. A reação ocorre sob refluxo e dá-se através da aminação redutiva que ocorre entre **104** e **86**. Na primeira etapa a carbonila fenólica de **104** é protonada e acaba tornando-se susceptível ao ataque do par de elétrons do nitrogênio da amina de **86**, formando o intermediário **105**. A troca protônica leva a **106** e ocorre a perda de água após o rearranjo de cargas. O par de elétrons de outra unidade de **86** ataca o carbono eletrofílico de **107**. Novamente, a captação do próton da amina pela hidroxila ocorre em **108** seguido de perda de água (**109**) formando a estreptocianina **19**.



Esquema 17: Mecanismo proposto para a formação da estreptocianina **19**.

Para auxiliar na elucidação estrutural das estreptocianinas, comparou-se com os espectros das aminas precursoras. Em ATF-d (ácido trifluoroacético deuterado) não foi possível observar os hidrogênios fenólicos e o grupo amino, que são observados em solventes como clorofórmio e DMSO. Observa-se na Figura 25 superior, o espectro de ^1H -RMN. Em 8,48 ppm observa-se um dubleto com acoplamento de 2,8 Hz, atribuído ao acoplamento *meta* do hidrogênio H_6 . Entre 7,85 ppm e 7,80 ppm observa-se um multipletto associado a 3 hidrogênios (H_4 , H_7 e H_4'). Entre 7,74 ppm e 7,66 ppm um multipletto com área associada a dois hidrogênios, onde é possível inferir a presença de acoplamentos *orto* de 7,2 Hz e 8,8 Hz, relacionados aos hidrogênios H_5 e H_6 . Em 7,39 ppm há um dubleto

com área relacionada a um hidrogênio e acoplamento *orto* de 9,2 Hz, indicando associação com H_{3'}. Com relação ao espectro de ¹³C-RMN (APT), na Figura 25 inferior, observa-se 7 sinais associados aos carbonos C-H e seis sinais positivos associados a carbonos quaternários da estrutura.

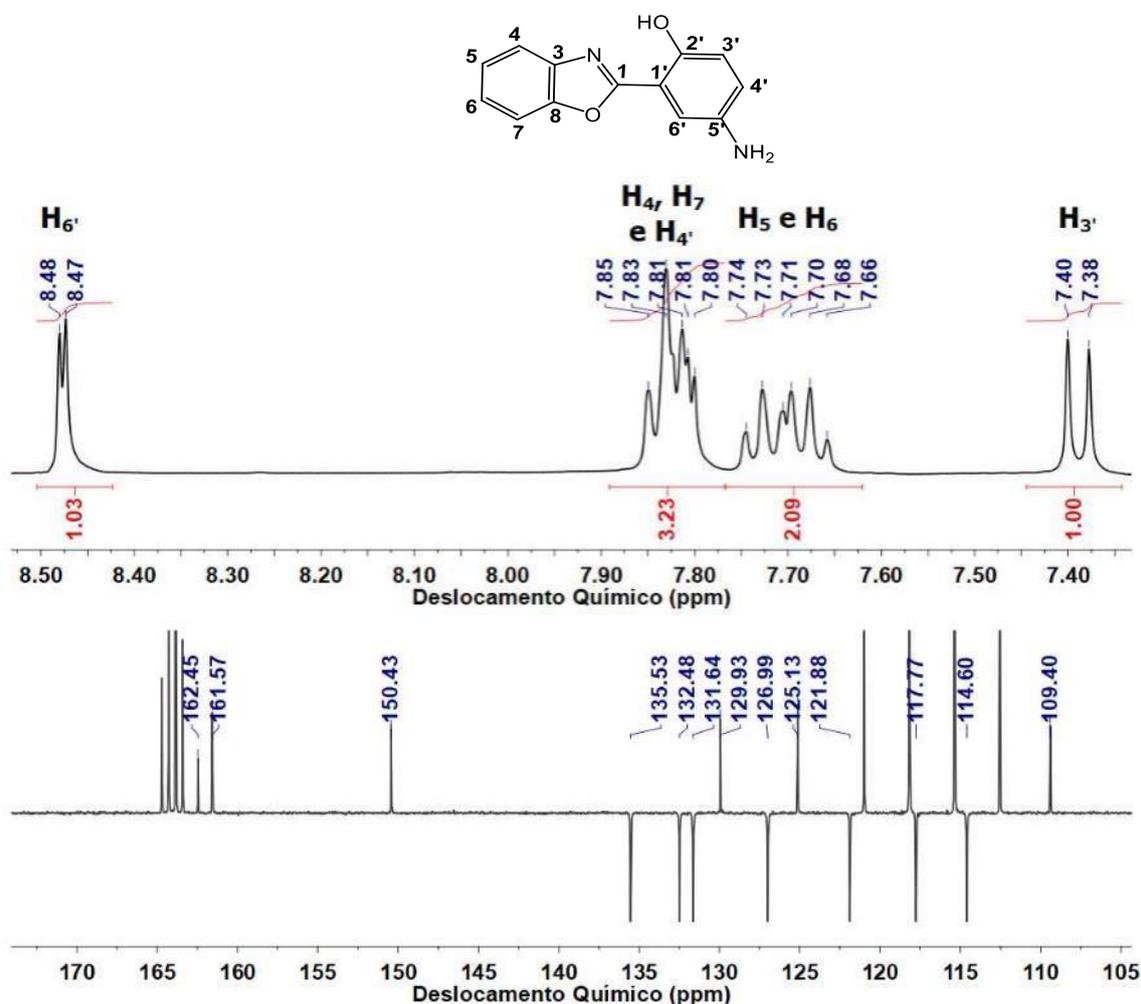


Figura 25: Espectro de ¹H-RMN e de ¹³C-RMN (APT) em TFA-*d* para **86**.

O espectro de ¹H-RMN de **19** em TFA-*d* está apresentado na Figura 26. Observa-se na região dos alifáticos em 2,06 ppm dois hidrogênios, e 2,72 ppm quatro hidrogênios que são associados aos hidrogênios **c** e **b**. Já em 7,43 um dupletto referente aos dois hidrogênios H_{3'} com $J_{orto} = 9$ Hz. Em 7,77 ppm tem-se um multipletto dos seis hidrogênios H₅, H₆ e H_{4'}; e em 7,90 ppm outro multipletto, que corresponde a quatro hidrogênios (H₄ e H₇). Em 8,30 ppm, como singletto, encontram-se dois hidrogênios H_{6'}, enquanto que em 8,75 ppm há um singletto relacionado aos dois hidrogênios olefínicos H_a. Quando comparado com o

espectro de **86**, vê-se que a formação da ligação carbono-nitrogênio leva a um deslocamento dos sinais dos hidrogênio próximos, em especial o H_{6'} e o H_{4'}.

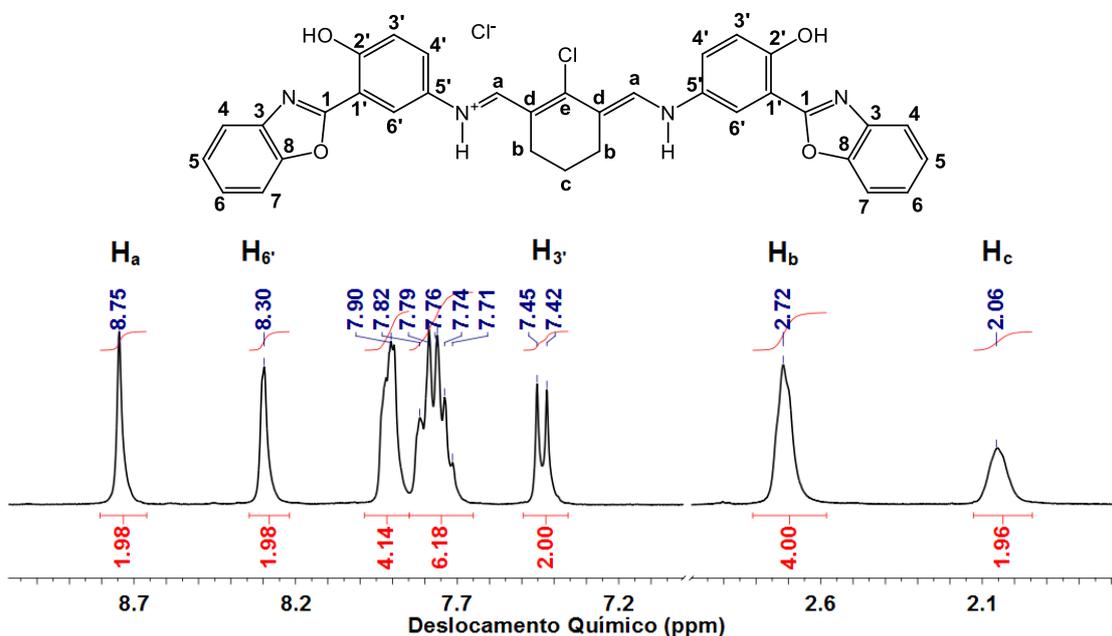


Figura 26: Espectro de ¹H-RMN (400 MHz) em TFA-*d* para **19**.

Com relação ao espectro de ¹³C-RMN (APT) para **19**, na Figura 27, observa-se em 19,56 e 24,23 ppm os sinais relacionados aos carbonos **b** e **c**. Os demais carbonos aromáticos e alifáticos encontram-se entre 107 ppm e 162 ppm. A partir do comparativo com o espectro do precursor **28**, foi possível identificar em 149,90 ppm o carbono **a**. Além disso, está destacado todos os 16 sinais relacionados aos carbonos aromáticos e olefínicos da estrutura, entre 162 e 107 ppm.

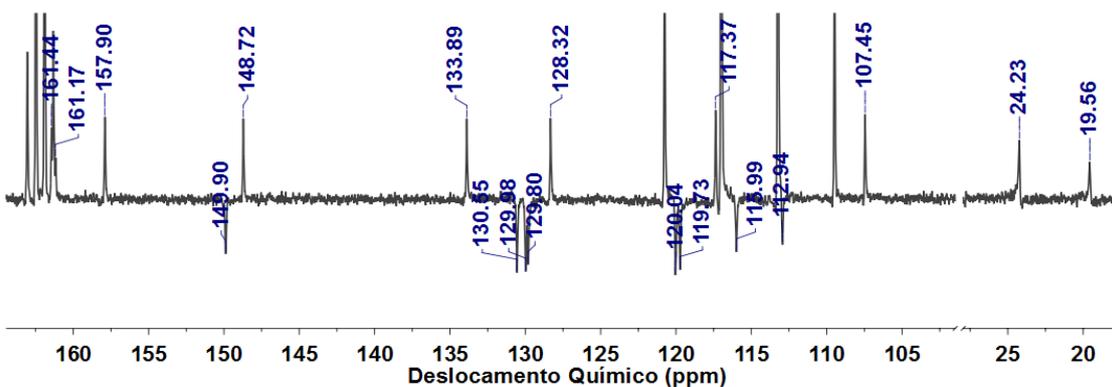


Figura 27: Espectro de ¹³C-RMN (APT – 75,4 MHz) em TFA-*d* para **19**.

Para a estreptocianina **20** (Figura 28) o espectro de ^1H -RMN mostra em 1,30 ppm um dubleto, de acoplamento de 6,4 Hz, associado a três hidrogênios H_f . Em 2,22 ppm sinal alargado, relacionado a 1 hidrogênio, o H_c . Em 2,36 ppm e 2,91 ppm há dois multipletos, cada um associado a dois hidrogênios, sendo esses os hidrogênios diastereotópicos (axial e equatorial) H_b . Já na região dos aromáticos, observa-se um dubleto associado a dois hidrogênios $\text{H}_{3'}$ em 7,52 ppm, com acoplamento $J_{orto} = 9,2$ Hz. Em 7,86 e 8,00 ppm estão dois multipletos associados a seis hidrogênios (H_4 , H_7 e $\text{H}_{4'}$) e quatro hidrogênios (H_5 e H_6), respectivamente. Em 8,37 ppm encontra-se um dubleto relacionado a dois hidrogênios $\text{H}_{6'}$ com acoplamento *meta* de 2,4 Hz. Em 8,83 ppm um singlete associado a dois hidrogênios H_a .

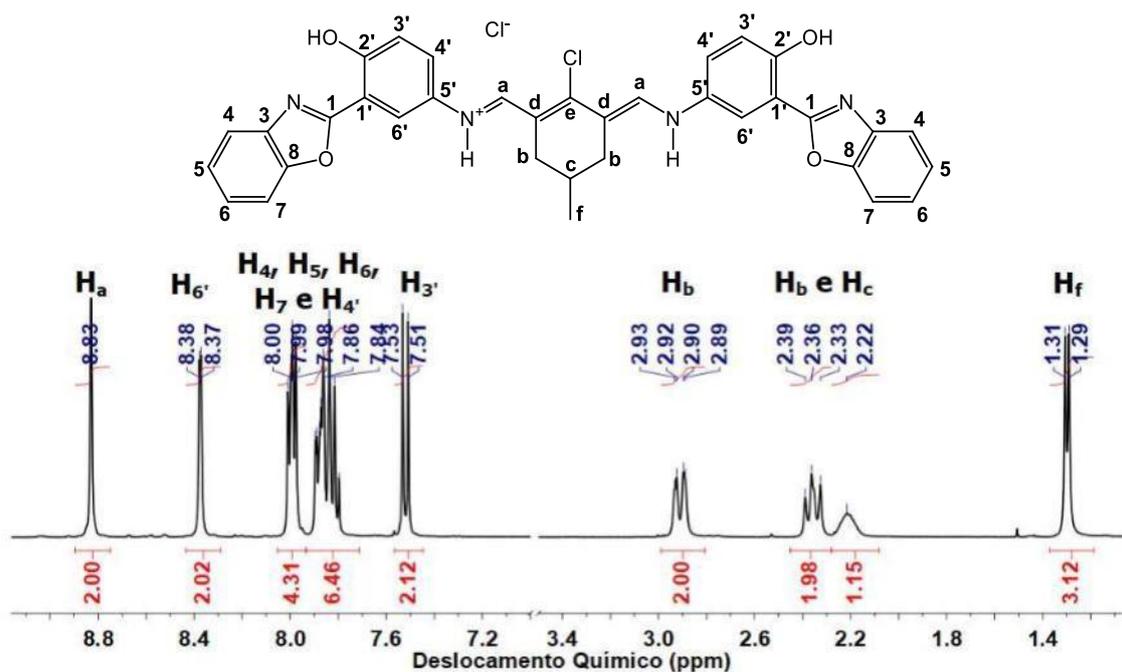


Figura 28: Espectro de ^1H -RMN (400 MHz) em TFA-*d* para **20**.

Através do ^{13}C -RMN (Figura 29) verifica-se na região dos alifáticos sinais em 21,16 ppm do C_f e 28,22 ppm do C_c , enquanto que em 33,51 ppm um sinal positivo associado ao C_b . Além disso, na região dos aromáticos há 8 sinais relacionados aos carbonos do tipo C-H, onde em 151,49 ppm, por comparação com o espectro do precursor, associa-se o carbono C_a , e outros 8 sinais

positivos, associados aos demais carbonos do tipo quaternários na estrutura.

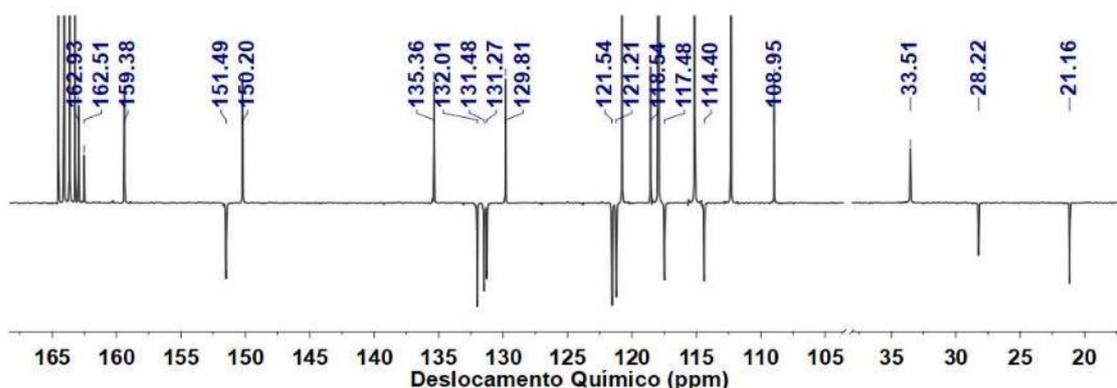


Figura 29: Espectro de ^{13}C -RMN (APT - 100 MHz) em TFA-*d* para **20**.

Para **21** o espectro de ^1H -RMN (Figura 30) mostra em 1,12 ppm um tripleto de acoplamento de 7,2 Hz, relacionado aos três hidrogênios H_g , em 1,64 ppm, um quintuplo, com acoplamento de 7,2 Hz, associado aos dois hidrogênios H_f . Em 1,97 observou-se um sinal alargado relacionado a um hidrogênio H_c . Em 2,36 ppm e 2,97 ppm, os multipletos, com área proporcional a duas unidades, associados aos hidrogênios H_b . Já na região dos aromáticos, em 7,52 ppm há um dubleto com acoplamento *orto* de 9,2 Hz, atribuído a dois hidrogênios H_3 . Em 7,83 ppm há um multipletto referente a 6 unidades: H_4 , H_7 e H_4' . Em 7,99 ppm um outro multipletto, com 4 hidrogênios: H_5 e H_6 . Em 8,37 ppm há um singletto referido a dois H_6 , e seguidamente em 8,83 ppm, um singletto indicativo de dois H_a na estrutura.

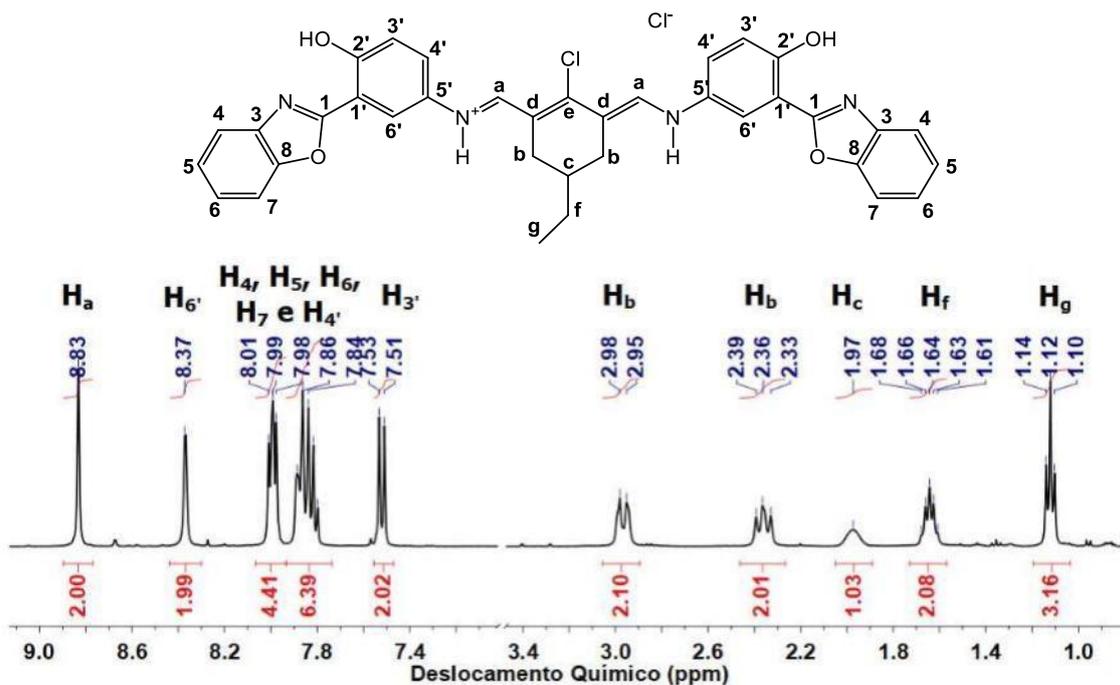


Figura 30: Espectro de ^1H -RMN (400 MHz) em TFA-*d* para **21**.

Para o espectro de RMN de carbono de **21** (Figura 31) observa-se em 11,89 ppm e 34,93 ppm dois sinais associados a C_g e C_c , respectivamente. Em 29,60 e 31,40 ppm tem-se dois sinais positivos relacionados aos carbonos C_f e C_b , respectivamente. Na região dos aromáticos há 8 sinais associados a carbonos do tipo C-H da estrutura, onde atribui-se em 151,43 ppm o carbono C_a . Além disso, os demais 16 carbonos são observados com os 8 sinais positivos evidenciados no espectro.

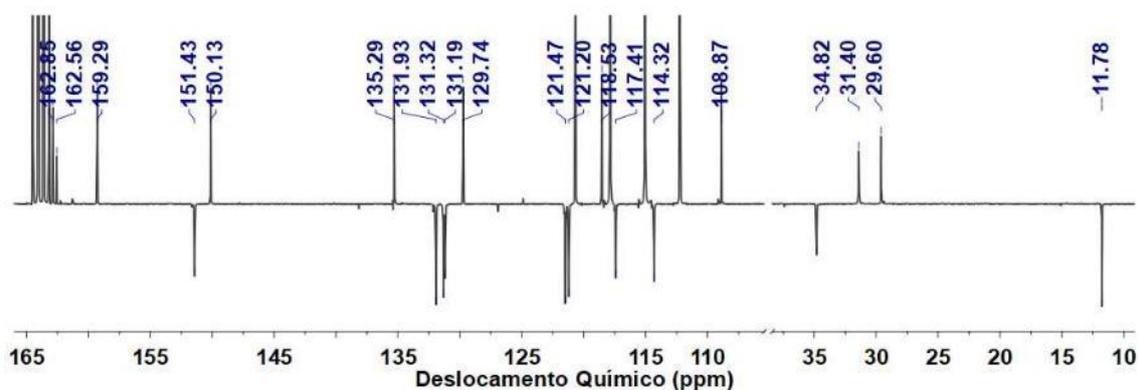


Figura 31: Espectro de ^{13}C -RMN (75,4 MHz) em TFA-*d* para **21**.

Para **22**, o espectro de ^1H -RMN (Figura 32) mostra que em 1,22 ppm está

um singleto associado a nove hidrogênios H_g. Em 1,90 ppm há um multipletto alargado, com área proporcional a um hidrogênio, associado ao H_c. Em 2,51 ppm e 3,57 ppm há dois multipletos, cada um correspondente a dois hidrogênios, associados aos 4 hidrogênios diastereotópicos H_b. Para os aromáticos, em 7,61 ppm encontra-se um dubleto com acoplamento *orto* de 8,9 Hz atribuído aos dois hidrogênios H_{3'}. Entre 7,52 ppm e 8,08 ppm há dois multipletos correspondente a 10 hidrogênios: H₄, H₅, H₆, H₇ e H_{4'}. Em 8,44 ppm há um singleto relacionado aos dois hidrogênios H_{6'} e em 8,92 ppm o singleto relacionado a dois hidrogênios H_a.

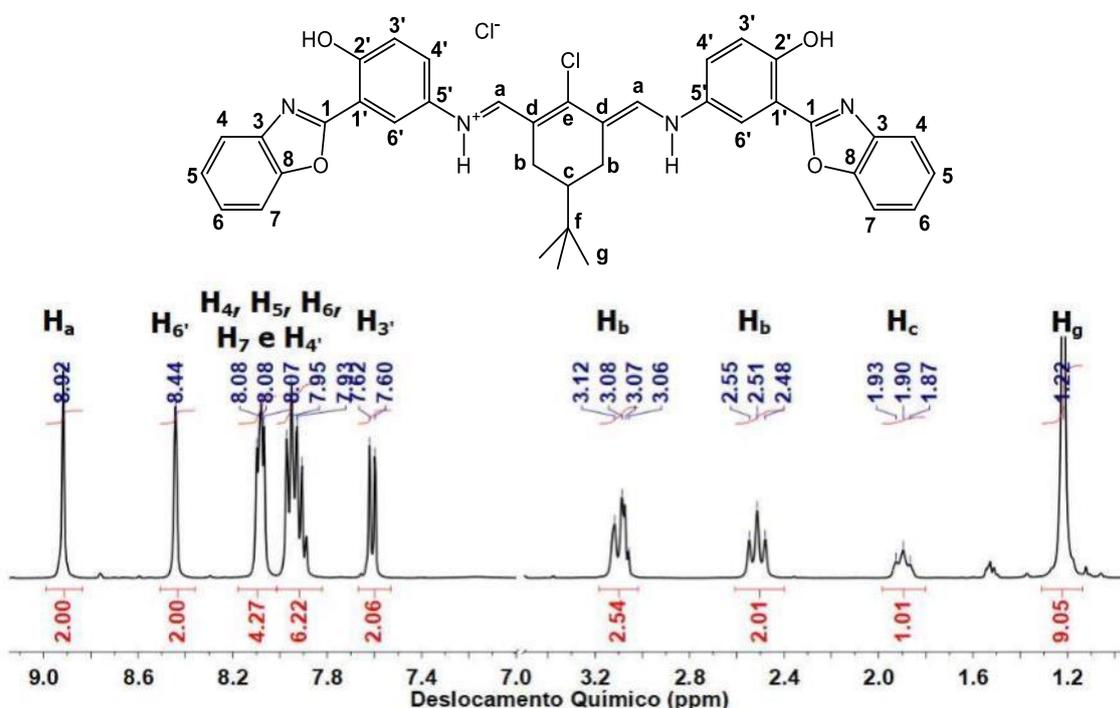


Figura 32: Espectro de ¹H-RMN (400 MHz) em TFA-*d* para **22**.

Para o espectro de ¹³C-RMN (APT) de **22**, na Figura 33, observa-se na região dos alifáticos dois sinais em 27,88 ppm e 43,82 ppm, relacionados aos carbonos C_g e C_c, além de dois sinais positivos em 27,32 ppm e 33,80 ppm, relacionados aos carbonos C_f e C_b. Na região dos aromáticos, observa-se 7 sinais relacionados a 16 carbonos do tipo C-H, sendo que em 151,35 ppm associa-se ao carbono C_a, além de 8 sinais positivos, relacionados a 15 carbonos quaternários presentes na molécula.

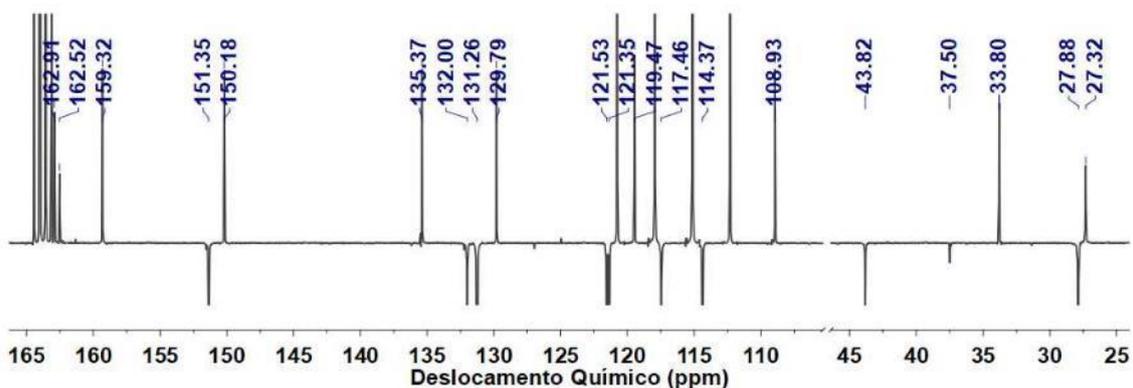


Figura 33: Espectro de ^{13}C -RMN (100 MHz) em TFA-*d* para **22**.

Com relação ao precursor **87**, a Figura 34 mostra o espectro de RMN de hidrogênio e carbono em TFA-*d*, para fins comparativos com os seus derivados apresentados seguidamente. Observa-se que nesse solvente não se observam os sinais relacionados ao hidrogênio fenólico nem aos hidrogênios da amina. Na região dos aromáticos, em 7,38 ppm observa-se um duplo dubleto com acoplamentos *orto* e *meta* de 5,6 Hz e 9,2 Hz associados a um hidrogênio H₄. Entre 7,10 ppm e 7,82 ppm tem-se dois multipletos relacionados a 3 hidrogênios da estrutura: H₄, H₇ e H₃. Entre 8,04 ppm e 8,13 ppm tem-se dois multipletos cujo acoplamento apresentado é tipo *orto* com valor de 8,05 Hz, relacionado aos hidrogênios H₅ e H₆. Em 8,22 ppm tem-se o multiplete de um hidrogênio, o H₆. Com relação ao espectro de APT mostrado na figura, espectro inferior, observa-se 7 sinais associados aos 7 carbonos do tipo C-H da estrutura.

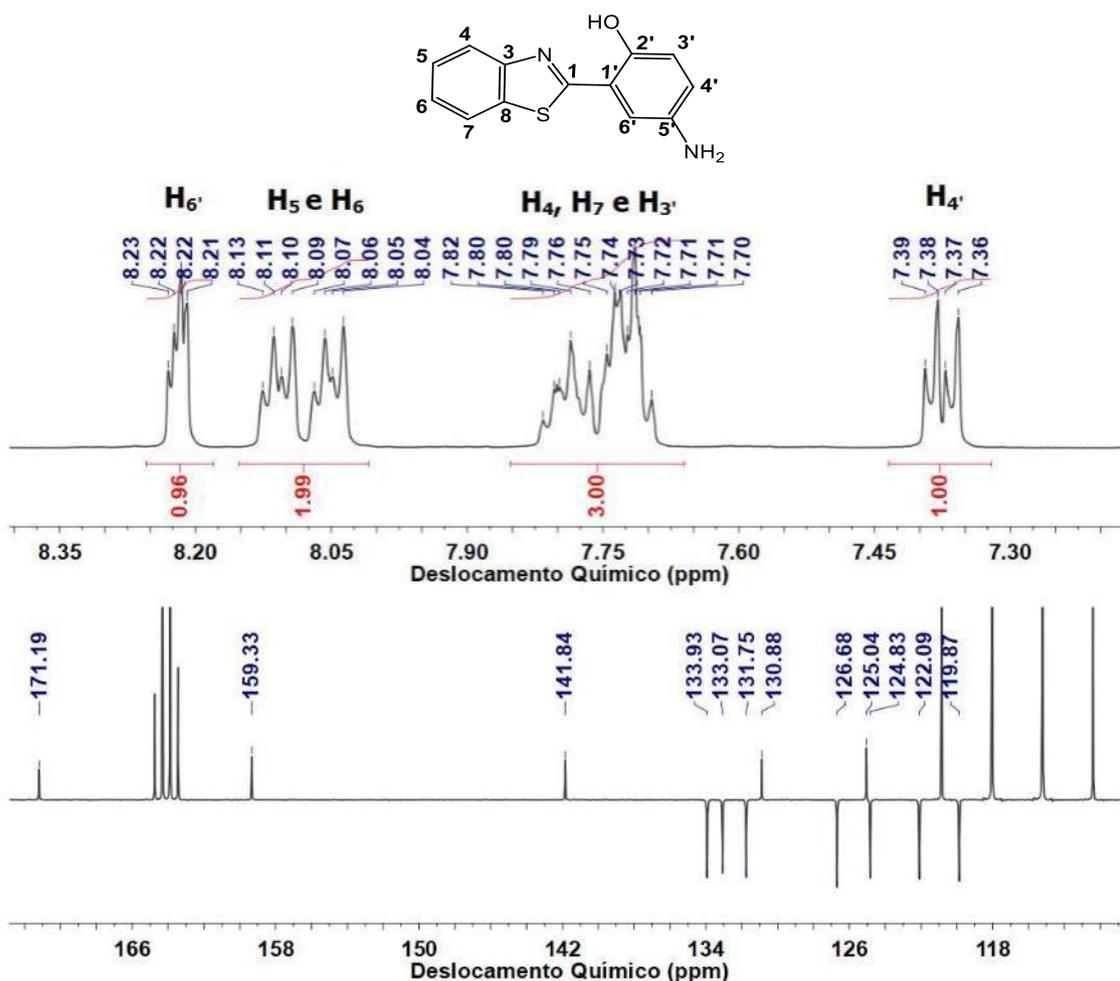


Figura 34: Espectro de $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz) e de $^{13}\text{C-RMN}$ (APT - 100 MHz) em TFA-*d* para **87**.

Na caracterização de **23** foi possível observar que, para o espectro de $^1\text{H-RMN}$ (Figura 35) há dois singletos alargados em 2,07 e 2,71 ppm que estão associados aos hidrogênios H_b e H_c . Já na região dos aromáticos, tem-se em 7,43 ppm um dubleto com acoplamento *orto* de 9 Hz, relacionado aos dois hidrogênios $\text{H}_{3'}$. De 7,71 a 7,86 ppm está um multipeto associado a seis hidrogênios hidrogênios $\text{H}_{4'}$, H_5 e H_6 . Outro multipeto entre 8,10 e 8,22 ppm relaciona-se a 6 hidrogênios: H_4 , H_7 e $\text{H}_{6'}$. Em 8,74 ppm, um singlete referente aos dois hidrogênios H_a .

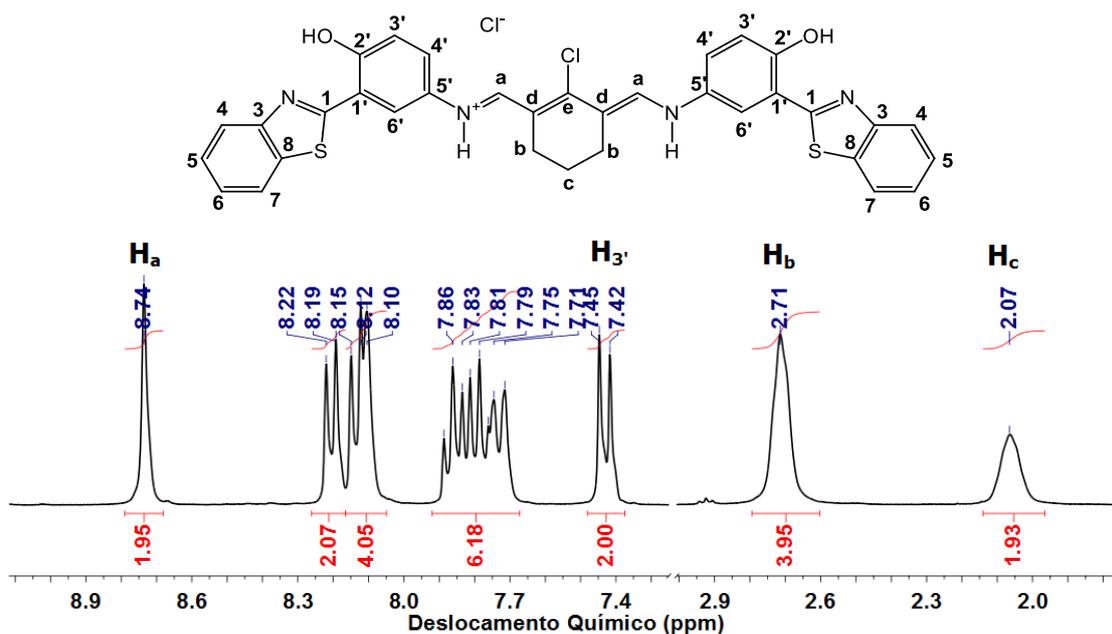


Figura 35: Espectro de ^1H -RMN (400 MHz) em TFA-*d* para **23**.

Na Figura 36, o espectro de ^{13}C -RMN apresenta em 21,54 ppm e 26,28 ppm os sinais positivos relacionados aos carbonos C_b e C_c . Na região dos aromáticos, 8 sinais associados aos 16 carbonos C-H foram evidenciados, sendo que em 151,88 ppm atribui-se ao carbono C_a . Além disso, 8 sinais positivos nessa mesma região foram observados, associados aos 15 carbonos quaternários da estrutura.

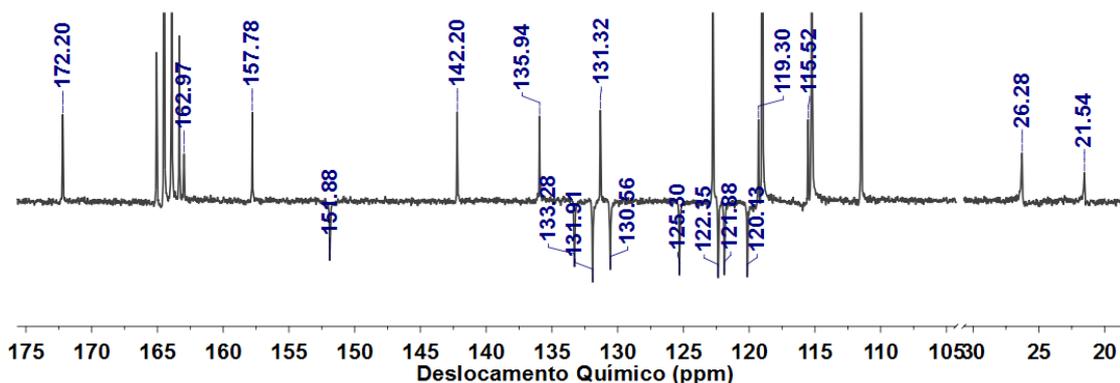


Figura 36: Espectro de ^{13}C -RMN (APT – 75,4 MHz) em TFA-*d* para **23**.

Para o derivado contendo enxofre **24**, o espectro de ^1H -RMN (Figura 37) mostra em 1,36 ppm um duplete referente aos três hidrogênios H_f . Em 2,27 ppm um multiplete alargado relacionado ao H_c , enquanto que em 2,41 ppm e 3,97

ppm dois multipletos atribuídos aos quatro hidrogênios diastereotópicos H_b. Já para os aromáticos, em 7,58 ppm está um dubleto com acoplamento *orto* de 9 Hz associado aos dois hidrogênios H_{3'}. Entre 7,84 ppm e 7,98 ppm está um multipletto relacionado a seis hidrogênios: H₄, H₇ e H_{6'}. Entre 8,24 ppm e 8,38 ppm está outro multipletto associado a outros seis hidrogênios: H₅, H₆ e H_{4'}. Em 8,87 ppm tem-se um singletto relacionado aos dois hidrogênios H_a.

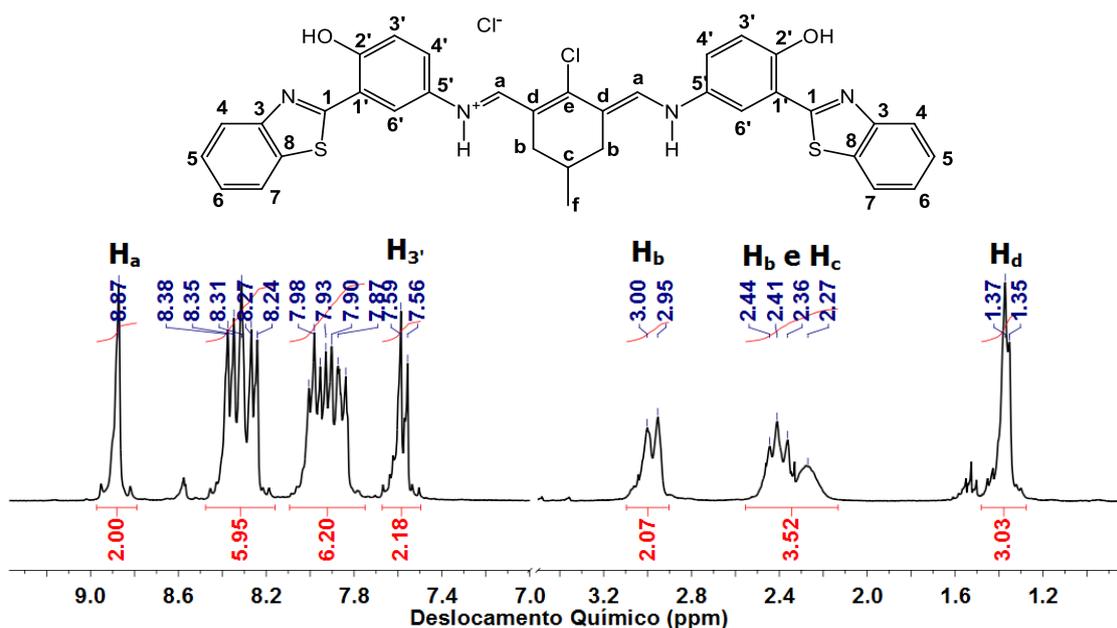


Figura 37: Espectro de ¹H-RMN (400 MHz) em TFA-*d* para **24**.

Para o espectro de ¹³C-RMN de **24**, na Figura 38, tem-se em 21,50 ppm, 28,60 ppm e 33,95 ppm os carbonos alifáticos C_f, C_c e C_b. Dos 16 sinais esperados para os carbonos olefínicos e aromáticos, 15 deles foram encontrados entre 115 e 172 ppm. Em 151,81 ppm atribui-se o sinal ao C_a.

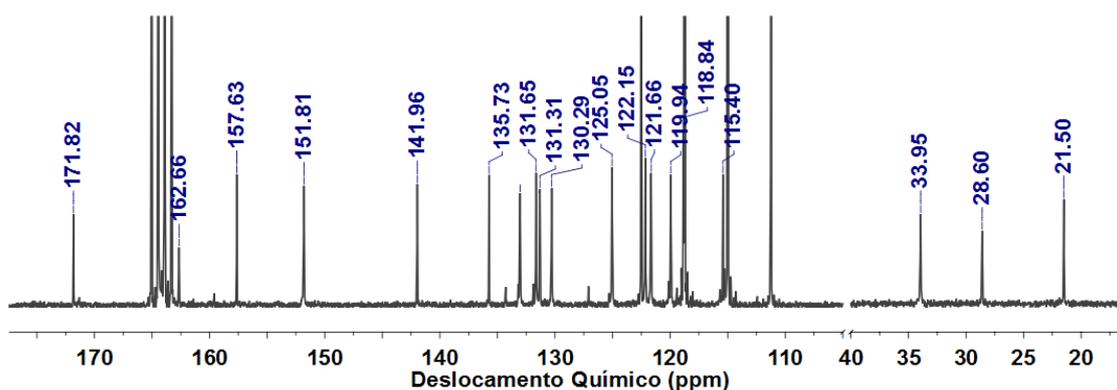


Figura 38: Espectro de ¹³C-RMN (75,4 MHz) em TFA-*d* para **24**

A Figura 39 mostra o espectro de RMN para **25**. Observa-se na região dos alifáticos, em 1,35 ppm um tripleto com acoplamento de 6,4 Hz associado aos 3 hidrogênios H_g. Já em 1,87 ppm tem-se um multipletto alargado, relacionado aos dois hidrogênios H_f. Em 2,19 ppm, um sinal alargado associado ao hidrogênio H_c e, em 2,57 ppm e 3,20 ppm dois multipletos relacionados aos 4 hidrogênios diastereotópicos H_b. Na região dos aromáticos temos em 7,73 ppm um dubleto de acoplamento *orto* de 8,8 Hz atribuído aos dois hidrogênios H_{4'}. 8,08 ppm, um dubleto com acoplamento *orto* de 8,4 Hz atribuído ao H_{4'}. Em 8,13 ppm, um duplo tripleto com área associada a 4 hidrogênios: H₅ e H₆. Em 8,57 ppm tem-se um duplo dupleto e um singleto sobrepostos, com área equivalente a 6 hidrogênios, onde um acoplamento *orto* de 8,7 Hz é observado associados aos hidrogênios H₄ e H₇, além do H_{6'} atribuído ao singleto. Em 9,04 ppm temos um singleto relacionado aos dois hidrogênios H_a.

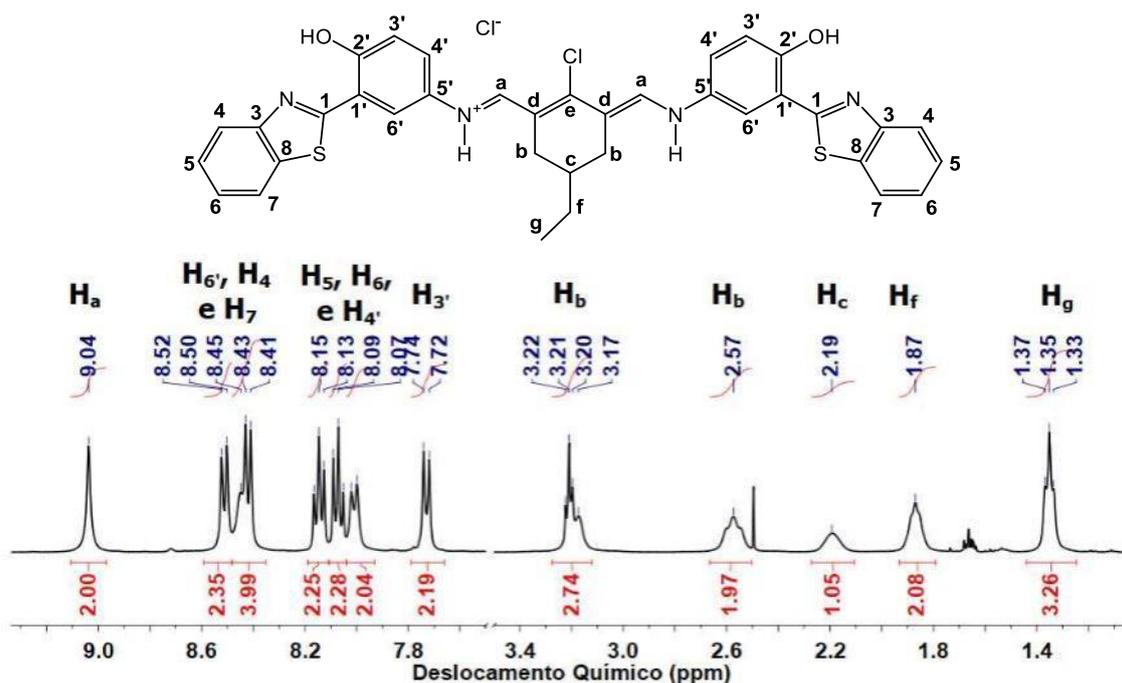


Figura 39: Espectro de 1H-RMN (400 MHz) em TFA-d para **25**.

Com relação ao espectro de APT para **25**, na Figura 40, observa-se na região dos alifáticos, dois sinais em 12,06 ppm e 35,09 ppm. Outros dois sinais positivos em 29,85 ppm e 31,72 ppm. Já na região dos aromáticos, observa-se 8 sinais relacionados aos 16 carbonos do tipo C-H, onde 151,66 ppm é atribuído ao carbono C_a, e 8 sinais positivos associados aos 15 carbonos quaternários da

estrutura.

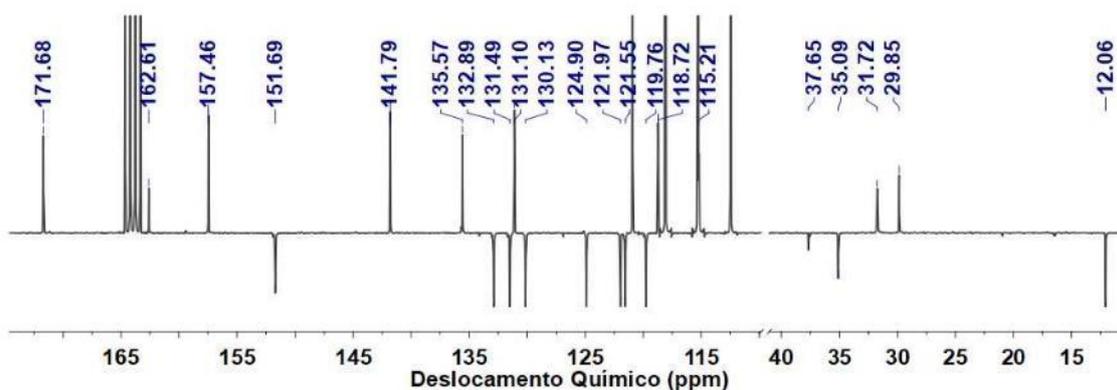


Figura 40: Espectro de ^{13}C -RMN (100 MHz) em TFA-*d* para **25**.

A Figura 41 mostra o espectro de **26**. Observa-se que em 1,27 ppm há um singlete com área equivalente a 9 hidrogênios, os H_g. Já em 1,92 ppm tem-se um multiplete alargado relacionado ao hidrogênio H_c. 2,54 ppm e 3,13 ppm tem-se dois multipletes associados aos 4 hidrogênios diastereotópicos H_b. Na região dos aromáticos, em 7,62 ppm tem-se um sinal atribuído a dois hidrogênios H₃. Entre 7,66 ppm e 8,06 ppm temos os multipletes relacionados aos hidrogênios H₅, H₆ e H_{4'}, enquanto que em 8,33 ppm e 8,43 ppm os multipletes associados aos 6 hidrogênios H₄, H₇ e H_{6'}. Em 8,94 ppm o singlete relacionado aos dois hidrogênios H_a. Nota-se que os acoplamentos bem como a definição dos sinais na região dos aromáticos está comprometida, provavelmente em decorrência da tendência de formar agregados em solução e tornar o campo não uniforme em dadas condições.

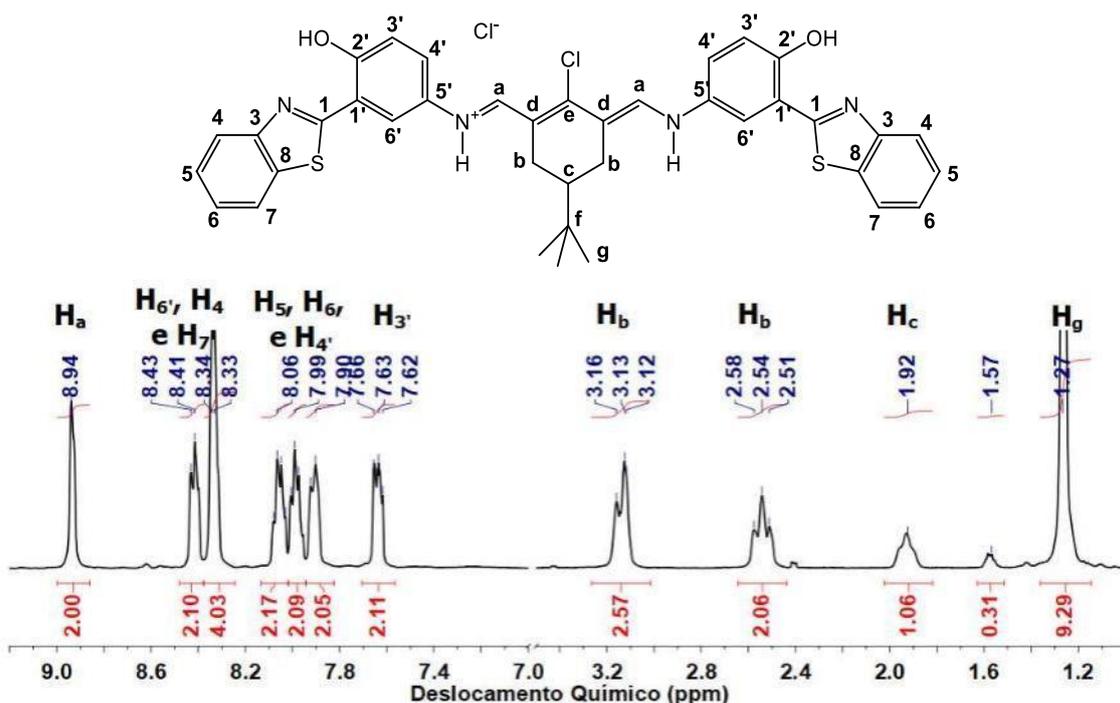


Figura 41: Espectro de $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz) em TFA-*d* para **26**.

No espectro de carbono de **26**, na Figura 42 abaixo, na região dos alifáticos observa-se dois sinais: 27,93 ppm e 43,89 ppm, relacionados aos carbonos C_g e C_c . Ainda nessa região, dois outros sinais positivos foram observados: 27,41 ppm e 33,84 ppm, onde atribui-se aos carbonos C_f e C_b . Na região dos aromáticos, observa-se 8 sinais atribuídos aos 16 carbonos do tipo C-H da estrutura, onde em 151,49 ppm associa-se ao carbono C_a . Além disso, 8 sinais positivos estão associados aos demais 15 carbonos quaternários da estrutura.

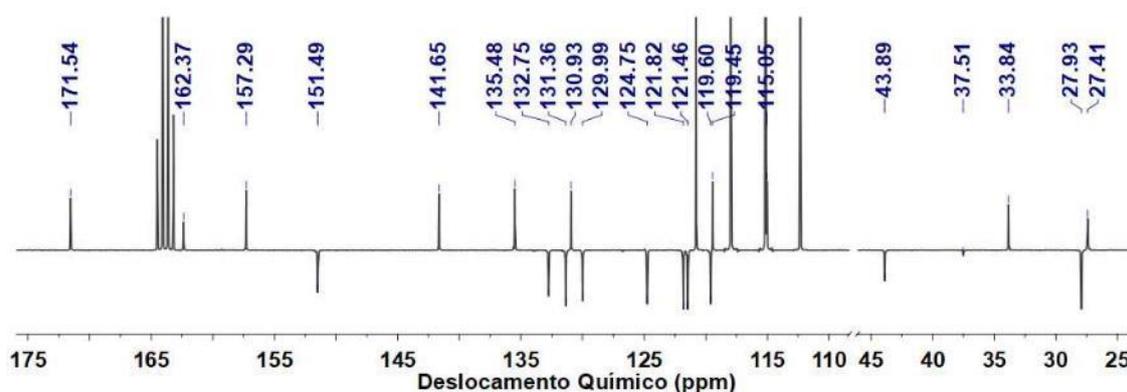


Figura 42: Espectro de $^{13}\text{C-RMN}$ (ATF - 100 MHz) em TFA-*d* para **26**.

Para fins comparativos, a Figura 43 apresenta os espectros de ^1H -RMN e ^{13}C -RMN para o precursor **88**. Com relação ao espectro de hidrogênio, observa-se em DMSO a ausência dos sinais referentes aos hidrogênios fenólicos e da amina. Os aromáticos são observados em 7,62 ppm, um duplo dubleto com acoplamentos de 3,2 e 5,6 Hz associados a dois hidrogênios: H₄ e H₇; em 7,25 ppm tem-se um multiplete com área proporcional a 3 hidrogênios: H₅, H₆ e H_{6'}; em 6,79 ppm observa-se um hidrogênio, dubleto, com acoplamento *orto* de 8,8 Hz relacionado ao H₃; e por fim em 6,71 ppm tem-se um duplo dubleto, com acoplamentos *orto* e *meta* de 8,4 e 2,4 Hz, respectivamente, relacionado a um hidrogênio H_{4'}. O espectro de ^{13}C -RMN apresenta 8 sinais.

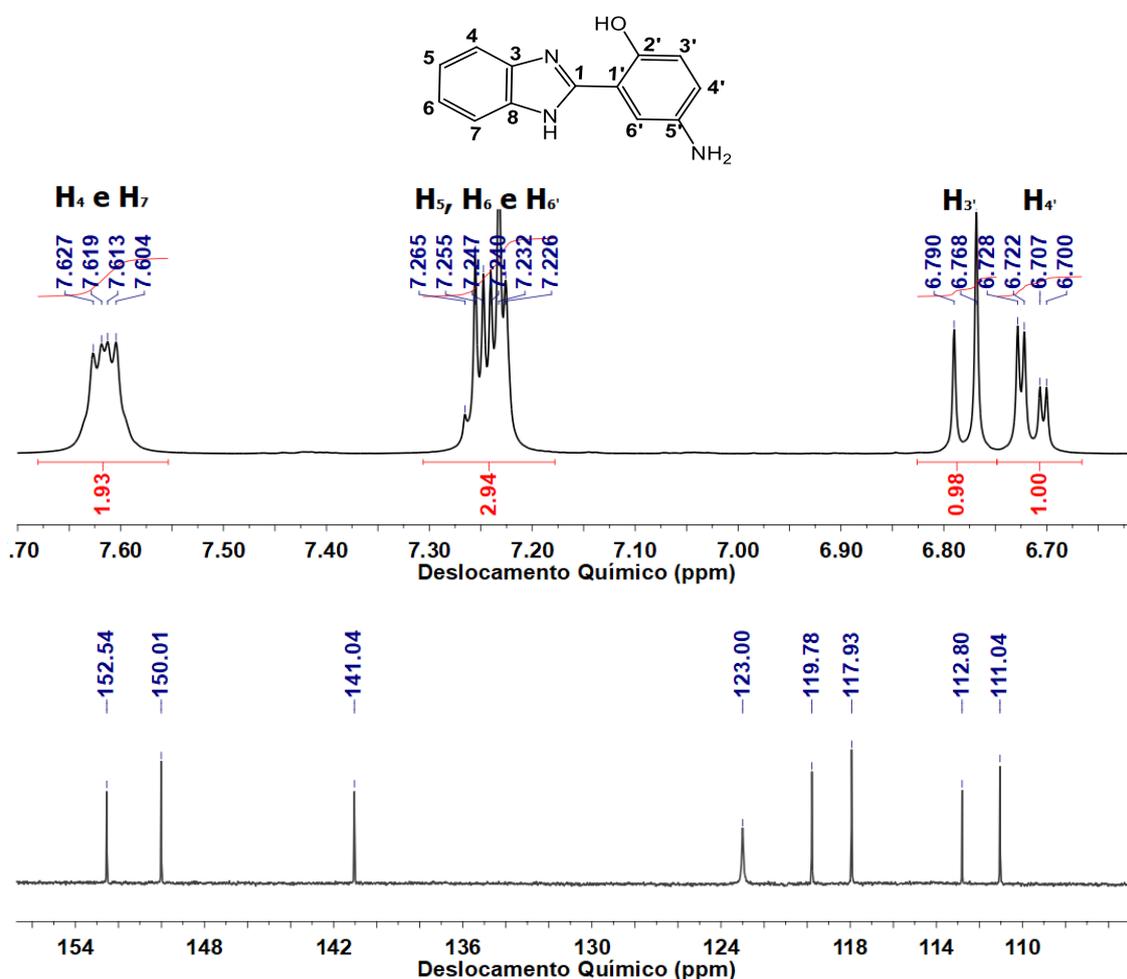


Figura 43: Espectro de ^1H -RMN (400 MHz) e de ^{13}C -RMN (100 MHz) em DMSO- d_6 para **88**.

Para **27**, o espectro de ^1H -RMN ilustrado na Figura 44, realizado em

DMSO, mostra em 1,82 e 2,68 ppm dois multipletos alargados associados aos hidrogênios H_b e H_c, respectivamente. Já na região dos aromáticos, dois multipletos em 7,47 e 7,86, cada um associado a seis hidrogênios foram identificados. Já em 8,53 ppm há um singlete associado a quatro hidrogênios: H_a e H_{6'}. Observa-se que em DMSO é possível evidenciar um singlete alargado em 11,36 ppm relacionado ao hidrogênio fenólico.

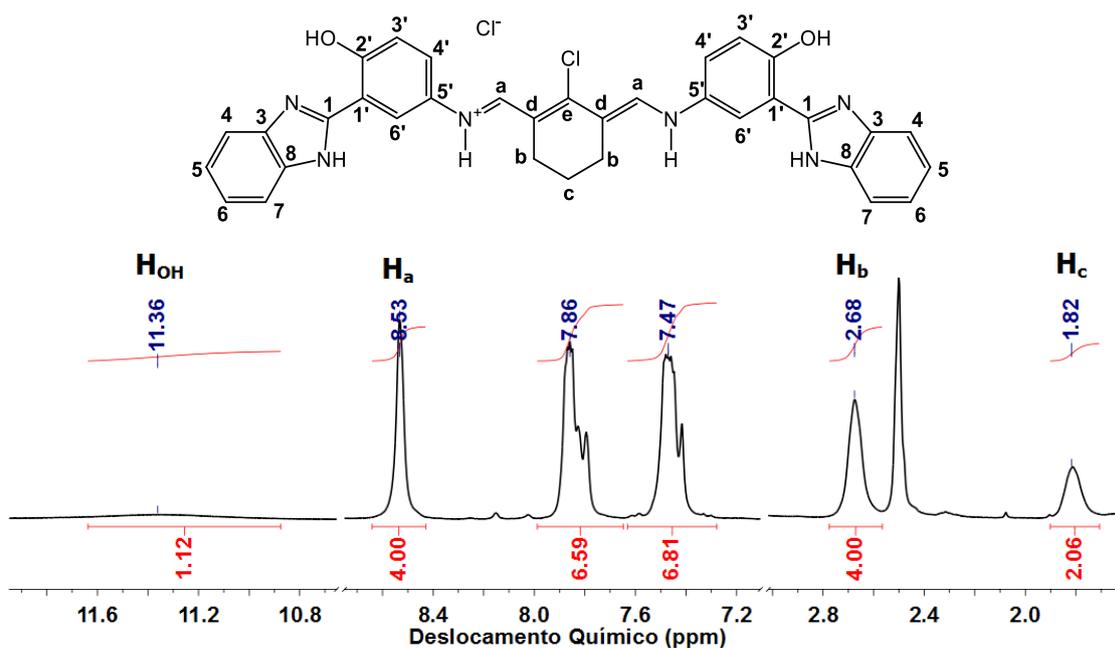


Figura 44: Espectro de ¹H-RMN (400 MHz) em DMSO-*d*₆ para **27**.

Para o espectro de ¹³C-RMN de **27**, na Figura 45, observa-se sinais em 19,44 ppm, 24,70 ppm e 34,05 ppm associados aos carbonos C_b e C_c. Nota-se que, comparados com as demais estreptocianinas, essas apresentam apenas 2 sinais, esses podem ser atribuídos ao efeito do solvente ser diferente, proporcionando uma diferente solvatação e tornando os carbonos equivalentes em termos de campo magnético quando em TFA-d. Acima de 115 ppm, estão os demais carbonos, aromáticos e olefínicos, com sinais de alguns carbonos quaternários não evidenciados.

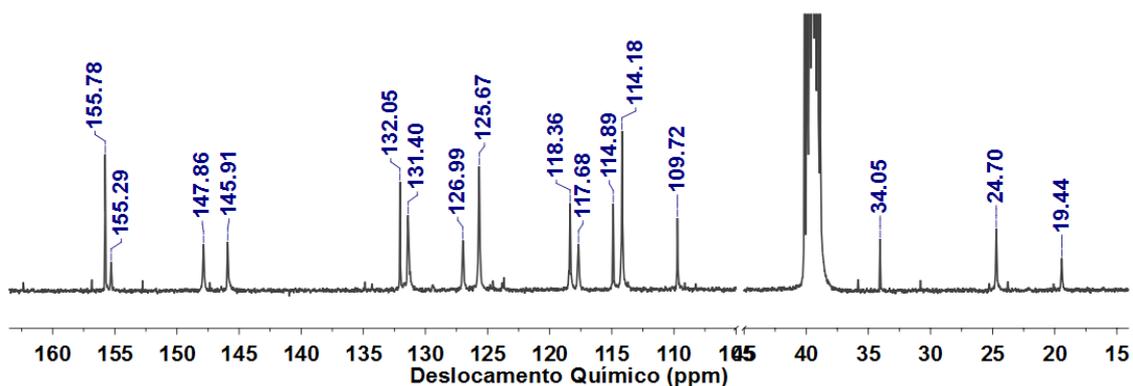


Figura 45: Espectro de ^{13}C -RMN (75,4 MHz) em $\text{DMSO-}d_6$ para **27**.

A Tabela I mostra as principais bandas encontradas nos espectros de infravermelho das estreptocianinas. Observa-se que entre 3350 e 3423 cm^{-1} uma banda de baixa intensidade associada ao estiramento N-H. Observa-se que existe um deslocamento significativo para essas bandas, quando comparadas com estiramentos N-H que são apresentados entre 3100 e 3400 cm^{-1} . [179] Esse deslocamento é identificado na literatura para estruturas em que apresentam fortes interações intermoleculares envolvendo hidrogênios de aminas, o que é característico desse perfil de estruturas. [180,181]

Em torno de 3050 cm^{-1} observam-se os estiramentos associados aos C-H aromáticos, bem como entre 2950 e 2800 cm^{-1} , os estiramentos simétricos e assimétricos associados aos C-H metínicos e metilênicos. Em aproximadamente 1650 e 1600 cm^{-1} estão os estiramentos simétricos e assimétricos relacionados aos C=C, assim como em aproximadamente 1580 cm^{-1} . Já em 1470 cm^{-1} observa-se um sinal intenso em todos os espectros, desta vez associados aos estiramentos C-H do anel cíclico presente na cadeia polimetínica. [179]

Tabela I: Principais bandas dos espectros de infravermelho para as estreptocianinas

	ν_{N-H}	ν_{C-H}^1	ν_{CH_3} e ν_{CH_2}		$\nu_{C=C}$			δ_{C-H}^2
19	3412	3045	2940	2800	1634	1611	1598	1470
23	3350	3054	2941	2825	1641	1606	1582	1484
27	3413	3041	2937	2861	1620	1582	1555	1475
20	3412	3054	2961	2864	1683	1622	1590	1475
24	3423	3057	2960	2866	1648	1606	1581	1473
21	3403	3049	2958	2873	1651	1616	1583	1480
25	3418	3060	2954	2872		1618	1598	1475
22	3417	3051	2945	2864	1635	1613	1579	1455
26	3391	3058	2959	2859	1654	1615	1581	1481

1. Associado aos estiramentos aromáticos; 2. Relacionado aos estiramentos do anel cíclico da porção polimetínica.

Com relação aos pontos de fusão, foram possíveis determinações utilizando equipamento com leitura não digital. Acredita-se que a coloração escura das estreptocianinas seja um fator que torne difícil a leitura em equipamento digital, uma vez que torna o ponto de fusão de difícil visualização.

As estreptocianinas **19-22** que possuem o heterociclo benzoxazol apresentaram os menores pontos de fusão quando comparados aos benzotiazóis **23-26**. A estreptocianina **27**, que tem o anel benzimidazol, apresentou o maior ponto de fusão, acima de 310 °C, sem ser possível identificá-lo no aparelho de ponto de fusão.

O grau de substituição da cetona (94a-d) influenciou diretamente nas propriedades físicas das estreptocianinas. Para as estreptocianinas com o anel benzoxazol (**19-22**) as que possuem hidrogênio (**19**) e etila (**21**) como substituintes do ciclo, apresentaram menor ponto de fusão, enquanto que as que possuem substituintes metila (**20**) e *terc*-butila (**22**) apresentaram pontos de

fusão mais elevados. Para as estreptocianinas com o anel benzotiazol, essa mesma tendência não foi observada: substituintes metila (**24**) e *terc*-butila (**26**) apresentaram menor ponto de fusão enquanto que hidrogênio (**23**) e etila (**25**) pontos de fusão mais elevados. Dessa forma, pode-se dizer que as interações intermoleculares são fortemente influenciadas pelo heteroátomo azólico, de forma que as estreptocianinas derivadas de oxigênio apresentam interações mais fracas quando comparadas com as demais.

Tabela II: Pontos de fusão obtidos para as estreptocianinas **19-27**.

Estreptocianinas- Benzoxazol		Estreptocianinas- Benzotiazol		Estreptocianinas- Benzimidazol	
19	237 °C	23	253 °C	27	>310 °C
20	254 °C	24	243 °C		
21	205 °C	25	253 °C		
22	254 °C	26	248 °C		

4.2. Caracterização Fotofísica

As estreptocianinas **19-27** foram caracterizadas através das espectroscopias de absorção no ultravioleta-visível e emissão de fluorescência em diferentes solventes.

4.2.1. Estreptocianinas contendo núcleo benzoxazol

Os espectros de absorção e emissão para **19** em DMF, DMSO, AcOEt e em dioxano encontram-se na Figura 46. Para esses casos não é observado formação de agregados. No espectro de absorção em DMSO, observa-se uma banda com máximo de 434 nm. Um estudo de diluição mostrou para essa banda um ϵ de $35,8 \times 10^3 \text{ Lmol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ associado a transições $\pi \rightarrow \pi^*$. Para DMF observa-se o espectro de absorção com um máximo de 427 nm. Estudos de diluição foram obtidos a fim de obter ϵ , cujo valor encontra-se em $33,5 \times 10^3 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$

¹, associado às transições $\pi \rightarrow \pi^*$. Para AcOEt e dioxano os valores dos λ_{\max} de absorção foram de 412 nm e 413 nm, respectivamente. Quando em acetato de etila, o valor de ϵ foi de $32,1 \times 10^3 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ enquanto que para dioxano, esse valor foi de $36,7 \times 10^3 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. Para ambos os solventes, pode-se associar esses valores de absorvidade molar com transições eletrônicas do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$.

Com relação aos espectros de emissão de fluorescência, vê-se para DMSO um máximo de emissão 485 nm com deslocamento de Stokes de 51 nm, enquanto que em DMF um máximo de emissão de 494 nm, com deslocamento de Stokes de 67 nm. Para os solventes de menor polaridade (AcOEt e dioxano), observou-se duas bandas, as quais podem ser associadas ao mecanismo de ES IPT. Em dioxano, essas bandas apresentam-se melhor definidas, com o máximo de maior energia em 482 nm, associada à emissão de fluorescência da forma enol*, enquanto que em 548 nm há a emissão da forma ceto*. Em acetato de etila observou-se um máximo em 489 nm associado ao tautômero enol* e um ombro associado à ceto* em 553 nm. Os valores dos deslocamentos de Stokes foram de 69 e 135 nm (correspondentes as bandas enol e ceto respectivamente) em dioxano, enquanto que em acetato de etila o deslocamento de Stokes foi de 77 nm.

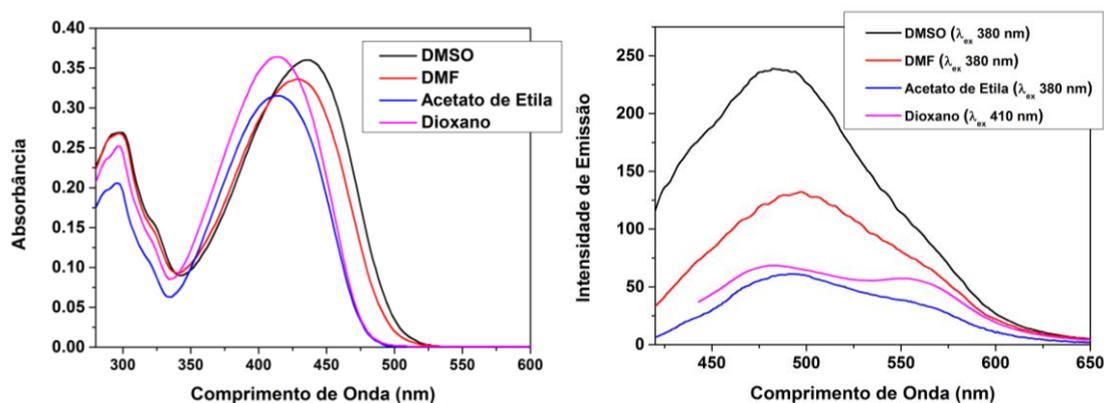


Figura 46: Espectros de absorção (esquerda) e de emissão de fluorescência (direita) para **19** ($10 \mu\text{mol/L}$) em DMSO, DMF, acetato de etila e dioxano.

Os espectros de absorção em etanol, acetonitrila e clorofórmio de **19** encontram-se na Figura 47. Para esses solventes, observa-se uma banda adicional em maior comprimento de onda quando comparados com os espectros

em solventes como DMF, DMSO, AcOEt e dioxano. Com o objetivo de estudar a natureza dessas bandas, foi realizado um estudo variando a concentração da estreptocianina para investigar a presença das bandas de agregados do tipo *J* e *H*. Em etanol em concentrações acima de 2,5 $\mu\text{mol/L}$ foi possível evidenciar a banda de agregados *J* em 539 nm. Essa banda se intensifica com o aumento da concentração e apresenta um $\epsilon = 41,5 \times 10^3 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. A banda associada à forma monomérica aparece em 423 nm com $\epsilon = 7,5 \times 10^3 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. Em 366 nm, vemos a banda relacionada aos agregados do tipo *H*, a qual aumenta de intensidade com o aumento da concentração.

Em MeCN e CHCl_3 , com a concentração de 1 $\mu\text{mol/L}$ já se observa a banda dos agregados do tipo *J*. Em acetonitrila essa banda absorve em 539 nm, enquanto que a banda de agregados *H* absorve em 364 nm. Para a banda associada à forma monomérica em acetonitrila, o máximo de absorção fica em 410 nm. Em clorofórmio observa-se que as bandas dos agregados *J* e *H* têm seus máximos de absorção em 533 nm e 346 nm, respectivamente. Já a banda com o máximo de absorção para a forma monomérica aparece em 412 nm.

Nesses três solventes em que se observam as bandas de agregados e monômeros, o coeficiente de absorvidade molar da banda que corresponde aos agregados *J* apresentou valores mais elevados do que as demais bandas.

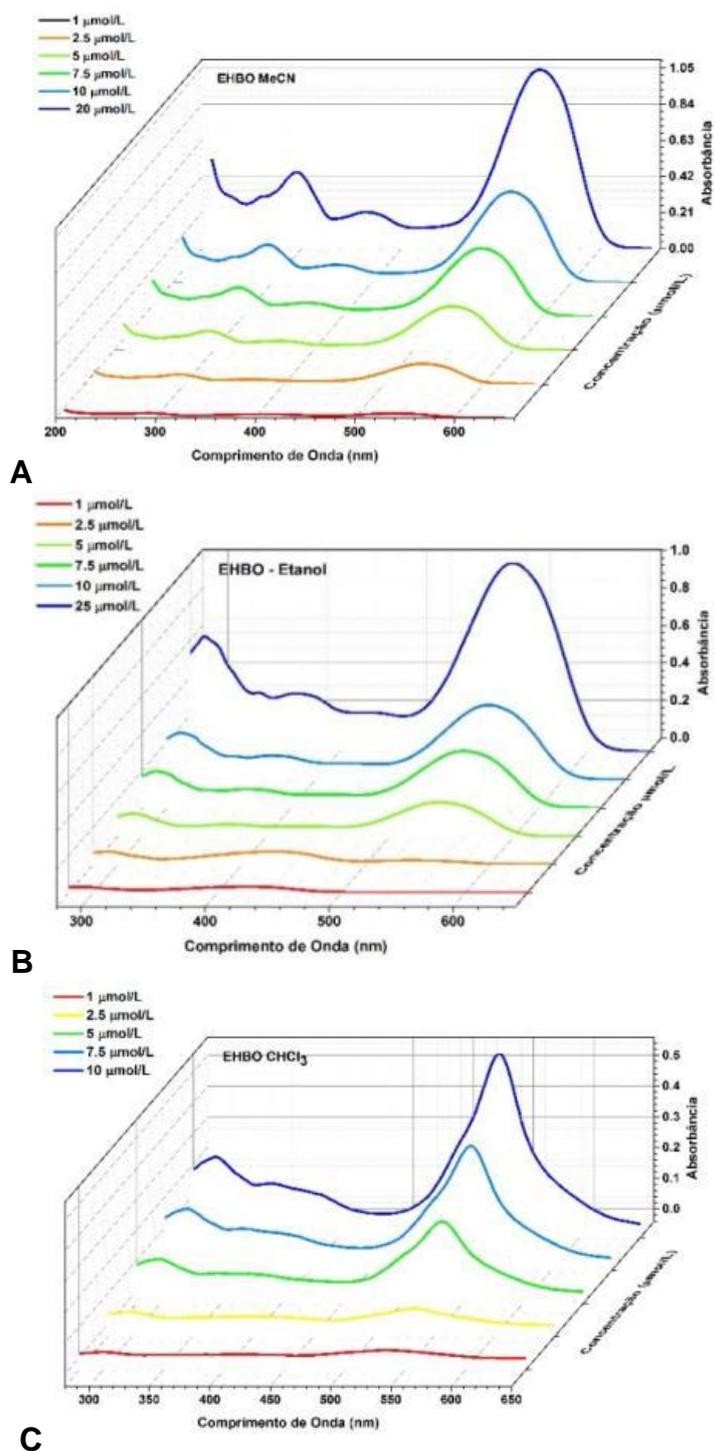


Figura 47: Espectros de absorção com estudo de diluição para **19** em etanol (A), acetonitrila (B) e CHCl₃ (C).

Os espectros de emissão de fluorescência de **19** mostram ser dependentes do comprimento de onda de excitação em função da presença dos agregados J. Para a banda associada à forma monomérica, na Figura 48

(esquerda), observaram-se máximos de 499 nm, 491 nm e 463 nm, para etanol, acetonitrila e clorofórmio, respectivamente. Já com relação à emissão de fluorescência da banda dos agregados J (Figura 48 à direita), os máximos em 599 nm para etanol e acetonitrila e de 602 nm para clorofórmio.

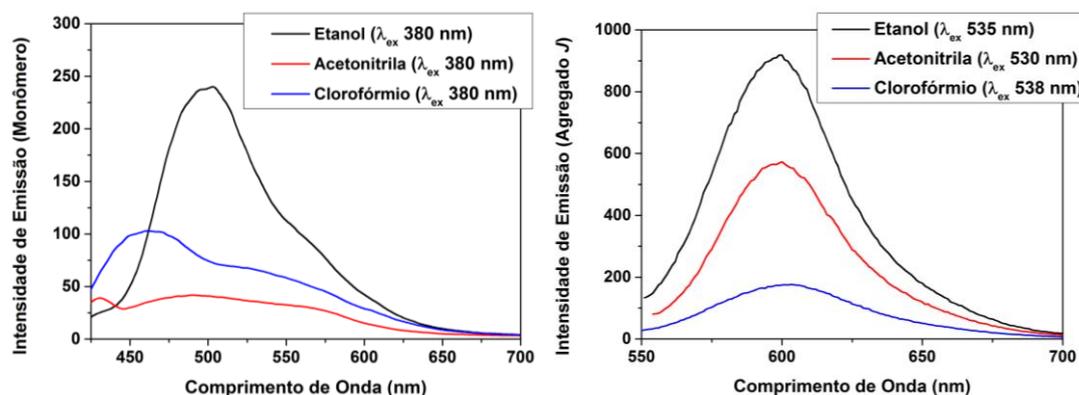


Figura 48: Espectros de emissão de fluorescência para **19** (10 µmol/L) em etanol, acetonitrila e clorofórmio associados à banda monomérica (esquerda) e à banda de agregados *J* (direita).

Para a estreptocianina **20** observou-se que em acetato de etila, DMF e DMSO não houve formação de agregados, e os máximos de absorção variaram entre 412 e 432 nm. Os valores de ϵ ficaram entre $31,3 \times 10^3 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ para acetato de etila, $49,2 \times 10^3 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ para DMF, e $46,2 \times 10^3 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$, para DMSO, indicando transições do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$, conforme Figura 49 A.

Para DMF (Figura 49 B), verificou-se que a estrutura não apresentou emissão de fluorescência quando excitado em 412 nm, inferindo assim que nesse solvente, o decaimento radiativo não é favorecido. Para acetato de etila, observou-se um máximo de emissão em 536 nm, gerando um deslocamento de Stokes de 124 nm. Para o DMSO (Figura 49 C), um máximo de emissão localizado em 495 nm, com um deslocamento de Stokes de 63 nm. Além disso, observa-se para acetato de etila que a excitação em comprimento de onda associado à transição $S_0 \rightarrow S_2$ (aproximadamente 300 nm), leva a uma emissão de fluorescência relativa ao decaimento $S_1 \rightarrow S_0$. Enquanto isso, para DMSO, a excitação associada à transição $S_0 \rightarrow S_2$ promove emissão $S_2 \rightarrow S_0$. A essa observação pode-se inferir que está ocorrendo uma emissão local, onde apenas

uma parte da molécula é excitada.

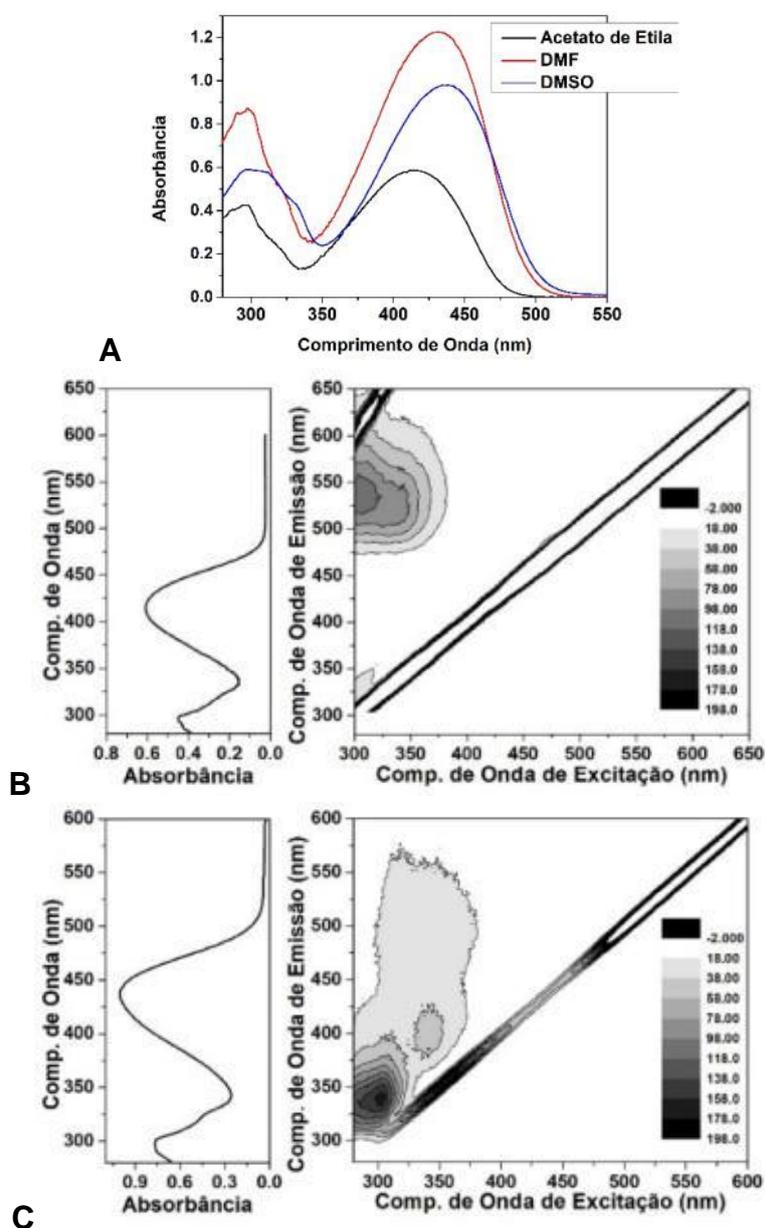


Figura 49: Espectros de absorção para **20** (A) em AcOEt, DMF e DMSO, e as curvas se superfície relacionando os comprimentos de onda de emissão com os comprimentos de onda de excitação em AcOEt (B) e DMSO (C), todos em concentração de 10 μ M.

Pode-se dessa forma inferir que ocorrem processos envolvendo o estado S_2 em alguns solventes, a emissão de fluorescência para monômeros e agregados, no entanto processos de emissão de fluorescência provenientes de

transferência protônica intramolecular no estado excitado e transferência de carga, não foram observados nos estudos fotofísicos. Esses processos de ativação e desativação das estruturas, estão ilustrados na Figura 50:

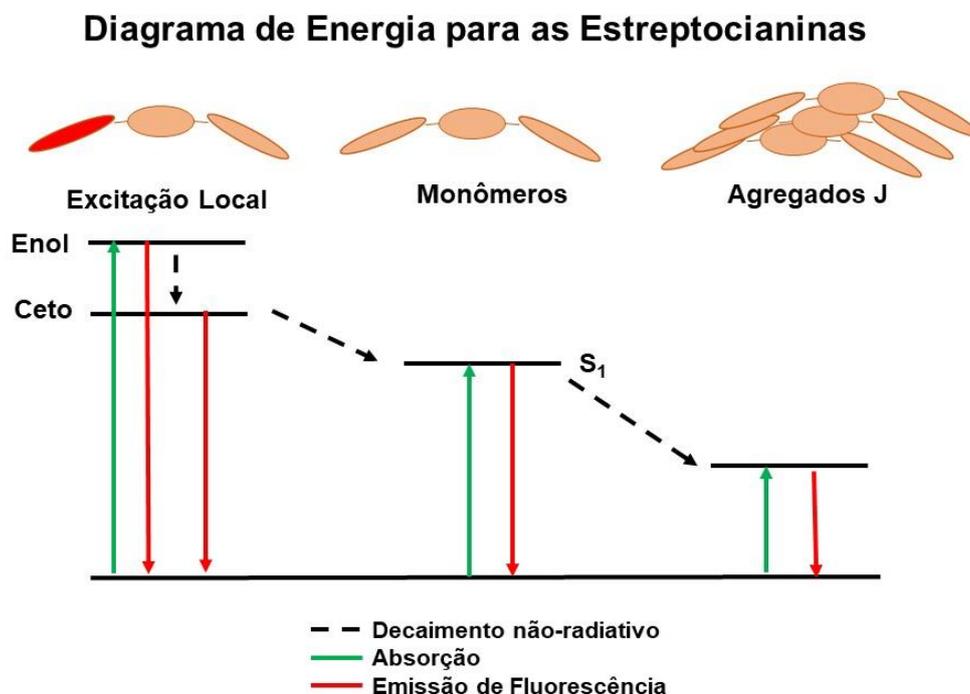
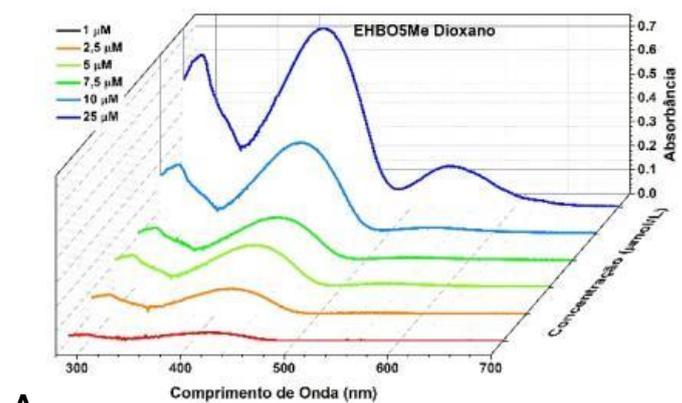
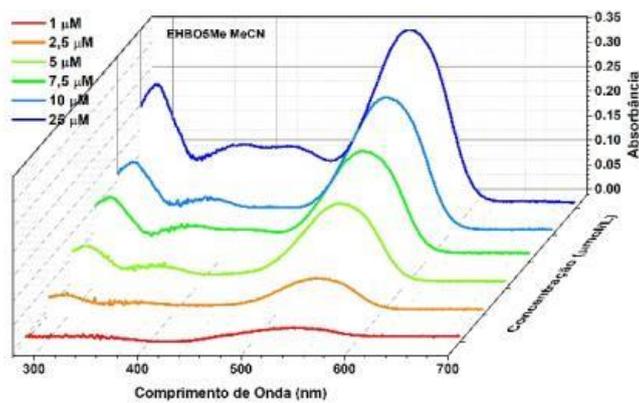


Figura 50: Processos de absorção e emissão possíveis e observados para as estreptocianinas.

Entretanto, nos solventes dioxano, acetonitrila, etanol e clorofórmio houve formação de agregados, conforme apresentado nas Figuras 51 e 52. Em dioxano, apenas os agregados J, em 536 nm, com ϵ não muito significativo de $9,3 \times 10^3 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. Para acetonitrila, ocorre a formação de agregados H em 376 nm e J em 539 nm, esse último com ϵ de $8,2 \times 10^3 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. Para esse solvente, a banda associada ao monômero não foi observada. Para etanol as bandas de monômero, agregados H e J são visíveis em 427, 381 e 541 nm, respectivamente, com ϵ de $39,1 \times 10^3 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$, $18,3 \times 10^3 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ e $65,5 \times 10^3 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. Já em clorofórmio, as bandas de monômero e agregados H não são evidenciadas no espectro, sendo apenas a de agregados J observada em 541 nm.



A



B

Figura 51: Espectros de absorção para os solventes em que houve formação de agregados de **20** em dioxano (A) e acetonitrila (B).

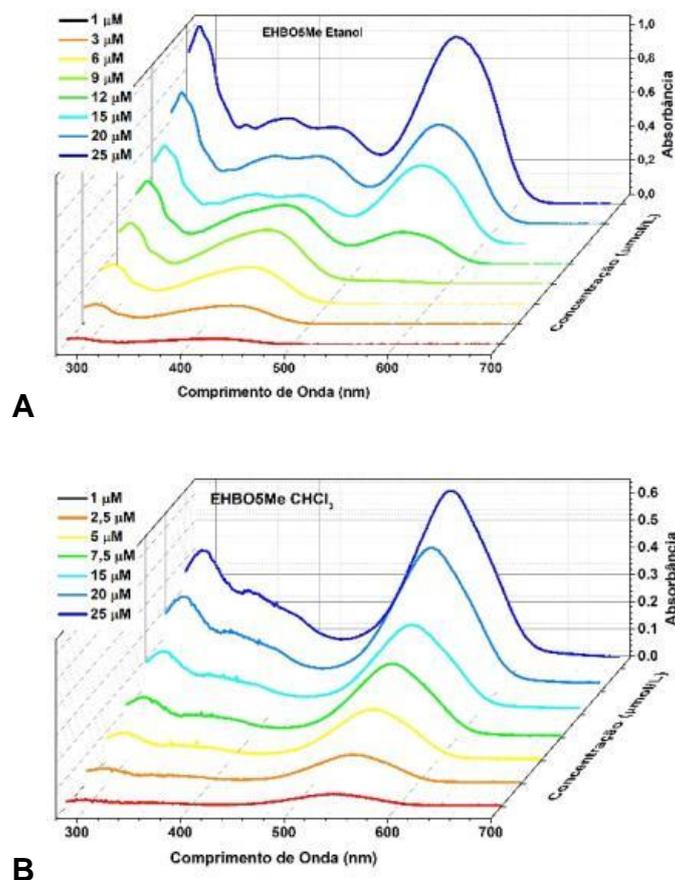


Figura 52: Espectros de absorção para os solventes etanol (A) e clorofórmio (B) com formação de agregados de **20**.

As curvas de superfície dos espectros de emissão de **20** encontram-se nas Figuras 53 e 54. Observa-se que em dioxano, acetonitrila e etanol apresentam banda de emissão quando excitados nos comprimentos de onda associados aos monômeros e agregados J. Para dioxano (Figura 53 A), os máximos encontrados são de 517 nm para o monômero, levando a um deslocamento de Stokes de 101 nm, e de 607 nm para os agregados J, com um deslocamento de Stokes de 71 nm. Para acetonitrila (Figura 53 B), o máximo de emissão em 517 nm é observado, e para a excitação associada à banda de absorção dos agregados J, uma emissão em 557 nm. Em etanol (Figura 54 A), o máximo de emissão da banda monomérica está em 483 nm, enquanto que o máximo de emissão da banda dos agregados está em 605 nm. Para a investigação em clorofórmio (Figura 54 B), observa-se apenas emissão para a

banda associada aos agregados, localizada em 605 nm, ocasionando um deslocamento de Stokes de 64 nm. Para dioxano, acetonitrila e etanol, observa-se um decaimento $S_1 \rightarrow S_0$ para excitações em $S_0 \rightarrow S_2$.

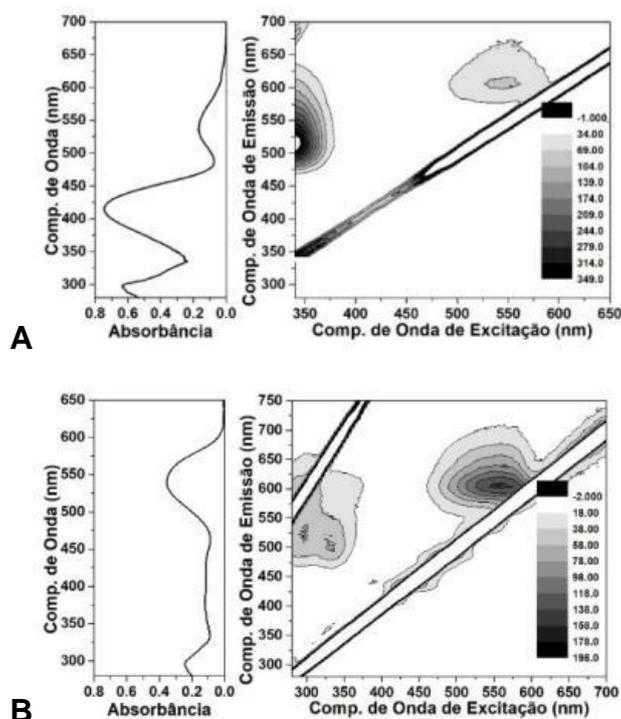


Figura 53: Curvas de superfície de emissão de fluorescência com os respectivos espectros de absorção à esquerda, para **20** em presença de agregados para dioxano (A) e acetonitrila (B), com concentrações de 25 μM .

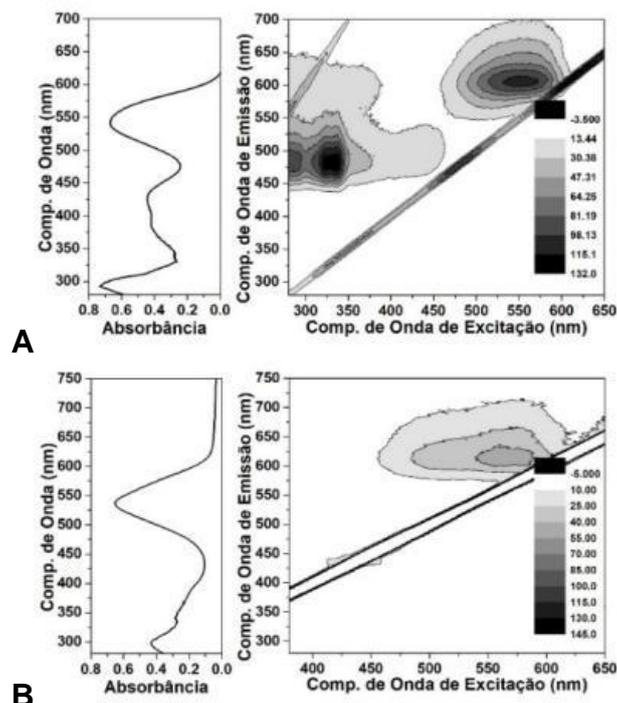


Figura 54: Curvas de superfície de emissão de fluorescência com os respectivos espectros de absorção à esquerda, para **20** em presença de agregados para etanol (A) e clorofórmio (B), com concentrações de 25 μM .

A estreptocianina **21** não forma agregados em acetato de etila e DMF. Seus espectros de absorção e emissão de fluorescência estão apresentados na Figura 55 A. Nota-se que os máximos de absorção para acetato de etila e DMF estão em 414 e 429 nm, bem como os valores de ϵ são de $27,8 \times 10^3 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ e $48,9 \times 10^3 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$, respectivamente. Com relação às curvas de superfície dos espectros de emissão (Figura 55 B para acetato de etila, C para DMF), nota-se que seus máximos de emissão estão em 513 e 494 nm, levando a deslocamentos de Stokes de 99 e 65 nm, respectivamente. Nota-se que para DMF, a intensidade de fluorescência é muito baixa. Em ambos solventes,

observa-se um decaimento $S_1 \rightarrow S_0$ para excitações em $S_0 \rightarrow S_2$.

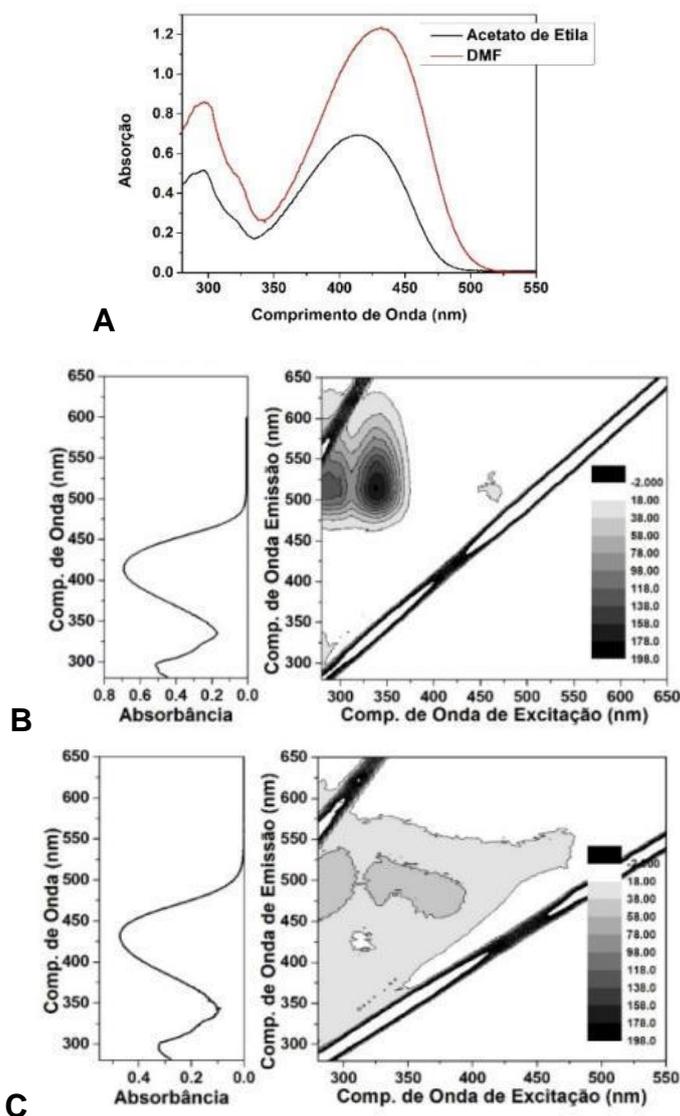
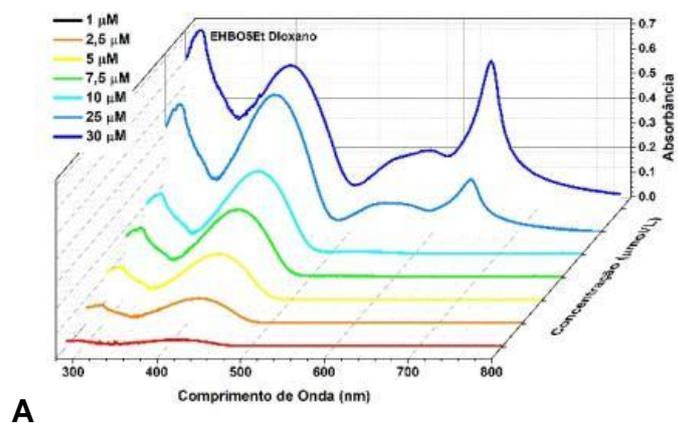
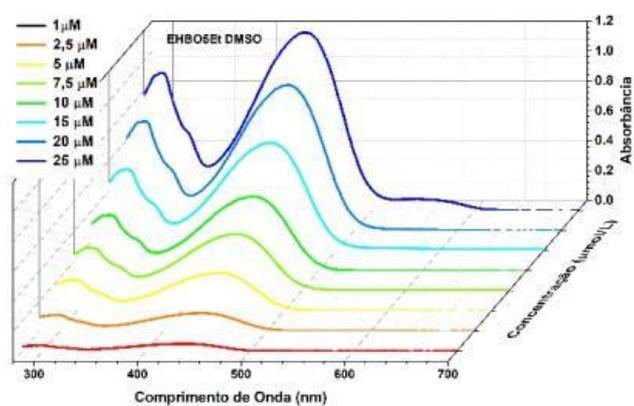


Figura 55: Espectros de absorção para **21** (A) em acetato de etila e DMF, e curva se superfície da emissão de fluorescência em acetato de etila (B) e DMF (C).

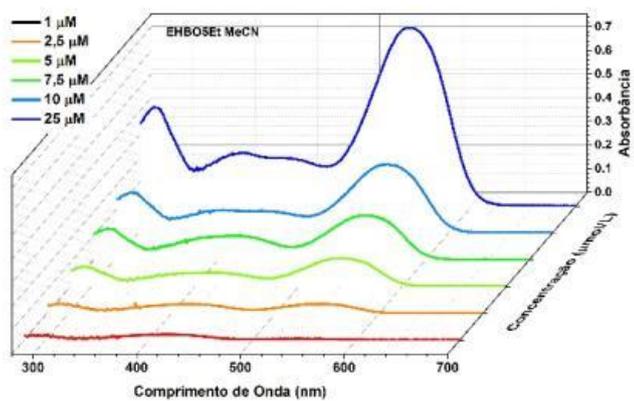
Para os solventes dioxano, DMSO, acetonitrila, etanol e clorofórmio há formação de agregados J (550, 540, 543 e 536 nm, respectivamente), conforme ilustrado nas Figuras 56 e 57. Os agregados H são observados apenas para acetonitrila (375 nm) e etanol (380 nm), enquanto que a banda associada aos monômeros não é perceptível em clorofórmio. Em dioxano, seu máximo ocorre em 414 nm, em DMSO, seu máximo ocorre em 436 nm, em acetonitrila, em 416 nm, em etanol, em 432 nm.



A

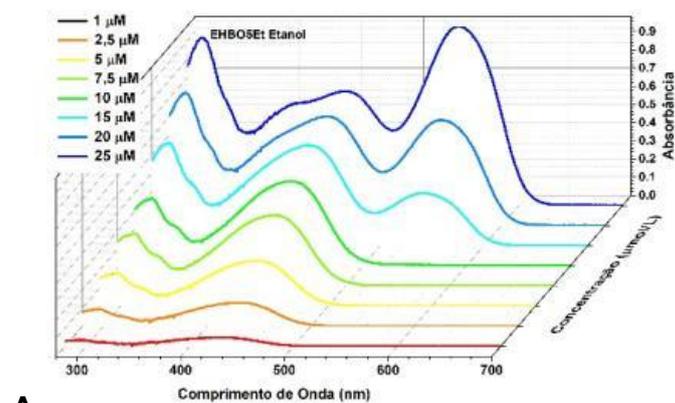


B

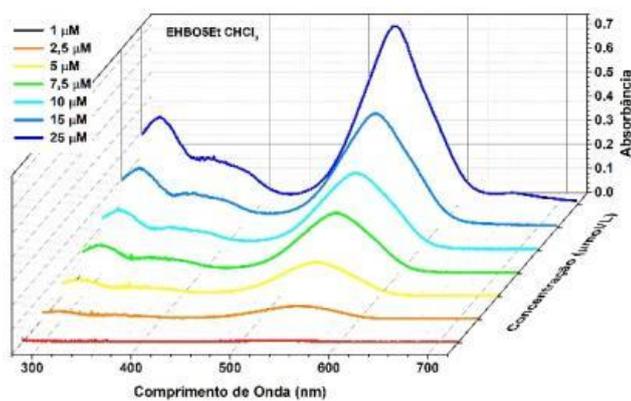


C

Figura 56: Espectros de absorção de **21**, em solventes que formaram agregados: (A) dioxano, (B) DMSO e (C) MeCN, em diversas concentrações.



A



B

Figura 57: Espectros de absorção de **21**, em solventes que formaram agregados: (A) etanol e (B) clorofórmio, em diversas concentrações.

A curva de superfície dos espectros de emissão em 3D de **21** encontra-se nas Figuras 58 e 59. Nota-se para dioxano (58 A), os máximos de emissão de monômero e agregados J ficam em 514 e 646 nm, com deslocamentos de Stokes de 100 e 2 nm, respectivamente. Para DMSO (58 B), o máximo de emissão associado à banda de monômeros está em 497 nm, com deslocamento de Stokes de 61 nm. Para os agregado J, o máximo de emissão está em 573 nm, e com um deslocamento de Stokes de 23 nm. Para acetonitrila e etanol (espectros 58 C e 59 A), a banda associada aos monômeros emite em 497 e 482 nm, com deslocamentos de Stokes de 81 e 50 nm, respectivamente, enquanto que para a banda de agregados J, as emissões estão localizadas em 606 nm, com deslocamentos de Stokes de 66 e 63 nm respectivamente. Para o clorofórmio (59 B), um máximo de emissão em 482 nm é observado e um, associado aos agregados, em 613 nm, com deslocamento de Stokes de 77 nm.

Para dioxano, DMSO e clorofórmio, observa-se um decaimento $S_1 \rightarrow S_0$ para excitações em $S_0 \rightarrow S_2$.

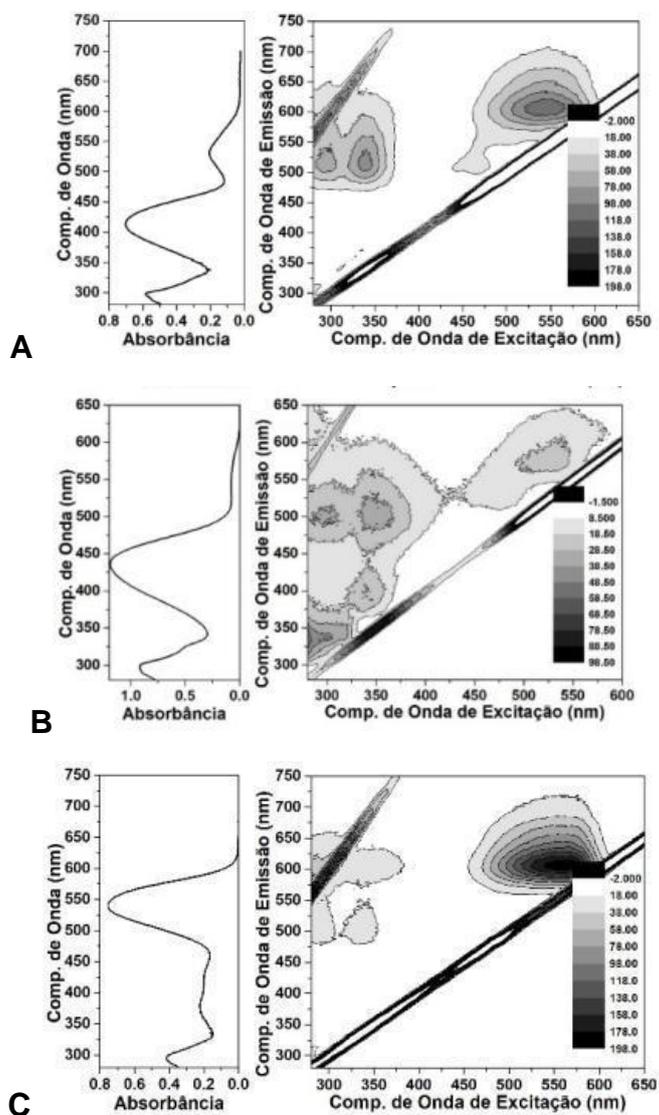


Figura 58: Curvas de superfície de emissão de fluorescência com os respectivos espectros de absorção à esquerda, para **21** em solventes em que houve formação de agregados: (A) dioxano, (B) DMSO e (C) acetonitrila, em concentrações de 25 μM .

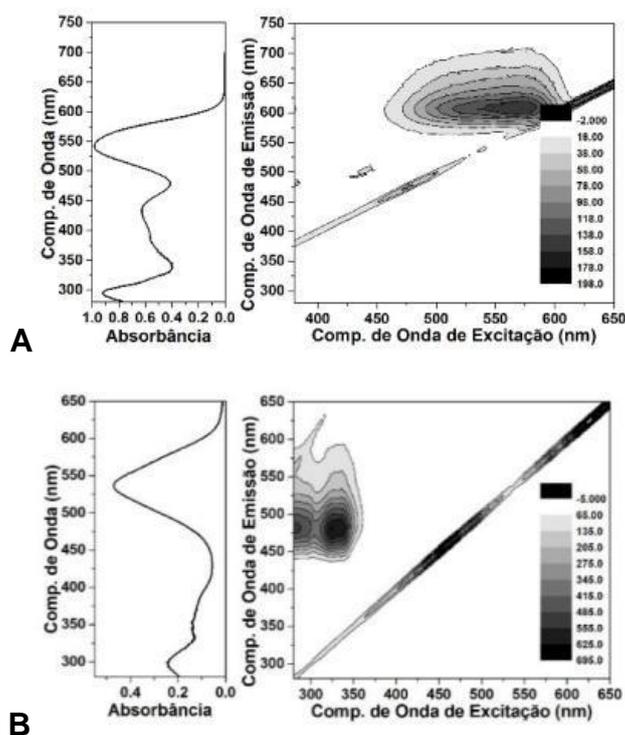
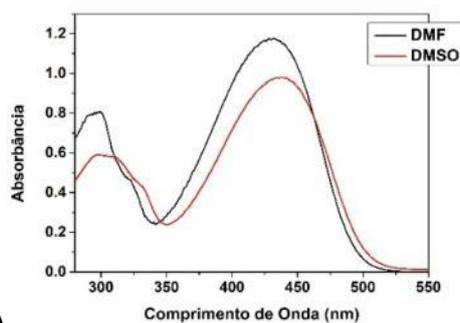
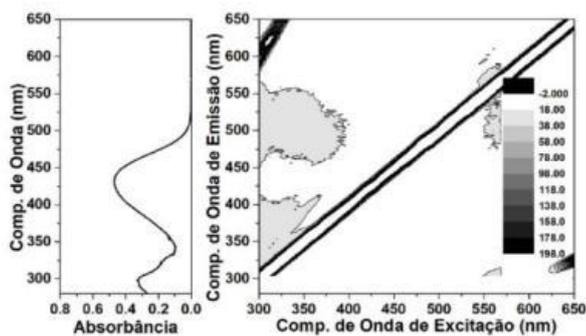


Figura 59: Curvas de superfície de emissão de fluorescência com os respectivos espectros de absorção à esquerda, para **21** em solventes em que houve formação de agregados: (A) etanol e (B) clorofórmio, em concentrações de 25 μM .

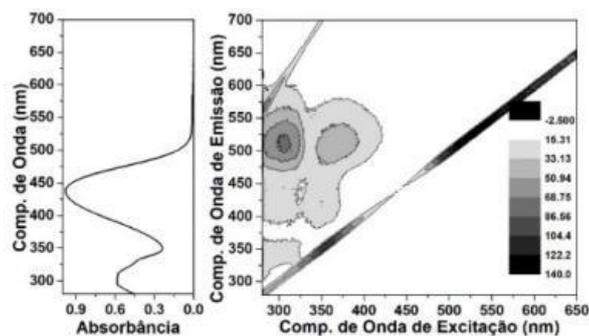
Para a estreptocianina **22**, observa-se que apenas em DMF e DMSO não há formação de agregados. Seus espectros de absorção (Figura 60 A) e emissão de fluorescência encontram-se na Figura 60 (B para DMF e C para DMSO). Observa-se máximos de absorção em 432 nm para DMF e 438 nm para DMSO. A emissão de fluorescência para DMF é extremamente baixa, podendo dessa forma ser desconsiderada. Para DMSO, o máximo de emissão observado está em 507 nm, com um deslocamento de Stokes de 69 nm. Os valores de ϵ para DMF encontrados foram de $47,2 \times 10^3 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ enquanto que para DMSO de $49,7 \times 10^3 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. Para DMSO, observa-se um decaimento $S_1 \rightarrow S_0$ para excitações em $S_0 \rightarrow S_2$.



A



B



C

Figura 60: Espectros de absorção para **22** (A) em DMF e DMSO, e curva se superfície da emissão de fluorescência em DMF (B) e DMSO (C).

Considerando os solventes em que houve formação de agregados – dioxano, acetato de etila, acetonitrila, etanol e clorofórmio – os espectros de absorção encontram-se nas Figuras 61 e 62 abaixo. Observa-se que para dioxano e acetato de etila, a banda associada aos monômeros, encontra-se em 413 e 412 nm, respectivamente, com ϵ de $38,5 \times 10^3 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ e $31,3 \times 10^3 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. Para esses solventes, não houve formação da banda associada aos agregados H, enquanto que a banda de agregados J está em 644 nm, com ϵ de $8,4 \times 10^3 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ para dioxano, e de 552 nm para acetato de etila, com ϵ de $9 \times 10^3 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. Em etanol e acetonitrila, os máximos associados ao monômero estão em 417 nm e 428 nm, respectivamente, com valores de ϵ significativos, nos valores de $39,5 \times 10^3 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ e $42,6 \times 10^3 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. Já

as bandas de agregados H estão em 367 nm para acetonitrila, com ϵ de $9,8 \times 10^3 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ e para etanol, em 382 nm, com ϵ de $20,9 \times 10^3 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. Para as bandas associadas aos agregados em acetonitrila e etanol, ambos seus máximos foram localizados em 543 nm, com ϵ de $60,3 \times 10^3 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ para acetonitrila e $54,3 \times 10^3 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ para etanol. Considerando clorofórmio, o máximo associado à formação de monômeros não foi evidenciado no espectro de absorção, indicando assim apenas, o máximo associado à presença de agregados H (383 nm, com $\epsilon = 4,3 \times 10^3 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) e o máximo em 540 nm para os agregados J, com ϵ de $15,3 \times 10^3 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$.

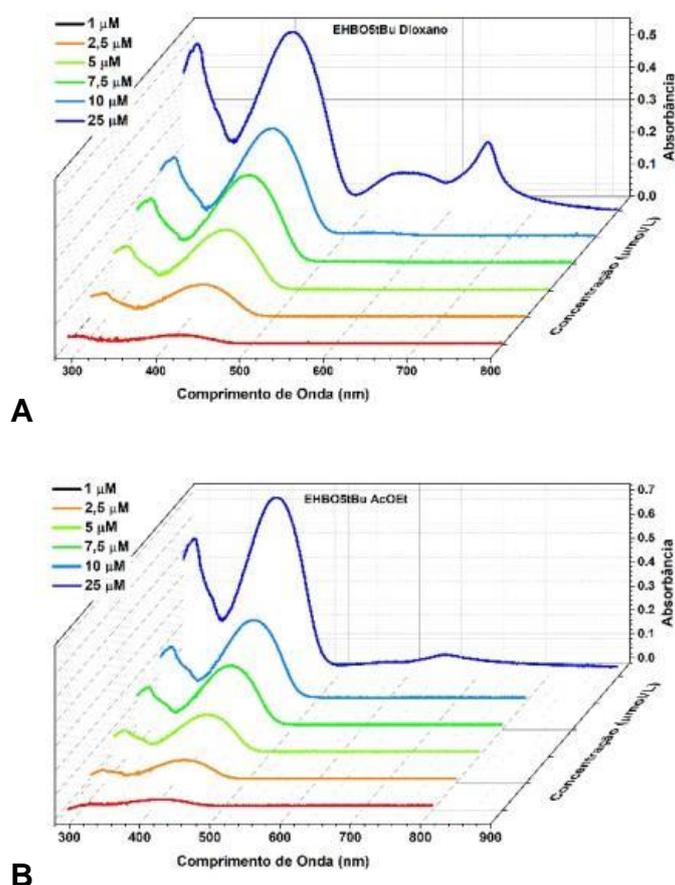


Figura 61: Espectros de absorção nos solventes em que houve formação de agregados de **22**: (A) dioxano e (B) acetato de etila.

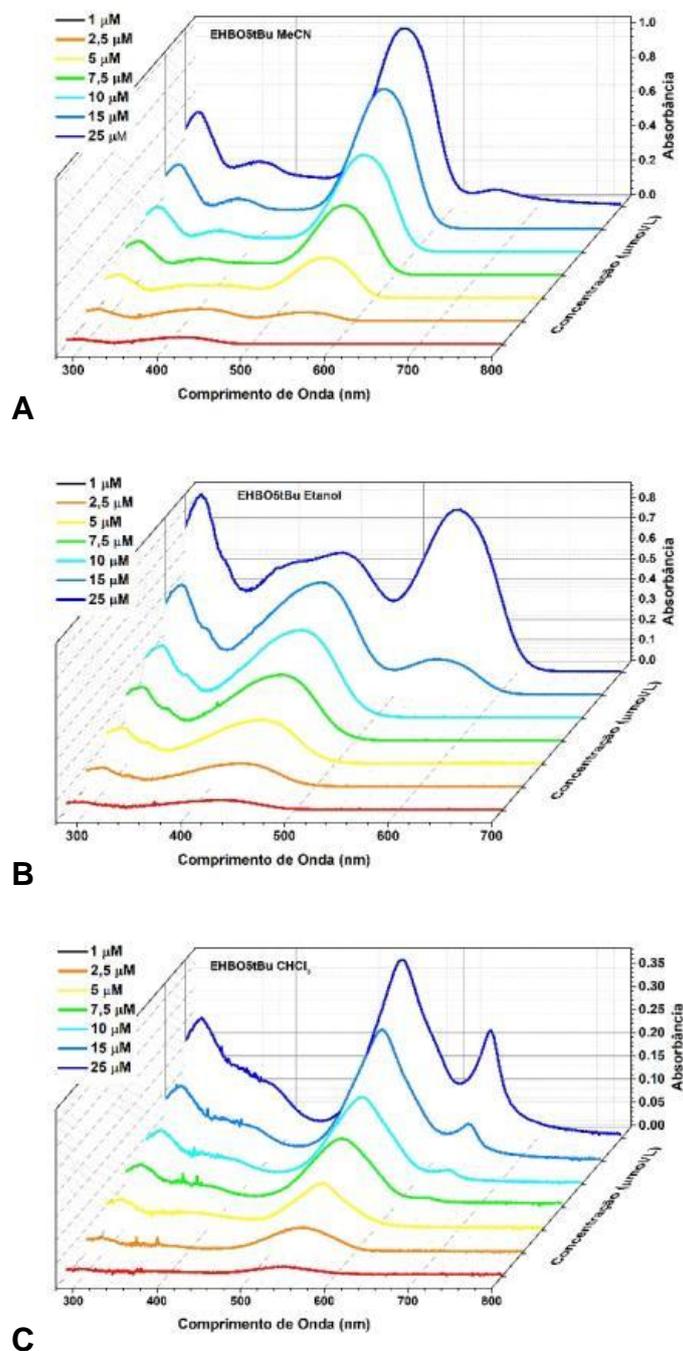


Figura 62: Espectros de absorção nos solventes em que houve formação de agregados de **22**: (A) acetonitrila, (B) etanol e (C) clorofórmio.

As curvas de superfície dos espectros de emissão em 3D para os casos em que houve formação de agregados encontra-se na Figura 63 abaixo. Observa-se que para dioxano (Figura 63 A) não há emissão de fluorescência significativa para os agregados J, em decorrência de sua baixa concentração no sistema em que a Lei de Lambert-Beer é linear, mostrando apenas um máximo

de emissão em 518 nm relacionado à banda de monômeros, com deslocamento de Stokes de 106 nm. Para acetato de etila (Figura 63 B), o máximo de emissão da banda monomérica não é observado, mostrando apenas o máximo associado à banda de agregados J, em 627 nm, com deslocamento de Stokes de 75 nm. Para acetonitrila e etanol (Figura 64 A e B, respectivamente), as bandas de emissão estão em 500 e 478 nm, respectivamente, com deslocamentos de Stokes de 83 e 50 nm. A emissão associada aos agregados J estão em 604 nm em ambos solventes, com deslocamentos de Stokes de 61 nm para ambos. Em clorofórmio (Figura 64 C), verifica-se um máximo de emissão em 496 nm, bem como um em 649 nm associado aos agregados J, com deslocamento de Stokes de 109 nm. Para dioxano e etanol, observa-se um decaimento $S_1 \rightarrow S_0$ para excitações em $S_0 \rightarrow S_2$.

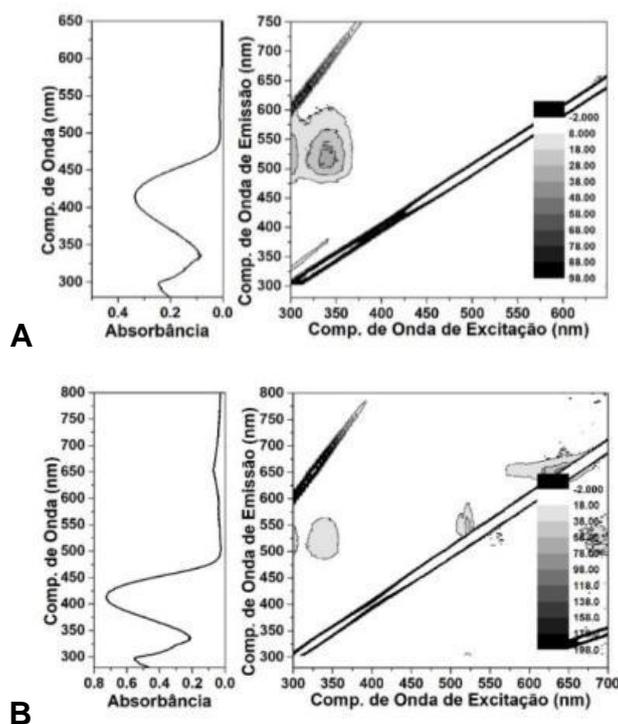


Figura 63: Curvas de superfície de emissão de fluorescência com os respectivos espectros de absorção à esquerda, para **22**, em solventes em que houve formação de agregados: (A) dioxano e (B) acetato de etila.

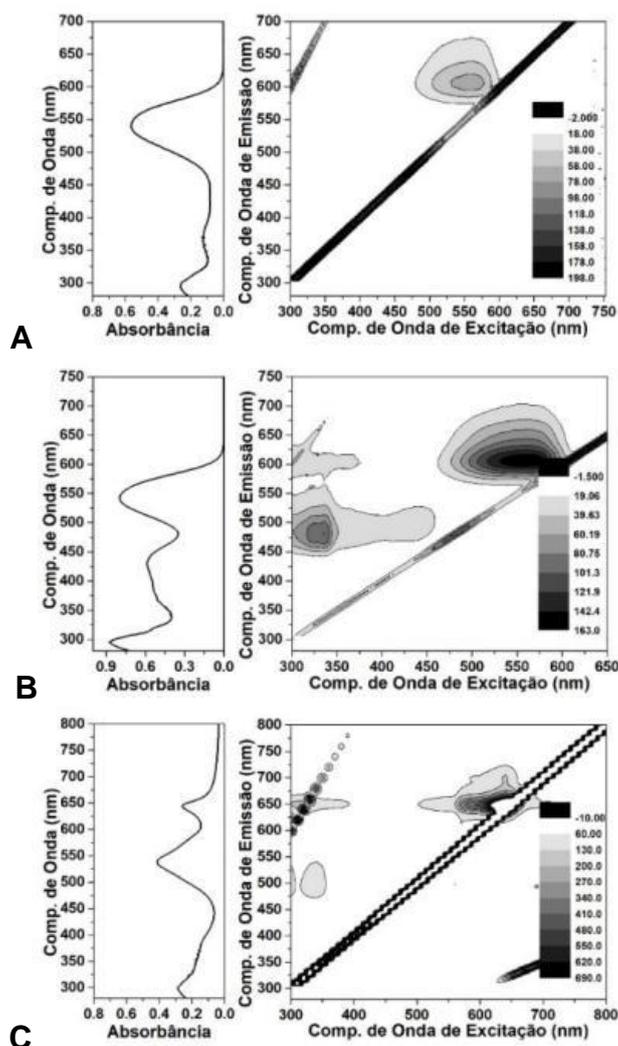


Figura 64: Curvas de superfície de emissão de fluorescência com os respectivos espectros de absorção à esquerda, para **22** em solventes em que houve formação de agregados: (A) acetonitrila, (B) etanol e (C) clorofórmio.

Para todos os derivados oxigenados, os resultados encontram-se sumarizados na Tabela III, apresentando dados de absorção e emissão, tanto das bandas monoméricas quanto de agregados.

Tabela III: Dados obtidos para as estreptocianinas **19-22** para monômeros e agregados. Comprimentos de onda do máximo de absorção (λ_{abs}), coeficientes de absorvidade molar (ϵ , $10^3 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$), comprimentos de onda do máximo de emissão (λ_{em}) e o deslocamento de Stokes (Δ_{ST}).

		Monômero				Agregado					
19	Solvente	λ_{abs}^{mon}	ϵ_{mon}	λ_{max}^{em}	Δ_{ST}	λ_{abs}^H	ϵ_H	λ_{abs}^J	ϵ_J	λ_{em}^J	Δ_{ST}
	19	DIOX	413	36,7	482 548	69 135	NA	NA	NA	NA	NA
AcOEt		412	32,1	489	77	NA	NA	NA	NA	NA	NA
DMF		427	33,5	494	67	NA	NA	NA	NA	NA	NA
DMSO		434	35,8	485	51	NA	NA	NA	NA	NA	NA
MeCN		410	4,7	491	81	364	12,4	539	41,5	599	60
EtOH		423	7,5	499	76	366	12,4	539	41,5	599	60
CHCl ₃		412	10,4	463	51	346	12,7	533	60,8	602	69
20	DIOX	416	43	517	101	NA	NA	536	9,2	607	71
	AcOEt	412	31,3	536	124	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	DMF	432	49,2	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	DMSO	432	46,2	495	63	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	MeCN	ND	NA	517	95	376	4,5	539	28,2	557	18
	EtOH	427	39,1	483	56	381	18,3	541	65,7	605	64
	CHCl ₃	ND	ND	NA	NA	NA	NA	541	38,2	605	64
21	DIOX	414	38,5	514	100	NA	NA	644	8,2	646	2
	AcOEt	414	27,8	513	99	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	DMF	429	48,9	494	65	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	DMSO	436	50,6	497	61	NA	NA	550	3	573	23
	MeCN	416	22,1	497	81	375	8,6	540	31,6	606	66
	EtOH	432	6,3	482	50	380	20,8	543	45,8	606	63
	CHCl ₃	ND	NA	482	NA	NA	NA	536	30,5	613	77
22	DIOX	413	38,5	518	106	NA	NA	644	8,4	NA	NA
	AcOEt	412	31,3	NA	NA	NA	NA	552	9	627	75
	DMF	432	47,2	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	DMSO	438	49,7	507	69	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	MeCN	417	39,5	500	83	367	9,8	543	60,2	604	61
	EtOH	428	42,6	478	50	382	20,9	543	54,3	604	61
	CHCl ₃	ND	NA	496	NA	383	4,3	540	15,3	649	109

NA – Não apresenta; ND – Não definido

4.2.2. Estreptocianinas contendo núcleo benzotiazol

Para **23**, os estudos fotofísicos em DMSO, DMF, acetonitrila e dioxano, encontram-se na Figura 65. Com relação aos espectros de absorção à esquerda, nota-se que os máximos de absorção encontrados foram de 436 nm para DMSO, 429 nm para DMF, 426 nm para acetonitrila e de 412 nm para dioxano. Os coeficientes de absorvidade molar estão relacionados, para os dois primeiros casos, a transições do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$, com valores de 54×10^3 e $47,3 \times 10^3 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$, respectivamente. Para dioxano e acetonitrila, esses valores não puderam ser obtidos já que não foi possível obter a concentração exata da solução. Com relação à emissão de fluorescência, nota-se que em dioxano e acetonitrila, a emissão é desprezível. Já para DMSO e DMF, observa-se máximos de 440 nm e 493 nm, respectivamente.

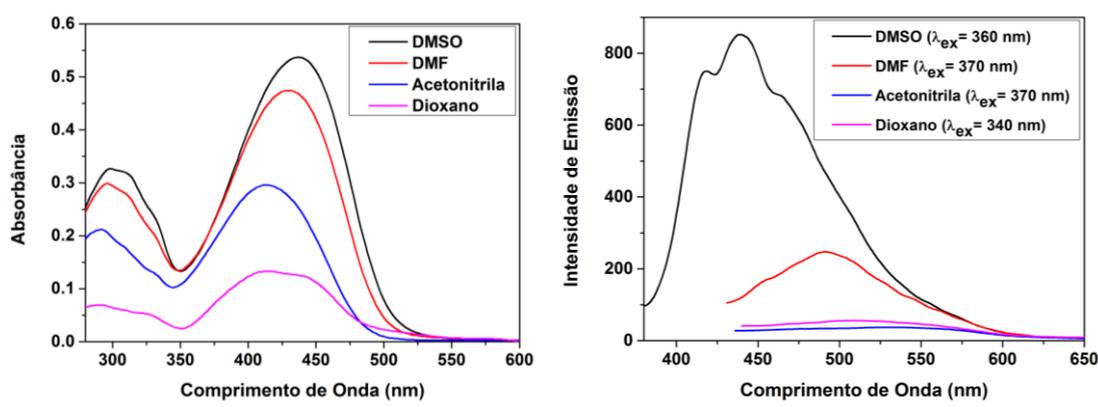


Figura 65: Espectros de absorção (esquerda) e emissão de fluorescência (direita) para **23** ($10 \mu\text{mol/L}$) em DMSO e DMF com concentração de $10 \mu\text{mol/L}$ e acetonitrila e dioxano com concentrações desconhecidas.

Em etanol, **23** apresentou a formação de agregados (Figura 66 A), com aumento da intensidade das bandas com o aumento da concentração. Observa-se o máximo de absorção em 415 nm para a forma monomérica enquanto que em 386 nm e 547 nm encontra-se os máximos de absorção para as formas agregadas (tipo *H* e *J*). O valor de ϵ para o monômero é de $33 \times 10^3 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$, referente a transições $\pi \rightarrow \pi^*$, enquanto que para os agregados *H* e *J*, esse valor fica em $22,5$ e $85,6 \times 10^3 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. Com relação à emissão de

fluorescência, observa-se na Figura 66 B que ambos monômero e agregado, *J* emitem, sendo a intensidade de fluorescência para o agregado mais intensa. O máximo de emissão para o monômero foi de 513 nm, com deslocamento de Stokes de 98 nm, enquanto que para o agregado, o máximo encontrado foi de 608 nm, com Deslocamento de Stokes de 61 nm.

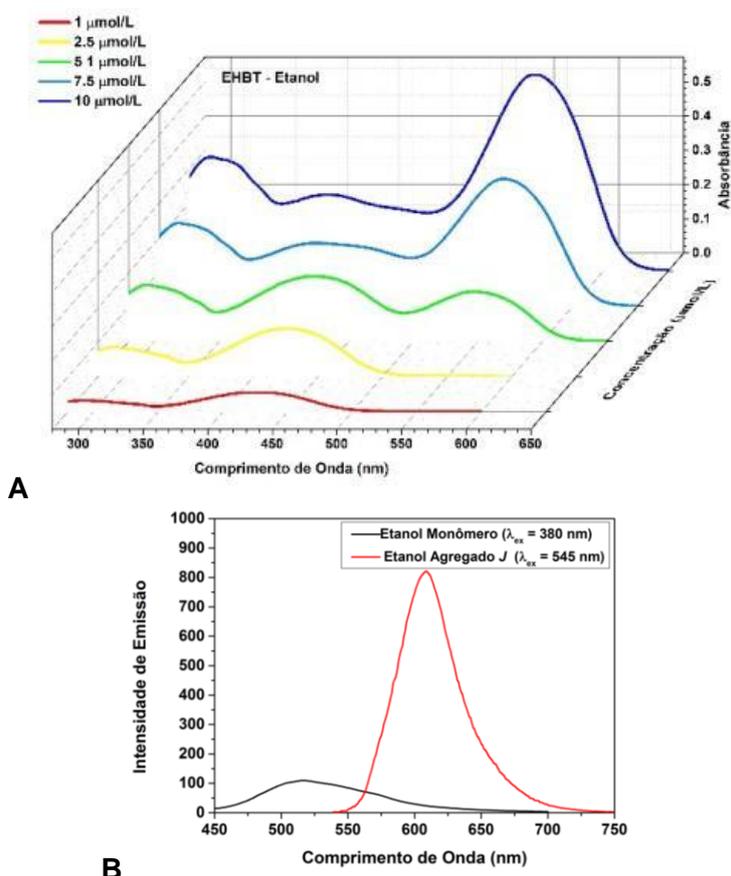


Figura 66: Espectros de absorção (A) para **23** em etanol e espectros de emissão de fluorescência (B) (10 μmol/L) associados às bandas de monômero e agregado.

Para a estreptocianina **24**, verifica-se na Figura 67 que DMF é o único solvente em que não há formação de agregados. Seu máximo de absorção monomérico localiza-se em 429 nm, com máximo de emissão em 503 nm, levando a um deslocamento de Stokes de 74 nm, e um ϵ de $50,7 \times 10^3 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. Para DMF, observa-se um decaimento $S_1 \rightarrow S_0$ para excitações em $S_0 \rightarrow S_2$.

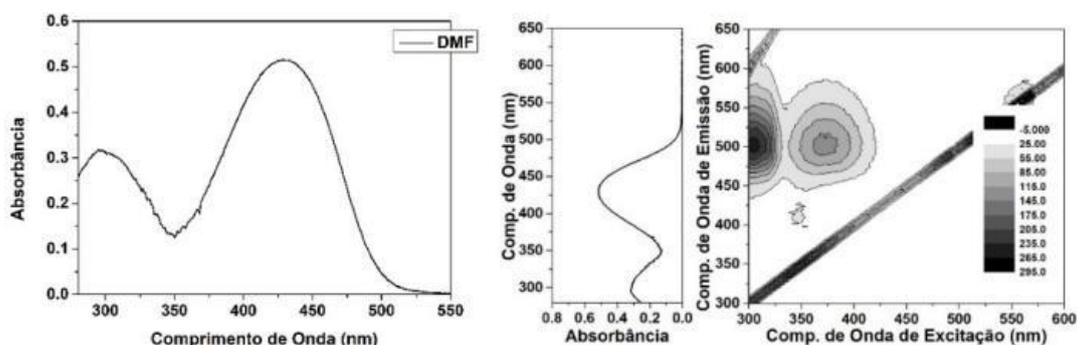
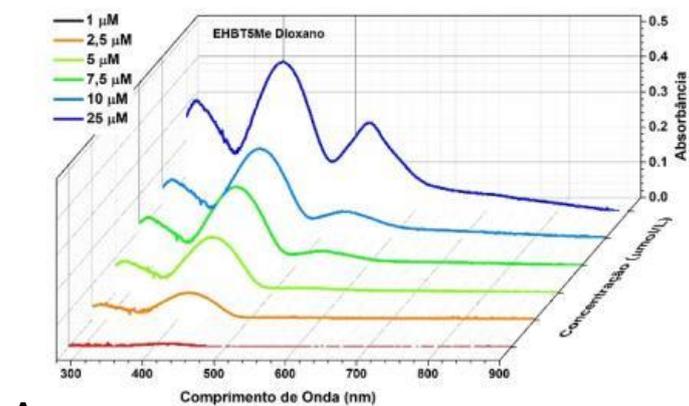
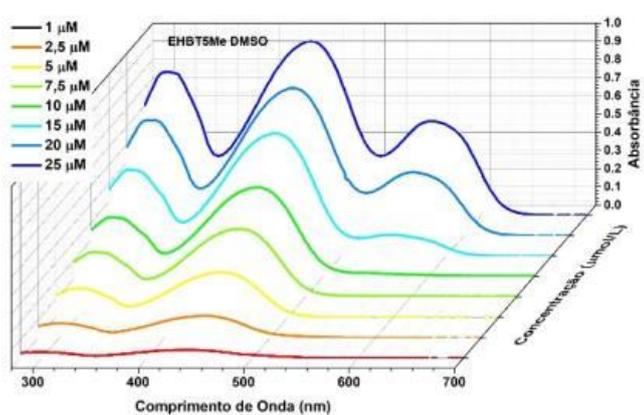


Figura 67: Espectro de absorção para **24** (direita) em DMF, e curva se superfície da emissão de fluorescência em DMF (direita).

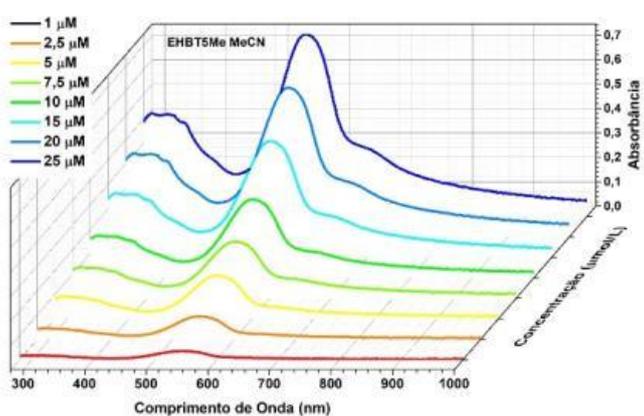
Para o mesmo composto, os agregados foram observados em dioxano, DMSO, acetonitrila, etanol e clorofórmio, conforme Figuras 68 e 69. A presença de Agregados H foi evidenciada apenas em etanol, com máximo de absorção de 374 nm e ϵ de $15,7 \times 10^3 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. Para dioxano, o máximo associado aos monômeros está em 415 nm ($\epsilon = 32,4 \times 10^3 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$), enquanto que o máximo associado aos agregados J é mostrado em 521 nm ($\epsilon = 11,6 \times 10^3 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). Para DMSO, o máximo de emissão monomérico está em 437 nm, enquanto que o máximo de agregados J está em 553 nm, com ϵ de $49,6 \times 10^3 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ e $40,2 \times 10^3 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$, respectivamente. Para acetonitrila, o máximo associado aos monômeros não é observado, enquanto que o máximo relacionado aos agregados J fica em 554 nm, com ϵ de 29,5. Para etanol, o máximo monomérico está em 422 nm, enquanto que o associado aos agregado J está em 645 nm, com ϵ de $24,3 \times 10^3 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ e $114 \times 10^3 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$, respectivamente. Para clorofórmio, observa-se que a banda monomérica não é mostrada no espectro, sendo a banda dos agregados J localizada em 645 nm, com $\epsilon = 25,7 \times 10^3 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$.



A



B



C

Figura 68: Espectros de absorção para os solventes em que houve formação de agregados de **24**: (A) dioxano, (B) DMSO e (C) acetonitrila.

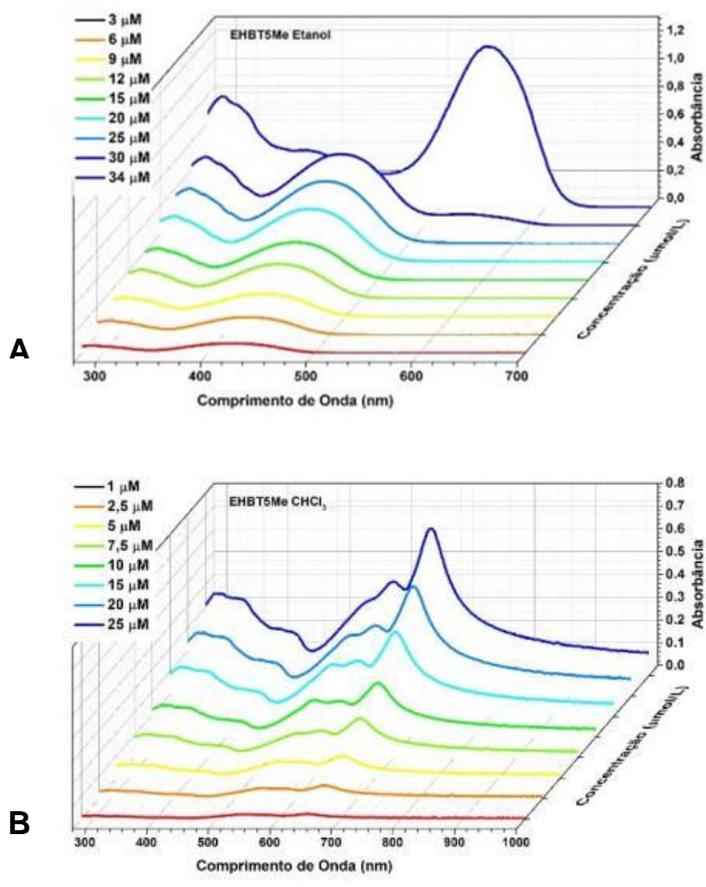


Figura 69: Espectros de absorção para os solventes em que houve formação de agregados de **24**: etanol (A) e clorofórmio (B).

Os espectros de emissão para os casos em que há formação de agregados estão ilustrados nas Figura 70 e 71. Nota-se que para dioxano (Figura 70 A), os máximos de emissão monomérico e para agregado J é de 486 e 603 nm, respectivamente, gerando um deslocamento de Stokes de 71 e 82 nm, respectivamente. Para DMSO (Figura 70 B), esses máximos estão em 510 nm para o monômero, com deslocamento de Stokes de 73 nm, enquanto em 620 tem-se a emissão dos agregados J, com deslocamento de Stokes de 67 nm. Já a acetonitrila (Figura 70 C) apresenta um máximo de emissão em 496 nm, e outro em 610 nm associado aos agregados J, com deslocamento de Stokes de 56 nm. Para etanol (Figura 71 A), os máximos de emissão monomérico e de agregados J estão localizados em 497 nm ($\Delta_{ST} = 75$ nm) e 615 nm ($\Delta_{ST} = 70$ nm). Em clorofórmio (Figura 71 B), um máximo de emissão em 526 nm é evidenciado no espectro, enquanto que em 658 nm, um máximo associado à excitação no

comprimento de onda da banda de agregados J é observado, com deslocamento de Stokes de 156 nm. Para DMSO e etanol, observa-se um decaimento $S_1 \rightarrow S_0$ para excitações em $S_0 \rightarrow S_2$.

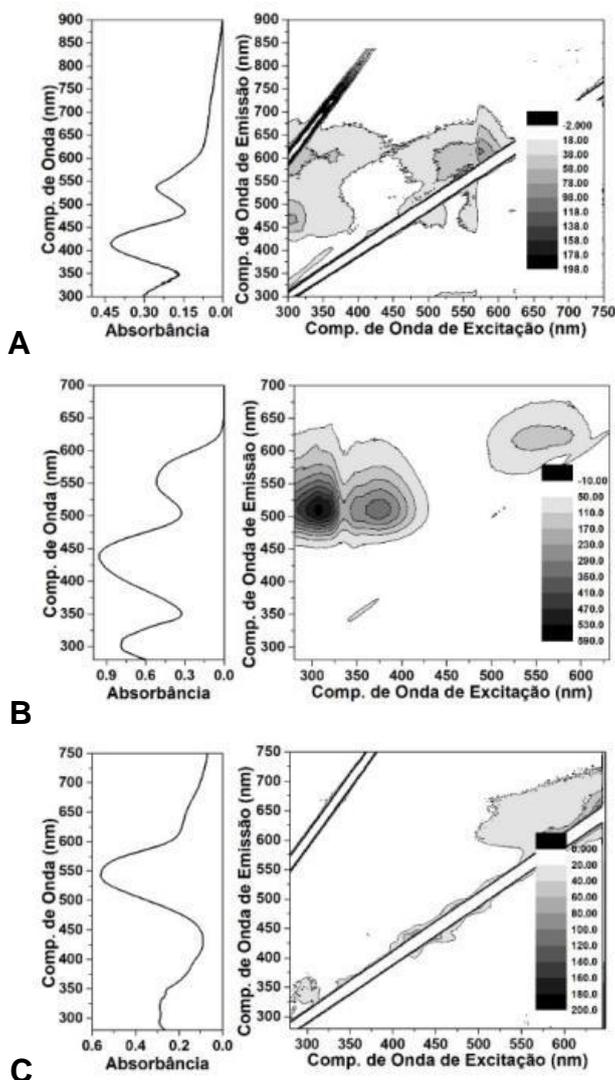


Figura 70: Curvas de superfície de emissão de fluorescência com os respectivos espectros de absorção à esquerda, para **24** em solventes em que houve formação de agregados: (A) dioxano, (B) DMSO e (C) acetonitrila.

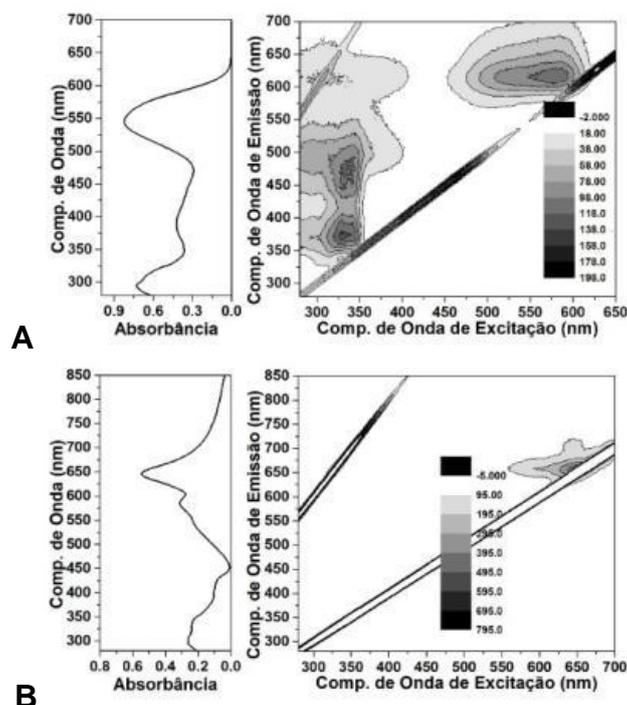


Figura 71: Curvas de superfície de emissão de fluorescência com os respectivos espectros de absorção à esquerda, para **24** em solventes em que houve formação de agregados: (A) etanol e (B) clorofórmio.

Para a estreptocianina **25**, em acetato de etila e DMF não houve formação de agregados. Os espectros encontram-se na Figura 72. Nota-se que, nos espectros de absorção, Figura 72 A, os máximos de absorção estão em 410 nm ($\epsilon = 23,3 \times 10^3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) e 4100 nm ($\epsilon = 50,5 \times 10^3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Os espectros de emissão (Figura 72 B para acetato de etila, e C para DMF) mostram máximos em 481 nm para acetato de etila e 502 nm para DMF, com deslocamentos de Stokes de 71 e 73 nm, respectivamente. Para DMF, observa-se um decaimento $S_1 \rightarrow S_0$ para excitações em $S_0 \rightarrow S_2$.

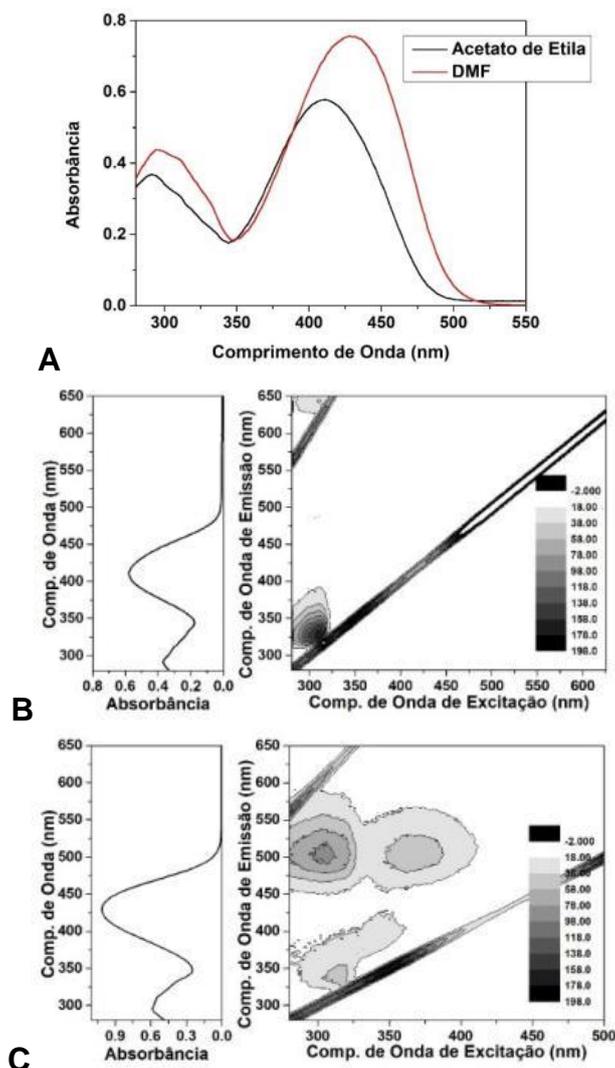
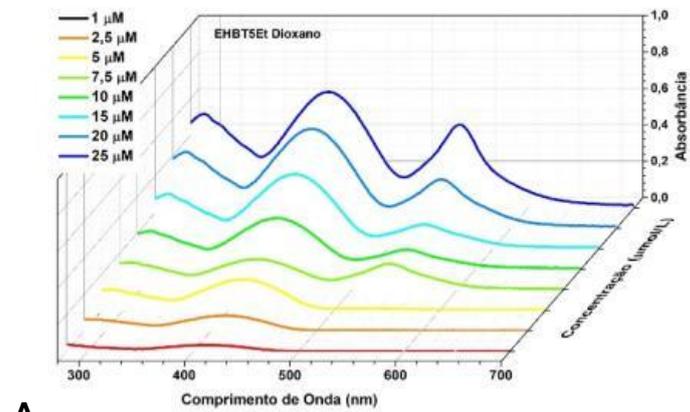
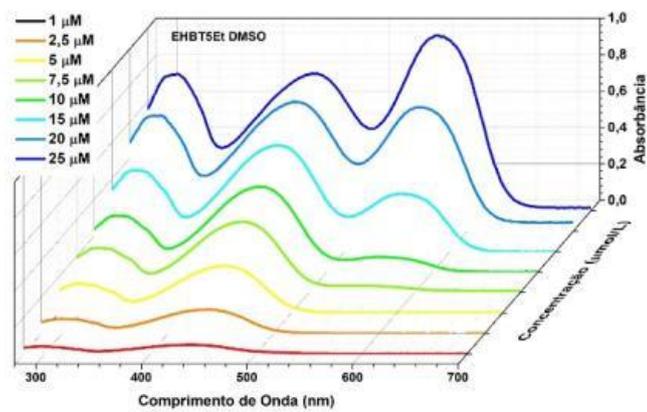


Figura 72: Espectros de absorção para **25** (A) em acetato de etila e DMF, e curva se superfície da emissão de fluorescência em acetato de etila (B) e DMF (C).

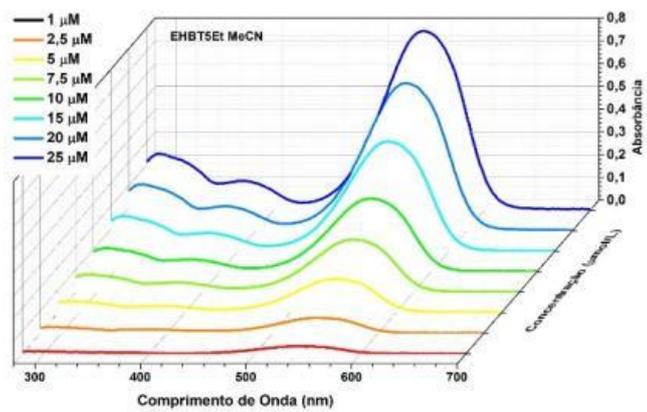
Para o mesmo composto, os espectros de absorção onde houve presença de agregados, encontra-se nas Figuras 73 e 74. Para os agregados H, nota-se apenas em acetonitrila, com máximo em 370 nm ($\epsilon = 5,2 \times 10^3 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) e em etanol, em 384 nm ($\epsilon = 10 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). A banda monomérica é observada em dioxano (411 nm, $\epsilon = 33,7 \times 10^3 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$), DMSO (436 nm, $\epsilon = 33,7 \times 10^3 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) e etanol (424 nm, $\epsilon = 19,4 \times 10^3 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). Para acetonitrila e clorofórmio a banda monomérica não é evidenciada nos espectros de absorção. Já a banda de agregados J está apresentada em dioxano (535 nm, $\epsilon = 32,3 \times 10^3 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$), DMSO (554 nm, $\epsilon = 59,9 \times 10^3 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$), acetonitrila (545 nm, $\epsilon = 32 \times 10^3 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$), etanol (548 nm, $\epsilon = 113,7 \times 10^3 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) e clorofórmio (540 nm, $\epsilon = 37,6 \times 10^3 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$).



A

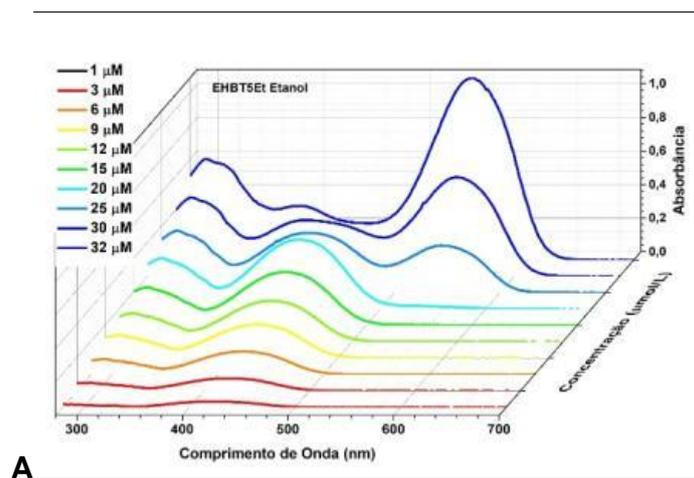


B

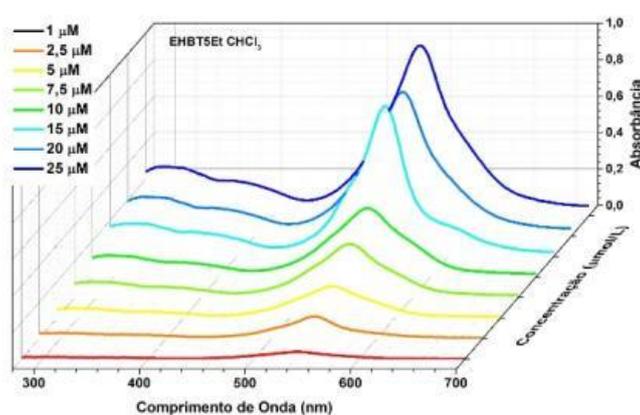


C

Figura 73: Espectros de absorção para os solventes em que houve formação de agregados de **25**: (A) dioxano, (B) DMSO e (C) acetonitrila.



A



B

Figura 74: Espectros de absorção para os solventes em que houve formação de agregados de **25**: (A) etanol e (B) clorofórmio.

Os espectros de emissão para os solventes com presença de agregados estão apresentados nas Figuras 75 e 76. Observa-se que para dioxano, um máximo de emissão em 469 nm, com deslocamento de Stokes de 58 nm é associado à banda monomérica, enquanto que o máximo de emissão em 621 nm está associado aos agregados J, com deslocamento de Stokes de 86 nm. Para DMSO verifica-se uma emissão associada à banda monomérica em 507 nm ($\Delta_{ST} = 71$ nm) e em 624 nm uma emissão associada aos agregados J, com $\Delta_{ST} = 70$ nm. Para acetonitrila, um máximo de emissão apenas em 614 é mostrado, associado à banda de agregados J. Em etanol, os máximos monomérico e de agregados J estão localizados em 493 nm e 614 nm, com deslocamentos de Stokes de 69 e 66 nm, respectivamente. Para clorofórmio, o máximo de emissão é evidenciado tão somente para a banda de agregados J, em 617 nm, com deslocamento de Stokes de 77 nm. Para DMSO e etanol,

observa-se um decaimento $S_1 \rightarrow S_0$ para excitações em $S_0 \rightarrow S_2$.

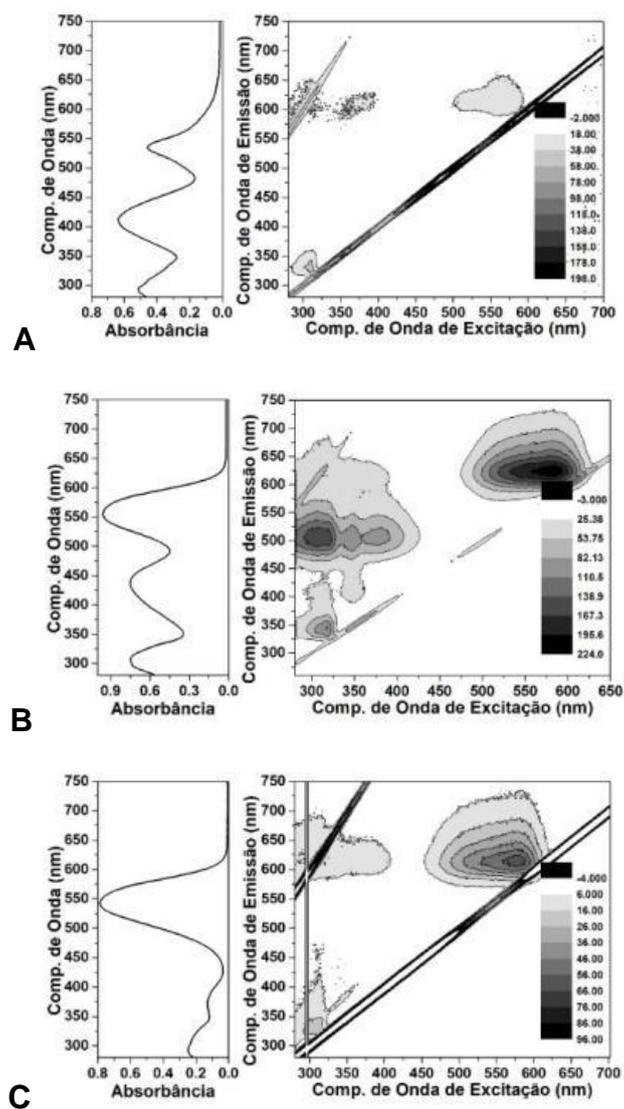


Figura 75: Curvas de superfície de emissão de fluorescência com os respectivos espectros de absorção à esquerda, para **25** em solventes em que houve formação de agregados: (A) dioxano, (B) DMSO e (C) acetonitrila.

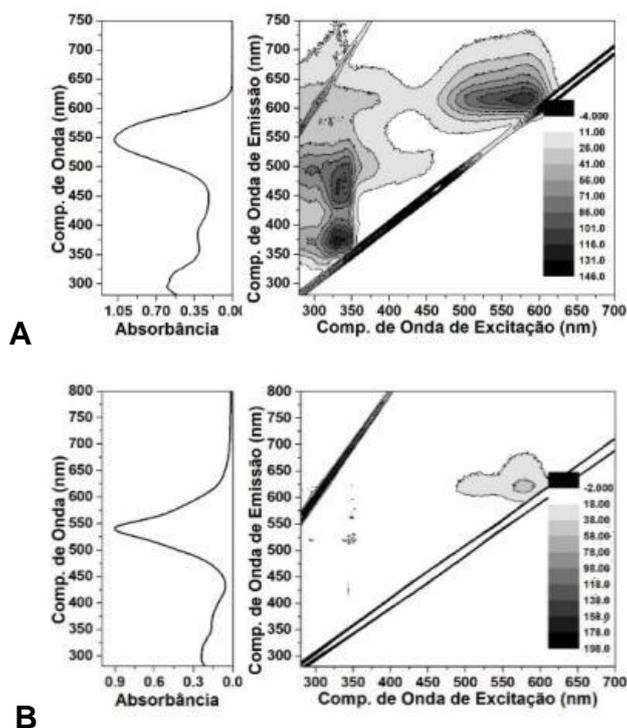


Figura 76: Curvas de superfície de emissão de fluorescência com os respectivos espectros de absorção à esquerda, para **25** em solventes em que houve formação de agregados: (A) etanol e (B) clorofórmio.

Para a estreptocianina **26**, nota-se que apenas em DMF não há formação de agregados. Os espectros de absorção e emissão encontram-se na Figura 77. Observa-se assim um máximo de absorção em 430 nm, com $\epsilon = 52,8 \times 10^3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, e uma emissão associada em 501 nm, gerando um deslocamento de Stokes de 71 nm. Para DMF, observa-se um decaimento $S_1 \rightarrow S_0$ para excitações em $S_0 \rightarrow S_2$.

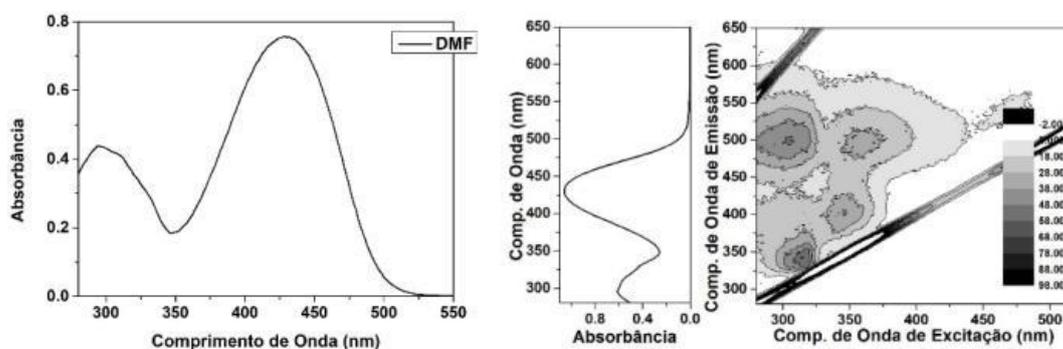


Figura 77: Espectro de absorção para **26** (esquerda) em, e curva se superfície da emissão de fluorescência em DMF (direita).

Para a mesma estreptocianina, as figuras 78 a 80 ilustram os espectros de absorção para os solventes em que a presença de agregados é evidenciada. Nota-se aqui que os agregados H são evidenciados apenas para acetonitrila (380 nm, $\epsilon = 10,9 \times 10^3 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) e etanol (376, $\epsilon = \times 10^3 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). As bandas monoméricas foram evidenciadas para dioxano (410 nm, $\epsilon = 47,9 \times 10^3 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$), acetato de etila (411 nm, $\epsilon = 36,7 \times 10^3 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$), DMSO (436 nm, $\epsilon = 51,4 \times 10^3 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$), acetonitrila (416 nm, $\epsilon = 35 \times 10^3 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) e etanol (423 nm, $\epsilon = 18,2 \times 10^3 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). Para clorofórmio a banda monomérica não é evidenciada. A banda associada aos agregados J para esses solventes foi obtida entre 532 nm e 546 nm, com ϵ variando entre $5,5 \times 10^3 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ para acetato de etila, e com valores mais significativos para etanol, de $90,5 \times 10^3 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$.

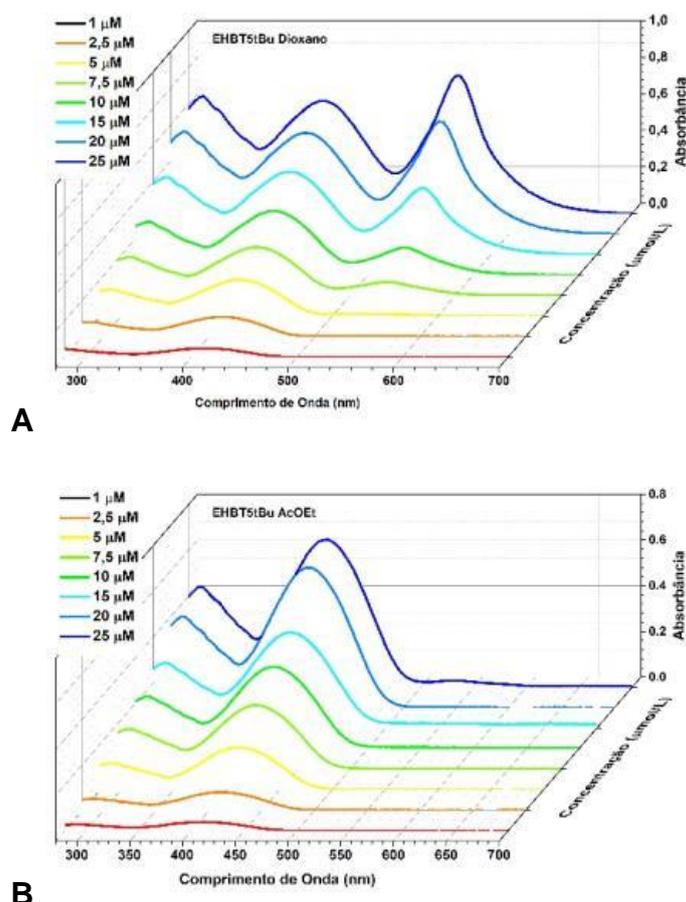
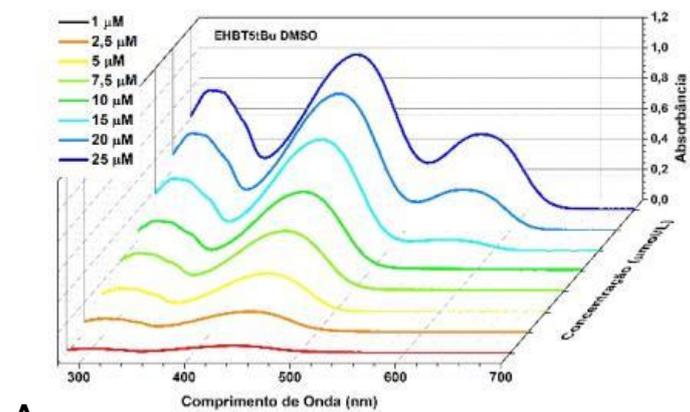
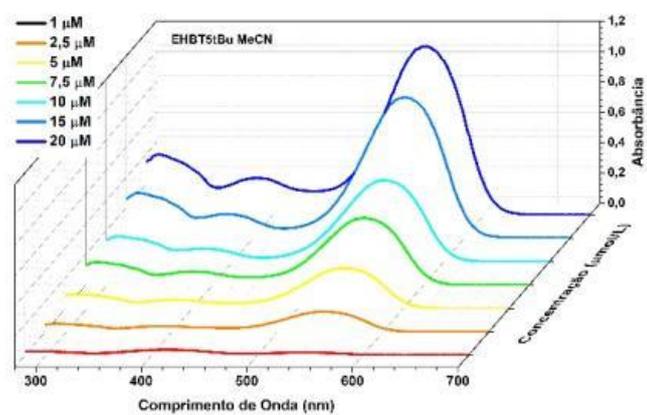


Figura 78: Espectros de absorção para os solventes em que houve formação de agregados de **26**: (A) dioxano e (B) acetato de etila.

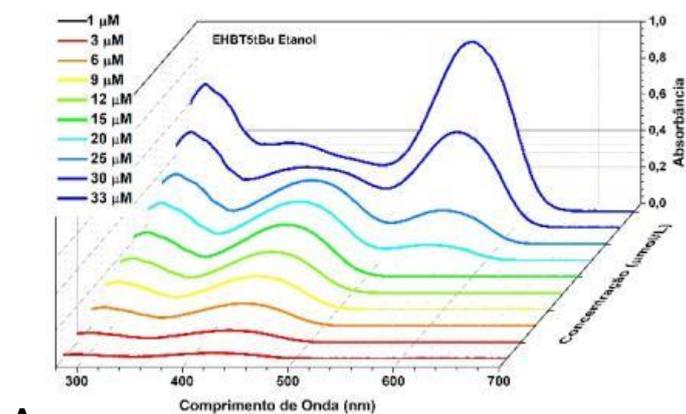


A

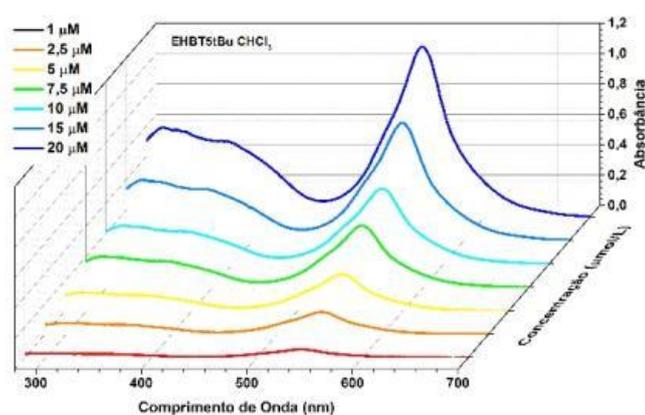


B

Figura 79: Espectros de absorção para os solventes em que houve formação de agregados de **26**: (A) DMSO e (B) acetonitrila.



A



B

Figura 80: Espectros de absorção para os solventes em que houve formação de agregados de **26**: (A) etanol e (B) clorofórmio.

Os espectros de emissão para os solventes em que houve formação de agregados de **26** estão apresentados nas Figuras 81 e 82. Verifica-se que a emissão de dioxano está em 518 nm para a banda monomérica e em 603 nm para a banda de agregados J, com deslocamentos de Stokes de 108 e 68 nm, respectivamente. Para acetato de etila a emissão de fluorescência associada à banda monomérica está em 482 nm, com deslocamento de Stokes de 71 nm. A emissão de fluorescência associada aos agregados não é evidenciada. Para DMSO, o máximo de emissão monomérico está em 509 nm e para os agregados em 624 nm, levando a um deslocamento de Stokes de 73 e 69 nm, respectivamente. Para acetonitrila, os máximos de emissão estão em 614 nm para a banda monomérica e de 620 para os agregados, com deslocamentos de Stokes de 198 e 78 nm. Em etanol, os máximos são de 520 nm ($\Delta_{ST} = 97$) e 614 nm ($\Delta_{ST} = 70$ nm) para as bandas monomérica e agregados J, respectivamente.

Em clorofórmio, a emissão de monômeros não é evidenciada, enquanto que a emissão de agregados J está em 612 nm, com deslocamento de Stokes de 66 nm. Para DMSO e clorofórmio, observa-se um decaimento $S_1 \rightarrow S_0$ para excitações em $S_0 \rightarrow S_2$.

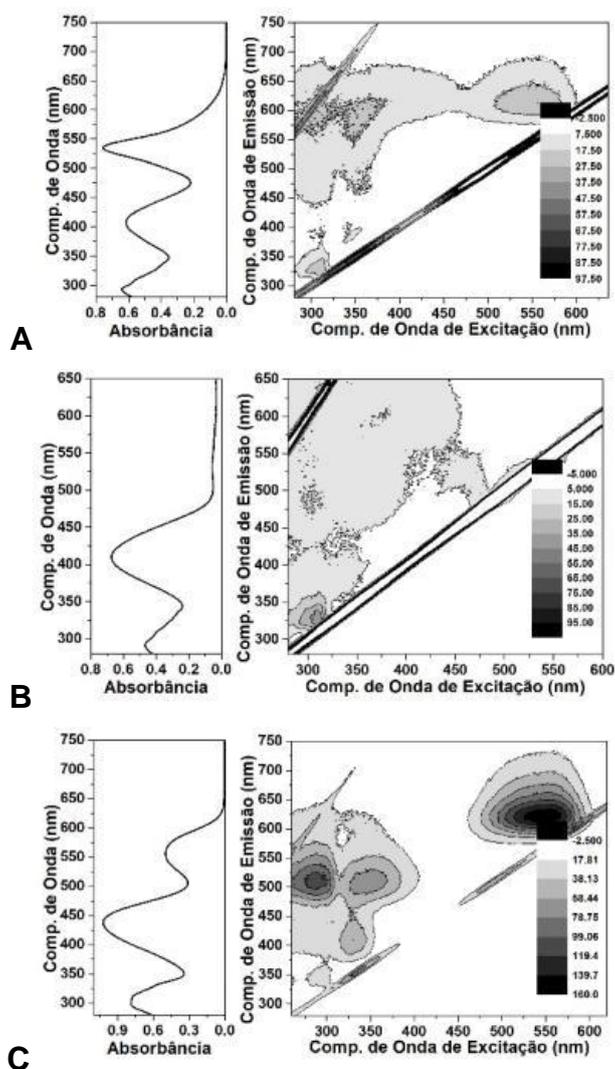


Figura 81: Curvas de superfície de emissão de fluorescência com os respectivos espectros de absorção à esquerda, para **26** em solventes em que houve formação de agregados: (A) dioxano, (B) acetato de etila e (C) DMSO.

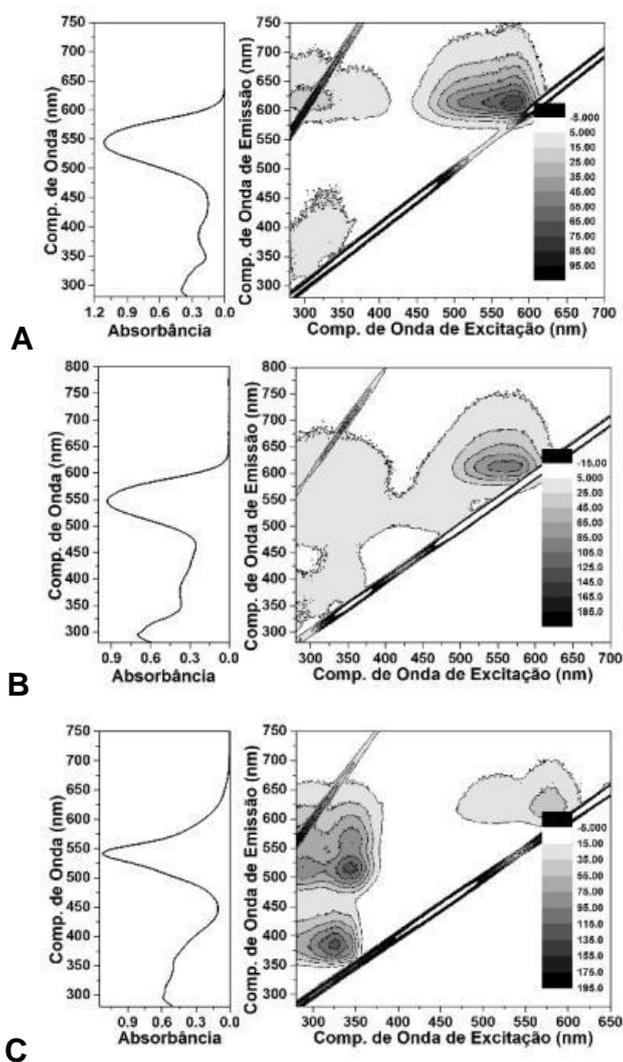


Figura 82: Curvas de superfície de emissão de fluorescência com os respectivos espectros de absorção à esquerda, para **26** em solventes em que houve formação de agregados: (A) acetonitrila, (B) etanol e (C) clorofórmio.

Os resultados obtidos a partir da caracterização fotofísica para os derivados sulfurados (**23** a **26**) estão apresentados na Tabela IV onde estão apresentados os valores de máximos de absorção da forma monomérica ($\lambda_{\text{abs}}^{\text{mon}}$ em nm), dos agregados *H* ($\lambda_{\text{abs}}^{\text{H}}$ em nm) e agregados *J* ($\lambda_{\text{abs}}^{\text{J}}$ em nm), seus coeficientes de absorvidade molar (ϵ em $10^3 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$), os máximos de emissão da forma monomérica ($\lambda_{\text{em}}^{\text{mon}}$ em nm) e dos agregados *J* ($\lambda_{\text{em}}^{\text{J}}$ em nm), e os deslocamentos de Stokes ($\Delta_{\text{ST}}^{\text{mon}}$ e $\Delta_{\text{ST}}^{\text{J}}$ em nm).

Tabela IV: Resultados fotofísicos dos derivados de enxofre, com valores de máximos de absorção monoméricos, de agregados *J* e *H* (λ_{abs}^{mon} , λ_{abs}^J e λ_{abs}^H em nm), coeficientes de absorvidade molar (ϵ em $10^3 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) e máximos de emissão monoméricos, dos agregados *J* e deslocamentos de Stokes (λ_{em}^{mon} , λ_{em}^J , Δ_{ST}^{mon} e Δ_{ST}^J e em nm).

	Solvente	Monômero				Agregado					
		λ_{abs}^{mon}	ϵ_{mon}	λ_{max}^{em}	Δ_{ST}	λ_{abs}^H	ϵ_H	λ_{abs}^J	ϵ_J	λ_{em}^J	Δ_{ST}
23	DIOX	412	*	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	DMF	429	47,3	493	64	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	DMSO	436	54	440	4	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	MeCN	426	*	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	EtOH	415	33	513	98	386	22,5	547	85,6	98	61
24	DIOX	415	32,4	486	71	NA	NA	521	11,8	603	82
	DMF	429	50,7	503	74	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	DMSO	437	49,6	510	73	NA	NA	553	40,2	620	67
	MeCN	NA	NA	496	NA	NA	NA	554	29,5	610	56
	EtOH	422	24,3	497	75	374	15,7	645	114	615	70
	CHCl ₃	ND	NA	526	NA	NA	NA	645	25,7	658	15
25	DIOX	411	33,7	469	58	NA	NA	535	32,3	621	86
	AcOEt	410	23,3	481	71	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	DMF	429	50,5	502	73	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	DMSO	436	33,7	507	71	NA	NA	554	59,9	624	70
	MeCN	NA	NA	NA	NA	370	5,2	545	32	614	69
	EtOH	424	19,4	493	69	384	10	548	113,7	614	66
	CHCl ₃	ND	NA	518	NA	NA	NA	540	37,6	617	77
26	DIOX	410	47,9	518	108	NA	NA	535	39,2	603	68
	AcOEt	411	36,7	482	71	NA	NA	532	5,5	NA	NA
	DMF	430	52,8	501	71	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	DMSO	436	51,4	509	73	NA	NA	555	42,6	624	69
	MeCN	416	35	614	198	380	10,9	542	58,3	620	78
	EtOH	423	18,2	520	97	376	381	544	90,5	614	70
	CHCl ₃	NA	NA	NA	NA	NA	NA	546	54,7	612	66

NA – não apresenta * Baixa solubilidade e sem concentração definida ** Baixa emissão de fluorescência

4.2.3. Estreptocianina contendo núcleo benzimidazol

Para dioxano e DMF, a caracterização fotofísica de **27** encontra-se na Figura 83. Para dioxano, o máximo de absorção está localizado em 419 nm. Seu valor de ϵ associado não foi calculado em decorrência da sua baixa solubilidade e conseguinte impossibilidade de obter a concentração. Para DMF, o máximo de absorção está localizado em 436 nm, bem como seu valor de ϵ é de $41 \times 10^3 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ($\pi \rightarrow \pi^*$). Já as emissões para dioxano e DMF foram de 486 nm e 540 nm respectivamente. Nota-se que para dioxano, embora a baixa solubilidade, o composto apresenta emissão de fluorescência significativa. Os deslocamentos de Stokes obtidos foram de 67 nm para dioxano e 104 nm para DMF.

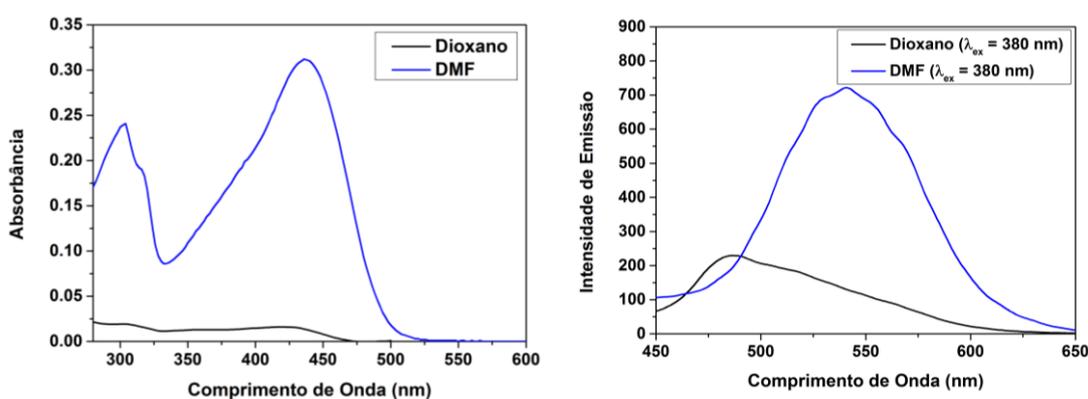


Figura 83: Espectros de absorção (esquerda) e de emissão de fluorescência (direita) para **27** em dioxano (preto) e DMF (azul) com concentração de $10 \mu\text{mol/L}$.

Para DMSO e etanol, a formação de agregados de **27** está presente em concentrações elevadas, como indicado na Figura 84. Essas bandas foram evidenciadas com a variação de concentração. Para DMSO, a forma monomérica possui máximo de absorção de 445 nm ($\epsilon = 33,9 \times 10^3 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) e a forma de agregados *J* um máximo de 555 nm ($\epsilon = 10,1 \times 10^3 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$), sem a clara evidência de agregados *H*. Já para etanol, esses valores são de 434 nm para os monômeros, com ϵ de $2,7 \times 10^3 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$, 550 nm para agregados *J*, com $\epsilon = 39,2 \times 10^3 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$, e 340 nm para agregados *H*, com $\epsilon = 17,2 \times 10^3 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$.

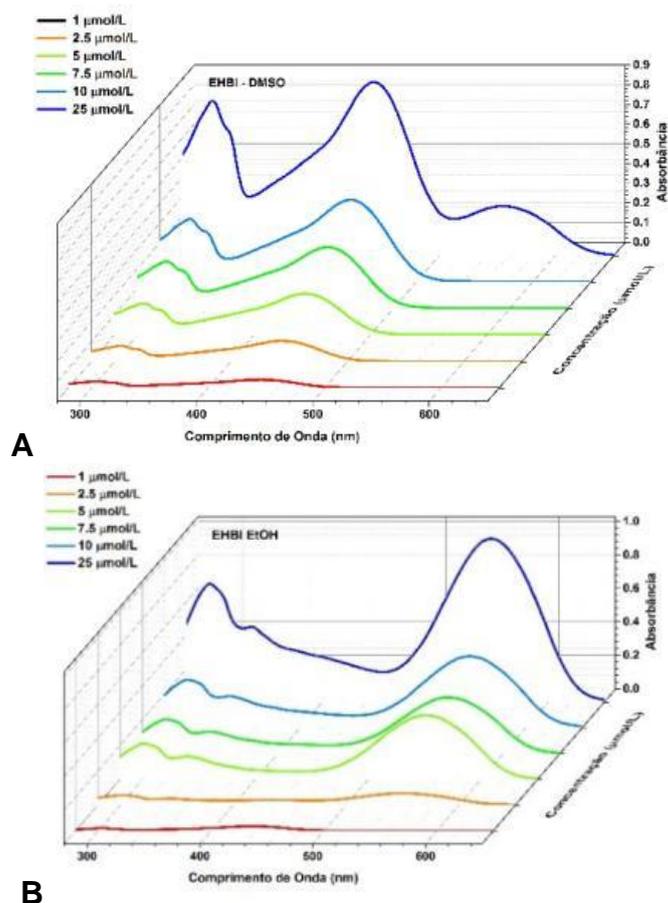


Figura 84: Espectros de absorção para **27** em (A) DMSO e (B) etanol.

Com relação à emissão de fluorescência (Figura 85), observa-se que em ambos os solventes, as formas de agregados e monoméricas são capazes de emitir fluorescência. Para DMSO, o máximo de emissão do monômero é de 531 nm ($\Delta_{ST} = 86$ nm), enquanto que para o etanol, o máximo de emissão é de 545 nm ($\Delta_{ST} = 111$ nm). Para a banda associada aos agregados *J*, observa-se um máximo de emissão de 613 nm para DMSO e de 615 nm em etanol, com Deslocamentos de Stokes de 58 e 65 nm, respectivamente.

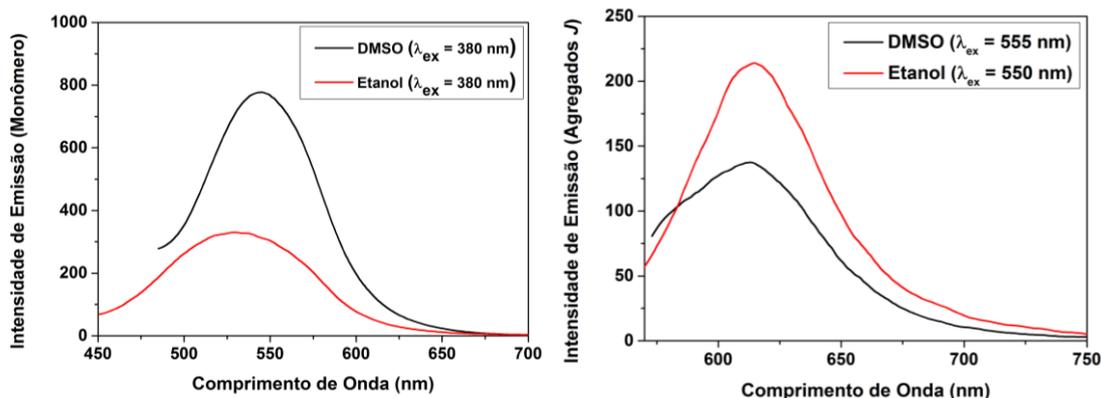


Figura 85: Espectros de emissão de fluorescência para **27** (25 μ mol/L) relacionados à banda monomérica (esquerda) e à banda de agregados *J* (direita).

Além dos solventes orgânicos, o estudo fotofísico do **27** foi realizado em água. Na Figura 86 observa-se o espectro de absorção e emissão dessas espécies. Nota-se que para absorção (Figura 86 A) existe um máximo em 650 nm e para emissão (Figura 86 B) apenas um máximo em 460 nm. Estudos de diluição para identificar a presença de agregados foram realizados mas observou-se que a banda de absorção em 637 nm não sofria alteração. Dessa forma optou-se por utilizar a variável temperatura para o estudo da banda associada aos agregados *J*. [52] Um estudo envolvendo o aumento da temperatura, variando de 26 a 88 °C, mostrou que ao passo que a solução é aquecida, o sinal em 637 nm reduz e uma nova banda em 468 nm é observada. A essa banda associou-se à forma monomérica da estrutura. Essa dificuldade em eliminar agregados *J* pode ser justificada com base nas propriedades do solvente, que ao ser muito polar e com ligações de hidrogênio, estabiliza muito mais facilmente a forma agregada de **27**. A forma monomérica não emite fluorescência em decorrência de transferências de energia não-radiativas.

Além disso, um estudo envolvendo a emissão de fluorescência em 460 nm nessas diversas temperaturas foi realizado. Em um sistema usual, o incremento da temperatura leva a um maior grau de agitação, que torna o relaxamento não-radiativo maior, fazendo com que uma redução da emissão de fluorescência ocorra. Nesse caso, o aumento da temperatura ocasionou em um aumento exponencial da emissão de fluorescência (Figura 86 B, gráfico superior). Isso pode ser novamente justificado pelo fato do aquecimento

ocasionar a redução de agregados, formando espécies capazes de emitir fluorescência, sendo esse fenômeno maior do que a perda de energia não-radiativa esperada.

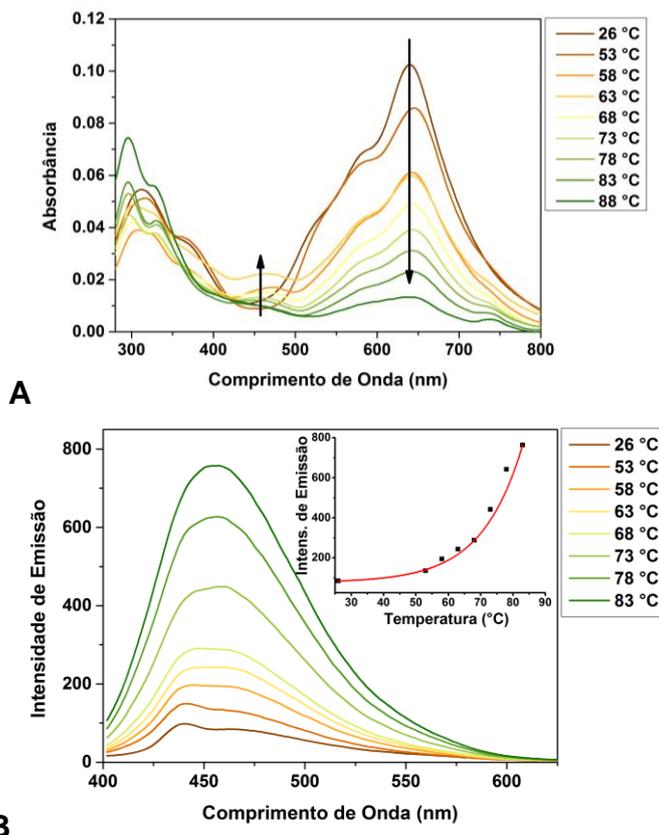


Figura 86: Espectros de absorção (A) e emissão de fluorescência (B) com variação de temperatura para **27**, e na direita, superior a relação temperatura e intensidade de fluorescência.

Para **27**, a diferente solubilidade quando comparada com as demais estreptocianinas, permitiu a obtenção dos seguintes resultados fotofísicos ilustrados na Tabela V, que apresenta os valores de máximos de absorção da forma monomérica ($\lambda_{\text{abs}}^{\text{mon}}$ em nm), dos agregados H ($\lambda_{\text{abs}}^{\text{H}}$ em nm) e agregados J ($\lambda_{\text{abs}}^{\text{J}}$ em nm), seus coeficientes de absorvidade molar (ϵ em $10^3 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$), os máximos de emissão da forma monomérica ($\lambda_{\text{em}}^{\text{mon}}$ em nm) e dos agregados J ($\lambda_{\text{em}}^{\text{J}}$ em nm), e os deslocamentos de Stokes ($\Delta_{\text{ST}}^{\text{mon}}$ e $\Delta_{\text{ST}}^{\text{J}}$ em nm).

Tabela V: Resultados fotofísicos obtidos para **27**, com valores de máximos de absorção monoméricos, de agregados J e H (λ_{abs}^{mon} , λ_{abs}^J e λ_{abs}^H em nm), coeficientes de absorvidade molar (ϵ em $10^3 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) e máximos de emissão monoméricos, dos agregados J e deslocamentos de Stokes (λ_{em}^{mon} , λ_{em}^J , Δ_{ST}^{mon} e Δ_{ST}^J e em nm).

27	Solvente	Monômero				Agregado					
		λ_{abs}^{mon}	ϵ_{mon}	λ_{max}^{em}	Δ_{ST}	λ_{abs}^H	ϵ_H	λ_{abs}^J	ϵ_J	λ_{em}^J	Δ_{ST}^J
	DIOX	419	*	486	67	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	DMF	436	41,1	540	104	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	DMSO	445	33,9	531	86	NA	NA	555	10,1	613	58
	EtOH	434	2,7	545	111	340	17,2	550	39,2	615	65
	H ₂ O	468**	ND	NA	NA	NA	NA	637	27,6	NA	NA

NA – não apresenta * Baixa solubilidade e sem concentração definida ** Valor obtido apenas através de aquecimento

De forma geral, observou-se que tanto a substituição presente na cadeia polimetínica quanto o heteroátomo na estrutura das estreptocianinas são importantes para determinar a solvatação nos solventes estudados, e, por conseguinte, a formação de agregados. Observa-se que para os casos em que não houve a formação de agregados, os valores de ϵ são significativos e condizentes com transições do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$. Nota-se que a formação de agregados, promove uma redução dos valores de ϵ das bandas monoméricas, mas mesmo com essa redução, os valores de ϵ continuam indicando transições do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$.

Entre todos os solventes, o DMF mostrou-se um solvente com boas características de solvatação uma vez que não houve a formação de agregados. No entanto, com relação à emissão de fluorescência, esse solvente mostrou-se desfavorável, uma vez que suas emissões apresentaram baixa intensidade, ou como no caso de **20**, onde não houve emissão de fluorescência. Dessa forma, pode-se inferir que DMF trata-se de um solvente que promove preferencialmente decaimentos não-radiativos para as estreptocianinas, embora seja um solvente que mantenha em seu meio apenas a presença de monômeros.

Para as estreptocianinas que contém o hidrogênio como substituinte da porção alifática, dioxano não se apresentou favorável à formação de agregados.

No entanto, para todos os demais casos, houve a formação de agregados, embora em algumas situações com uma baixa intensidade. Acetato de etila mostrou-se favorável à formação de agregados apenas para o caso em que o substituinte da porção alifática foi o grupo *terc*-butila, mostrando-se assim como um solvente com características de boa solvatação da forma monomérica para os demais casos. De forma intermediária, DMSO apresentou diferentes comportamentos, conforme característica das estruturas, para as estruturas contendo como substituinte hidrogênio na cadeia polimetínica, o único caso de formação de agregados J esteve presente para a estreptocianina contendo nitrogênio como heteroátomo. Para as estruturas contendo oxigênio, os agregados foram observados em **21** e **22**. Já para as estruturas contendo enxofre, os agregados foram observados para **24-26**.

Nos solventes acetonitrila, etanol e clorofórmio houve a formação de agregados J, sendo que o etanol foi um solvente capaz de diferenciar de forma clara as bandas monoméricas das bandas dos agregados J. Para alguns casos em acetonitrila, a banda monomérica não foi visualizada. E para todos os casos, a banda associada aos monômeros em clorofórmio também não foi evidenciada, contendo inclusive em soluções bastante diluídas a banda associada a agregados J.

Em dioxano e clorofórmio houve o aparecimento de uma banda intensa e fina associada a agregados J. Essa formação pode estar relacionada a diferentes arranjos espaciais possíveis de serem formados, uma vez que essas bandas foram observadas apenas para as moléculas que não continham hidrogênio como substituinte na cadeia polimetínica. A presença de substituintes como metila, etila e *terc*-butila pode ocasionar em diferentes ângulos de deslizamento, bem como diferentes torções nas moléculas formadoras de agregados, levando a sinais associados a agregados de menor energia.

A banda associada aos agregados H não foi evidente em todos solventes, com exceção do etanol, acetonitrila e clorofórmio.

Como os máximos de absorção da banda de agregados e a emissão da banda monomérica são próximos, pode-se inferir que outros processos de transferência de energia podem ocorrer, ocasionando uma redução da emissão

associada aos monômeros, um acréscimo da emissão da banda de agregados, ou em alguns casos até mesmo a emissão de fluorescência associada a banda de agregados quando excitada nos comprimentos de onda associados ao monômero. Com relação aos rendimentos quânticos, verificou-se valores inferiores a 0,005, mostrando que as estreptocianinas possuem baixo rendimento quântico de fluorescência.

4.2.4. A emissão ESIPT na estreptocianina **27**

Para a estrutura **27** observou-se que é possível identificar o ESIPT em sistema diluído em etanol. Para tanto, evidenciou-se através de titulação variando a concentração de **27** entre 3,2 e 32 μM . Observou-se máximos de emissão em 475 e 544 nm quando excitados em 355 nm. A essas bandas associa-se a emissão enol e ceto, respectivamente. A Figura 87 apresenta a titulação, bem como a comparação com o precursor **88** em etanol (banda ceto) e diclorometano (banda enol).

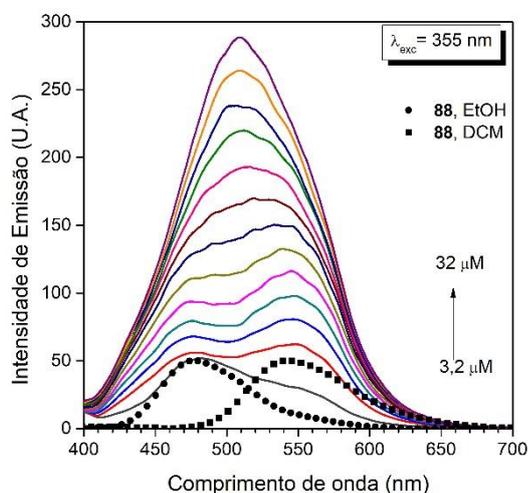


Figura 87: Emissão ESIPT em etanol para **27**, com excitação em 355 nm.

Para sistemas concentrados, essa banda não é evidenciada. Pela semelhança dessas emissões com o espectro do benzimidazol **88**, infere-se que uma quebra na simetria da estreptocianina pode estar ocorrendo, favorecendo a excitação e emissão de fluorescência apenas para a porção do benzimidazol. Esse fenômeno é conhecido como excitação local.[182]

4.2.5. Absorção no estado sólido das estreptocianinas 19-27

A Figura 88 mostra os espectros de absorção das estreptocianinas no estado sólido. Moléculas com transferência protônica no estado excitado, quando observadas em estado sólido, tendem a ter suas emissões de fluorescência aumentadas, por um fenômeno conhecido como fluorescência induzida por agregados. Para as estreptocianinas observa-se que a presença de heteroátomos não influencia no perfil dos espectros. Nota-se assim que a inserção de um substituinte na cadeia polimetínica, independente do seu tamanho e volume, leva a uma maior faixa de absorção. Para as estreptocianinas contendo hidrogênio, a absorção em estado sólido é dada até 700 nm, aproximadamente. Para os demais casos, essa absorção contínua e intensa dá-se até 900 nm.

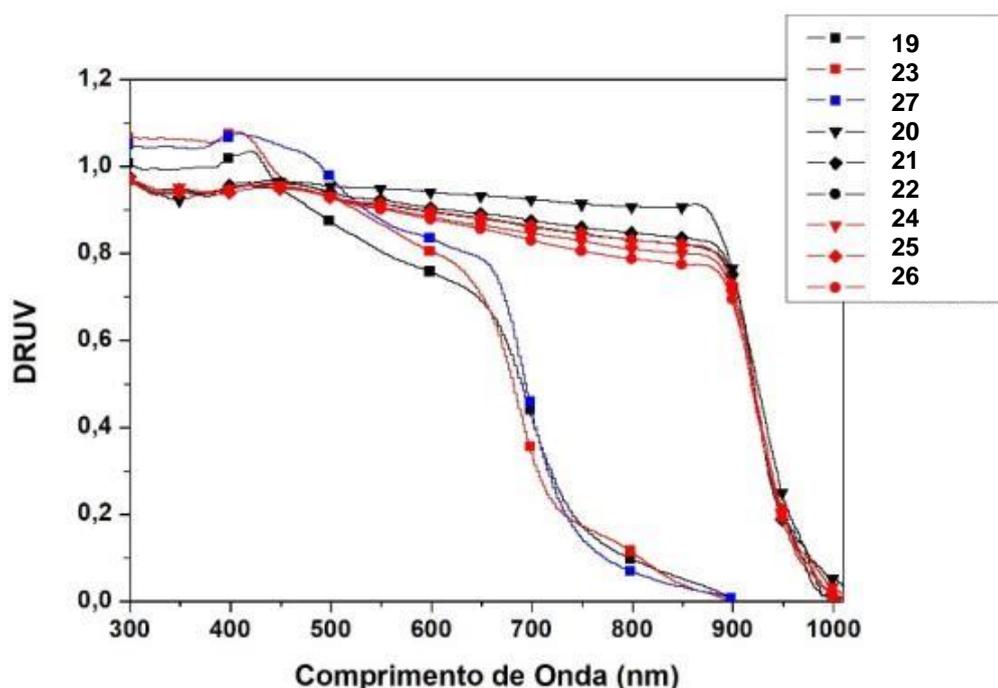


Figura 88: Espectros de absorção por reflectância difusa (DRUV) para as estreptocianinas 19 a 27.

Com relação à emissão de fluorescência no estado sólido para esses compostos, verificou-se que todas as estreptocianinas não emitem fluorescência

sob essas condições, inferindo-se que o processo ESIPT não é o preferencial.

Para investigar a influência dos agregados em filme, foram realizados espectros de absorção de seus filmes depositados em quartzo. Os espectros de absorção dos filmes para as estreptocianinas **19** a **27** estão ilustrados na Figura 89. Observa-se que para os derivados contendo hidrogênio no anel polimetínico (**19**, **23** e **27**), os máximos de absorção ficaram entre 500 e 650 nm. Para os derivados onde a presença de substituintes na cadeia polimetínica foi inserida, os espectros contendo enxofre como heteroátomo ficaram deslocados para o vermelho (linha vermelha) (**24** a **26**), quando comparados com os derivados oxigenados (linha preta). Para o caso dos substituintes etila e terc-butila (**21**, **25**, **22** e **26**), esses máximos ficaram pouco acima de 500 nm, mostrando assim as estreptocianinas na forma de agregados em filme. Para os filmes, a emissão de fluorescência também não foi evidenciada.

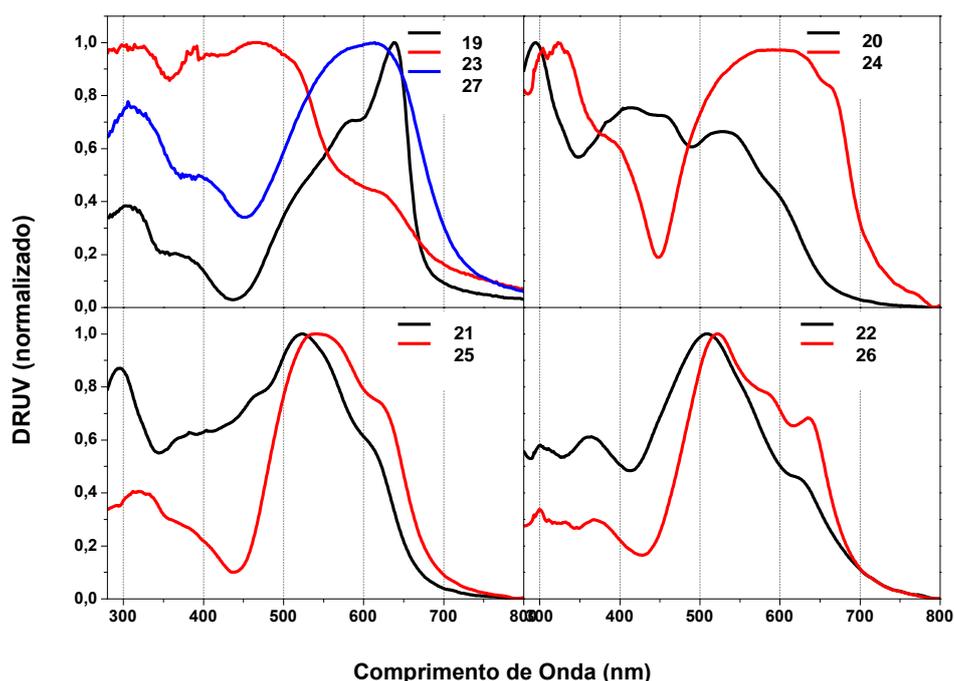


Figura 89: Espectros de absorção por reflectância difusa (DRUV) para as estreptocianinas em filme.

4.3. Caracterização dos agregados em etanol

Considerando que as estreptocianinas presentes neste trabalho formaram agregados em etanol, esse solvente foi empregado para ampliar o estudo de agregados. Os gráficos apresentando os espectros de absorção em diferentes concentrações para as estreptocianinas **19-22** encontram-se na Figura 90, para as estreptocianinas **23-26** na Figura 91. A partir dos espectros de absorção em que não existem agregados, verificados pelas amostras cujas absorções não possuem a banda acima de 500 nm, obteve-se o valor do coeficiente de absortividade molar para a espécie monomérica. Esse valor foi obtido através da inclinação da reta que relaciona as absorbâncias com a concentração.

A partir daí, considerou-se que em um estado sem a formação de agregados, toda molécula adicionada ao sistema estaria na forma monomérica. Valendo-se dessa informação, e sabendo que acima de uma concentração limite a formação de agregados é formada, com os máximos de absorção reais das bandas monoméricas, em presença de agregados, pode-se calcular a concentração real de monômeros no sistema. A diferença entre a concentração ideal (sem monômeros) e real (observada em presença de monômeros) fornece a quantidade de moléculas que se encontram sob forma de agregados no sistema. Sendo assim, obteve-se a concentração real de monômeros e agregados para as soluções contendo ambas espécies.

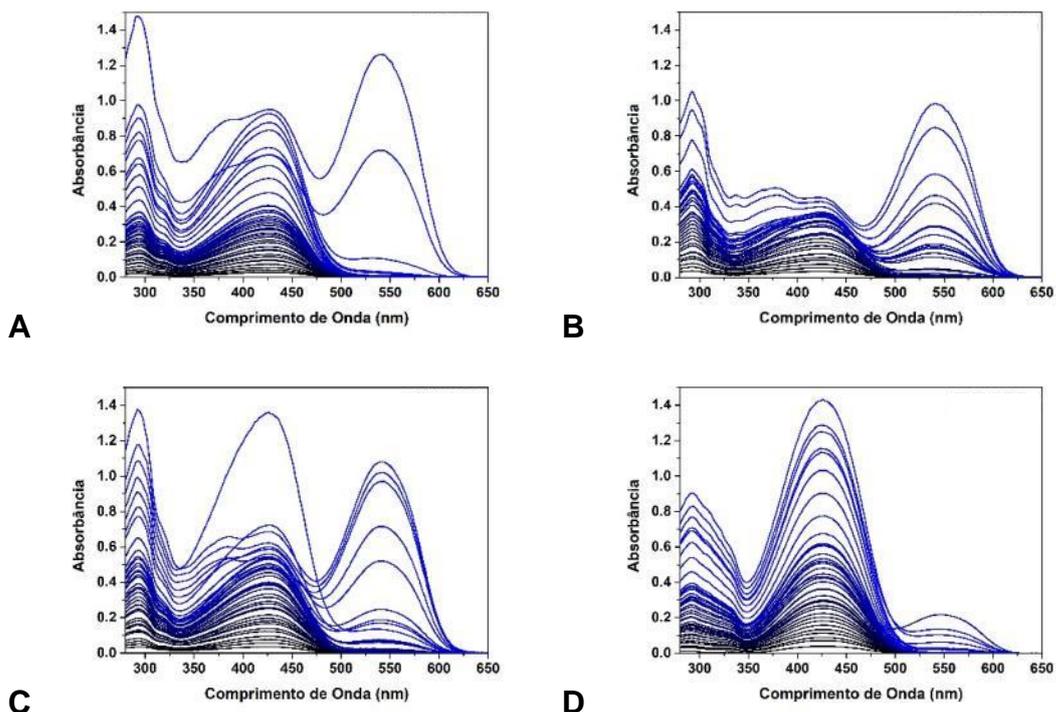


Figura 90: Espectros de absorção em etanol variando a concentração para as estreptocianinas **19** (A), **20** (B), **21** (C) e **22** (D).

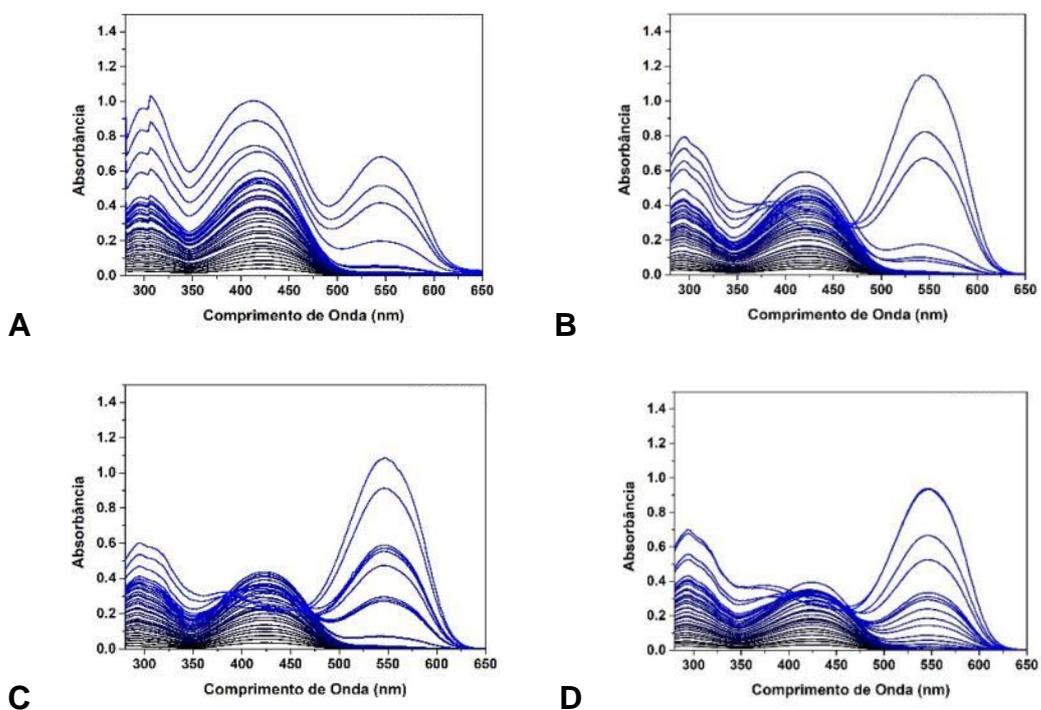


Figura 91: Espectros de absorção em etanol variando a concentração para as estreptocianinas **23** (A), **24** (B), **25** (C) e **26** (D).

A partir daí, com as concentrações de monômeros das soluções obtidas, e as concentrações totais conhecidas, escolheu-se um modelo para uso. Para o estudo em questão, escolheu-se o modelo isodésmico modificado uma vez que é possível avaliar diferentes tipos de interações intermoleculares através das interpretações dos parâmetros obtidos, bem como definir se há tendência de formação de dímeros ou agregados maiores, como trímeros, tetrâmeros, etc. A equação que define esse modelo é:

$$c_T = (1 - \rho)c_1 + \frac{\rho c_1}{(1 - Kc_1)^2} \quad \mathbf{(29)}$$

Como facilidade para interpretar os resultados e para fins comparativos com a literatura que apresenta os resultados sob o mesmo perfil de gráfico, a relação entre concentração de monômeros c_1 e a concentração total c_T foi plotada conforme Figura 92. Observa-se que as retas são modelos simulados a partir da equação citada acima, para valores mencionados de ρ e diferentes frações molares de monômeros. Os pontos estão associados aos resultados experimentais obtidos através da análise.

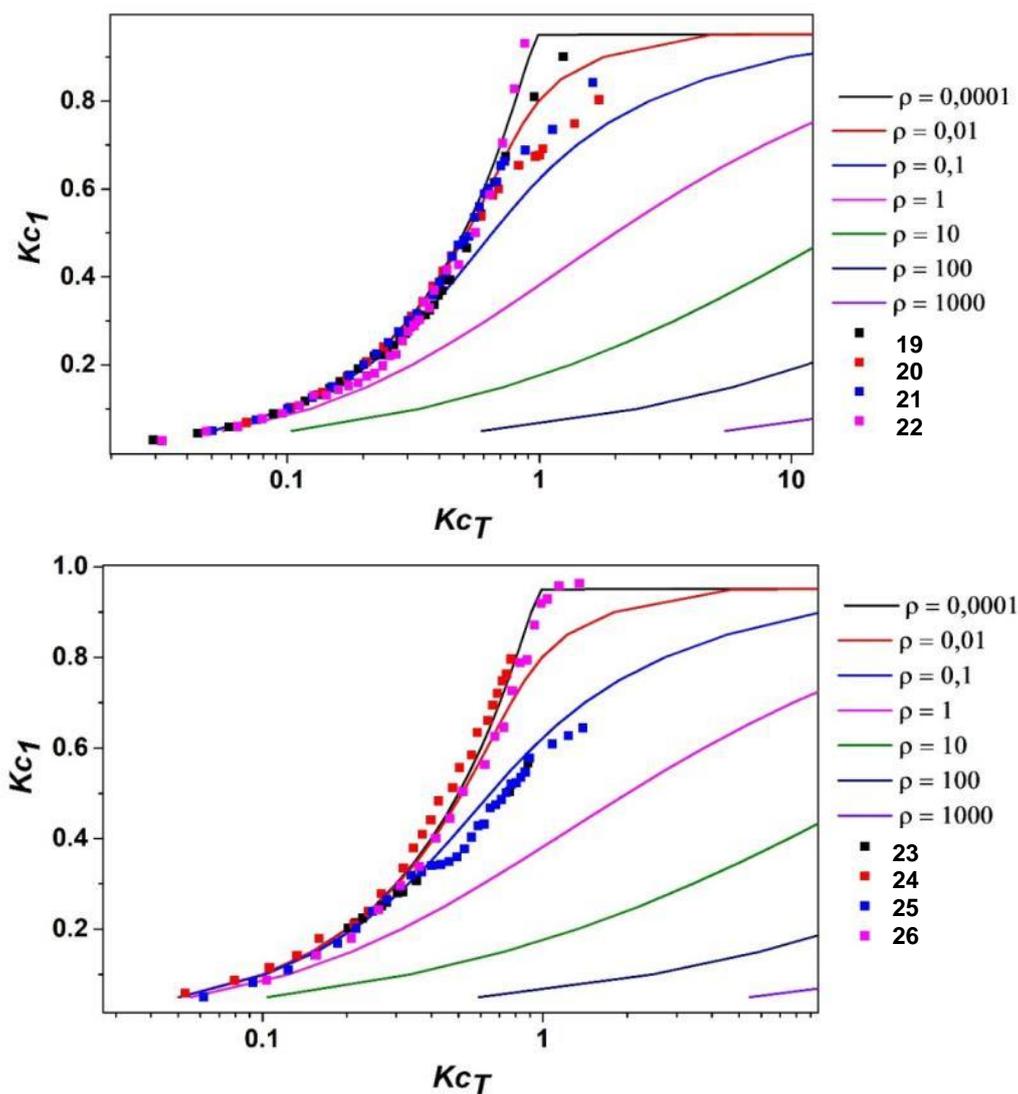


Figura 92: Resultados experimentais obtidos no gráfico acima para os derivados de oxigênio, e no gráfico abaixo, para os derivados de enxofre, em pontos, apresentados juntamente com os dados teóricos para diferentes valores de ρ , em linha contínua.

Enquanto na literatura utiliza-se um método de tentativas, estipulando valores de K e ρ até uma aproximação da curva dos resultados experimentais com os dados teóricos, a metodologia aqui empregada foi de ajustar os resultados experimentais conforme equação 29, com auxílio do software Origin. Dessa forma, todos os pontos foram adicionados a um gráfico, conforme equação que descreve o modelo isodésmico modificado. Como resultado do ajuste dos dados à equação 29, obteve-se assim os valores das constantes ρ e K . Considerando que $\rho = K_2/K$, com os valores de ρ e K obtidos foi calculada a constante de dimerização K_2 . Os resultados encontram-se na Tabela VI.

Tabela VI: Dados coletados a partir dos espectros de absorção em etanol para as estreptocianinas: os valores de ϵ_{mon} , os valores de K e ρ , obtidos a partir dos dados experimentais ajustados à equação do modelo isodésmico modificado, bem como o valor de K_2 obtido a partir da definição de ρ e os valores de ΔG tanto para a formação de agregados maiores quanto para a formação de dímeros.

	ϵ_{mon}	$K (M^{-1})$	ρ	R^2	$K_2 (M^{-1})$	$\Delta G (\frac{kJ}{mol})$	$\Delta G_2 (\frac{kJ}{mol})$
19	30213	29375	0,0037	0,99	108	-25	-11
20	36690	68867	0,048	0,99	3305	-27	-19
21	40856	50175	0,024	0,98	1204	-26	-17
22	4326	31804	0,00085	0,99	27	-25	-8
23	25314	25270	0,137	0,99	3461	-24	-19
24	31675	53013	$1,68 \times 10^{-5}$	0,98	0,890	-26	0,283
25	41853	61690	0,154	0,99	9500	-26	-22
26	37716	103587	$4,87 \times 10^{-4}$	0,98	50	-28	-9

Para os resultados obtidos, observa-se que quanto menor o coeficiente de absorvidade molar dos monômeros, maior a tendência de formar agregados. As estreptocianinas que tem como substituinte na porção alifática o substituinte etila, apresentaram os maiores valores de coeficiente de absorvidade molar. Quando o substituinte foi o *terc*-butila houve uma redução nos valores de ϵ , indicando maior formação de agregados.

Com relação aos valores da constante de agregação K, observa-se que são todos superiores a $25 \times 10^3 M^{-1}$, sendo que para as estreptocianinas contendo benzoxazol, as estreptocianinas **20** e **21** têm seus valores de K mais altos, o que indica que para essas estruturas a formação de agregados ocorre com maior facilidade em etanol. Para as estreptocianinas contendo benzotiazol, esse valor significativo de K ocorre para derivados contendo etila **25** e *terc*-butila **26**.

Para definir se esses processos cooperativos têm a tendência de formar dímeros ou estruturas maiores, os valores de K_2 foram obtidos a partir de K e ρ . Observa-se que, comparados com os valores de formação de agregados maiores K, a formação de dímeros é menos favorecida, principalmente para as

estruturas contendo *terc*-butila. Para a estreptocianina contendo benzotiazol e metila como substituinte na porção alifática **24**, a formação de dímeros também é desfavorecida. Sendo assim, observa-se que as estreptocianinas tendem a formar agregados contendo mais de duas unidades estruturais.

Com relação aos valores de ρ , verifica-se que, para todos os casos, são valores inferiores a 1. Isso afirma que se tratam de processos cooperativos para as estreptocianinas estudadas. Com base nos valores de ρ , para as estreptocianinas com valores entre 10^{-1} e 10^{-3} , pode-se afirmar que a origem da auto-associação cooperativa se dá em decorrência de efeitos eletrônicos. Para as estruturas contendo *terc*-butila (**22** e **26**) e para (**24**), esses valores foram significativamente menores. Isso significa que, além desses efeitos, deve-se considerar contribuições da estrutura da estreptocianina e hidrofobicidade para a formação de agregados cooperativos.

Os valores de energia de Gibbs calculados, tanto a partir da constante de nucleação K , quanto a partir da constante de dimerização K_2 , indicam que a formação de dímeros é energeticamente desfavorável frente à nucleação. Observa-se uma diferença significativa para os derivados contendo *terc*-butila, e para o caso de **24** um valor positivo, mostrando que nessa situação a nucleação prevalece.

Para a estrutura **27**, um bom resultado a partir do ajuste dos dados experimentais com a equação do modelo isodésmico modificado não foi obtido. Em outras palavras, pode-se concluir apenas que esse modelo não é capaz de descrever as interações intermoleculares de formação de agregados para essa molécula, sendo necessário a utilização de outros aportes matemáticos para tanto.

4.4. Complexação com Proteína BSA

Os espectros de absorção da BSA e BSA+estreptocianina encontram-se nas Figuras 93 a 95. Observa-se que para as estreptocianinas contendo núcleo benzoxazol, a banda associada à formação de agregados, localizada acima de

500 nm não foi evidenciada, indicando que em BSA não há tendência de formação de agregados. Para as estreptocianinas contendo núcleo benzotiazol, essa banda foi levemente evidenciada com o incremento da concentração da estreptocianina. Para **27** a banda associada aos monômeros ficou bem definida, bem como a banda associada aos agregados J, assim como nos espectros de **27** em PBS (ver anexos). Dessa forma, observa-se que a presença de BSA não influencia de forma significativa a formação de agregados em solução tampão de PBS, favorecendo assim a presença das estreptocianinas em sua forma monomérica. Todos os espectros de absorção dos corantes em tampão PBS encontram-se em anexo.

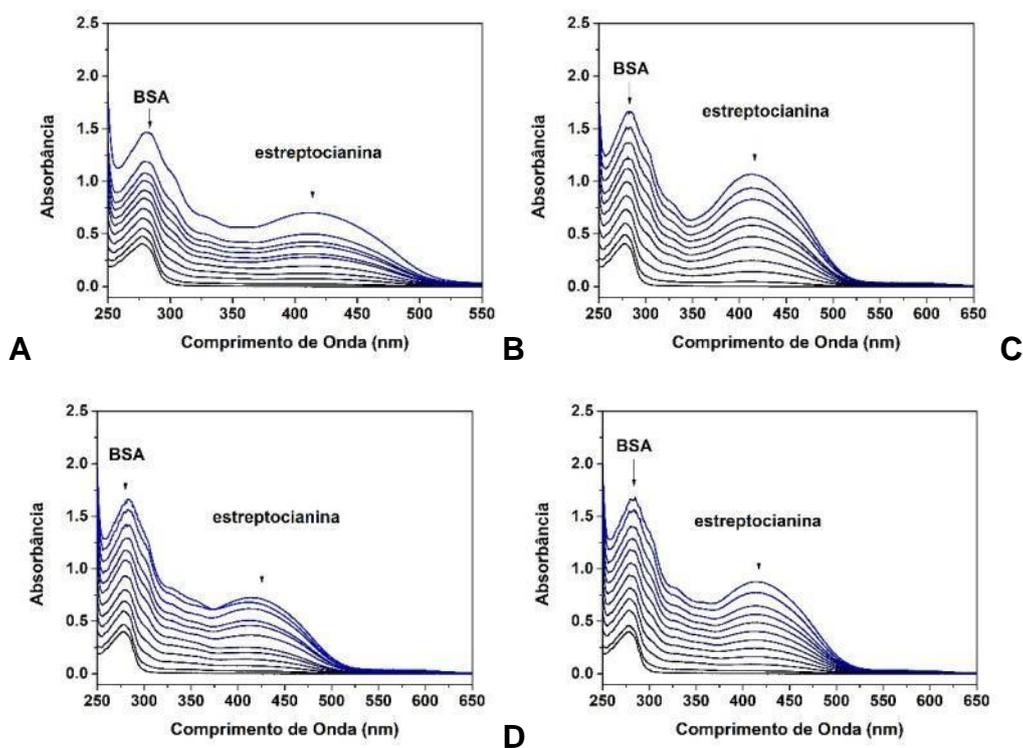


Figura 93: Espectros de absorção para BSA (preto - inferior) e BSA+estreptocianina (demais espectros): **19** (A), **20** (B), **21** (C) e **22** (D). Todos os espectros com concentração de BSA constante (10 μ M) e concentração de corante variando de 2 a 80 μ M.

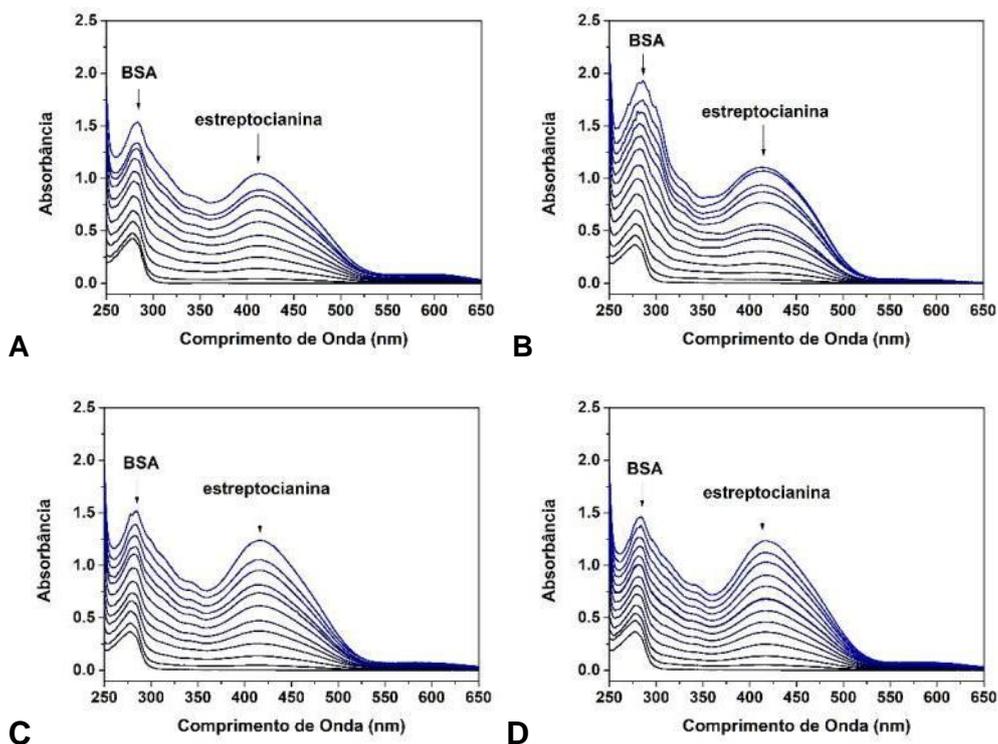


Figura 94: Espectros de absorção para BSA (preto - inferior) e BSA+estreptocianina: **23 (A), 24 (B), 25 (C) e 26 (D)**. Todos os espectros com concentração de BSA constante ($10 \mu\text{M}$) e concentração de corante variando de 2 a $80 \mu\text{M}$.

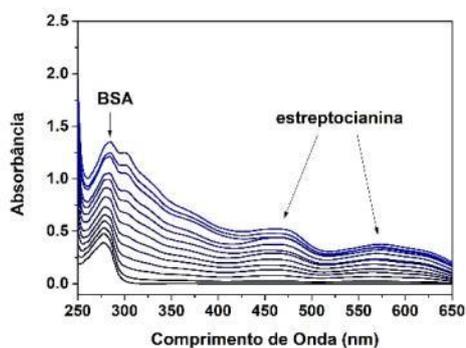


Figura 95: Espectros de absorção para BSA (preto) e BSA+estreptocianina **27**. Todos os espectros com concentração de BSA constante ($10 \mu\text{M}$) e concentração de corante variando de 2 a $80 \mu\text{M}$.

Para as mesmas soluções analisadas, espectros de emissão de fluorescência foram obtidos com excitação em 280 nm, que está associado à emissão de fluorescência do triptofano presente na BSA. Observa-se para todos os casos, a supressão de fluorescência associada à proteína, com o acréscimo da concentração de estreptocianina. Os espectros obtidos encontram-se nas

Figuras 96 a 98. Nos gráficos, para cada sistema BSA+estreptocianina, tem-se os máximos de emissão de fluorescência versus concentração de estreptocianina sem correção (em preto), e levando em consideração o efeito do filtro interno **46**, bem como a sua correção (em vermelho). Para todos os casos, a intensidade de fluorescência é significativamente reduzida, mostrando que as estreptocianinas são boas supressoras de fluorescência para o sistema.

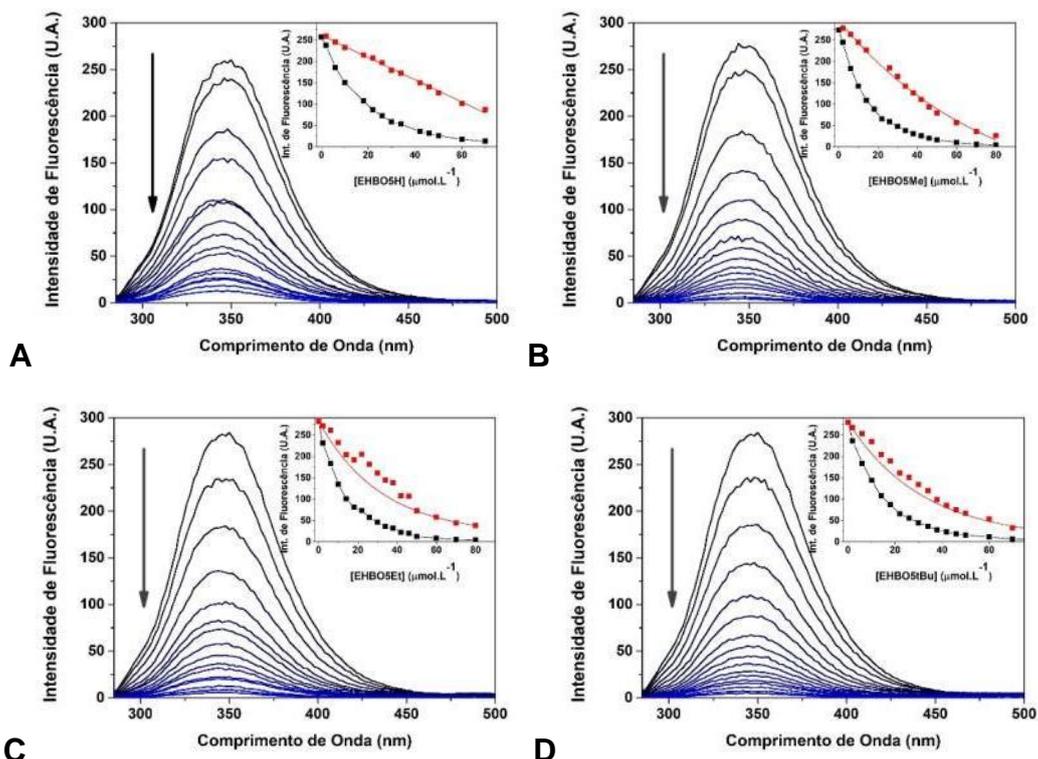


Figura 96: Espectros de emissão de fluorescência da BSA, com excitação em 280 nm e concentração de 10 μM de BSA, e os comparativos com adição dos corantes **19** (A), **20** (B), **21** (C) e **22** (D), bem como o gráfico no anexo superior, relacionando as intensidades de fluorescência com a concentração de supressor experimentais (preto) e corrigidos (vermelho).

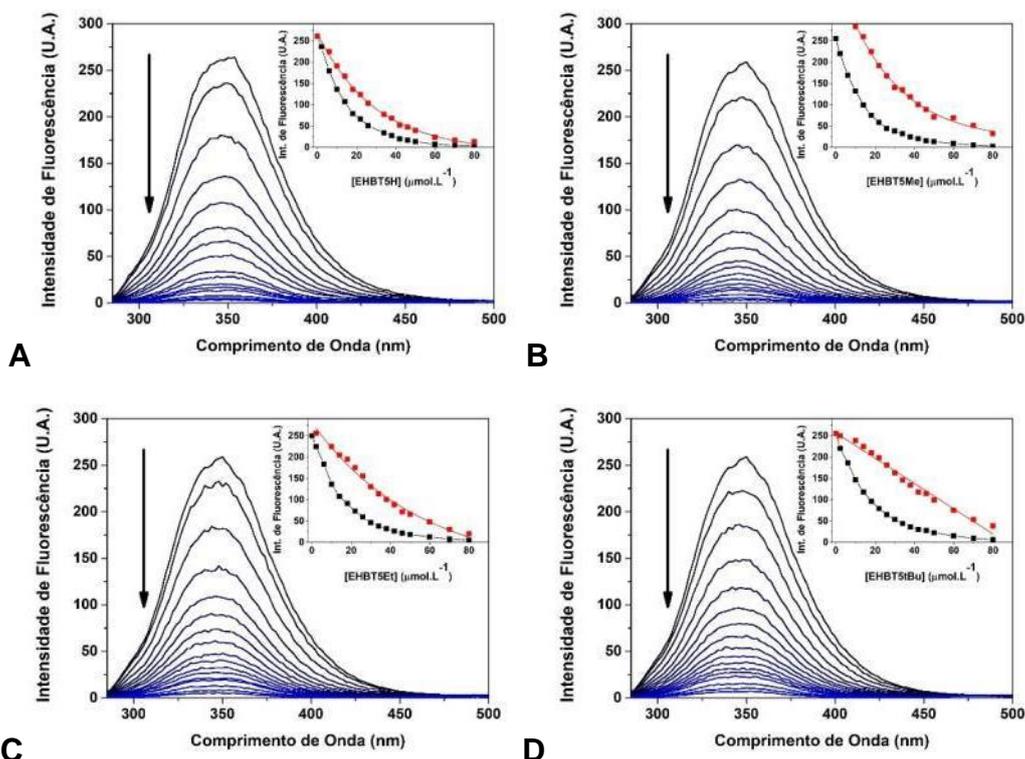


Figura 97: Espectros de emissão de fluorescência da BSA, com excitação em 280 nm e concentração de 10 μM de BSA, e os comparativos com adição dos corantes **23** (A), **24** (B), **25** (C) e **26** (D), bem como os gráficos no anexo superior, relacionando as intensidades de fluorescência com a concentração de supressor experimentais (preto) e corrigidos (vermelho).

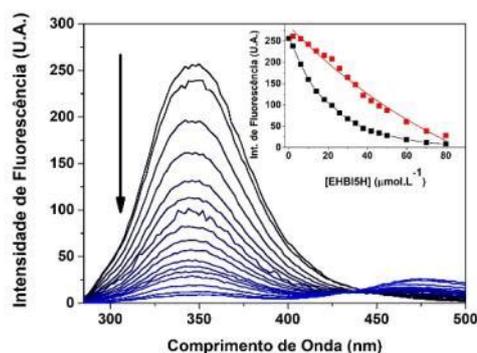


Figura 98: Espectros de emissão de fluorescência da BSA, com excitação em 280 nm e concentração de 10 μM de BSA, e os comparativos com adição do corante **27**, bem como os gráficos no anexo superior relacionando as intensidades de fluorescência com a concentração de supressor experimentais (preto) e corrigidos (vermelho).

Com base nos resultados obtidos a partir dos espectros de emissão de fluorescência corrigidos, obteve-se a constante de ligação proteína-

estreptocianina, através da associação desses, com o uso da seguinte equação (14):

$$\log\left(\frac{F_0-F}{F}\right) = \log k_b + m \cdot \log[\text{estreptocianina}] \quad 45$$

Para a obtenção dos dados, gráficos com $\log[\text{estreptocianina}]$ versus $\log\left(\frac{F_0-F}{F}\right)$ foram construídos e, a partir da inclinação da reta bem como do intercepto no eixo x, obteve-se os valores de k_b e m . Os gráficos para as estreptocianinas, conforme heteroátomo estão ilustradas na Figura 99 abaixo.

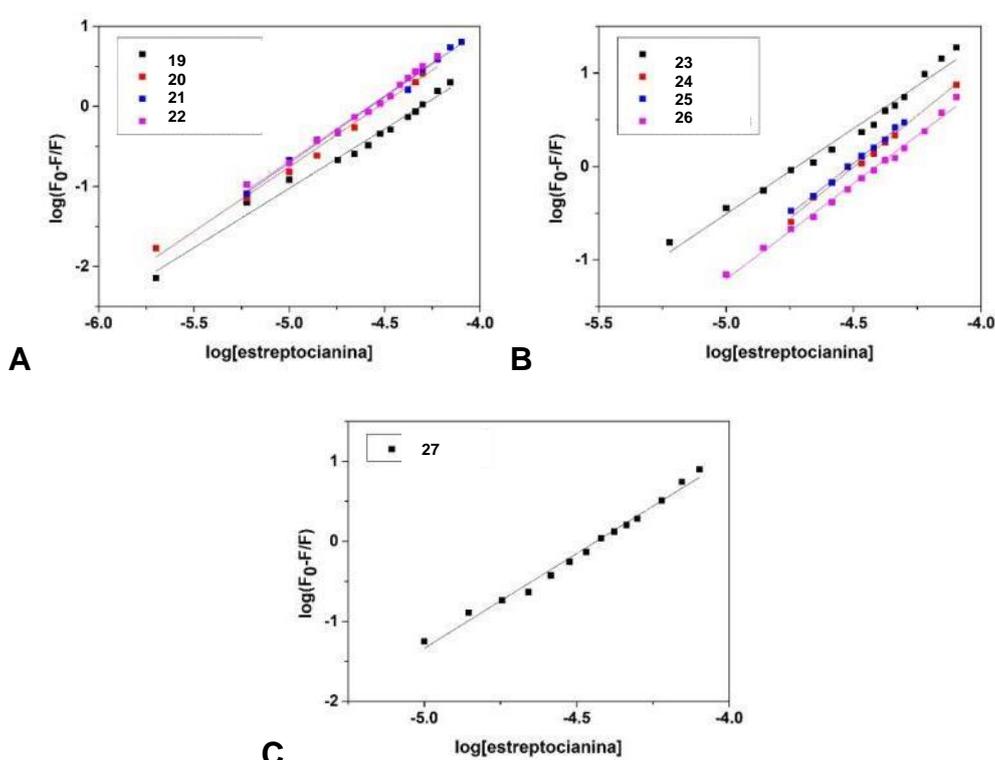


Figura 99: Gráficos para obtenção da constante de ligação e número de moléculas que interagem num sítio da proteína, em (A) as estreptocianinas contendo núcleo benzoxazol, em (B) núcleo benzotiazol e em (C) núcleo benzimidazol.

Com auxílio do programa Origin, um ajuste linear para cada conjunto de pontos foi realizado e, com base nos resultados, os valores dos parâmetros bem como de R^2 para cada reta estão apresentados na Tabela abaixo. Nota-se que para m , que nos dá a informação de quantas moléculas de estreptocianina estão interagindo simultaneamente com cada sítio, os valores são todos superiores a 1. Para o caso das estreptocianinas **23** a **26** e para **27**, esse valor torna-se

superior a 2. Esses resultados estão em concordância com a presença de agregados formados nos sítios da proteína. Para os derivados de oxigênio, tanto m quanto a constante k_b são crescentes conforme incremento da cadeia presente na cadeia polimetínica das estreptocianinas, indicando que ocorre preferência entre interação proteína-estreptocianina quando comparada com a interação estreptocianina-solvente. Observa-se que para os derivados de enxofre, não há um padrão em que se possa associar as variações com a cadeia. Os valores de constante de ligação para estreptocianinas com núcleo benzotiazol são superiores quando comparadas com as estreptocianinas com núcleo benzoxazol. Tal fato pode surgir em decorrência de efeitos solvofóbicos entre os corantes e a água, juntamente com afinidades entre estreptocianina e BSA, o que também ratifica o acréscimo nos valores de m .

Tabela VII: Parâmetros de ligação e energia de Gibbs entre as estreptocianinas e BSA.

	k_b (10^7 L/mol)	ΔG (10^4 J/mol)	m	R^2
19	0,245	-3,64	1,48	0,98
20	1,9	-4,15	1,61	0,98
21	3,6	-4,31	1,65	0,99
22	3,0	-4,27	1,63	0,99
23	44,6	-4,93	1,83	0,98
24	885	-5,67	2,20	0,99
25	707	-5,62	2,18	0,99
26	115	-5,17	2,05	0,99
27	400	-5,48	2,36	0,98

No que se refere às formas de supressão de fluorescência, diversas avaliações foram necessárias para que se pudesse obter de forma clara o tipo de supressão que rege a interação BSA-estreptocianina. De início, para avaliar a presença de supressão dinâmica, fez-se uso da equação de Stern-Volmer. Dessa forma, gráficos de F_0/F versus [estreptocianina] estão apresentados na Figura 100. Observa-se que para o caso das estreptocianinas, a adição de

metila, etila ou terc-butila aumenta a supressão de fluorescência. Para todos os casos, seguindo a premissa de que a equação de Stern-Volmer é linear e destinada para supressão dinâmica, observa-se uma curvatura positiva. Esse perfil de comportamento exclui a existência de apenas supressão dinâmica de fluorescência e abre possibilidade para outras interpretações do processo. A partir de então pode-se considerar a presença de supressão estática no sistema.

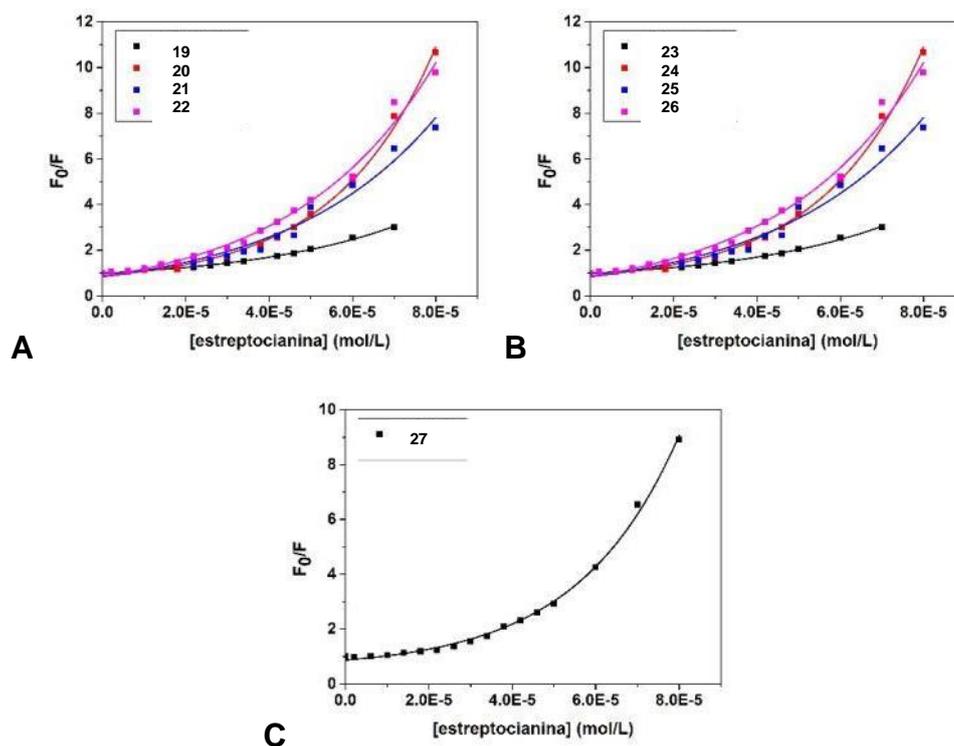


Figura 100: Gráficos seguindo equação de Stern-Volmer para sistemas com supressão dinâmica: estreptocianinas contendo núcleo (A) benzoxazol, (B) benzotiazol e (C) benzimidazol.

Considerando então que uma constante aparente, que representa as constantes de supressão de fluorescência estática e dinâmica, pode ser considerada para representação do comportamento de supressão de fluorescência da BSA em presença das estreptocianinas, para cada ponto, a constante aparente foi obtida e um gráfico de K_{ap} versus [estreptocianina] foi obtido. Os valores de $K_D + K_E$ e $K_D \times K_E$ foram obtidos a partir da equação da reta, onde $K_D + K_E$ representa o intercepto da equação do gráfico e $K_D \times K_E$ representa a inclinação da reta (Equação 34). A resolução da equação não permitiu números reais, tornando assim a interpretação dos resultados, através

dessas considerações, impossível.

$$K_{ap} = \left[\frac{F_0}{F} - 1 \right] \frac{1}{[S]} = (K_D + K_E) + K_D K_E [S] \quad 34$$

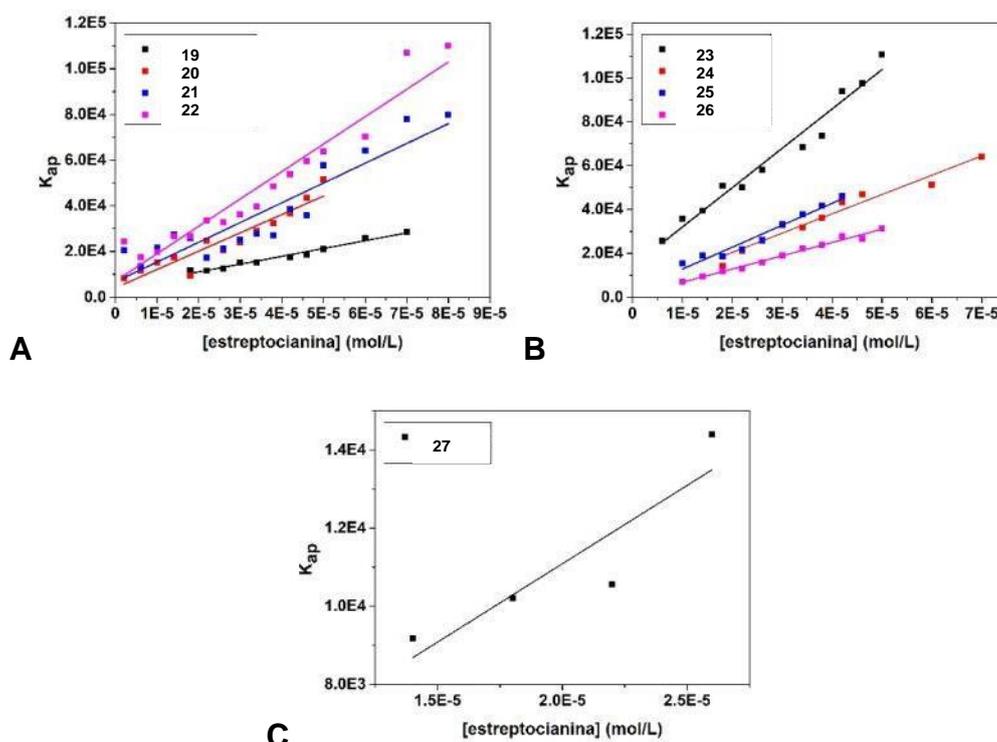


Figura 101: Gráficos com os resultados de [estreptocianina] *versus* K_{ap} , lineares: estreptocianinas contendo núcleo (A) benzoxazol, (B) benzotiazol e (C) benzimidazol.

De forma análoga, sabendo que para essa mesma situação os gráficos F_0/F *versus* [estreptocianina] poderiam ser ajustados por uma equação de parábola (Equação 33), o procedimento foi então realizado com auxílio do programa Origin. Aqui, mais uma vez, os valores obtidos para $K_D + K_E$ e $K_D \times K_E$ não puderam ser resolvidos. Mostrando assim que esse ajuste não é adequado para os resultados de interação BSA-estreptocianina.

$$\frac{F_0}{F} = 1 + (K_D + K_E)[S] + K_D K_E [S]^2 \quad 33$$

Dessa vez, considerando que uma parte da contribuição da supressão é dada de forma dinâmica e outra estática, e acrescentando à equação de Stern-Volmer um fator que determina a esfera efetiva de supressão estática,

representada pela equação 35 abaixo, tem-se na Figura 102 os resultados dessa análise.

$$\frac{F_0}{F} = (1 + K_D[\text{estreptocianina}])\exp(V_S \cdot N_A[\text{estreptocianina}]) \quad \mathbf{35}$$

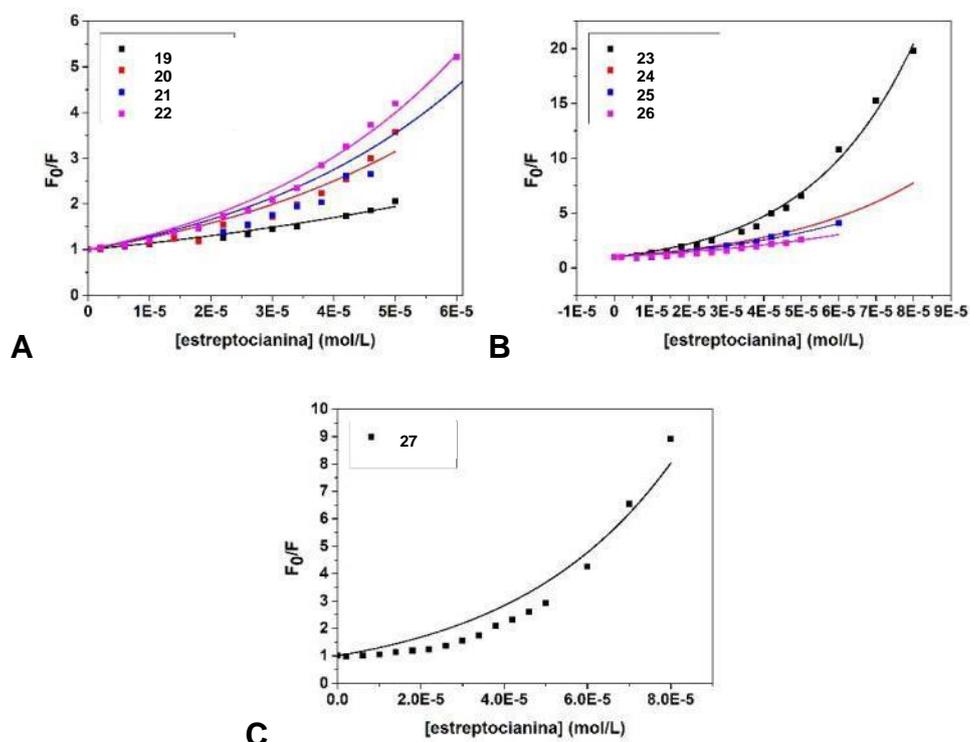


Figura 102: Gráficos relacionando F_0/F com [estreptocianina] e os ajustes não lineares, seguindo a equação que contém fator que determina a esfera efetiva de supressão estática: estreptocianinas contendo núcleo (A) benzoxazol, (B) benzotiazol e (C) benzimidazol.

Tem-se que os dados experimentais coletados a partir do gráfico de F_0/F versus [estreptocianina], bem como um ajuste à equação 35, com auxílio do programa Origin, foi possível obter os resultados apresentados na Tabela VIII. Para todas as estreptocianinas, é notado que a contribuição de supressão dinâmica é muito inferior à contribuição de supressão estática. Tal fato é evidenciado através dos baixos valores da constante de supressão dinâmica, K_D , com exceção de **23**, onde o valor foi significativamente mais alto. Por consequência, os valores da constante de supressão bimolecular foram baixos. Os valores de K_D para sistemas cuja única forma de supressão é a dinâmica, tipicamente ficam na ordem de 10^4 L/mol. Dessa forma, nota-se mais uma vez

que a supressão estática prevalece no sistema. Além disso, pode-se inferir que, pelo fato de prevalecer a supressão estática, nos sítios esteja ocorrendo a formação de um complexo não-fluorescente entre BSA e as estreptocianinas, ou que a supressão ocorra devido a uma dada proximidade espacial entre o fluoróforo e as estreptocianinas, estando essa distância dentro do raio de supressão estática. Além disso, em sistemas onde há altas concentrações de supressor, ocorre preferencialmente a supressão estática, uma vez que há uma maior probabilidade do supressor estar relativamente próximo ao fluoróforo da proteína. Isso de fato confere com os resultados obtidos, já que a concentração de supressor é maior que a de proteína. Além disso, na Tabela VIII encontra-se descrito o raio onde a supressão estática ocorre com eficiência. Tal valor foi extraído a partir de V , encontrado a partir do ajuste de equação 35, e sua igualdade com a equação que descreve o volume de uma esfera. Os valores de raio encontrados, entre 0,1 e 2,3 nm são inferiores ao tamanho da BSA, indicando a necessidade de uma aproximação maior entre as estreptocianinas e o fluoróforo para que a supressão ocorra. Essa equação é largamente empregada para sistemas complexos, como micelas, membranas e sistemas coloidais. O complexo comportamento das estreptocianinas pode estar intimamente relacionado com sua tendência de formar agregados e, no mesmo sistema, haver estreptocianinas em sua forma monomérica e de agregados, sendo que cada um desses possui diferentes comportamentos em termos de solvatação, momento de dipolo, propriedades fotofísicas, entre outros.

Tabela VIII: Dados experimentais coletados a partir das equações de reta para a equação considerando supressão dinâmica e esfera efetiva de supressão estática.

	K_D (L/mol)	k_q (10^7 L/(mol.s))	r (nm)	R^2
19	0,0160	0,160	0,174	0,97
20	0,105	1,05	2,08	0,92
21	0,233	2,33	2,16	0,97
22	0,305	3,05	2,22	0,99
23	9840	$9,84 \times 10^4$	2,29	0,99
24	0,764	7,64	2,16	0,96
25	0,321	3,21	2,10	0,96
26	0,305	3,05	1,94	0,94
27	0,116	1,16	2,18	0,93

Além dos espectros de emissão de fluorescência já apresentados, para as mesmas soluções, espectros de fluorescência sincronizada foram obtidos. Essa técnica permite a obtenção de espectros com uma variação fixa entre os comprimentos de onda de excitação e emissão, $\Delta\lambda$. Para o caso das proteínas, essa técnica torna-se importante uma vez que para variações de $\Delta\lambda = 15$ nm é possível estudar as influências do supressor sobre os resíduos de tirosina, enquanto que para $\Delta\lambda = 60$ nm é permitido avaliar a influência sobre os resíduos de triptofano. Para todos os casos, as Figuras 103 a 105 ilustram os espectros, onde os espectros da esquerda são para $\Delta\lambda = 15$ nm e os da direita para $\Delta\lambda = 60$ nm.

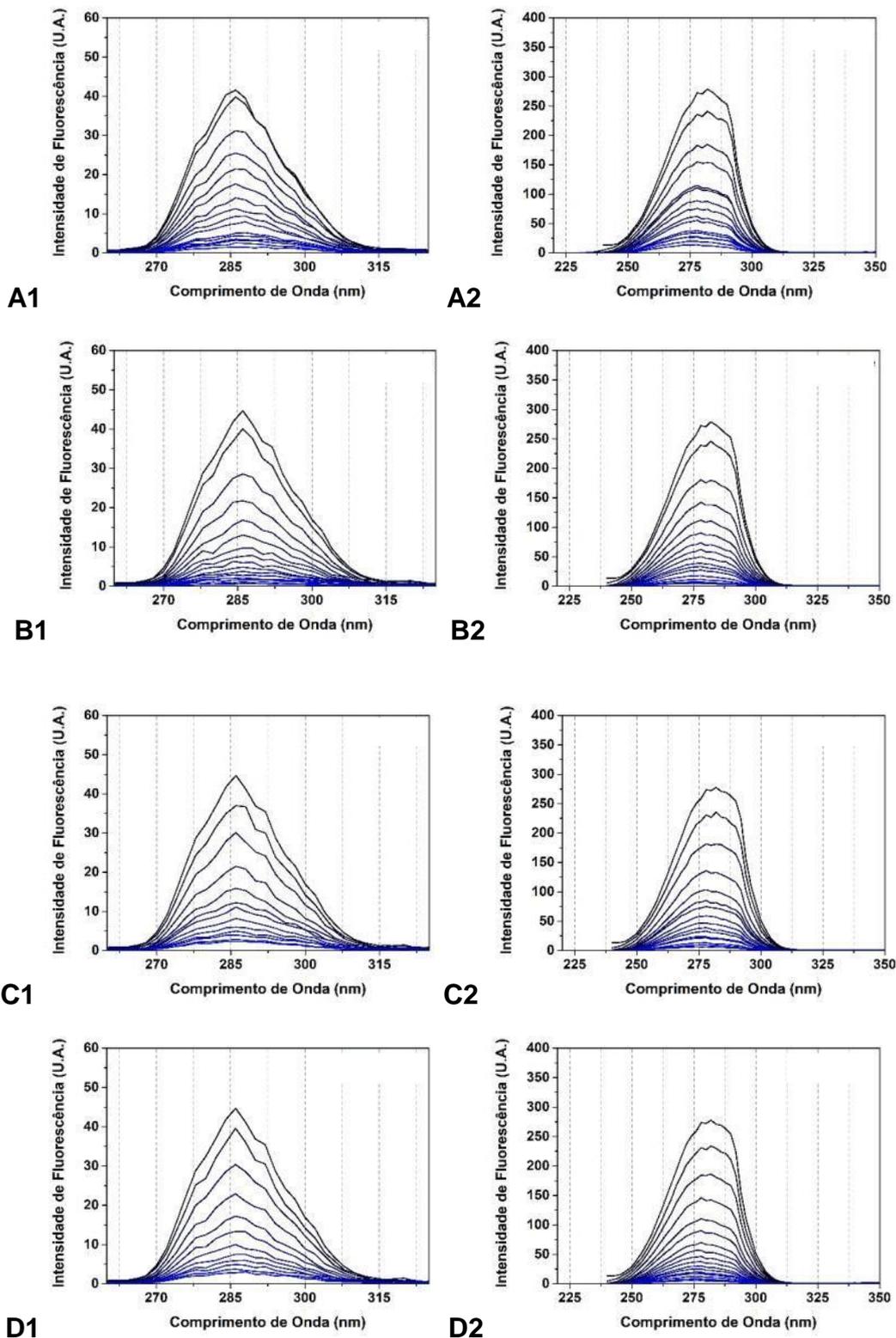


Figura 103: Espectros de fluorescência sincronizada com $\Delta\lambda = 15$ nm (tirosina) à esquerda (19 (A1), 20 (B1), 21 (C1) e 22 (D1)) e $\Delta\lambda = 60$ nm à direita (triptofano) (19 (A2), 20 (B2), 21 (C2) e 22 (D2)).

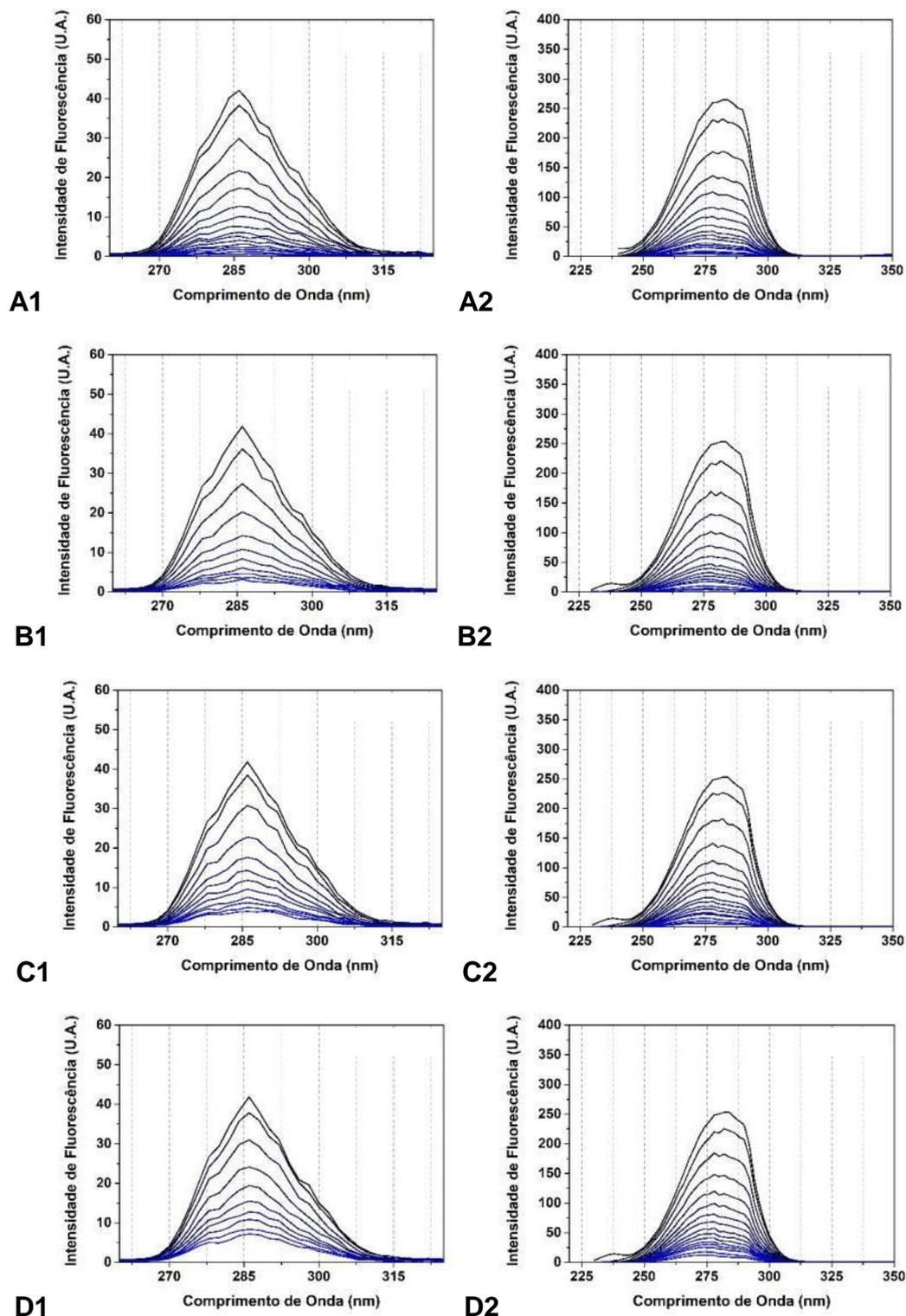
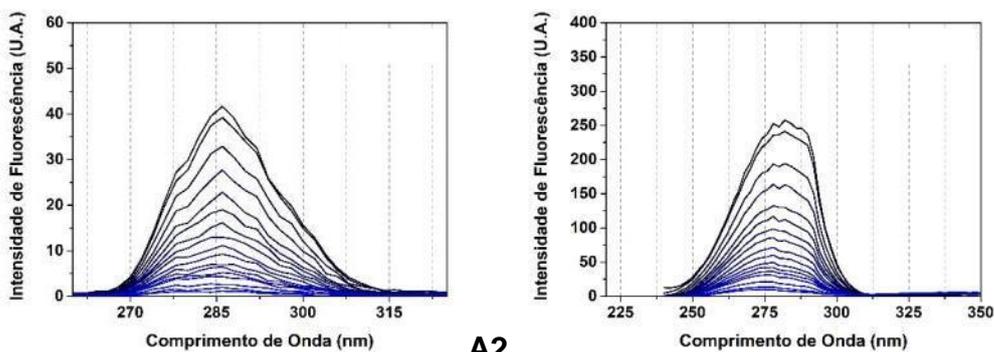


Figura 104: Espectros de fluorescência sincronizada com $\Delta\lambda = 15$ nm (tirosina) à esquerda (**23** (A1), **24** (B1), **25** (C1) e **26** (D1)) e $\Delta\lambda = 60$ nm à direita (triptofano) (**23** (A2), **24** (B2), **25** (C2) e **26** (D2)).



A1 **A2**
Figura 105: Espectros de fluorescência sincronizada com $\Delta\lambda = 15$ nm (tirosina) (A1) e $\Delta\lambda = 60$ nm (triptofano) (A2), para **27**.

Observa-se que, para todas as estreptocianinas, não houve variação dos máximos quando analisados os resíduos de tirosina (à esquerda). No entanto, na direita, avaliando os resíduos de triptofano, observa-se que ocorreu para todas as análises, um deslocamento de 8 nm com o acréscimo de supressor no sistema. Esse comportamento indica que as interações ocorrem com os resíduos de triptofano, alterando assim o seu microambiente, levando a um ambiente de diferente polaridade, quando comparado com o sistema sem supressor, a ponto de levar a modificações espectroscópicas característica dos resíduos de triptofano.

4.5. Sensores de pH

Os espectros de absorção das estreptocianinas **19-27** com variação do pH estão indicados nas Figuras 106 a 110. Nos espectros é possível observar que, para todas as estreptocianinas, seu comportamento frente à variação de pH é bastante complexo, mesmo considerando todos os experimentos com a força iônica constante. As setas indicam a variação dos espectros com o aumento do pH. Notadamente, em nenhum dos casos há presença de um ponto isobéstico nos espectros, indicando que não apenas espécies diferentes estão presentes no sistema, mas que essas espécies sofrem influência do microambiente, podendo-se inferir possíveis interações intermoleculares, como por exemplo os agregados, conforme a variação do pH, uma característica que tem se mostrado

usual para essas estruturas. Nota-se que em pH ácido há em todos os casos uma banda de absorção na região do vermelho, sendo a espécie mais protonada das estreptocianinas. Pelo deslocamento espectral, observa-se que as protonação das espécies promovem absorção em comprimentos de menor energia, notando-se assim uma estrutura mais conjugada frente às demais. pHs próximos do neutro promovem redução da banda em aproximadamente 550 nm, e um incremento de uma banda em aproximadamente 400 nm. Aqui, observa-se uma semelhança das características espectrais das estreptocianinas apresentadas em solventes orgânicos, sem a formação de agregados. Com o incremento do pH, esse máximo se desloca para comprimentos de onda de maior energia, abaixo de 400 nm.

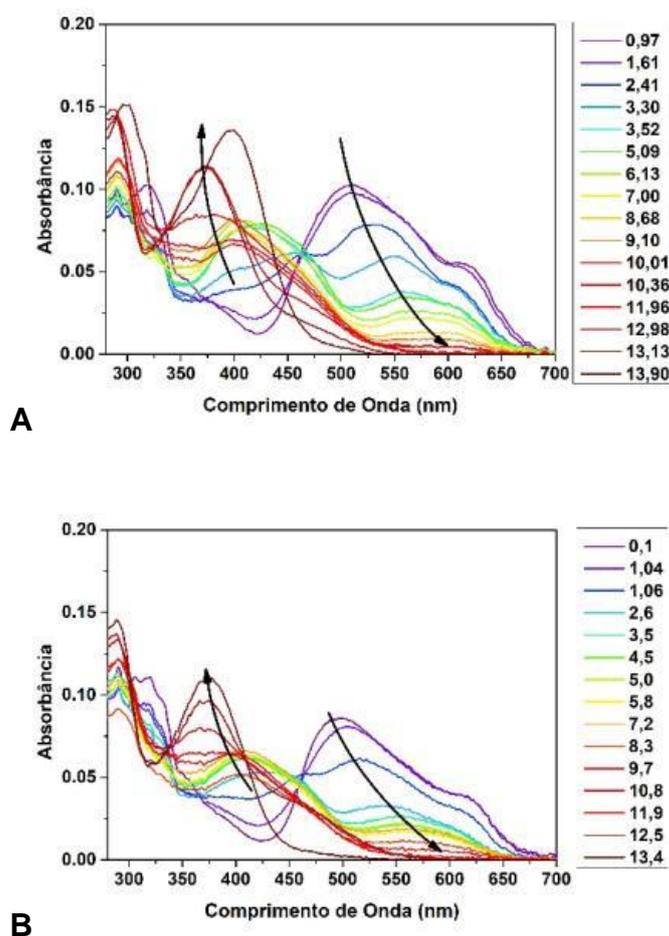


Figura 106: Espectros de absorção para **19** (A) e **20** (B), variando o pH.

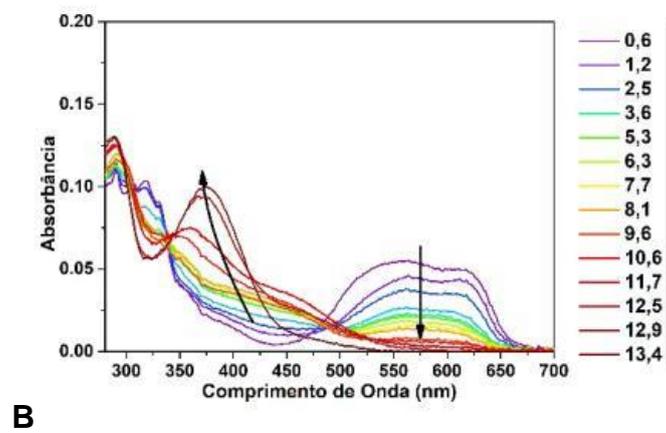
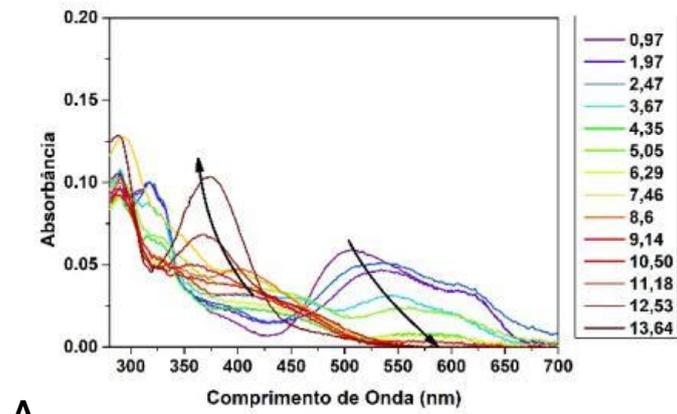


Figura 107: Espectros de absorção para **21** (A) e **22** (B), variando o pH.

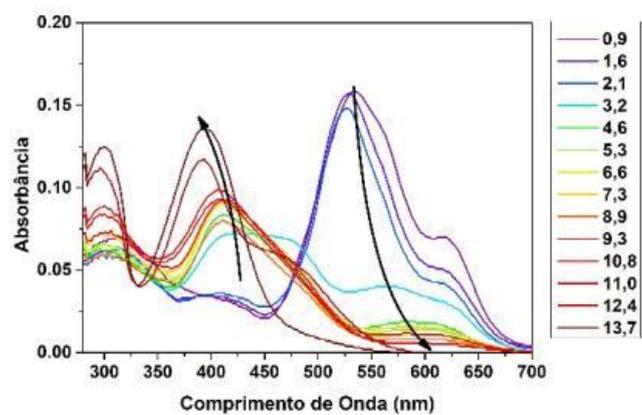
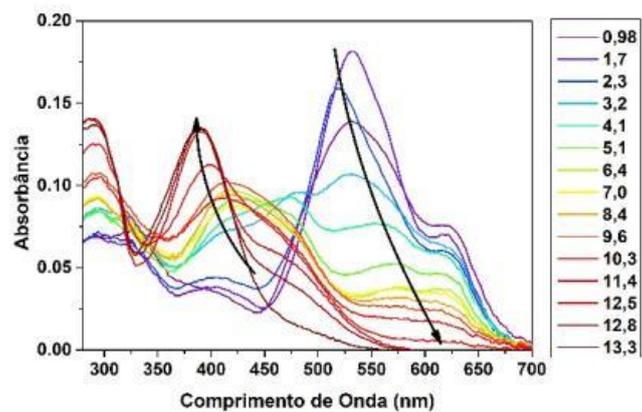


Figura 108: Espectros de absorção de **23** (A), **24** (B), variando o pH.

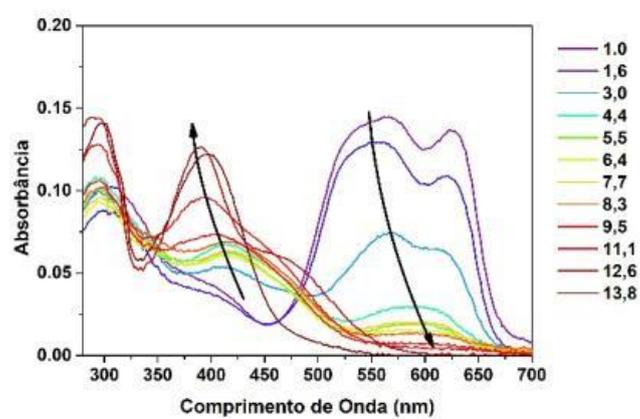
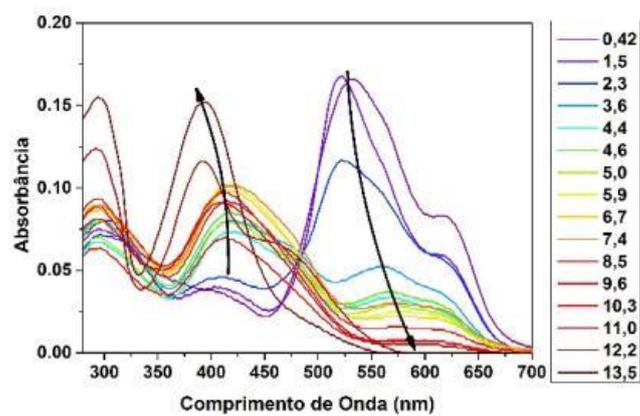


Figura 109: Espectros de absorção de **25** (A), **26** (B), variando o pH.

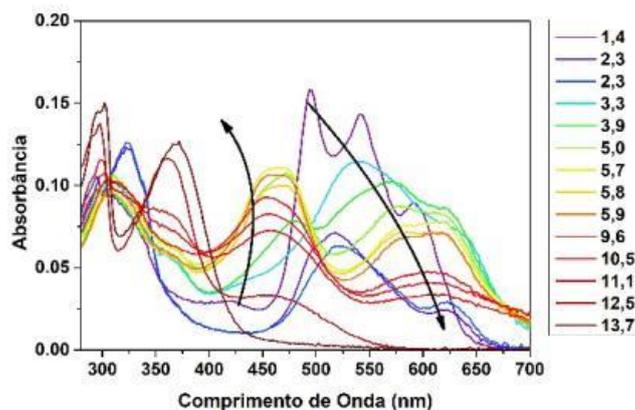


Figura 110: Espectros de absorção para **27** em diversos pHs.

Uma proposta de possíveis estruturas com a variação do pH para **19** está apresentada na Figura 111. Nela observa-se a estrutura obtida sinteticamente na forma representada por **b**. Ao reduzir o pH, 6 sítios são passíveis de protonação: dois associados aos nitrogênios da estreptocianina, dois aos nitrogênios do benzazol, além das hidroxilas fenólicas. Essa estrutura totalmente protonada, representando o caso de pH extremamente ácido, está representada por **a**, e apresenta coloração rosa a lilás, dependendo das estreptocianinas. Para o caso de um aumento de pH a partir de **b**, a coloração das soluções torna-se amarela, e num primeiro momento tem-se a estrutura neutra, representada por **c**. Para o caso em que os hidrogênios fenólicos são abstraídos formando a estrutura aniônica em um dado pH alcalino, tem-se a representação **d**. Considerando ainda os intermediários, pode-se verificar que para a estreptocianina, uma vasta possibilidade de espécies pode estar presente com a variação do pH. E em dado pH, diferentes interações podem estar presentes, sejam essas interações solvatocrômicas ou intermoleculares, com diferentes máximos de absorção, formando diferentes arranjos de agregados – esses especialmente em pH ácido devido às características dos espectros de absorção - que podem ter seus máximos de absorção também distintos.

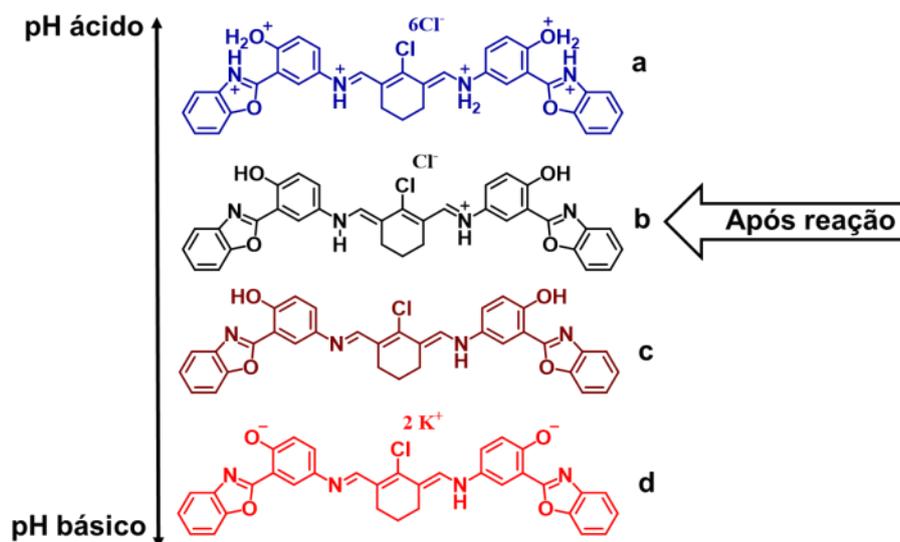


Figura 111: Proposta com possíveis estruturas, com variação do pH, para **19**.

Em termos práticos, essa variação promove uma importante aplicação como sensores colorimétricos das estruturas. Nota-se que pHs ácidos promovem coloração rosa, enquanto que pHs básicos promovem uma coloração amarela. A Figura 112 mostra as imagens para os derivados sulfurados. As mesmas propriedades podem ser estendidas às outras estruturas.

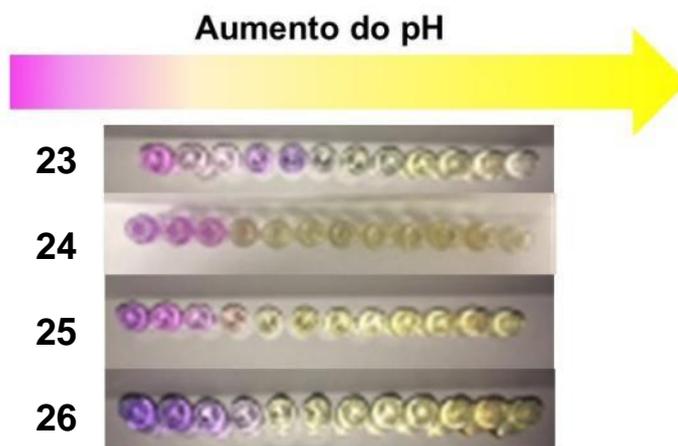


Figura 112: Imagens da coloração das soluções com a variação do pH, da esquerda para a direita, do pH mais ácido ao mais básico analisado para as estruturas **23**, **24**, **25** e **26**.

Com relação aos espectros de emissão desse estudo em pH, para todos os casos houve variação da intensidade de emissão, especialmente para pHs básicos, acima de 10. Além disso observou-se ausência de fluorescência para a banda associada aos pHs ácidos, sendo essa fluorescência observada em aproximadamente 340 nm. A intensidade de fluorescência para todos os casos aumenta significativamente, e está apresentado nas Figuras 113 a 117.

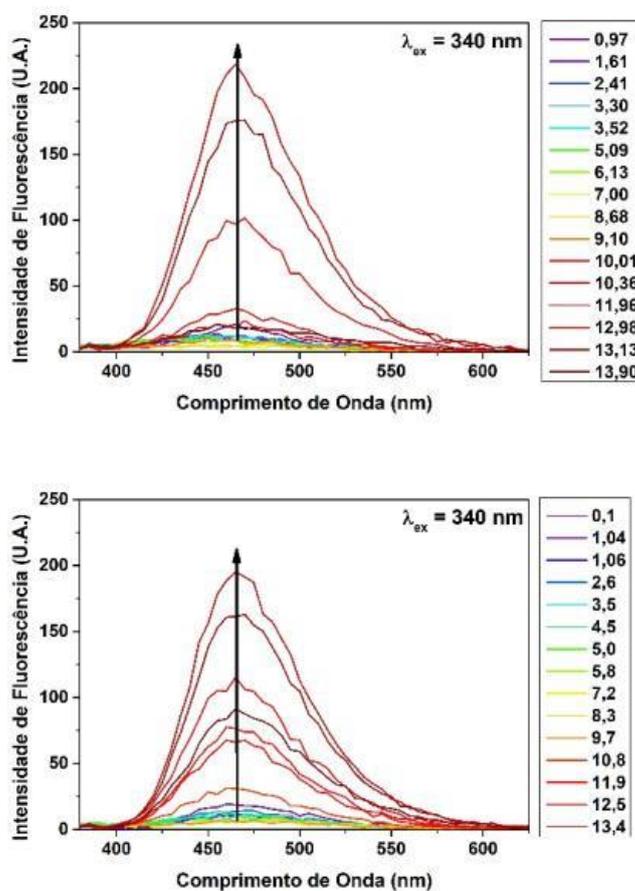


Figura 113: Espectros de emissão com excitação em 340 nm para as estruturas **19 e 20**.

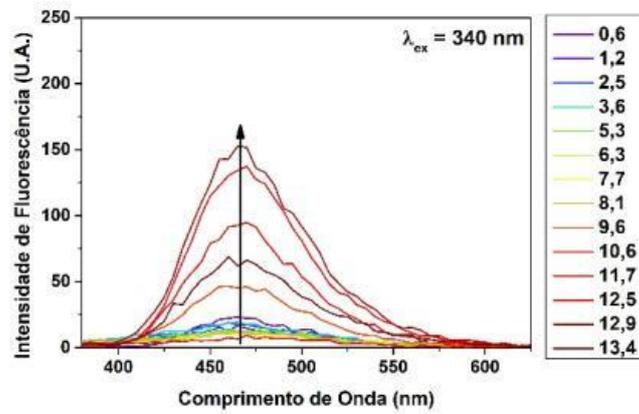
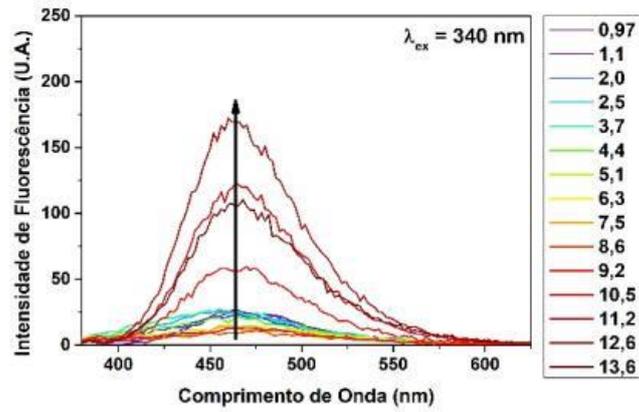


Figura 114: Espectros de emissão com excitação em 340 nm para as estruturas **21** e **22**.

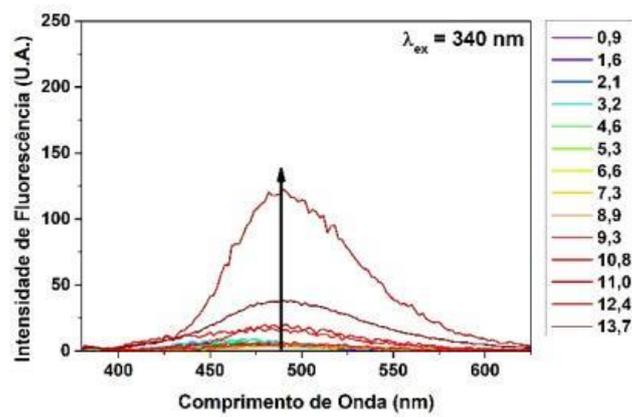
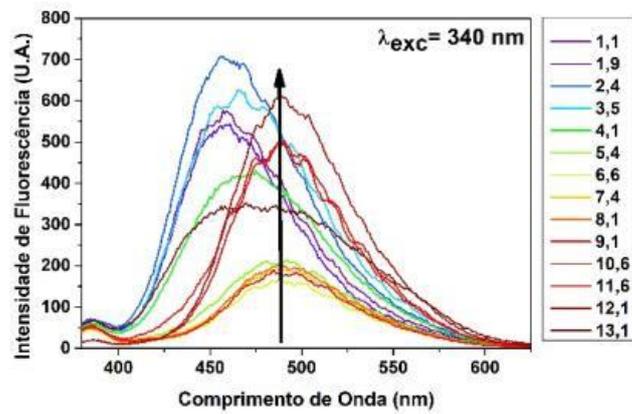


Figura 115: Espectros de emissão com excitação em 340 nm para as estruturas **23** e **24**.

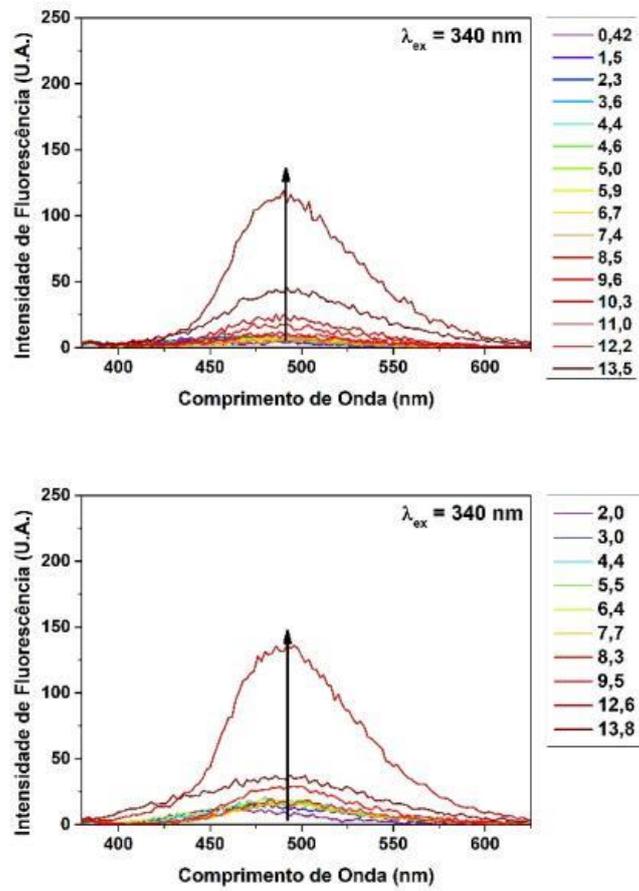


Figura 116: Espectros de emissão com excitação em 340 nm para as estruturas **25** e **26**.

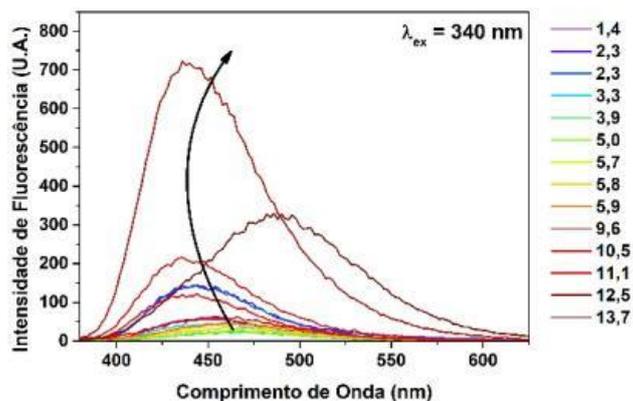


Figura 117: Espectros de emissão com excitação em 340 nm para a estrutura **27**.

O estudo de espécies que absorvem e emitem fluorescência, experimentalmente, é relativamente simples. Considera-se para tanto que cada espécie em dado pH possua um espectro de absorção e emissão característico. Para a identificação de pK_a dessas espécies, um estudo de suas intensidades de emissão de fluorescência ou absorção, em função do pH, leva a uma função sigmoide, que quando matematicamente ajustada, é possível identificar seu pK_a , no ponto de inflexão da curva. Essa técnica foi empregada nos estudos do presente trabalho, utilizando um ajuste de Boltzmann, para a faixa de pH básico exclusivamente. Os demais pK_a s não foram observados por não haver uma modificação pronunciada na intensidade de fluorescência. Nota-se que, com o aumento da substituição do hidrogênio por metila, etila ou terc-butila, há uma redução do pK_a das estruturas. A Figura 118 ilustra as curvas de intensidade de fluorescência, normalizadas pela intensidade do menor pH em função do pH. A Tabela IX apresenta seus pK_a s e os coeficientes de determinação R^2 do ajuste da equação.

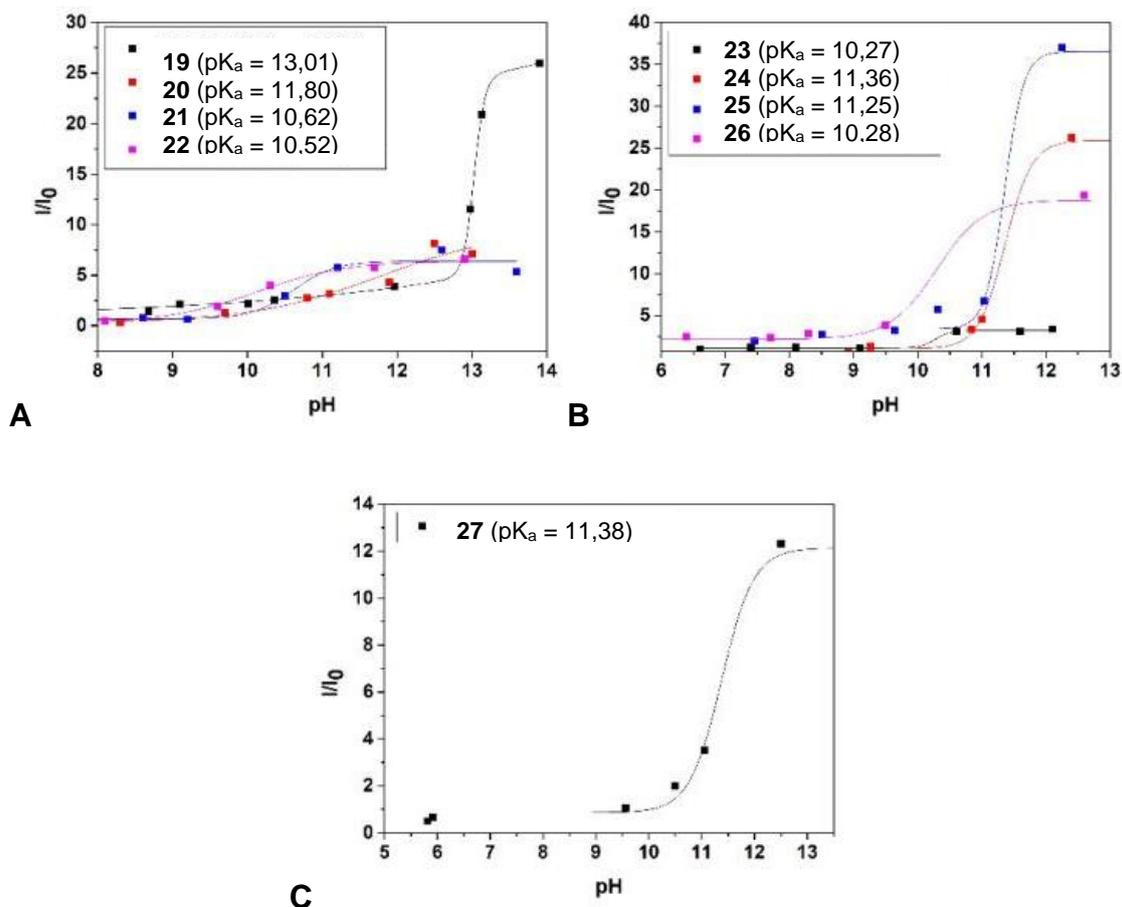


Figura 118: Curvas da variação de intensidade de fluorescência relacionadas com o pH para a obtenção do pK_a , para **19**, **20**, **21** e **22** no gráfico (A), para **23**, **24**, **25** e **26** no gráfico (B) e para **27** no gráfico (C).

Tabela IX: Relação dos pK_a encontrados.

Estrutura	pK_a	R^2
19	13,02	0,99
20	11,80	0,90
21	10,60	0,91
22	10,12	0,99
23	10,27	0,98
24	11,36	0,98
25	11,35	0,98
26	10,29	0,98
27	11,38	0,99

Tendo em vista essas características das estreptocianinas, observa-se que essas podem ser usadas como sensores do tipo liga-desliga de fluorescência. No ponto do pK_a básico desses referidos corantes, está a faixa em que atuam como sensores fluorescentes. A Figura 119 abaixo ilustra para os derivados oxigenados esse processo. Para todos os demais, a mesma observação foi averiguada. Nota-se que em pHs ácidos e neutros o sistema não é ativado, tornando-se fluorescente em pHs básicos.

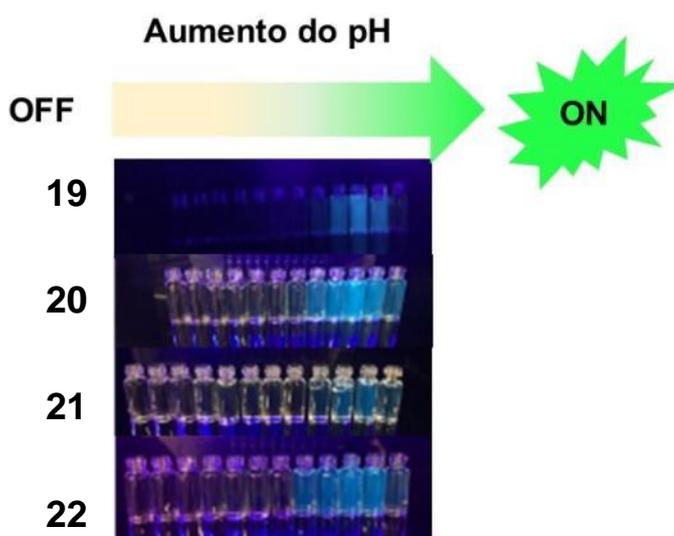


Figura 119: Esquema da variação de emissão de fluorescência, conforme variação do pH para os derivados oxigenados **19, 20, 21 e 22**.

5. Parte Experimental

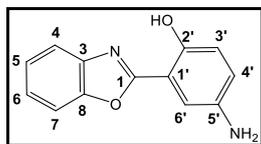
5.1. Materiais e Equipamentos

Para a síntese dos compostos, foram utilizados reagentes da marca Sigma-Sigma-Aldrich ou Merck, com pureza superior a 95%. Os solventes foram usados de grau PA. Para a purificação dos compostos via coluna cromatográfica, foi utilizado Silicagel 60 da Sigma-Aldrich. Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C foram realizados nos equipamentos Varian Inova de 300 MHz ou Bruker Ascend de 400 MHz. Os deslocamentos químicos estão em δ (ppm) relativos ao tetrametilsilano (TMS) como padrão interno ou relativos ao solvente, usando $\text{DMSO-}d_6$, CF_3COOD (TFA) ou CDCl_3 . Os espectros de Infravermelho foram obtidos no equipamento Varian 640-IR, através de pastilhas de KBr. Os espectros de absorção e emissão de fluorescência foram feitos nos espectrofotômetros Shimadzu UV-2450, RF-5301PC. Para as medidas em estado sólido foi acoplada a esfera de integração ISR-2200. Na caracterização fotofísica e experimentos, todos os solventes utilizados foram solventes PA-ACS, sendo o etanol anidro.

5.2. Síntese dos heterociclos 2-(5'-amino-2'-hidroxifenil)benzazóis

Em um balão de fundo redondo, adicionou-se 0,0221 mol do *o*-aminofenol **68**, *o*-aminotiofenol **69** ou 1,2-diaminobenzeno **70**, seguido de 15 ml de APF. A temperatura foi elevada lentamente (2 horas) até atingir 150 °C, quando o ácido 5-aminosalicílico **85** (0,0221 mol) foi adicionado. Após a reação foi aquecida por 3 horas a 195 °C. A reação é resfriada e vertida em gelo picado até obtenção de precipitado. A reação foi neutralizada com bicarbonato de sódio até pH 7, filtrada e o sólido foi purificado via coluna cromatográfica utilizando sílica na fase estacionária e diclorometano como eluente.

5.2.1. 2-(5'-amino-2'-hidroxifenil)benzoxazol (86)



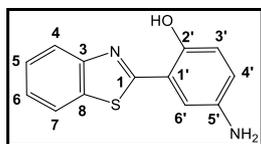
Rendimento: 69%.

Infravermelho: 3411 (ν_{asNH_2}); 3333 (ν_{sNH_2}); 1619 e 1542 ($\nu_{\text{aromC=C}}$).

$^1\text{H-RMN}$ (ATF-*d*) 400 MHz, δ (ppm):, 8,48 (1H, d, $J_{\text{meta}} = 2,8$ Hz, H_{6'}), 7,85 a 7,80 (3H, m, H_{4'}, H₄ e H₇), 7,74 a 7,66 (2 H, 2 tripletos, , $J_{\text{orto}} = 8,8$ e 7,2 Hz, H₅ e H₆), 7,39 (1H,d, $J_{\text{orto}} = 9,2$ Hz, H_{3'}).

$^{13}\text{C-RMN-APT}$ (ATF-*d*) 100 MHz, δ (ppm): 162,60; 161,72; 150,58; 135,67; 132,63; 131,78; 130,08; 127,14; 125,27; 122,03; 117,91; 114,74; 109,54.

5.2.2. 2-(5'-amino-2'-hidroxifenil)benzotiazol (87)



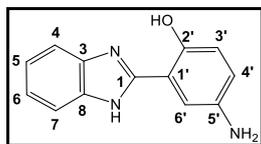
Rendimento: 56%

Infravermelho: 3408 (ν_{asNH_2}); 3328 (ν_{sNH_2}); 1633 e 1593 ($\nu_{\text{aromC=C}}$).

$^1\text{H-RMN}$ (ATF-*d*) 400 MHz, δ (ppm): 8,22 (1H, dd, $J_{\text{meta}} = 5,8$ Hz e $J_{\text{para}} = 2,4$ Hz, H_{6'}), 8,13 a 8,04 (2H, m, H₅ e H₆), 7,82 a 7,70 (3H, m, H_{3'}, H₄ e H₇), 7,38 (1H,dd, $J_{\text{orto}} = 9,2$ Hz e $J_{\text{meta}} = 5,6$ Hz, H_{4'}).

$^{13}\text{C-RMN-APT}$ (ATF-*d*) 100 MHz, δ (ppm): 171,29; 159,43; 141,94; 134,03; 133,17; 131,85; 130,99; 126,78; 125,14; 124,93; 122,20; 119,98.

5.2.3. 2-(5'-amino-2'-hidroxifenil)benzimidazol (88)



Rendimento: 52%

Infravermelho: 3400 (ν_{asNH_2}); 3300 (ν_{sNH_2}); 1637 e 1589 ($\nu_{\text{aromC=C}}$).

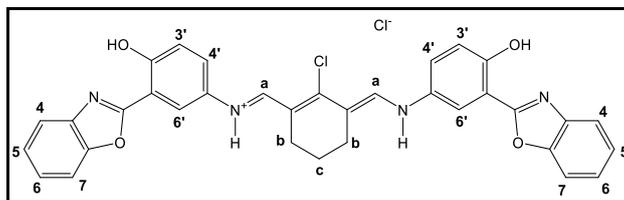
$^1\text{H-RMN}$ (DMSO- d_6) 400 MHz, δ (ppm): 7,62 (2H, dd, $J_{\text{orto}} = 5,6$ Hz e $J_{\text{meta}} = 3,2$ Hz, H₄ e H₇), 7,25 (3H, m, H_{6'}, H₅ e H₆), 6,79 (1H, d, $J_{\text{orto}} = 8,8$ Hz), 6,72 (1H, dd, $J_{\text{orto}} = 8,4$ Hz e $J_{\text{meta}} = 2,4$ Hz, H_{4'}).

$^{13}\text{C-RMN-APT}$ (DMSO- d_6) 100 MHz, δ (ppm): 152,54; 150,01; 141,04; 123,00; 119,78; 117,93; 112,8; 111,04.

5.3. Síntese das Estreptocianinas 19 – 27

Adicionou-se 4,94 mmol de cloreto de fosforila, gota a gota em 7,8 mmol de DMF, sob temperatura reduzida (0 °C) e sob agitação constante. A reação permaneceu sob agitação por 2 horas a temperatura ambiente, quando então 1,35 mmol da ciclohexanona correspondente foi adicionada (**94a** a **94d**). A reação foi mantida sob refluxo a 95 °C por 1 hora. Após o resfriamento, uma solução em etanol (dissolvido em quantidade suficiente para a dissolução) contendo o correspondente heterociclo **86** a **88** foi adicionado e a reação permaneceu sob refluxo a 70 °C por 1 hora. A solução foi resfriada e o precipitado filtrado e lavado com etanol e hexano. A purificação procedeu com lavagens do sólido em extrator Soxhlet com hexano como solvente.

5.3.1. Estreptocianina bis-(benzoxazolil-hidroxfenilamino) (19)



Rendimento: 71% (sólido azul escuro)

Ponto de Fusão: 237 °C

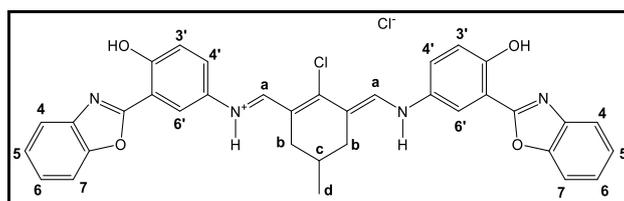
Infravermelho: Infravermelho (cm^{-1}): 3412 ($\nu_{\text{N-H}}$), 3045 ($\nu_{\text{C-H arom}}$), 2940 e 2800 ($\nu_{\text{C-H alifático}}$), 1634 e 1611 ($\nu_{\text{C=C}}$), 1598 ($\nu_{\text{C=C}}$), 1470 ($\delta_{\text{C-H}}$).

$^1\text{H-RMN}$ (ATF-*d*) 300 MHz, δ (ppm): 8,75 (s, 2H, H_a), 8,30 (s, 2H, $\text{H}_{6'}$), 7,90 (m, 4H, H_5 e H_6), 7,77 (m, 6H, H_4 , H_7 e $\text{H}_{4'}$), 7,43 (d, 2H, $J_o = 9$ Hz, $\text{H}_{3'}$), 2,72 (*Salargado*, 4H, H_b), 2,06 (*Salargado*, 2H, H_c).

$^{13}\text{C-RMN-APT}$ (ATF-*d*) 75,4 MHz, δ (ppm): 161,44; 161,17; 157,90; 149,90; 148,72; 133,89; 130,55; 129,98; 129,80; 128,32; 120,04; 119,73; 117,37; 115,99; 112,94; 107,45; 24,23; 19,56.

HRMS (ESI): Calculado ($[\text{M}+\text{H}]^+-\text{Cl}^-$): 589,1637, Experimental: 589,1625.

5.3.2. Metilestreptocianina bis-(benzoxazolil-hidroxfenilamino) (20)



Rendimento: 57% (sólido azul escuro)

Ponto de Fusão: 254 °C

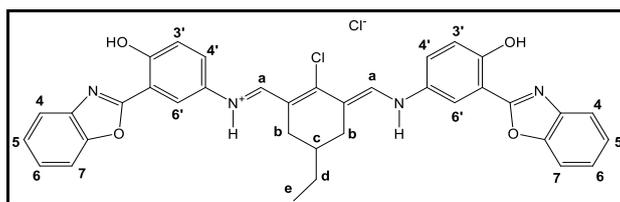
Infravermelho (cm^{-1}): 3412 ($\nu_{\text{N-H}}$), 3054 ($\nu_{\text{C-H arom}}$), 2961 e 2864 ($\nu_{\text{C-H alifático}}$), 1683 e 1622 ($\nu_{\text{C=C}}$), 1590 ($\nu_{\text{C=C}}$), 1475 ($\delta_{\text{C-H}}$).

$^1\text{H-RMN}$ (ATF-*d*) 300 MHz, δ (ppm): 8,91 (s, 2H, H_a), 8,45 (s, 2H, $\text{H}_{6'}$), 8,06 (m, 4H), 7,94 (m, 6H), 7,61 (d ($J_o = 9$ Hz), 2H, $\text{H}_{3'}$), 2,98 (d, 2H, H_b), 2,48 a 2,30

(m+*Salgado*, 3H, H_b + H_c), 1,38 (d, 3H, H_d).

¹³C-RMN-APT (ATF-d) 75,4 MHz, δ (ppm): 163,31; 162,89; 159,75; 151,87; 150,57; 135,72; 132,37; 131,85; 131,64; 130,17; 121,92; 121,60; 118,92; 117,84; 114,76; 109,33; 33,88; 28,58; 21,51.

5.3.3. *Etilestreptocianina bis-(benzoxazolil-hidroxfenilamino)* (21)



Rendimento: 77% (sólido azul escuro)

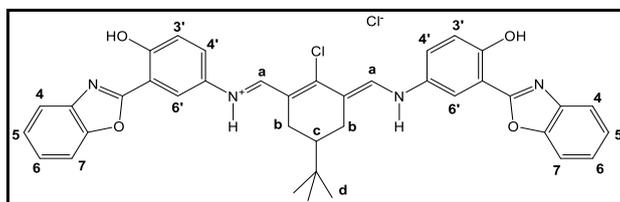
Ponto de Fusão: 205 °C

Infravermelho (cm⁻¹): 3403 (ν_{N-H}), 3049 (ν_{C-H arom}), 2958 e 2873 (ν_{C-H alifático}), 1651 e 1616 (ν_{C=C}), 1583 (ν_{C=C}), 1480 (δ_{C-H}).

¹H-RMN (ATF-d) 300 MHz, δ (ppm): 8,63 (s, 2H, H_a), 8,25 (m, 4H), 8,10 (m, 6H), 7,78 (d, J_o = 7,3 Hz, 2H, H_{3'}), 3,23 (d, 2H, H_b), 2,63 (t, 2H, H_b), 2,24 (*Salgado*, 1H, H_c), 1,91 (m, 2H, H_d), 1,38 (t, 3H, H_e).

¹³C-RMN (ATF-d) 75,4 MHz, δ (ppm): 163,07; 159,78; 151,94; 150,61; 135,77; 132,42; 131,82; 131,69; 130,21; 121,97; 121,70; 119,02; 117,88; 114,80; 109,37; 35,31; 31,88; 30,07; 12,26.

5.3.4. *Terbutilestreptocianina bis-(benzoxazolil-hidroxfenilamino)* (22)



Rendimento: 75% (sólido verde escuro)

Ponto de Fusão: 254 °C

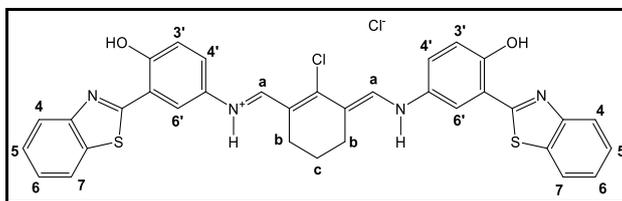
Infravermelho (cm⁻¹): 3417 (ν_{N-H}), 3051 (ν_{C-H arom}), 2945 e 2864 (ν_{C-H alifático}), 1635

e 1613 ($\nu_{C=C}$), 1579 ($\nu_{C=C}$), 1455 (δ_{C-H}).

$^1\text{H-RMN}$ (ATF-d) 300 MHz, δ (ppm): 8,98 (s, 2H, H_a), 8,51 (s, 2H, $\text{H}_{6'}$), 8,15 (m, 4H), 8,01 (m, 6H), 7,68 (d, $J_o = 8,9$ Hz, $\text{H}_{3'}$), 3,15 (m, 2H, H_b), 2,58 (t, 2H, H_b), 1,96 (m, 1H, H_c), 1,29 (s, 9H, H_d).

$^{13}\text{C-RMN}$ (ATF-d) 75,4 MHz, δ (ppm): 163,28; 162,90; 151,74; 150,55; 135,74; 132,36; 131,62; 130,16; 121,92; 121,74; 119,85; 117,82; 114,73; 109,31; 44,21; 37,86; 34,17; 28,24; 27,70.

5.3.5. Estreptocianina bis-(benzotiazolil-hidroxifenilamino) (23)



Rendimento: 66% (sólido azul escuro)

Ponto de Fusão: 253 °C

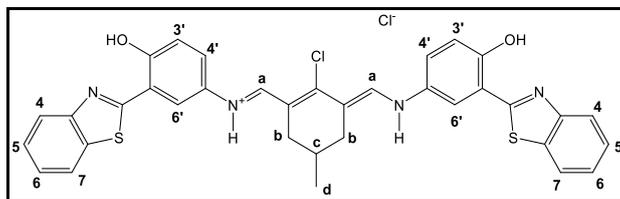
Infravermelho: Infravermelho (cm^{-1}): 3350 (ν_{N-H}), 3054 (ν_{C-H} arom), 2941 e 2825 (ν_{C-H} alifático), 1641 e 1625 ($\nu_{C=C}$), 1582 ($\nu_{C=C}$), 1484 (δ_{C-H}).

$^1\text{H-RMN}$ (ATF-d) 300 MHz, δ (ppm): 8,74 (s, 2H, H_a), 8,22 a 8,10 (m, 6H), 7,86 a 7,71 (m, 6H), 7,43 (d, $J_{orto} = 9\text{Hz}$, $\text{H}_{3'}$), 2,71 (Salargado, 4H, H_b), 2,07 (Salargado, 2H, H_c)

$^{13}\text{C-RMN}$ (ATF-d) 75,4 MHz, δ (ppm): 169,6; 160,4; 155,2; 149,3; 139,6; 133,3; 130,7; 129,3; 128,7; 127,9; 122,7; 119,3; 117,5; 116,7; 112,9; 23,7; 18,9.

HRMS (ESI): Calculado ($[\text{M}+\text{H}]^+-\text{Cl}^-$): 621,1180, Experimental: 621,1157.

5.3.6. Metilestreptocianina bis-(benzotiazolil-hidroxifenilamino) (24)



Rendimento: 72% (sólido verde escuro)

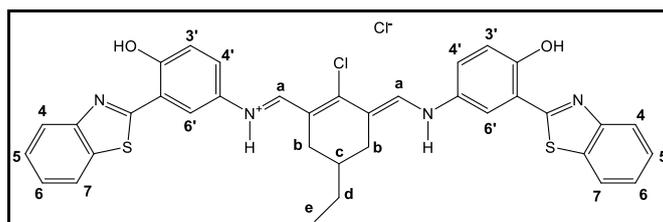
Ponto de Fusão: 243 °C

Infravermelho (cm⁻¹): 3423 (ν_{N-H}), 3057 (ν_{C-H arom}), 2960 e 2866 (ν_{C-H alifático}), 1648 e 1606 (ν_{C=C}), 1581 (ν_{C=C}), 1473 (δ_{C-H}).

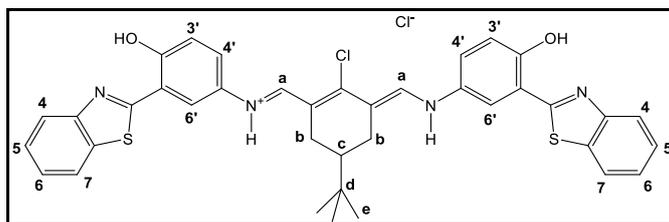
¹H-RMN (ATF-d) 300 MHz, δ (ppm): 8,87 (s, 2H, H_a), 8,38 – 8,24 (m, 6H), 7,98 – 7,84 (m, 6H), 7,58 ppm (d, J_o = 9 Hz, 2H, H_{3'}), 2,97 (d, 2H, H_b), 2,44 – 2,27 (t + *Salargado*, 3H, H_b + H_c), 1,36 (d, 3H, H_d)

¹³C-RMN (ATF-d) 75,4 MHz, δ (ppm): 171,82; 162,66; 157,63; 151,81; 141,96; 135,73; 131,65; 131,31; 130,29; 125,05; 122,15; 121,66; 119,94; 118,84; 115,40; 33,95; 28,60; 21,50.

5.3.7. *Etilestreptocianina bis-(benzoxazolil-hidroxfenilamino)* (25)



5.3.8. Terbutilestreptocianina bis-(benzoxazolil-hidroxfenilamino) (26)



Rendimento: 87% (sólido verde escuro)

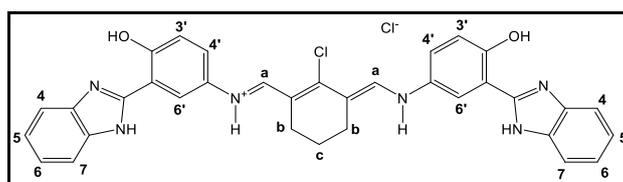
Ponto de Fusão: 248 °C

Infravermelho (cm⁻¹): 3391 (ν_{N-H}), 3058 (ν_{C-H arom}), 2959 e 2859 (ν_{C-H alifático}), 1654 e 1615 (ν_{C=C}), 1581 (ν_{C=C}), 1481 (δ_{C-H}).

¹H-RMN (ATF-d) 400 MHz, δ (ppm): 8,98 (s, 2H, H_a), 8,51 (s, 2H, H_{6'}), 8,15 (m, 4H), 8,01 (m, 6H), 7,68 (d, J_o = 8,9 Hz, H_{3'}), 3,15 (m, 2H, H_b), 2,58 (t, 2H, H_b), 1,96 (m, 1H, H_c), 1,29 (s, 9H, H_d).

¹³C-RMN (ATF-d) 100 MHz, δ (ppm): 163,28; 162,90; 151,74; 150,55; 135,74; 132,36; 131,62; 130,16; 121,92; 121,74; 119,85; 117,82; 114,73; 109,31; 44,21; 37,86; 34,17; 28,24; 27,70.

5.3.9. Estreptocianina bis-(benzimidazolil-hidroxfenilamino) (27)



Rendimento: 75% (sólido azul escuro)

Ponto de Fusão: acima de 310 °C

Infravermelho: Infravermelho (cm⁻¹): 3413 (ν_{N-H}), 3041 (ν_{C-H arom}), 2937 e 2861 (ν_{C-H alifático}), 1620 e 1582 (ν_{C=C}), 1555 (ν_{C=C}), 1475 (δ_{C-H}).

¹H-RMN (ATF-d) 300 MHz, δ (ppm): 11,36 (*Salargado*, HOH), 8,53 (s, 4H, H_a), 7,86 (m, 6H), 7,47 (m, 6H), 2,68 (*Salargado*, 4H, H_b), 1,82 (*Salargado*, 2H, H_c).

¹³C-RMN-APT (ATF-d) 75,4 MHz, δ (ppm): 155, 78; 155,29; 147,86; 145,91;

132,05; 131,40; 126,89; 125,67; 118,36; 117,68; 114,89; 114,18; 109,72; 34,05; 24,70; 19,44.

HRMS (ESI): Calculado ($[M+H]^+-Cl$): 587,1957, Experimental: 587,1946.

5.4. Caracterização Fotofísica

Para o preparo das amostras pesou-se em uma balança microanalítica quantidades inferiores a 1 mg dissolvidos em solventes de grau HPLC. A partir de uma solução estoque, soluções de concentração entre 1 μ M a 40 μ M foram preparadas. Para as medidas no estado sólido, utilizou-se suporte para sólidos com janela de quartzo, utilizando esfera integradora. As amostras em filme foram preparadas com auxílio de etanol, gotejando a solução em uma lâmina de quartzo, também utilizando esfera integradora para obtenção das medidas de absorção.

5.5. Estudo de Agregados

Uma solução de 10 ml de etanol anidro contendo entre 0,3 e 1 mg de corante foram preparadas e utilizadas para a preparação das soluções diluídas. As concentrações diluídas variaram entre 1 e 70 μ mol.L⁻¹, e imediatamente seus espectros de absorção no UV-Visível foram obtidos.

5.6. Estudo da Interação com BSA

Para cada estreptocianina, diferentes amostras foram preparadas em solução tampão PBS com pH de 7,2, todas elas mantendo a concentração de proteína fixada em 10 μ M. Diversas soluções contendo BSA e concentração variando entre 2 a 80 μ M das estreptocianinas foram preparadas, até que houvesse saturação do sistema ou supressão significativa da emissão de fluorescência da proteína. A partir dessas soluções, foram medidos os espectros de absorção, emissão de fluorescência analisando a emissão da proteína, bem

como os espectros de fluorescência sincronizada com $\Delta\lambda$ de 15 e 60 nm. Para a obtenção dos espectros corrigidos, para todos os corantes, espectros de absorção com concentração inicial de 2 μM das estreptocianinas em PBS foram medidos até saturação da solução.

5.7. Estudo de pH

Para as medidas de pH, foram preparadas soluções de 10 mL com 5 μM de estreptocianina para cada pH, a partir de uma solução das estreptocianinas em DMSO, com adições de volumes de 250 μL dessa solução. Para a solução aquosa, utilizou-se água Mili-Q e a força iônica foi mantida em 0,15. Os pHs foram ajustados com auxílio de pHmetro. Após duas horas os pHs foram medidos novamente e as soluções tiveram seus espectros de absorção e emissão medidos.

6. Considerações Finais

A síntese de novos corantes do tipo estreptocianinas foi obtida com sucesso, sendo essas estruturas inéditas na literatura. A metodologia de síntese apresentada mostrou-se de boa eficiência, justificada pelos rendimentos bons em poucas etapas, e de fácil purificação. As estreptocianinas apresentaram características de cor semelhantes às cianinas descritas na literatura: todas de coloração escura, variando entre azul e verde, bem como iridescentes.

As estreptocianinas tiveram importantes características fotofísicas, provenientes tanto das propriedades das cianinas quanto dos núcleos contendo ESIPT. Observou-se que a formação de agregados em solventes polares é preferencial, e que variou conforme substituição da cadeia polimetínica e heteroátomo presente nas moléculas. Para alguns casos, tanto agregados H quanto J foram observados. A emissão de fluorescência para os agregados J foi evidenciada, assim como ocorre nas cianinas. Os deslocamentos de Stokes apresentados pelas estreptocianinas mostraram-se em termos de magnitude muito maiores que os típicos de cianinas, mas inferiores aos apresentados por benzazóis. Além disso, a dupla emissão de fluorescência típica das benzazóis foi evidenciada, quando em sistemas diluídos, para alguns casos. Em estado sólido, foi característico das estreptocianinas uma janela de absorção bem ampla, podendo chegar à região do vermelho. Já em filme, as estruturas mostraram a presença de agregados J bastante clara, e em ambos os casos não houve emissão de fluorescência, ao contrário de estruturas contendo ESIPT, que possuem suas fluorescências aumentadas quando em estado sólido.

A partir de um estudo dos espectros de absorção das estreptocianinas variando sua concentração foi possível obter importantes relações acerca da formação de agregados dessa estrutura. Observou-se que o emprego do modelo isodésmico modificado indicou que a formação de agregados é regida por processos cooperativos. Além disso, os valores de Energia de Gibbs foram calculados e mais uma vez pôde-se observar a tendência de formar agregados maiores que dímeros.

Com relação às características de supressores de fluorescência das estreptocianinas frente à BSA, para todos os casos pôde-se descartar a predominância de supressão dinâmica no sistema em virtude da não-linearidade dos dados experimentais frente à equação de Stern-Volmer. Com base nos ajustes de equações que descrevem a supressão de fluorescência, evidenciou-se que ocorre prioritariamente a supressão estática, sem levar em conta a formação de complexos não-fluorescentes. Foram calculados os raios ao redor do fluoróforo onde a supressão de fluorescência ocorre, sendo esse inferior ao tamanho da proteína BSA. Além disso, através de espectros de fluorescência sincronizada, foi possível identificar que as interações ocorrem predominantemente nos resíduos de triptofano e não de tirosina, também presentes na BSA.

Todas as estreptocianinas foram identificadas como sensores colorimétricos de pH, e também como sensores fluorimétricos para pHs básicos.

De forma geral, as estreptocianinas obtidas nesse trabalho apresentaram propriedades únicas. Além disso, suas características fotofísicas mostraram a formação de agregados J e H sob dadas condições. Sendo assim, o presente trabalho foi capaz de estudar suas principais características fotofísicas com sucesso, e foi identificado que essas estruturas podem ser utilizadas em diversas aplicações, dadas as suas propriedades investigadas.

Referências

- [1] E. Wiedermann, Ueber Fluorescenz und Phosphorescenz I. Abhandlung, *Ann. Phys.* 270 (1888) 446–463.
- [2] S.E. Braslavsky, Glossary of terms used in photochemistry, *Pure Appl. Chem.* 79 (2007) 293–465.
- [3] B. Valeur, Introduction, in: *Mol. Fluoresc. Princ. Appl.*, 2nd ed., Willey-VHC, 2012: pp. 1–30.
- [4] M.D. Laramie, A. Levitz, M. Henary, Cyanine and Squaric Acid Metal Sensors, *Sensors Actuators, B Chem.* 243 (2017) 1191–1204.
- [5] H.A. Shindy, Fundamentals in the chemistry of cyanine dyes: A review, *Dye. Pigment.* 145 (2017) 505–513.
- [6] G.B. Behera, P.K. Behera, B.K. Mishra, Cyanine dyes : Self aggregation and behaviour in surfactants: A review, *J. Surf. Sci. Technol.* 23 (2007) 1–31.
- [7] F. Würthner, T.E. Kaiser, C.R. Saha-Möller, J-aggregates: From serendipitous discovery to supramolecular engineering of functional dye materials, *Angew. Chemie - Int. Ed.* 50 (2011) 3376–3410.
- [8] G.C. Williams, Researches on Chinoline and its Homologues, *Trans. R. Soc. Edinburgh.* 21 (1856) 377–402.
- [9] H.A. Shindy, Basics, Mechanisms and Properties in the Chemistry of Cyanine Dyes: A Review Paper, *Mini. Rev. Org. Chem.* 9 (2012) 352–360.
- [10] A. V Kulinich, A.A. Ishchenko, Merocyanine dyes: synthesis, structure, properties and applications, *Russ. Chem. Rev.* 78 (2009) 141–164.
- [11] M. Panigrahi, S. Dash, S. Patel, B.K. Mishra, Syntheses of cyanines : a review, *Tetrahedron.* 68 (2012) 781–805.
- [12] A. Mishra, R.K. Behera, P.K. Behera, B.K. Mishra, G.B. Behera, Cyanines during the 1990s : A Review, *Chem. Rev.* 100 (2011) 1973–2011.
- [13] S. Pascal, A. Haefele, C. Monnereau, A. Charaf-Eddin, D. Jacquemin, B. Le Guennic, O. Maury, C. Andraud, On the versatility of electronic

- structures in polymethine dyes, Proc. SPIE. 9253 (2014) 1–11.
- [14] A.P. Demchenko, *Advanced Fluorescence Reporters in Chemistry and Biology I - Fundamentals and Molecular Design*, First Ed., Springer, 2010.
- [15] S. Pisoni, C. Liberato, M. Pereira, D. Abreu, F. Severo, L. Franciscato, *Comptes Rendus Chimie Synthesis*, spectroscopic characterization and photophysical study of dicyanomethylene-substituted squaraine dyes, *Comptes Rendus - Chim.* 15 (2012) 454–462.
- [16] S. Pisoni, M. Pereira, D. Abreu, C. Liberato, F. Severo, L. Franciscato, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry Synthesis*, photophysical study and BSA association of water-insoluble squaraine dyes, *Journal Photochem. Photobiol. A Chem.* 252 (2013) 77–83.
- [17] B. Oswald, F. Lehmann, L. Simon, E. Terpetschnig, O.S. Wolfbeis, Red Laser-Induced Fluorescence Energy Transfer in an Immunosystem, *Anal. Biochem.* 277 (2000) 272–277.
- [18] B. Oswald, L. Patsenker, J. Duschl, H. Szmecinski, O.S. Wolfbeis, E. Terpetschnig, Synthesis, spectral properties, and detection limits of reactive squaraine dyes, a new class of diode laser compatible fluorescent protein labels, *Bioconjug. Chem.* 10 (1999) 925–931.
- [19] R.B. Mujumdar, L.A. Ernst, S.R. Mujumdar, C.J. Lewis, A.S. Waggoner, Cyanine Dye Labeling Reagents: Sulfoindocyanine Succinimidyl Esters, *Bioconjug. Chem.* 4 (1993) 105-111.
- [20] S.R. Mujumdar, R.B. Mujumdar, C.M. Grant, A.S. Waggoner, Cyanine-Labeling Reagents : Sulfobenzindocyanine Succinimidyl Esters, *Bioconjug. Chem.* 1802 (1996) 356–362.
- [21] A.L. Tatarets, I.A. Fedyunyaeva, E. Terpetschnig, L.D. Patsenker, Synthesis of novel squaraine dyes and their intermediates, *Dye. Pigment.* 64 (2005) 125–134.
- [22] A.L. Tatarets, I.A. Fedyunyayeva, T.S. Dyubko, Y.A. Povrozin, A.O. Doroshenko, E.A. Terpetschnig, L.D. Patsenker, Synthesis of water-soluble, ring-substituted squaraine dyes and their evaluation as fluorescent

- probes and labels, *Anal. Chim. Acta.* 570 (2006) 214–223.
- [23] A. Go, Long-wavelength fluorophores : new trends in their analytical use, *Trends Anal. Chem.* 23 (2004) 127–136.
- [24] J.H. Flanagan, S.H. Khan, S. Menchen, S.A. Soper, R.P. Hammer, Functionalized tricarbocyanine dyes as near-infrared fluorescent probes for biomolecules, *Bioconjug. Chem.* 8 (1997) 751–756.
- [25] X. Peng, F. Song, E. Lu, Y. Wang, W. Zhou, J. Fan, Y. Gao, Heptamethine cyanine dyes with a large Stokes shift and strong fluorescence: a paradigm for excited-state intramolecular charge transfer, *J. Am. Chem. Soc.* 127 (2005) 4170–4171.
- [26] O. Mader, K. Reiner, H. Egelhaaf, R. Fischer, R. Brock, Structure Property Analysis of Pentamethine Indocyanine Dyes : Identification of a New Dye for Life Science Applications, *Bioconjug. Chem.* 1 (2004) 70–78.
- [27] A.P. Demchenko, Introduction to Fluorescence Sensing Introduction to Fluorescence Sensing, 2008.
- [28] Lumiprobe, <https://www.lumiprobe.com/tech/cyanine-dyes>, acessado em junho de 2017.
- [29] S. Mukhopadhyay, C. Risko, S.R. Marder, J.-L. Brédas, Polymethine dyes for all-optical switching applications: a quantum-chemical characterization of counter-ion and aggregation effects on the third-order nonlinear optical response, *Chem. Sci.* 3 (2012) 3103–3112.
- [30] W. West, S. Pearce, The Dimeric State of Cyanine Dyes, *J. Phys. Chem.* 566 (1964) 1894–1903.
- [31] H. Fidder, J. Terpstra, D. a. Wiersma, Dynamics of Frenkel excitons in disordered molecular aggregates, *J. Chem. Phys.* 94 (1991) 6895.
- [32] A. Hagfeldt, G. Boschloo, L. Sun, L. Kloo, H. Pettersson, Dye-Sensitized Solar Cells, (2010) 6595–6663.
- [33] G. Cicero, G. Musso, A. Lamberti, B. Camino, S. Bianco, D. Pugliese, F. Risplendi, A. Sacco, N. Shahzad, A.M. Ferrari, B. Ballarin, C. Barolo, E.

- Tresso, G. Caputo, Combined experimental and theoretical investigation of the hemi-squaraine/TiO₂ interface for dye sensitized solar cells., *Phys. Chem. Chem. Phys.* 15 (2013) 7198–203.
- [34] T. Maeda, S. Mineta, H. Fujiwara, H. Nakao, S. Yagi, H. Nakazumi, Conformational effect of symmetrical squaraine dyes on the performance of dye-sensitized solar cells, *J. Mater. Chem. A*. 1 (2013) 1303-1309.
- [35] M.D. Ward, W. Seitz, L. Beverina, A squaraine – phthalocyanine ensemble: towards molecular panchromatic sensitizers in solar cells, *Chem. Commun.* 7345 (2009) 1–4.
- [36] J. Gong, J. Liang, K. Sumathy, Review on dye-sensitized solar cells (DSSCs): Fundamental concepts and novel materials, *Renew. Sustain. Energy Rev.* 16 (2012) 5848–5860.
- [37] B. Stender, S.F. Völker, C. Lambert, J. Pfl, Optoelectronic Processes in Squaraine Dye-Doped OLEDs for Emission in the Near-Infrared, *Adv. Mater.* 25 (2013) 2943–2947.
- [38] R.R. Avirah, D.T. Jayaram, N. Adarsh, D. Ramaiah, Squaraine dyes in PDT : from basic design to in vivo demonstration, *Org. Biomol. Chem.* 10 (2012) 911–920.
- [39] L. Beverina, M. Crippa, M. Landenna, R. Ruffo, P. Salice, F. Silvestri, S. Versari, A. Villa, L. Ciaffoni, E. Collini, C. Ferrante, S. Bradamante, C.M. Mari, R. Bozio, G. a Pagani, Assessment of water-soluble π -extended squaraines as one- and two-photon singlet oxygen photosensitizers: design, synthesis, and characterization., *J. Am. Chem. Soc.* 130 (2008) 1894–902.
- [40] D. Gayathri Devi, T.R. Cibir, D. Ramaiah, A. Abraham, Bis(3,5-diiodo-2,4,6-trihydroxyphenyl)squaraine: a novel candidate in photodynamic therapy for skin cancer models in vivo., *J. Photochem. Photobiol. B.* 92 (2008) 153–9.
- [41] L. Beverina, M. Crippa, M. Landenna, R. Ruffo, P. Salice, F. Silvestri, S. Versari, A. Villa, L. Ciaffoni, E. Collini, C. Ferrante, S. Bradamante, C.M. Mari, R. Bozio, G.A. Pagani, Assessment of water-soluble π -extended

- squaraines as one- and two-photon singlet oxygen photosensitizers: Design, synthesis, and characterization, *J. Am. Chem. Soc.* 130 (2008) 1894–1902.
- [42] E. Arunkumar, P.K. Sudeep, P. V Kamat, B.C. Noll, B.D. Smith, Singlet oxygen generation using iodinated squaraine and squaraine-rotaxane dyes., *New J. Chem.* 31 (2007) 677–683.
- [43] L. Beverina, A. Abboto, M. Landenna, M. Cerminara, R. Tubino, F. Meinardi, S. Bradamante, G. a Pagani, New π -extended water-soluble squaraines as singlet oxygen generators., *Org. Lett.* 7 (2005) 4257–60.
- [44] V. Rapozzi, L. Beverina, P. Salice, G.A. Pagani, M. Camerin, L.E. Xodo, Photooxidation and phototoxicity of π -extended squaraines, *J. Med. Chem.* 53 (2010) 2188–2196.
- [45] J. Zhao, S. Ji, Y. Chen, H. Guo, P. Yang, Excited state intramolecular proton transfer (ESIPT): from principal photophysics to the development of new chromophores and applications in fluorescent molecular probes and luminescent materials, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 14 (2012) 8803–8817.
- [46] J.F. Ireland, P.A.H. Wyatt, Acid-base Properties of Electronically Excited States of Organic Molecules, *Adv. Physical Org. Chem.* 12 (1976) 131–221.
- [47] M. Kasha, Proton-transfer Spectroscopy, *J. Chem Soc., Faraday Trans.* 82 (1986) 2379–2392.
- [48] J.E. Kwon, S.Y. Park, Advanced Organic Optoelectronic Materials: Harnessing Excited-State Intramolecular Proton Transfer (ESIPT) Process, *Adv. Mater.* (2011) 3615–3642.
- [49] C. Azarias, Š. Budzák, A.D. Laurent, G. Ulrich, D. Jacquemin, Tuning ESIPT fluorophores into dual emitters, *Chem. Sci.* 4 (2016) 1166–1169.
- [50] C.B. Silva, T. Kroetz, F.S. Santos, F.S. Rodembusch, Synthesis and Photophysical Characterization of Proton Transfer-Based Thiourea Derivatives: Potential Application as Colorimetric Naked-Eye Chemosensor for Fluoride Detection in Solution, *J. Brazilian Chem. Soc.* 28 (2017) 1830–1841.

- [51] P.T. Chou, W.S. Yu, Y.M. Cheng, S.C. Pu, Y.C. Yu, Y.C. Lin, C.H. Huang, C.T. Chen, Solvent-polarity tuning excited-state charge coupled proton-transfer reaction in p-N,N-ditolylaminosalicylaldehydes, *J. Phys. Chem. A*. 108 (2004) 6487–6498.
- [52] S.M. Dennison, J. Guharay, P.K. Sengupta, Excited-state intramolecular proton transfer (ESIPT) and charge transfer (CT) fluorescence probe for model membranes, *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 55 (1999) 1127–1132.
- [53] Y. Xu, Q. Liu, B. Dou, B. Wright, J. Wang, Y. Pang, Zn²⁺ binding-enabled excited state intramolecular proton transfer: A step toward new near-infrared fluorescent probes for imaging applications, *Adv. Healthc. Mater.* 1 (2012) 485–492.
- [54] Y. Zhang, L. Guan, H. Yu, Y. Yan, L. Du, Y. Liu, M. Sun, D. Huang, S. Wang, Reversible Fluorescent Probe for Selective Detection and Cell Imaging of Oxidative Stress Indicator Bisulfite, *Anal. Chem.* 88 (2016) 4426–4431.
- [55] D. Dahal, L. McDonald, X. Bi, C. Abeywickrama, F. Gombedza, M. Konopka, S. Paruchuri, Y. Pang, An NIR-emitting lysosome-targeting probe with large Stokes shift via coupling cyanine and excited-state intramolecular proton transfer, *Chem. Commun.* 53 (2017) 3697–3700.
- [56] A. C. Nunes, Síntese e estudo fotofísico de novas cianinas conjugadas com heterociclos fotoativos por ESIPT, *Dissertação, UFRGS*, 2015.
- [57] S.M. Makin, N. V. Monich, O.A. Shavrygina, M.I. Berezhnaya, S.A. Kheifets, A novel method of the synthesis of higher polymethinium salts, *Tetrahedron.* 25 (1969) 4939–4948.
- [58] D.P. Hagberg, J.H. Yum, H. Lee, F. De Angelis, T. Marinado, K.M. Karlsson, R. Humphry-Baker, L. Sun, A. Hagfeldt, M. Grätzel, M.K. Nazeeruddin, Novel Near-Infrared Cyanine Dyes for Fluorescence Imaging in Biological Systems, *J. Am. Chem. Soc.* 130 (2008) 6259–6266.
- [59] T. Geiger, H. Benmansour, B. Fan, R. Hany, F. Nüesch, Low-Band Gap Polymeric Cyanine Dyes Absorbing in the NIR Region, *Macromol. Rapid*

- Commun. 29 (2008) 651–658.
- [60] L.A. Ernst, R.K. Gupta, R.B. Mujumdar, A.S. Waggoner, Cyanine Dye Labeling Reagents for Sulfhydryl Groups, *Cytometry*. 10 (1989) 3–10.
- [61] E. Terpetschnig, J.R. Lakowicz, Synthesis and Characterization of Unsymmetrical Squaraines: A New Class of Cyanine Dyes, *Dye. Pigment*. 21 (1993) 227–234.
- [62] P.L. Southwick, L.A. Ernst, E.W. Tauriello, S.R. Parker, R.B. Mujumdar, S.R. Mujumdar, H.A. Clever, A.S. Waggoner, Cyanine Dye Labeling Succinimidyl Esters, *Cytometry*. 430 (1990) 418–430.
- [63] M. V. Kvach, A. V. Ustinov, I.A. Stepanova, A.D. Malakhov, M. V. Skorobogatyi, V. V. Shmanai, V.A. Korshun, A Convenient Synthesis of Cyanine Dyes: Reagents for the Labeling of Biomolecules, *European J. Org. Chem.* (2008) 2107–2117.
- [64] Y. Madaule, M. Ramarohetra, J. - G Wolf, J. - P Declercq, A. Dubourg, Arsenic Compounds in Organic Synthesis: Pentamethinium Salts from Aminoarsanes and Pyrylium Salts, *Angew. Chemie Int. Ed. English*. 30 (1991) 994–996.
- [65] N. Obaya, C. Payrastra, Y. Madaule, Synthesis of new pentacarbon chain streptocyanines (pentamethinium salts), *Tetrahedron*. 57 (2001) 9137–9147.
- [66] A. Izquierdo, V. Guieu, H. Gornitzka, Y. Madaule, C. Payrastra, Synthesis and reactivity of a new nonacarbon chain carboxonium salt - Access to a new class of streptocyanine dyes, *European J. Org. Chem.* (2003) 2317–2320.
- [67] A. Izquierdo, V. Guieu, H. Gornitzka, Y. Madaule, C. Payrastra, Synthesis and reactivity of a new nonacarbon chain carboxonium salt - Access to a new class of streptocyanine dyes, *European J. Org. Chem.* (2004) 2317–2320.
- [68] V. Guieu, A. Izquierdo, S. Garcia-Alonso, C. André, Y. Madaule, C. Payrastra, Fluorescent streptocyanine dyes: Synthesis and photophysical

- properties - Synthesis of a new hemicarboxonium salt, *European J. Org. Chem.* (2007) 804–810.
- [69] M.-P. Maether, V. Bernat, M. Maturano, C. André-Barrès, S. Ladeira, A. Valentin, H. Vial, C. Payrastra, Synthesis and antiplasmodial activity of streptocyanine/peroxide and streptocyanine/4-aminoquinoline hybrid dyes., *Org. Biomol. Chem.* 9 (2011) 7400–10.
- [70] L. Jie Jack, The Vilsmeier-Haack Reaction, in: *Name React.*, 2006: pp. 14–78.
- [71] C.M. Marson, Reactions of carbonyl compounds with (monohalo) methyleniminium salts (vilsmeier reagents), *Tetrahedron.* 48 (1992) 3659–3726.
- [72] F.A. Carey, *Organic Chemistry*, McGraw-Hill, 2002.
- [73] Y. Kanaoka, T. Hamada, O. Yonemitsu, Polyphosphate Ester as a Synthetic Agent. XIII. Syntheses of 2-Substituted Benzoxazoles and Benzthiazoles with PPE, *Chem. Pharm. Bull.* 18 (1970) 587–590.
- [74] C.M. Orlando, J.G. Wirth, D.R. Heath, Methyl Aryl Ether Cleavage in Benzazole Syntheses in Polyphosphoric Acid, *J. Org. Chem.* 35 (1970) 3147–3149.
- [75] D.W. Hein, R.J. Alheim, J.J. Leavitt, The Use of Polyphosphoric Acid in the Synthesis of 2-Aryl- and 2-Alkyl-substituted Benzimidazoles, Benzoxazoles and Benzothiazoles, *J. Am. Chem. Soc.* 79 (1957) 427–429.
- [76] M.R. Patil, J.T. Bhanushali, B.M. Nagaraja, R.S. Keri, TiO₂–ZrO₂ composite: Synthesis, characterization and application as a facile, expeditious and recyclable catalyst for the synthesis of 2-aryl substituted benzoxazole derivatives, *Comptes Rendus Chim.* 21 (2018) 399–407.
- [77] J.R. Lakowicz, *Principles of fluorescence spectroscopy*, 3rd Edition, , Springerlink, 2006.
- [78] B. Wardle, *Principles and Applications of Photochemistry*, Wiley, 2009.
- [79] Niconas J. Turro, *Modern Molecular Photochemistry*, University Science

Books, 1991.

- [80] B. Valeur, Characteristics of Fluorescence Emission, in: *Mol. Fluoresc. Princ. Appl.*, 2012: pp. 53–74.
- [81] D. Skoog, D.M. West, *Princípios de Análise Instrumental*, Bookman, 2002.
- [82] B. Valeur, Absorption of Ultraviolet , Visible , and Near - Infrared Radiation, *Mol. Fluoresc. Princ. Appl.* (2012) 31–51.
- [83] B. Valeur, Environmental Effects on Fluorescence Emission, in: *Mol. Fluoresc. Princ. Appl.*, 2001: pp. 109–140.
- [84] S. Fery-Fargues, D. Lavabre, Are Fluorescence Quantum Yields so Tricky to Measure? A Demonstration Using Familiar Stationery Products, *J. Chem. Educ.* 76 (1999) 1260–1264.
- [85] U. Resch-Genger, K. Rurack, Determination of the photoluminescence quantum yield of dilute dye solutions (IUPAC Technical Report), *Pure Appl. Chem.* 85 (2013) 2005–2026.
- [86] M.B. Rubin, S.E. Braslavsky, Quantum yield: the term and the symbol. A historical search, *Photochem. Photobiol. Sci.* 9 (2010) 670.
- [87] C. Würth, M. Grabolle, J. Pauli, M. Spieles, U. Resch-Genger, Relative and absolute determination of fluorescence quantum yields of transparent samples, *Nat. Protoc.* 8 (2013) 1535–1550.
- [88] J. Huang, A. Peng, H. Fu, Y. Ma, T. Zhai, J. Yao, Temperature-dependent ratiometric fluorescence from an organic aggregates system, *J. Phys. Chem. A.* 110 (2006) 9079–9083.
- [89] M. Homocianu, A. Airinei, D.O. Dorhoi, Solvent effects on the electronic absorption and fluorescence spectra, *J. Adv. Res. Phys.* 2 (2011) 1–9.
- [90] F.. Kröger, E. Al, The influence of temperature quenching on the decay of fluorescence, *Phys. XIV.* 2 (1948) 81–96.
- [91] M.A. Rauf, S. Hisaindee, Studies on solvatochromic behavior of dyes using spectral techniques, *J. Mol. Struct.* 1042 (2013) 45–56.
- [92] H.- Meerwein, C. Reichardt, C. Schorlemmer, *Solvatochromism*,

- Thermochromism, Piezochromism, Halochromism, and Chiro-Solvatochromism of Pyridinium, *Chem. Soc. Rev.* (1992) 147.
- [93] V.S. Pavlovich, Solvatochromism and nonradiative decay of intramolecular charge-transfer excited states: Bands-of-energy model, thermodynamics, and self-organization, *ChemPhysChem.* 13 (2012) 4081–4093.
- [94] A. Marini, A. Muñoz-Losa, A. Biancardi, B. Mennucci, What is solvatochromism?, *J. Phys. Chem. B.* 114 (2010) 17128–35.
- [95] V.S. Padalkar, D. Sakamaki, K. Kuwada, N. Tohnai, T. Akutagawa, K. Sakai, S. Seki, AIE Active Triphenylamine–Benzothiazole Based Motifs: ESIPT or ICT emission, *RSC Adv.* 6 (2016) 26941–26949.
- [96] B.K. Paul, N. Guchhait, Modulated photophysics of an ESIPT probe 1-hydroxy-2-naphthaldehyde within motionally restricted environments of liposome membranes having varying surface charges, *J. Phys. Chem. B.* 114 (2010) 12528–12540.
- [97] F.S. Rodembusch, F.R. Brand, D.S. Corrêa, J.C. Pocos, M. Martinelli, V. Stefani, Transition metal complexes from 2-(2'-hydroxyphenyl)benzoxazole: A spectroscopic and thermogravimetric stability study, *Mater. Chem. Phys.* 92 (2005) 389–393.
- [98] F.S. Rodembusch, F.P. Leusin, L.F. Campo, V. Stefani, Excited state intramolecular proton transfer in amino 2-(2'-hydroxyphenyl)benzazole derivatives: Effects of the solvent and the amino group position, *J. Lumin.* 126 (2007) 728–734.
- [99] G.O.W. Lins, L.F. Campo, F.S. Rodembusch, V. Stefani, Novel ESIPT fluorescent benzazolyl-4-quinolones: Synthesis, spectroscopic characterization and photophysical properties, *Dye. Pigment.* 84 (2010) 114–120.
- [100] S.J. Formosinho, L.G. Arnaut, Excited-State proton transfer reactions II. Intramolecular reactions, *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* 75 (1993) 21–48.
- [101] I.E. Serdiuk, A.D. Roshal, Exploring double proton transfer: A review on

- photochemical features of compounds with two proton-transfer sites, *Dye. Pigment.* 138 (2017) 223–244.
- [102] F.A.S. Chipem, A. Mishra, G. Krishnamoorthy, The role of hydrogen bonding in excited state intramolecular charge transfer, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 14 (2012) 8775.
- [103] A.P. Demchenko, K.-C. Tang, P.-T. Chou, Excited-state proton coupled charge transfer modulated by molecular structure and media polarization., *Chem. Soc. Rev.* 42 (2013) 1379–408.
- [104] P. Arora, H.C. Joshi, N.K. Joshi, N. Pandey, P. Pandey, S. Pant, Modulation of the fluorescence properties of 5-amino salicylic acid by triethylamine, *J. Mol. Liq.* 191 (2014) 128–136.
- [105] V.I. Tomin, A.P. Demchenko, P.-T. Chou, Thermodynamic vs. kinetic control of excited-state proton transfer reactions, *J. Photochem. Photobiol. C Photochem. Rev.* 22 (15) 1–18.
- [106] V.I. Tomin, D. V. Ushakou, Characterization of ESIPT reactions with instant spectra of fluorescence and complexation processes, *J. Lumin.* 178 (2016) 94–105.
- [107] E. Buncel, S. Rajagopal, Solvatochromism and Solvent Polarity Scales, *Acc. Chem. Res.* 23 (1990) 226–231.
- [108] T. Virgili, L. Lüer, G. Cerullo, G. Lanzani, S. Stagira, D. Coles, A.J.H.M. Meijer, D.G. Lidzey, Role of intramolecular dynamics on intermolecular coupling in cyanine dye, *Phys. Rev. B - Condens. Matter Mater. Phys.* 81 (2010) 1–6.
- [109] H.J. Queisser, Effects of Intermolecular Photophysical Processes on Fluorescence Emission, *Mol. Fluoresc.* (2012) 72–124.
- [110] V. Czikkely, H.D. Försterling, H. Kuhn, Light absorption and structure of aggregates of dye molecules, *Chem. Phys. Lett.* 6 (1970) 11–14.
- [111] F.C. Spano, Excitons in Conjugated Oligomer Aggregates, Films, and Crystals, *Annu. Rev. Phys. Chem.* 57 (2006) 217–243.

- [112] B. Heyne, Self-assembly of organic dyes in supramolecular aggregates, *Photochem. Photobiol. Sci.* 15 (2016) 1103–1114.
- [113] B.I. Shapiro, Molecular Assemblies of Polymethine Dyes, *Russ. Chem. Rev.* 75 (2006) 433–456.
- [114] G.M. Whitesides, B. Grzybowski, Self-assembly at all scales., *Science*. 295 (2002) 2418–21.
- [115] E.E. Jelley, Spectral Absorption and Fluorescence of Dyes in the Molecular State, *Nature*. 138 (1936) 1009–1010.
- [116] G. Scheibe, Die Stereoisomerie organischer Farbstoffe und ihr Zusammenhang mit Konstitution und Eigenschaften reversibel polymerer Farbstoffe, *Angew. Chemie*. 52 (1939) 631–642.
- [117] X. Chien, J. Yin, Mechanical Self-assembly in Nature, in: *Mech. Self-Assembly*, SpringerLink, 2012: pp. 1–8.
- [118] M. Boncheva, G.M. Whitesides, Making Things by Self-Assembly, *MRS Bull.* 30 (2005) 736–742.
- [119] M. Kasha, H.R. Rawls, M.A. El-Bayoumi, The Exciton Model in Molecular Spectroscopy, *Pure Appl. Chem.* 11 (1965) 371–392.
- [120] M. Kasha, The proton-transfer laser, *SPIE*. 1637 (2012) 2–8.
- [121] A.R. Hirst, B. Escuder, J.F. Miravet, D.K. Smith, High-tech applications of self-assembling supramolecular nanostructured gel-phase materials: From regenerative medicine to electronic devices, *Angew. Chemie - Int. Ed.* 47 (2008) 8002–8018.
- [122] K. Thorkelsson, P. Bai, T. Xu, Self-assembly and applications of anisotropic nanomaterials: A review, *Nano Today*. 10 (2015) 48–66.
- [123] M. Kasha, Energy Transfer Mechanisms and the Molecular Exciton Model for Molecular Energy Transfer Mechanisms and the Molecular Exciton Model for, *Radiat. Res.* 178 (2012) 27–34.
- [124] V.S. Jisha, K.T. Arun, M. Hariharan, D. Ramaiah, Site-selective interactions: Squaraine dye-serum albumin complexes with enhanced

- fluorescence and triplet yields, *J. Phys. Chem. B.* 114 (2010) 5912–5919.
- [125] B. Wang, J. Fan, S. Sun, L. Wang, B. Song, X. Peng, 1-(Carbamoylmethyl)-3H-indolium squaraine dyes: Synthesis, spectra, photo-stability and association with BSA, *Dye. Pigment.* 85 (2010) 43–50.
- [126] Y. Xu, Z. Li, A. Malkovskiy, S. Sun, Y. Pang, Aggregation control of squaraines and their use as near infrared fluorescent sensor for protein, 33.
- [127] M. Matsui, Y. Hashimoto, K. Funabiki, J.Y. Jin, T. Yoshida, H. Minoura, Application of near-infrared absorbing heptamethine cyanine dyes as sensitizers for zinc oxide solar cell, *Synth. Met.* 148 (2005) 147–153.
- [128] S.K. Yen, D. Jańczewski, J.L. Lakshmi, S. Bin Dolmanan, S. Tripathy, V.H.B. Ho, V. Vijayaragavan, A. Hariharan, P. Padmanabhan, K.K. Bhakoo, T. Sudhakaran, S. Ahmed, Y. Zhang, S. Tamil Selvan, Design and synthesis of polymer-functionalized NIR fluorescent dyes-magnetic nanoparticles for bioimaging, *ACS Nano.* 7 (2013) 6796–6805.
- [129] H. Bürckstümmer, Merocyanine Dyes for Solution-Processed Organic Bulk-Heterojunction Solar Cells, PhD Thesis. (2011).
- [130] A. Connell, P.J. Holliman, M.L. Davies, C.D. Gwenin, S. Weiss, M.B. Pitak, P.N. Horton, J. Coles, dyes for dye-sensitized solar cells, (2014) 4055–4
- [131] T.F.A. De Greef, M.M.J. Smulders, M. Wolfs, A.P.H.J. Schenning, R.P. Sijbesma, E.W. Meijer, Supramolecular polymerization, *Chem. Rev.* 109 (2009) 5687–5754.
- [132] Z. Chen, A. Lohr, C.R. Saha-Möller, F. Würthner, Self-assembled π -stacks of functional dyes in solution: structural and thermodynamic features, *Chem. Soc. Rev.* 38 (2009) 564–584.
- [133] R.B. Martin, Comparisons of Indefinite Self-Association Models, *Chem. Rev.* 96 (1996) 3043–3064.
- [134] C. Shao, M. Grüne, M. Stolte, F. Würthner, Perylene bisimide dimer aggregates: Fundamental insights into self-assembly by NMR and UV/vis spectroscopy, *Chem. A Eur. J.* 18 (2012) 13665–13677.

- [135] F. Würthner, S. Yao, T. Debaerdemaeker, R. Wortmann, Dimerization of merocyanine dyes. Structural and energetic characterization of dipolar dye aggregates and implications for nonlinear optical materials, *J. Am. Chem. Soc.* 124 (2002) 9431–9447.
- [136] Y.C. Yang, J.R. Ward, R.P. Seiders, Dimerization of Cobalt (II) Tetrasulfonated Phthalocyanine in Water and Aqueous Alcoholic Solutions, *Inorg. Chem.* 24 (1985) 1765–1769.
- [137] D. Görl, F. Würthner, Entropically Driven Self-Assembly of Bolaamphiphilic Perylene Dyes in Water, *Angew. Chemie - Int. Ed.* 55 (2016) 12094–12098.
- [138] G. Fernández, M. Stolte, V. Stepanenko, F. Würthner, Cooperative supramolecular polymerization: Comparison of different models applied on the self-assembly of bis(merocyanine) dyes, *Chem. A Eur. J.* 19 (2013) 206–217.
- [139] U. Mayerhöffer, F. Würthner, Cooperative self-assembly of squaraine dyes, *Chem. Sci.* 3 (2012) 1215–1520.
- [140] J. Gershberg, F. Fennel, T.H. Rehm, S. Lochbrunner, F. Würthner, Anti-cooperative supramolecular polymerization: a new $K_2 - K$ model applied to the self-assembly of perylene bisimide dye proceeding *via* well-defined hydrogen-bonded dimers, *Chem. Sci.* 7 (2016) 1729–1737.
- [141] L.A. Marky, K.J. Breslauer, Calculating thermodynamic data for transitions of any molecularity from equilibrium melting curves, *Biopolymers.* 26 (1987) 1601–1620.
- [142] J.J. Apperloo, A.J. Janseen, P.R.L. Malenfant, J.M.L. Fréchet, Concentration-Dependent Thermochromism and Supramolecular Aggregation in Solution of Triblock Copolymers Based on Lengthy Oligothiophene Cores and Poly(benzyl ether) Dendrons, *Macromolecules.* 33 (2000) 7038–7043.
- [143] B. Valeur, M.N. Berberan- Santos, Structural Effects on Fluorescence Emission, *Mol. Fluoresc.* (2012) 75–107.
- [144] B. Valeur, M.N. Berberan- Santos, Environmental Effects on Fluorescence

- Emission, in: *Mol. Fluoresc. Princ. Appl.*, Wiley-VHC, 2012: pp. 109–140.
- [145] Q. Liu, X. Hong Su, L. Ying Wang, W. Sun, Y. Bo Lei, Z. Yi Wen, An OFF-ON-OFF type of pH fluorescent sensor: Benzo[c,d]indole-based dimethine cyanine dye-synthesis, spectral properties and density functional theory studies, *J. Lumin.* 154 (2014) 124–130.
- [146] M.E. Cooper, S. Gregory, E. Adie, S. Kalinka, pH-Sensitive Cyanine Dyes for Biological Applications, 12 (2002) 3–7.
- [147] ThermoFischer, The Molecular Probes® Handbook Molecular Probes™ - Their Amine-Reactive Fluorophores and Derivatives Their Derivatives, 11th ed., 2010.
- [148] P.R. Callis, Binding phenomena and fluorescence quenching. II: Photophysics of aromatic residues and dependence of fluorescence spectra on protein conformation, *J. Mol. Struct.* 1077 (2014) 22–29.
- [149] J. R. Lakowicz, *Topics in Fluorescence Spectroscopy, Volume 6 - Protein Fluorescence*, First Ed., Springer, 2002.
- [150] M. Van De Weert, L. Stella, Fluorescence quenching and ligand binding: A critical discussion of a popular methodology, *J. Mol. Struct.* 998 (2011) 145–150.
- [151] M.R. Eftink, C.A. Ghiron, Fluorescence quenching studies with proteins, *Anal. Biochem.* 114 (1981) 199–227.
- [152] Z. Lakos, *New Trends in Photobiology Protein dynamics and fluorescence*, 18 (1993) 3–16.
- [153] T. Peters, A.J. Stewart, Albumin research in the 21st century, *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1830 (2013) 5351–5353.
- [154] A.A. Naddaf, I. Tsibranska, H.J. Bart, Kinetics of BSA release from poly(N-isopropylacrylamide) hydrogels, *Chem. Eng. Process. Process Intensif.* 49 (2010) 581–588.
- [155] J.A. Molina-Bolívar, F. Galisteo-González, C. Carnero Ruiz, M. Medina-O'Donnell, A. Parra, Spectroscopic investigation on the interaction of maslinic

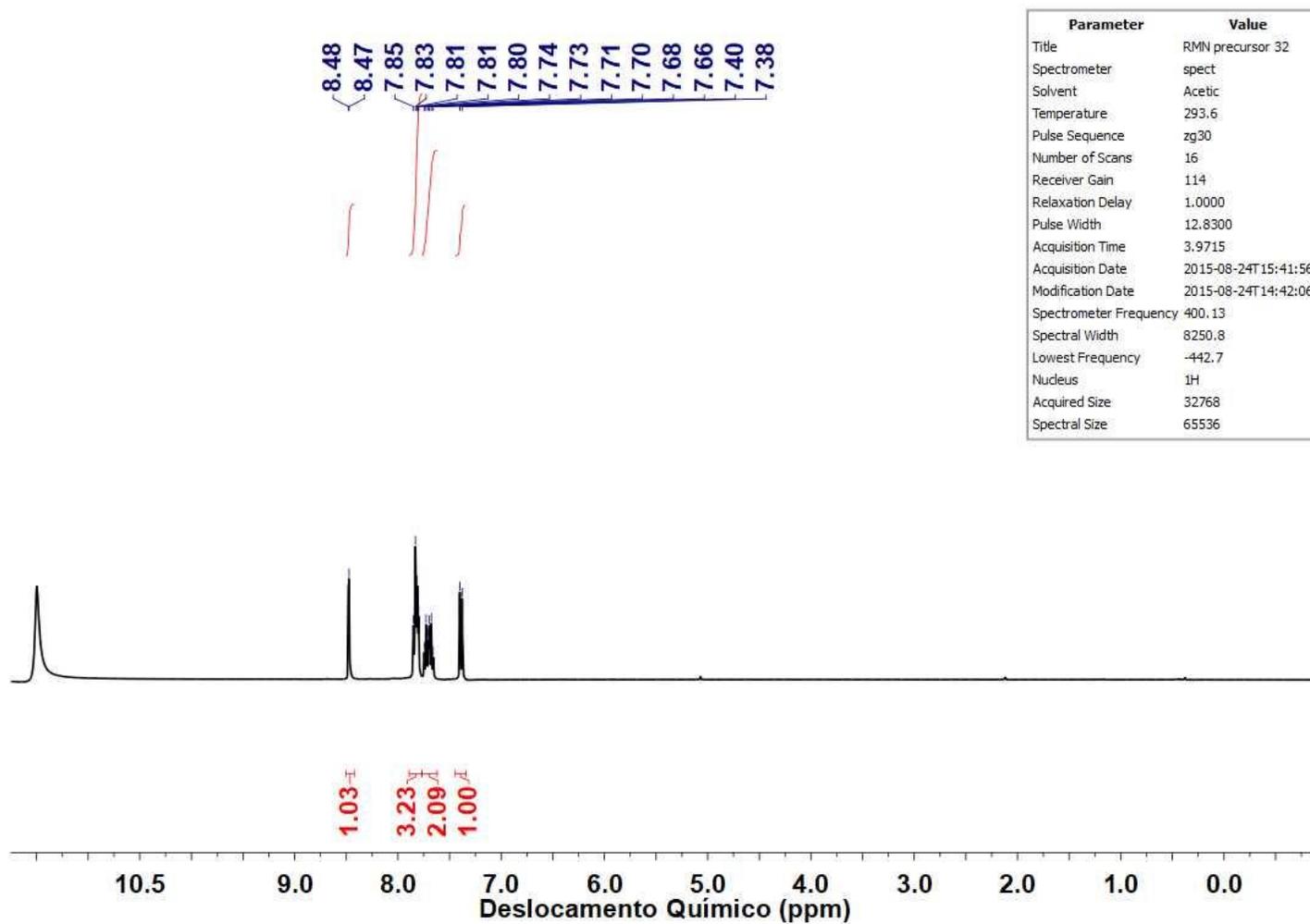
- acid with bovine serum albumin, *J. Lumin.* 156 (2014) 141–149.
- [156] F.L. Cui, J.L. Wang, Y.R. Cui, J.P. Li, Fluorescent investigation of the interactions between N-(p-chlorophenyl)-N-(1-naphthyl) thiourea and serum albumin: Synchronous fluorescence determination of serum albumin, *Anal. Chim. Acta.* 571 (2006) 175–183.
- [157] Y. Xu, A. Malkovskiy, Y. Pang, A graphene binding-promoted fluorescence enhancement for bovine serum albumin recognition., *Chem. Commun.* 47 (2011) 6662–6664.
- [158] E. Bucci, R.F. Steiner, Anisotropy decay of fluorescence as an experimental approach to protein dynamics., *Biophys. Chem.* 30 (1988) 199–224.
- [159] J. Thomas, D.B. Sherman, T.J. Amiss, S. a Andaluz, J.B. Pitner, Synthesis and biosensor performance of a near-IR thiol-reactive fluorophore based on benzothiazolium squaraine., *Bioconjug. Chem.* 18 (2007) 1841–1846.
- [160] K.D. Volkova, V.B. Kovalska, M.Y. Losytsky, L. V. Reis, P.F. Santos, P. Almeida, D.E. Lynch, S.M. Yarmoluk, Aza-substituted squaraines for the fluorescent detection of albumins, *Dye. Pigment.* 90 (2011) 41–47.
- [161] J. Pauli, R. Brehm, M. Grabolle, T. Behnke, J. Mathejczyk, F. Hamann, F. Alves, D.- Jena, Dye-Biomolecule Conjugates and NIR-Fluorescent Particles for Targeting of Disease-related Biomarkers, *Proc. SPIE.* 7910 (2011) 1–15.
- [162] W. Bujalowski, M.J. Jezewska, Quantitative thermodynamic analyses of spectroscopic titration curves, *J. Mol. Struct.* 1077 (2014) 40–50.
- [163] A. Mallick, P. Purkayastha, N. Chattopadhyay, Photoprocesses of excited molecules in confined liquid environments : An overview, *J. Photochem. Photobiol. C Photochem. Rev.* 8 (2007) 109–127.
- [164] P.R. Callis, Binding phenomena and fluorescence quenching. I: Descriptive quantum principles of fluorescence quenching using a supermolecule approach, *J. Mol. Struct.* 1077 (2014) 14–21.
- [165] B. Valeur, M.N. Berberan- Santos, Effects of Intermolecular Photophysical

- Processes on Fluorescence Emission, in: *Mol. Fluoresc. Princ. Appl.*, 2nd ed., Wiley-VHC, 2012: pp. 141–179.
- [166] M. Ahumada, E. Lissi, A.M. Montagut, F. Valenzuela-Henríquez, N.L. Pacioni, E.I. Alarcon, Association models for binding of molecules to nanostructures, *Analyst*. 142 (2017) 2067–2089.
- [167] J. Kuśba, V. Bogdanov, I. Gryczynski, J.R. Lakowicz, Theory of light quenching: effects of fluorescence polarization, intensity, and anisotropy decays, *Biophys. J.* 67 (1994) 2024–2040.
- [168] G.K. Rollefson, R.W. Stoughton, The Nature of the Quenching The Quenching of Fluorescence in Solution Process, *J. Am. Chem. Soc.* 63 (1941) 1517–1520.
- [169] M. Van De Weert, Fluorescence quenching to study protein-ligand binding: Common errors, *J. Fluoresc.* 20 (2010) 625–629.
- [170] H. Boaz, G.K. Rollefson, The Quenching of Fluorescence. Deviations from the Stern-Volmer Law, *J. Am. Chem. Soc.* 72 (1950) 3435–3443.
- [171] J. Keizer, Nonlinear Fluorescence Quenching and the Origin of Positive Curvature in Stern-Volmer Plots, *J. Am. Chem. Soc.* 105 (1983) 1494–1498.
- [172] J.A. Molina-Bolívar, C.C. Ruiz, F. Galisteo-González, M. Medina-Ó Donnell, A. Parra, Simultaneous presence of dynamic and sphere action component in the fluorescence quenching of human serum albumin by diphtaloylmaslinic acid, *J. Lumin.* 178 (2016) 259–266.
- [173] B.G. Evale, S.M. Hanagodimath, Static and dynamic quenching of biologically active coumarin derivative by aniline in benzeneacetonitrile mixtures, *J. Lumin.* 130 (2010) 1330–1337.
- [174] E. Lissi, E. Abuin, On the Evaluation of the Number of Binding Sites in Proteins from Steady State Fluorescence Measurements, *J. Fluoresc.* (2011) 1831–1833.
- [175] M. Kubista, R. Sjöback, S. Eriksson, B. Albinsson, Experimental correction for the inner-filter effect in fluorescence spectra, *Analyst*. 119 (1994) 417–

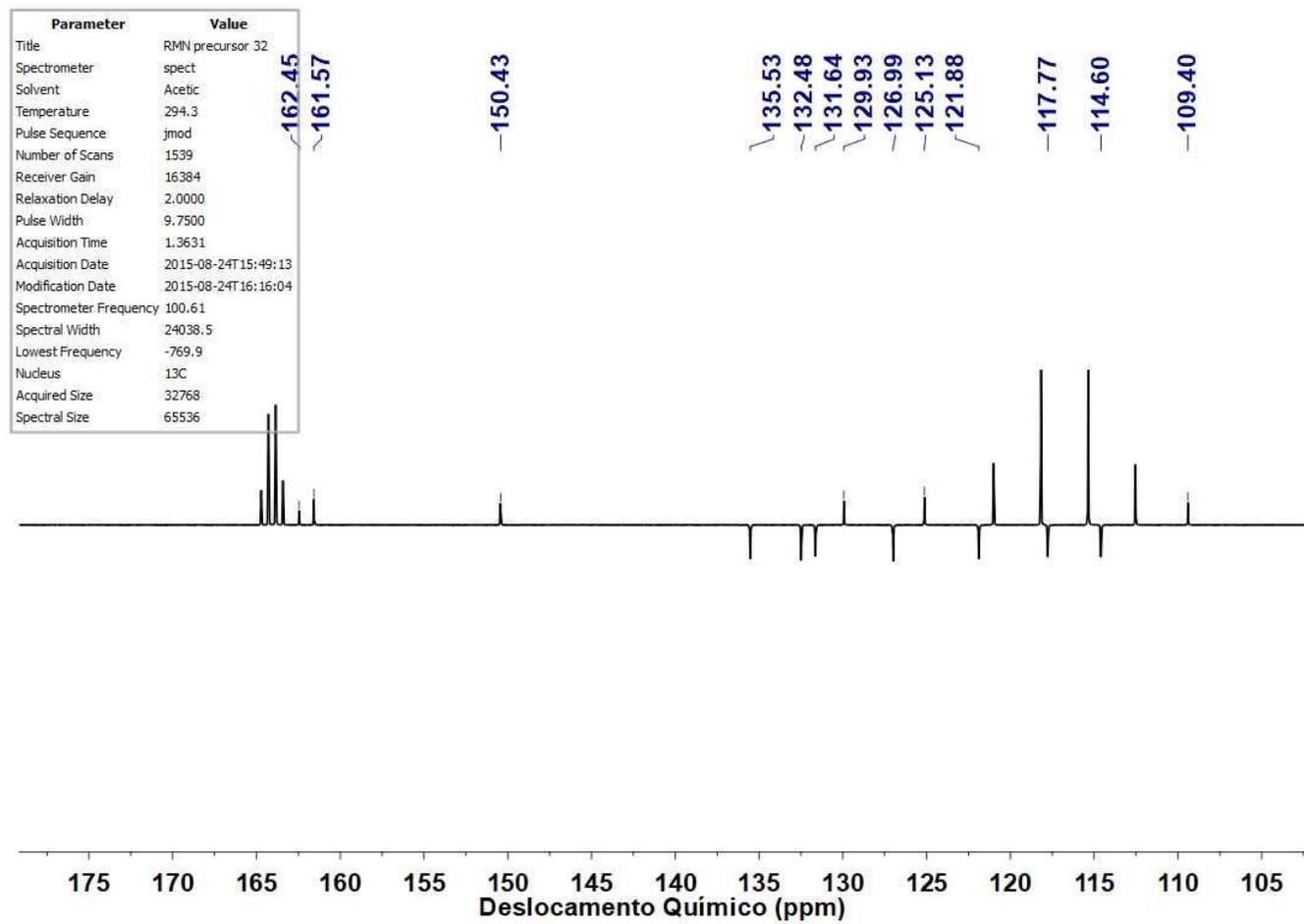
419.

- [176] T. Wang, L.H. Zeng, D.L. Li, A review on the methods for correcting the fluorescence inner-filter effect of fluorescence spectrum, *Appl. Spectrosc. Rev.* 52 (2017) 883–908.
- [177] Y.-H. So, J.P. Heeschen, Mechanism of Polyphosphoric Acid and Phosphorous Pentoxide - Methanesulfonic Acid as Synthetic Reagents for Benzoxazole Formation, *J. Org. Chem.* (1997) 3552–3561.
- [178] N.T. Fernando, *Novel Near-Infrared Cyanine Dyes for Fluorescence Imaging in Biological Systems*, Georgia State University, 2011.
- [179] R. Silverstein, F. Webster, K. David J., *Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos*, 3rd ed., LTC, 1987.
- [180] L.J. Bellamy, *The Infrared Spectra of Complex Molecules Volume I*, Springer, 1975.
- [181] L.J. Bellamy, *The Infrared Spectra of Complex Molecules Volume II*, Springer, 1980.
- [182] M.P. De Abreu, A.D.C. Nunes, F.L. Coelho, L.F. Campo, Highly conjugated streptocyanine-ESIPT dyes via Vilsmeier-Haack reagent, *J. Lumin.* 213 (2019) 98–107.

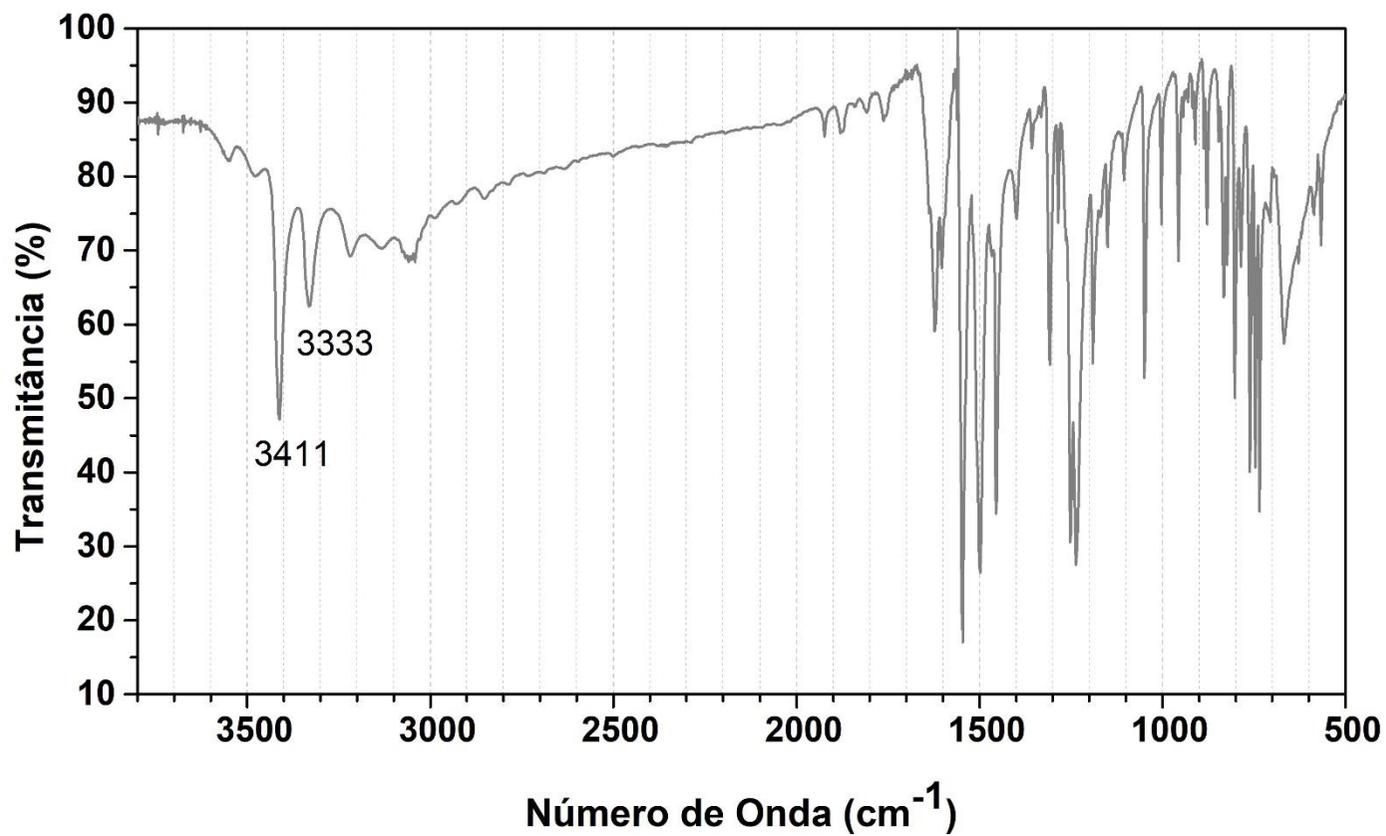
Anexos



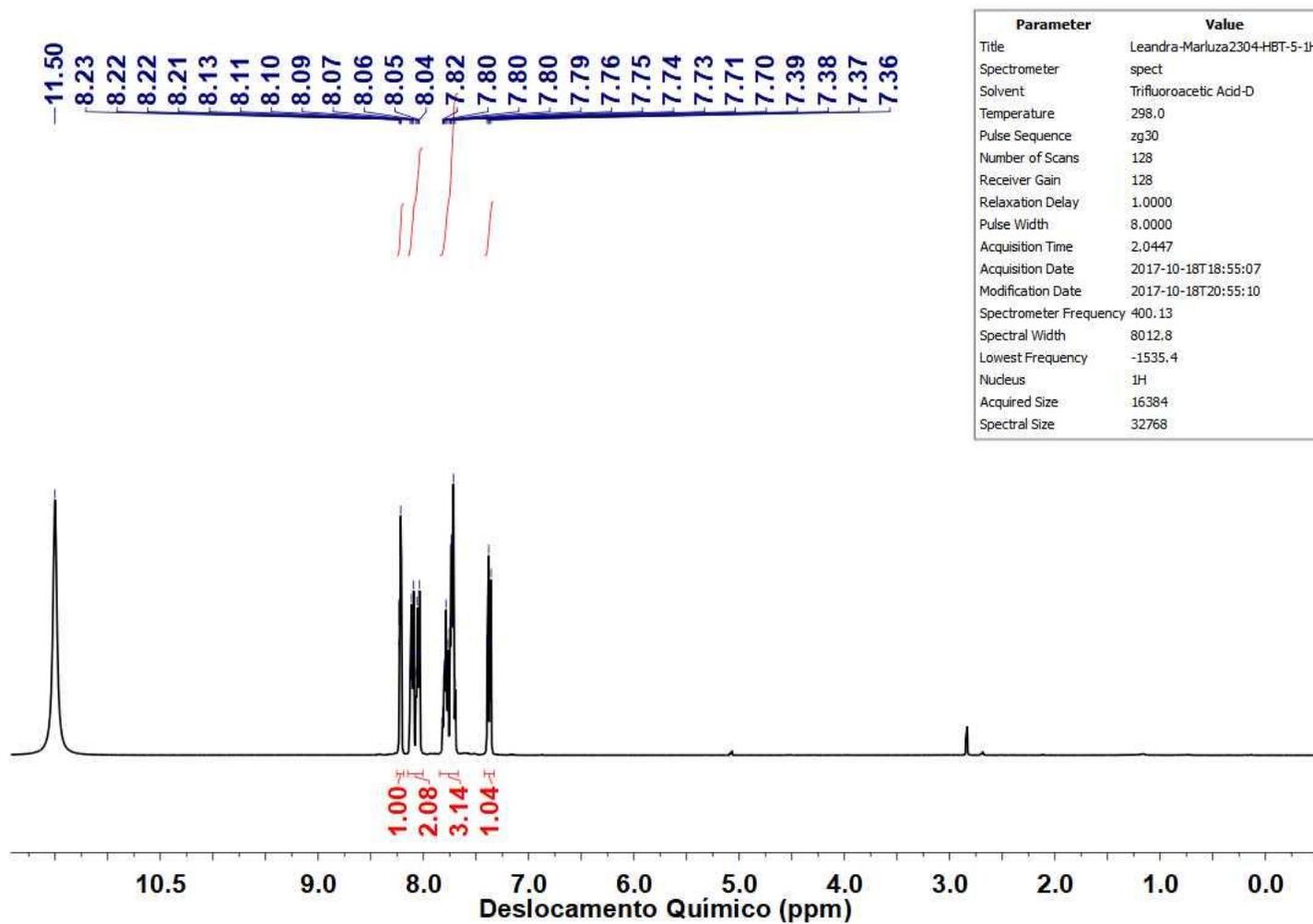
Anexo 1: Espectro de ¹H-RMN (400 MHz) em ATF-d para **86**.



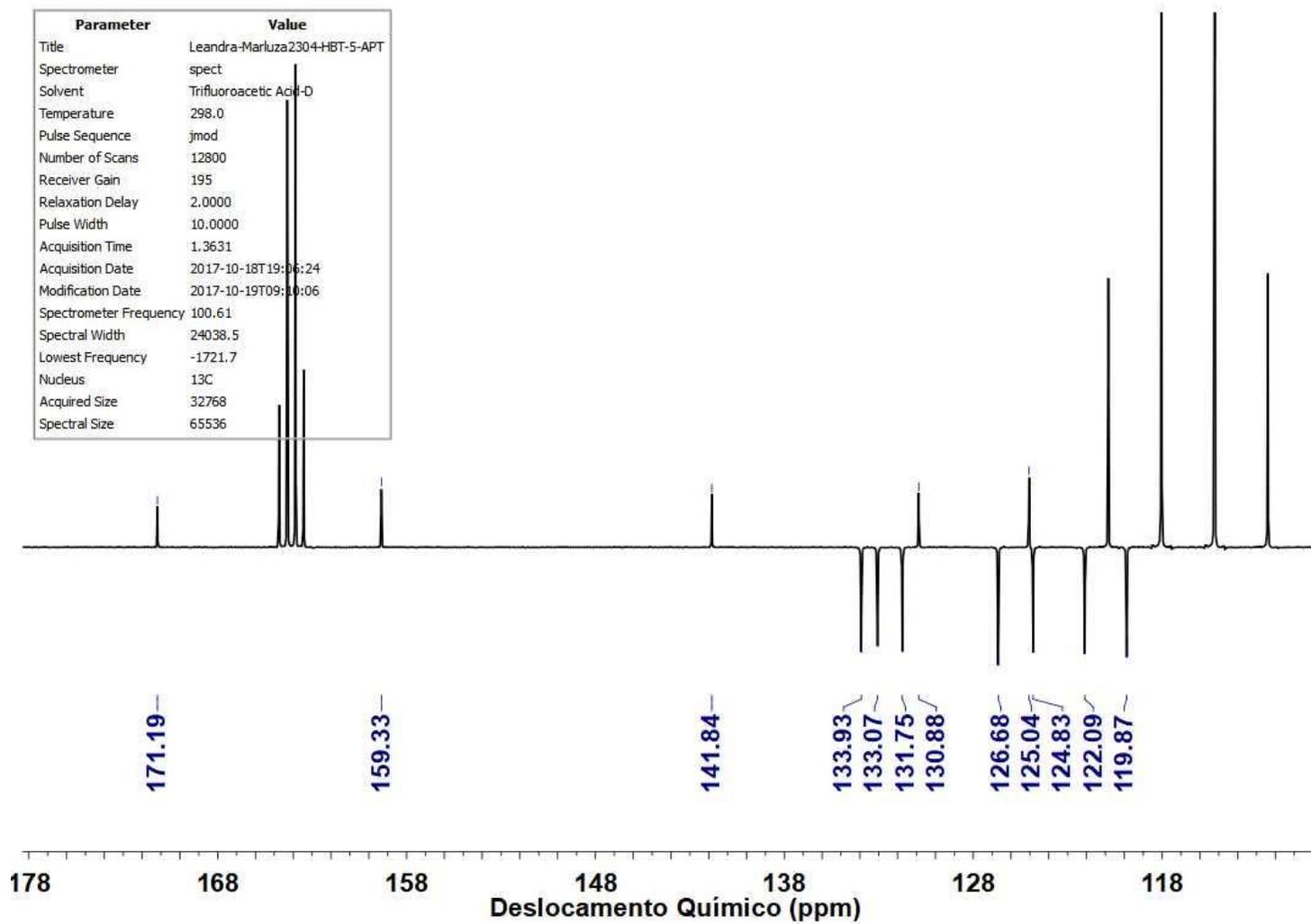
Anexo 2: Espectro de ¹³C-RMN (100 MHz) em ATF-d para **86**



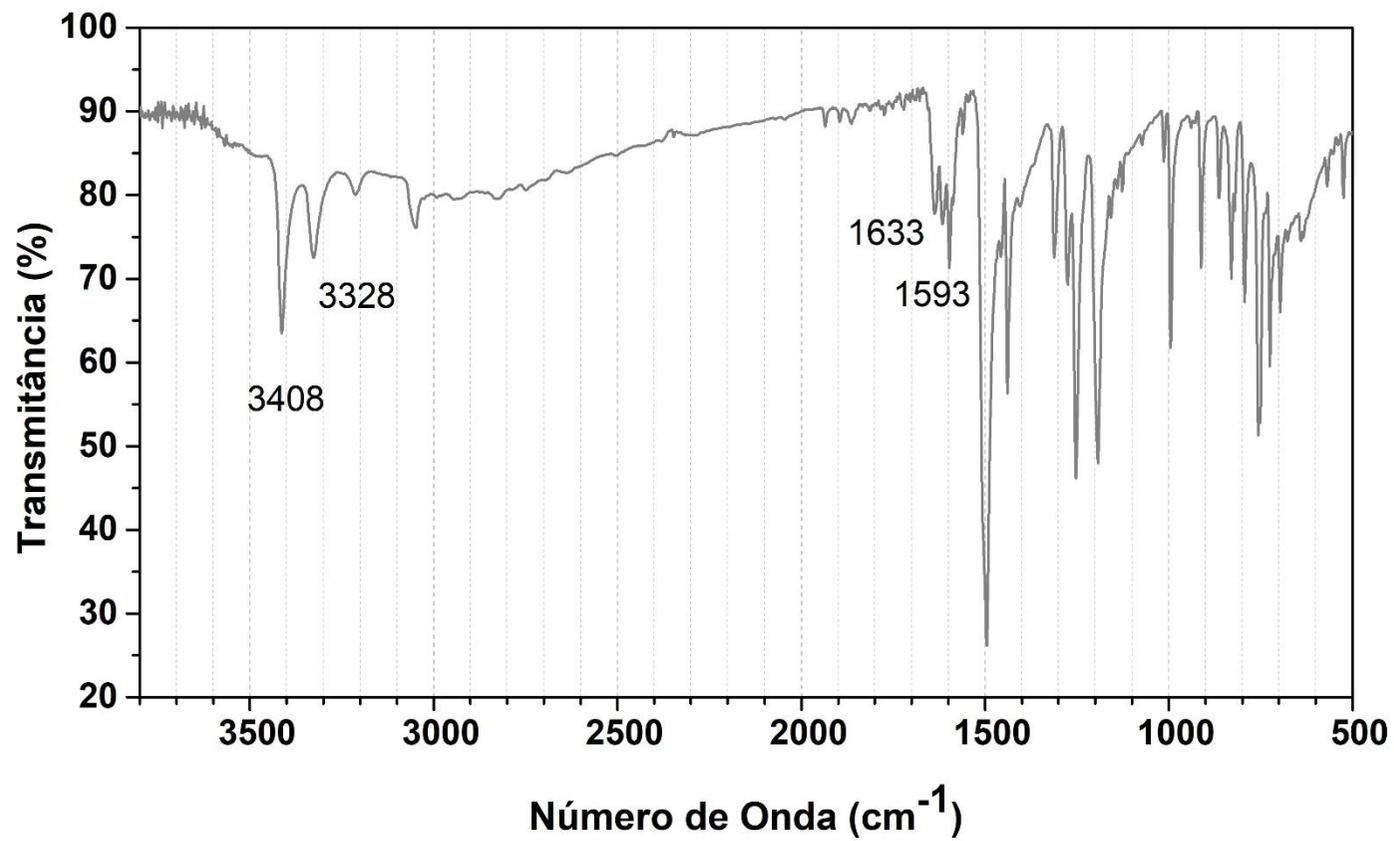
Anexo 3: Espectro de FT-IV em pastilha de KBr para **86**.



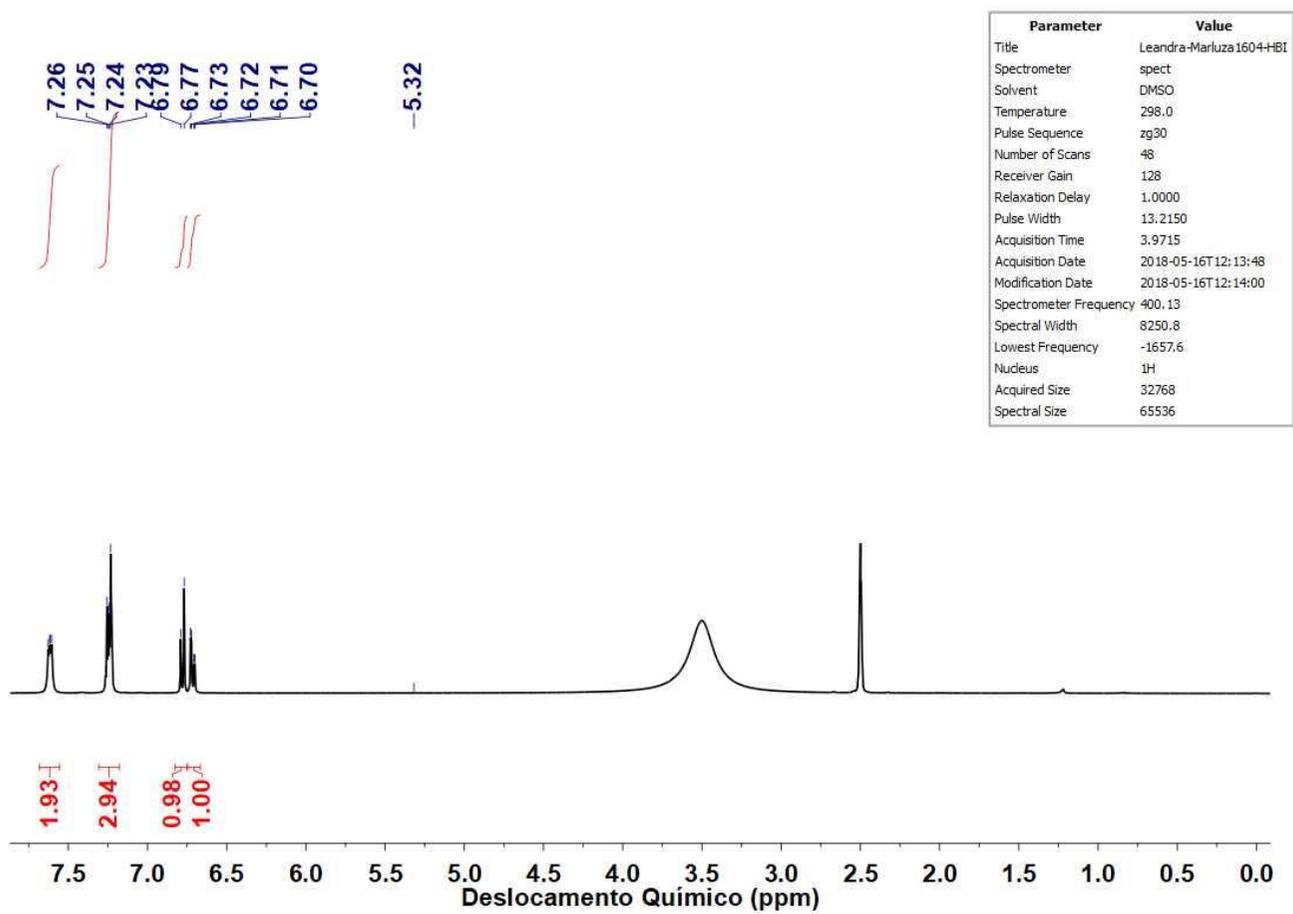
Anexo 4: Espectro de ¹H-RMN (400 MHz) em ATF-d para **87**.



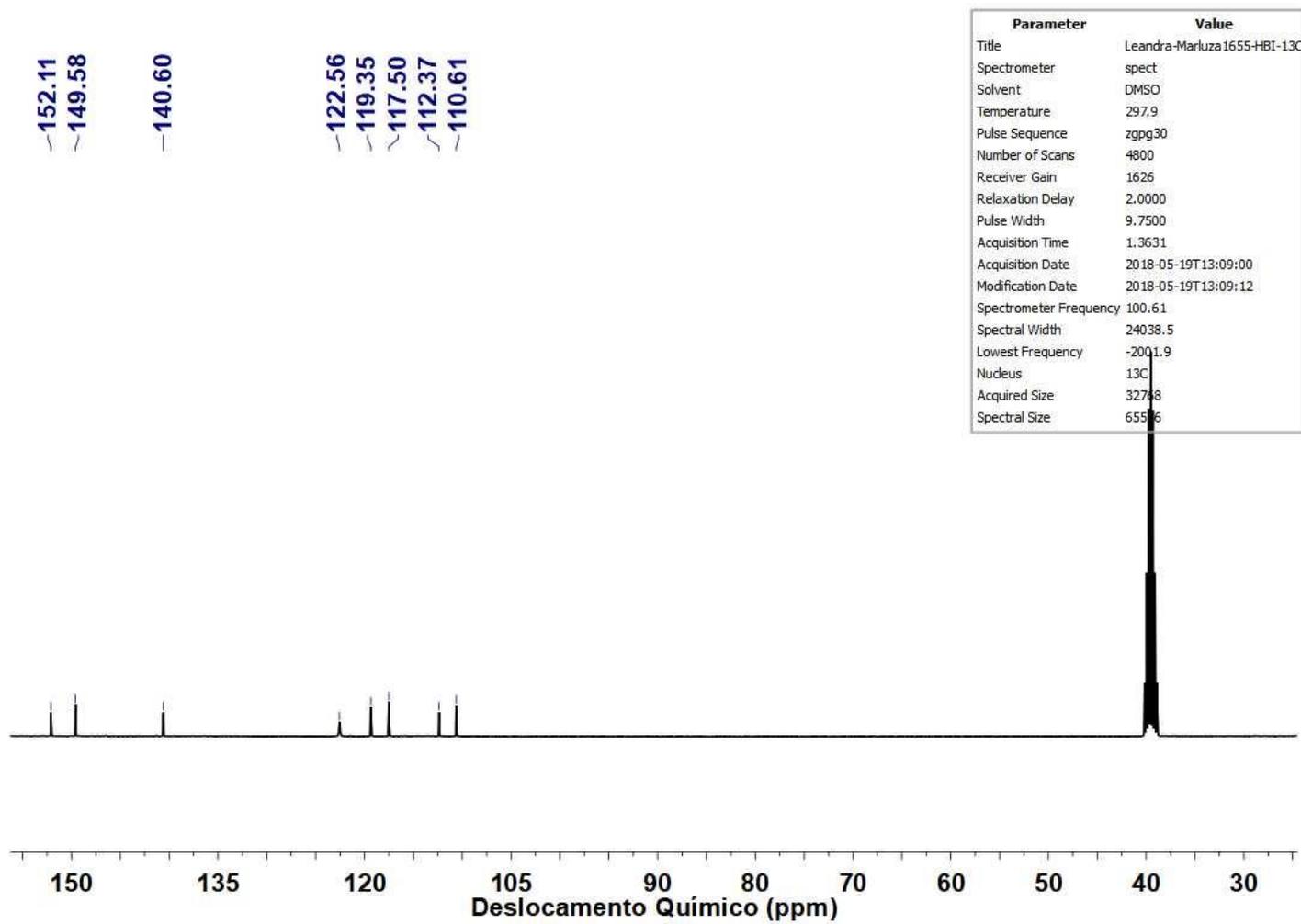
Anexo 5: Espectro de ¹³C-RMN (100 MHz) em ATF-d para **87**.



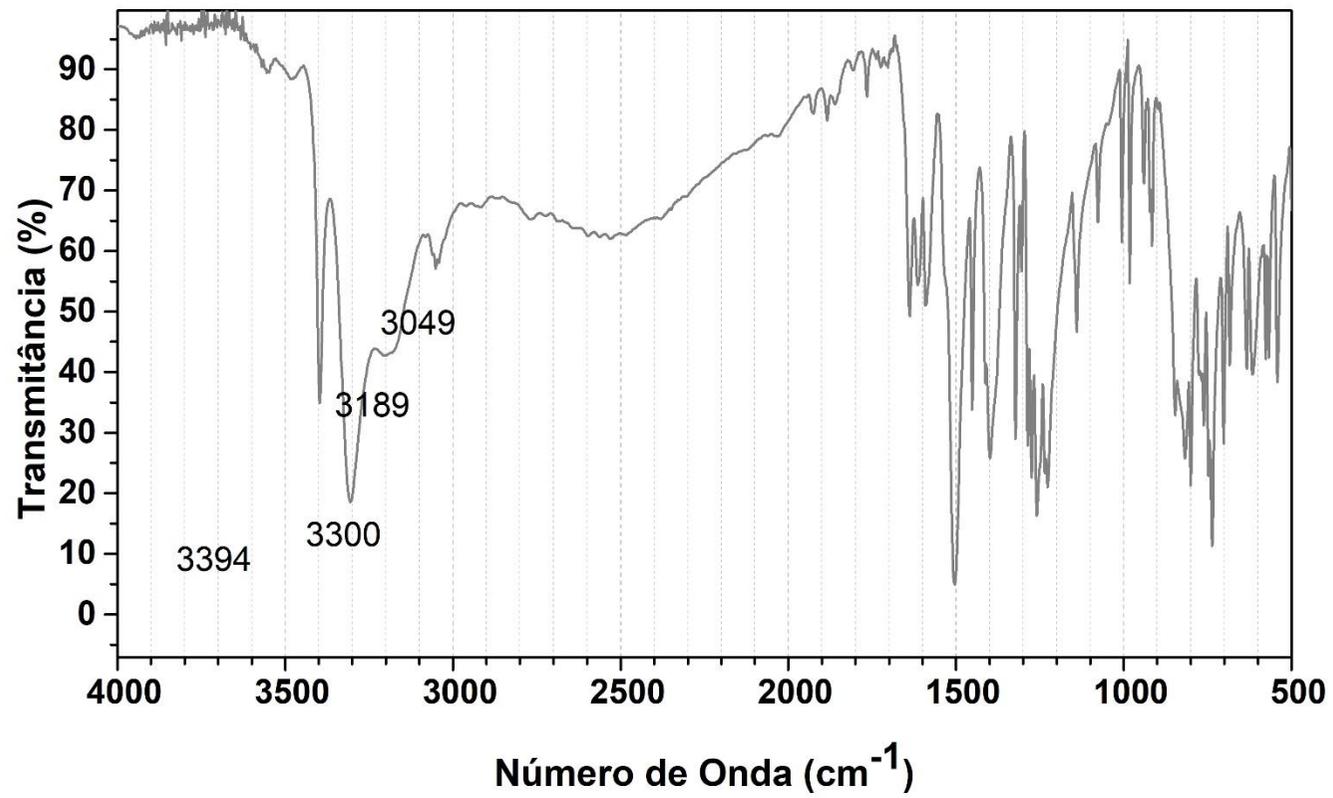
Anexo 6: Espectro de FT-IV em pastilha de KBr para **87**.



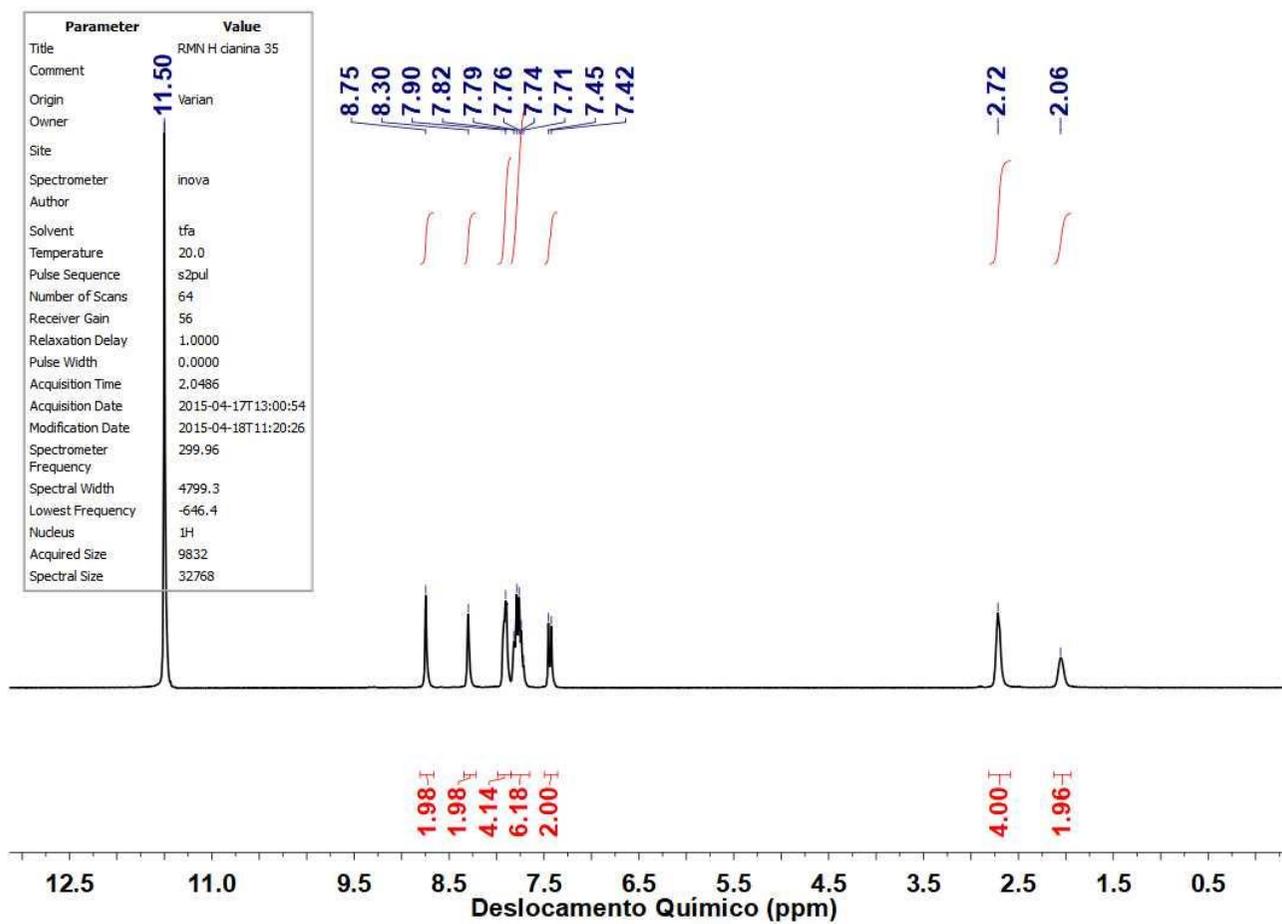
Anexo 7: Espectro de ¹H-RMN (400 MHz) em DMSO-d₆ para **88**.



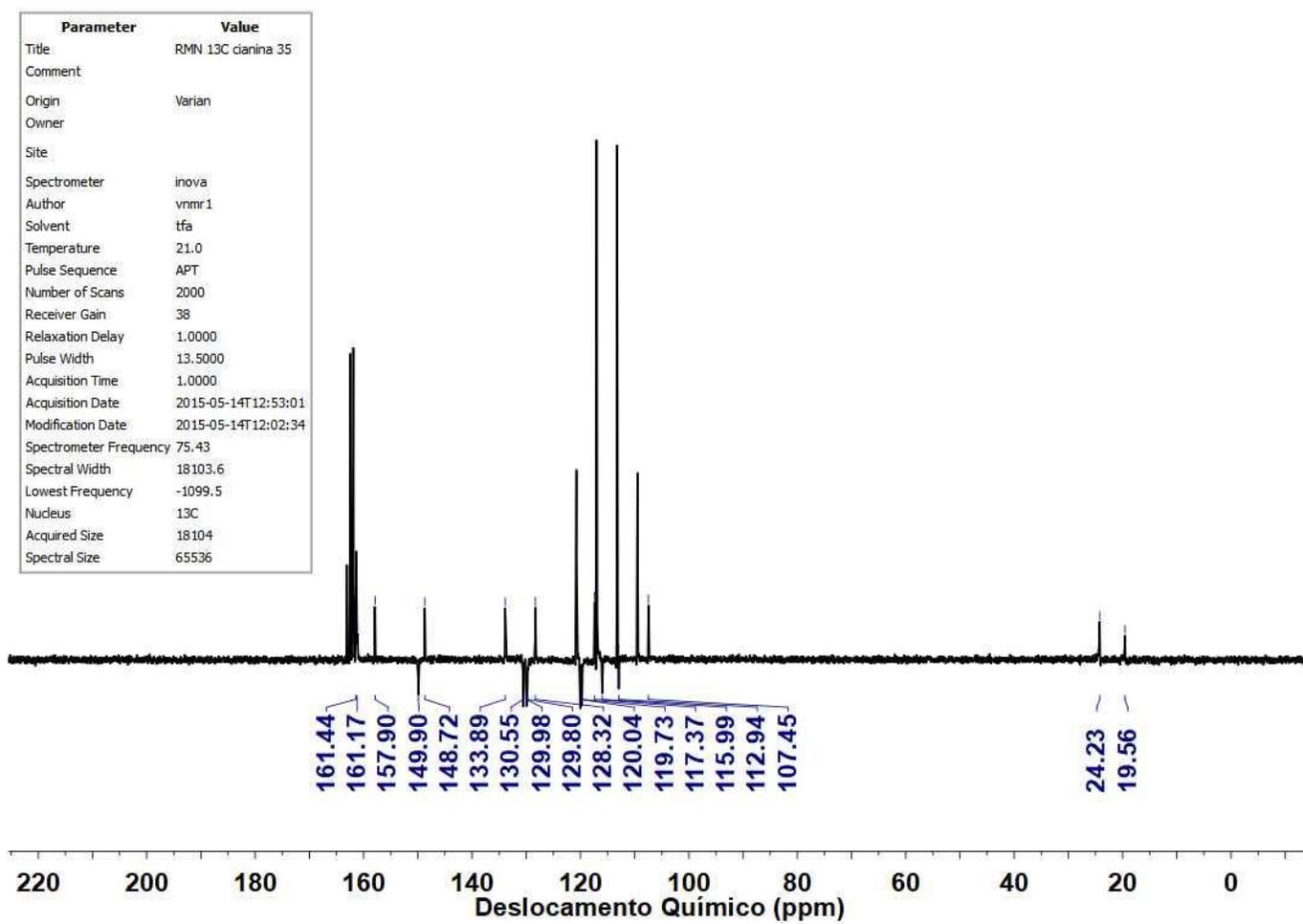
Anexo 8: Espectro de ^{13}C -RMN (100 MHz) em ATF-d para **88**.



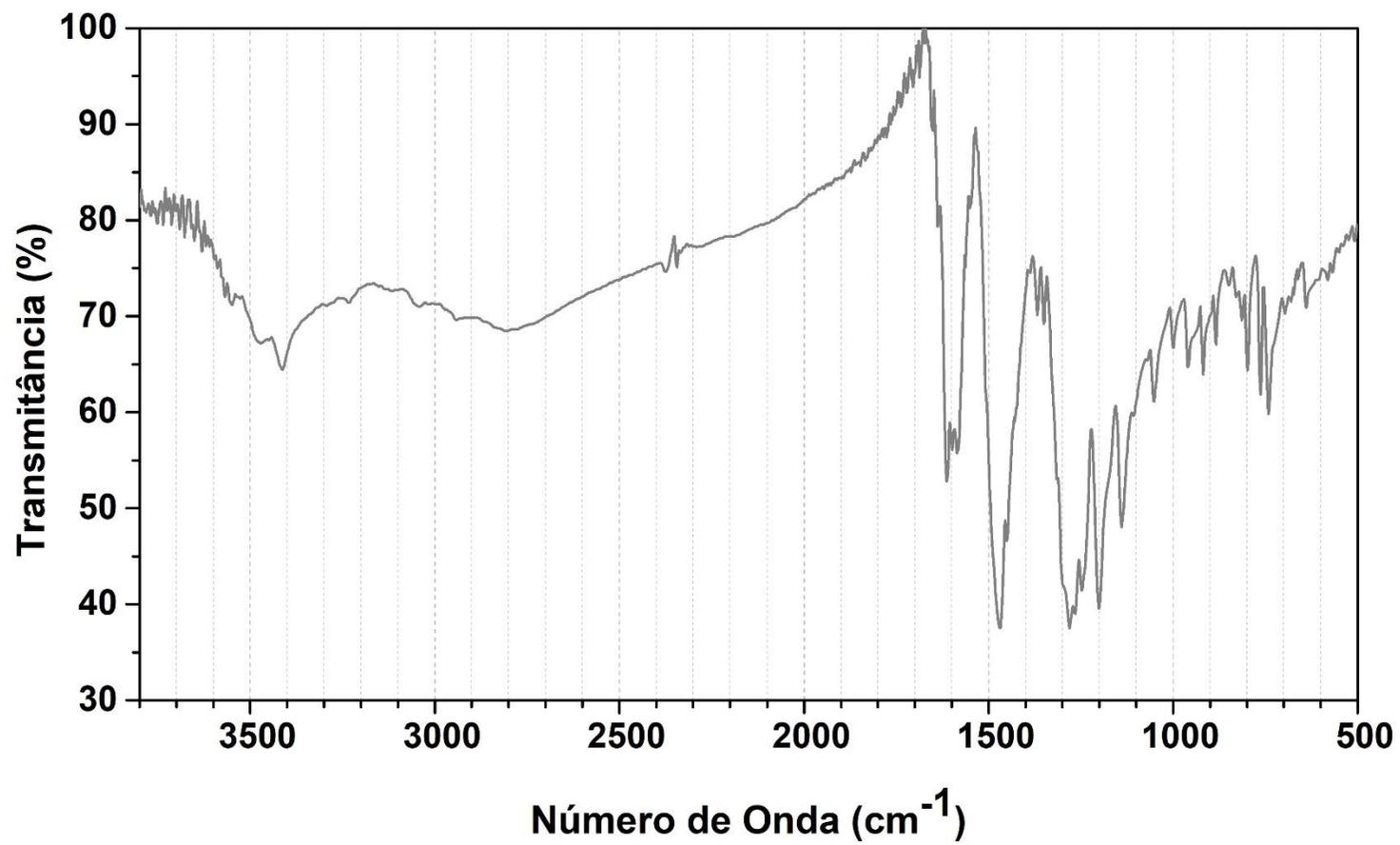
Anexo 9: Espectro de FT-IV em pastilha de KBr para **88**.



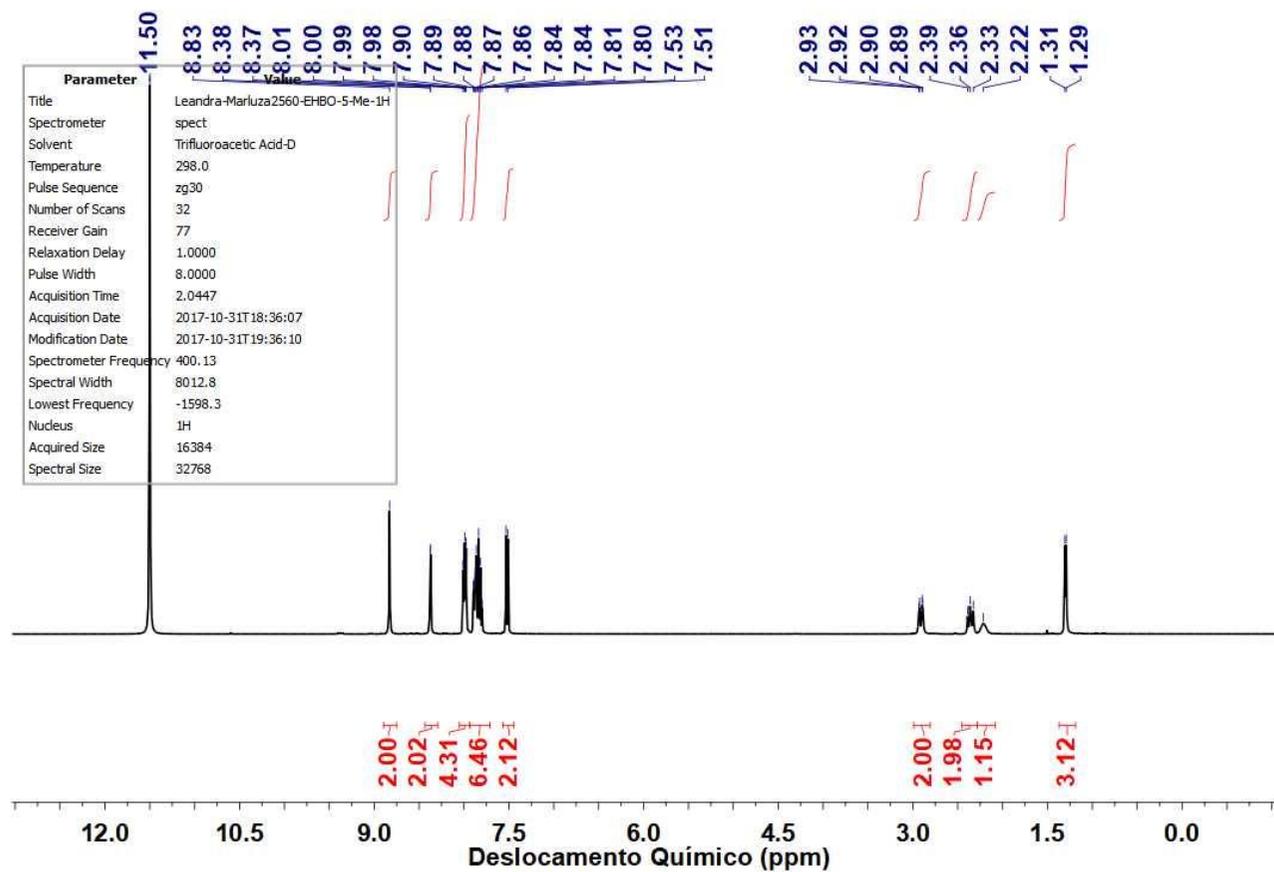
Anexo 10: Espectro de 1H-RMN (300 MHz) em ATF-d para 19.



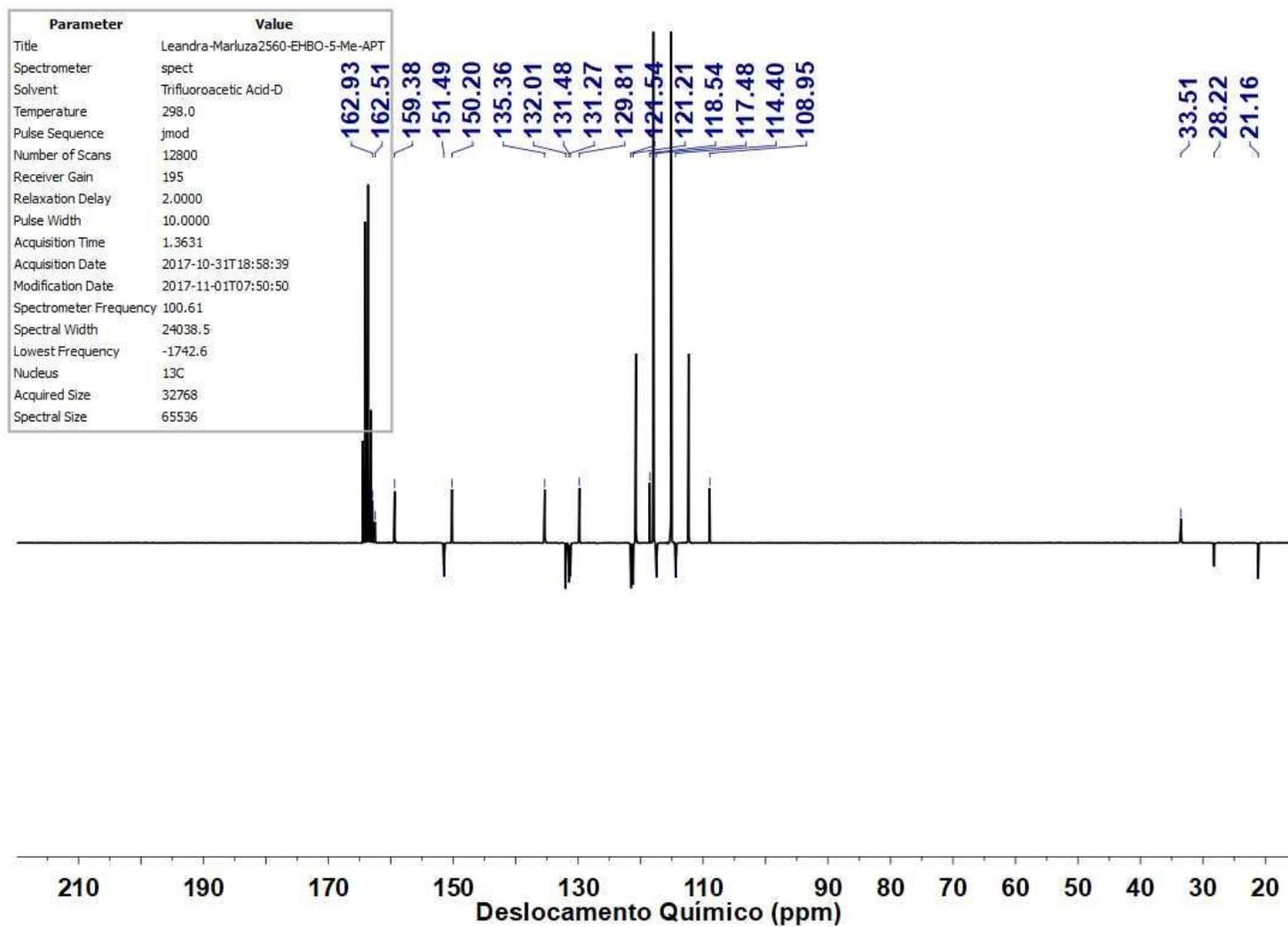
Anexo 11: Espectro de 13C-RMN (75,5 MHz) em ATF-d para 19.



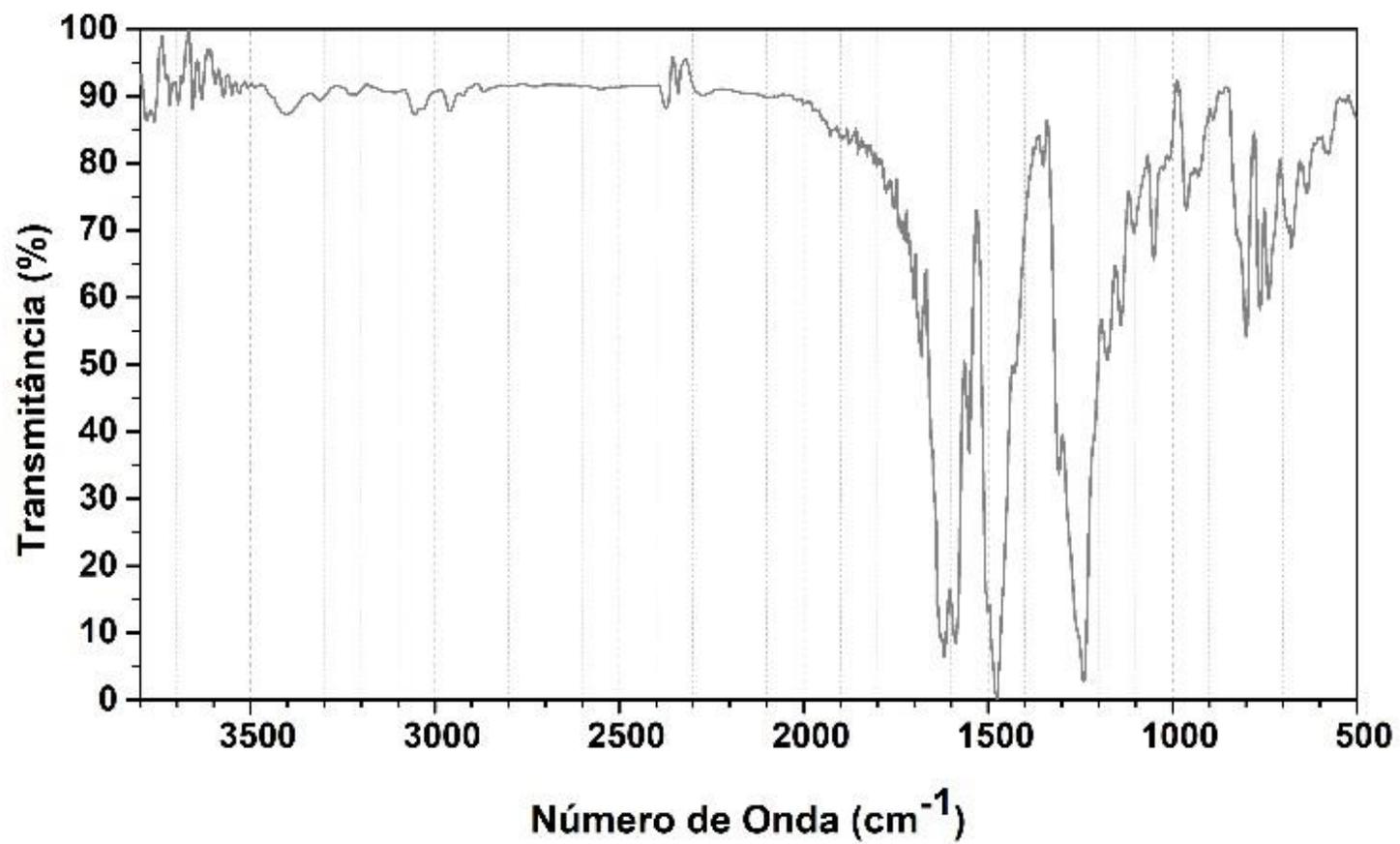
Anexo 12: Espectro de FT-IV em pastilha de KBr para 19.



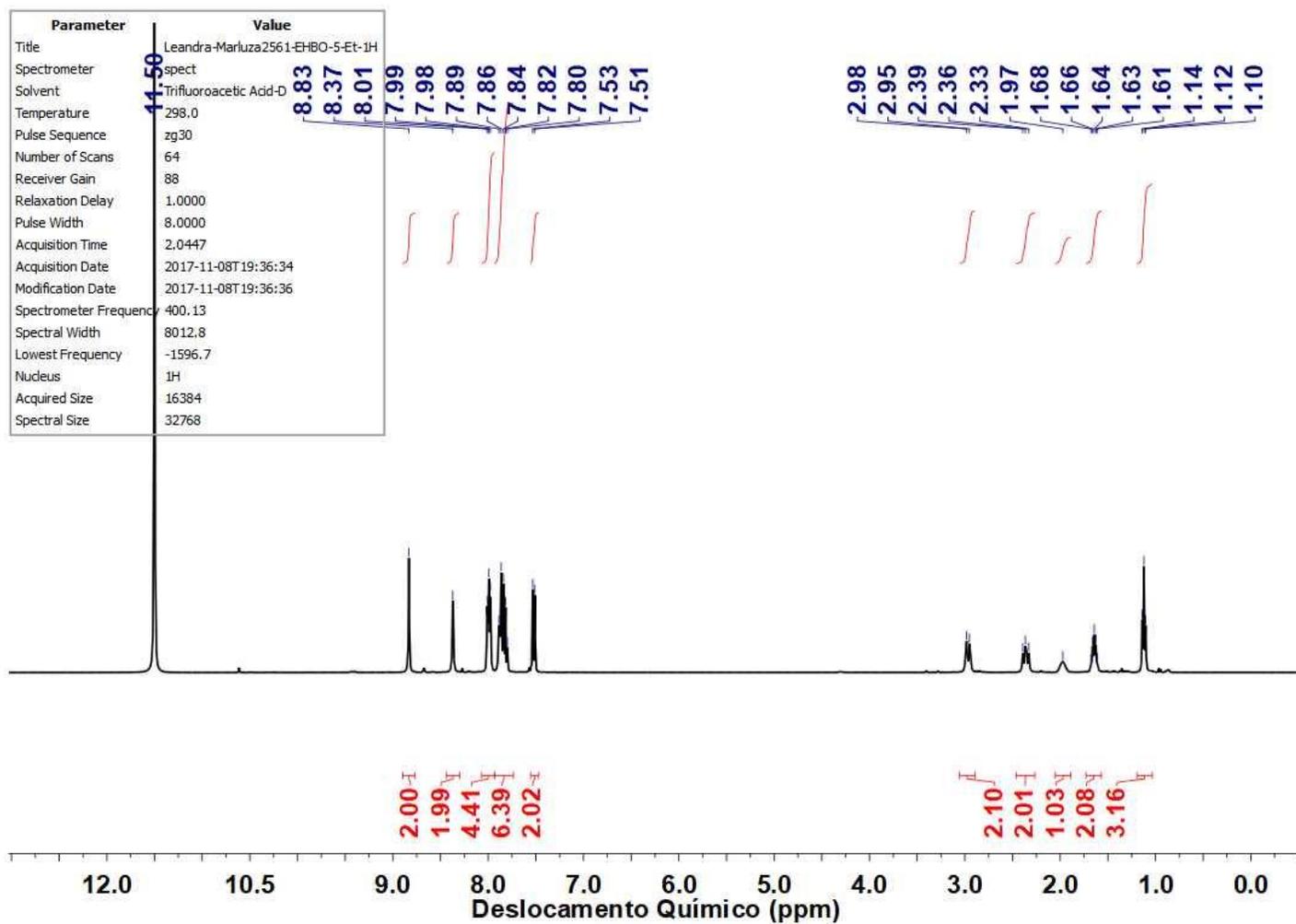
Anexo 13: Espectro de 1H-RMN (400 MHz) em ATF-d para **20**.



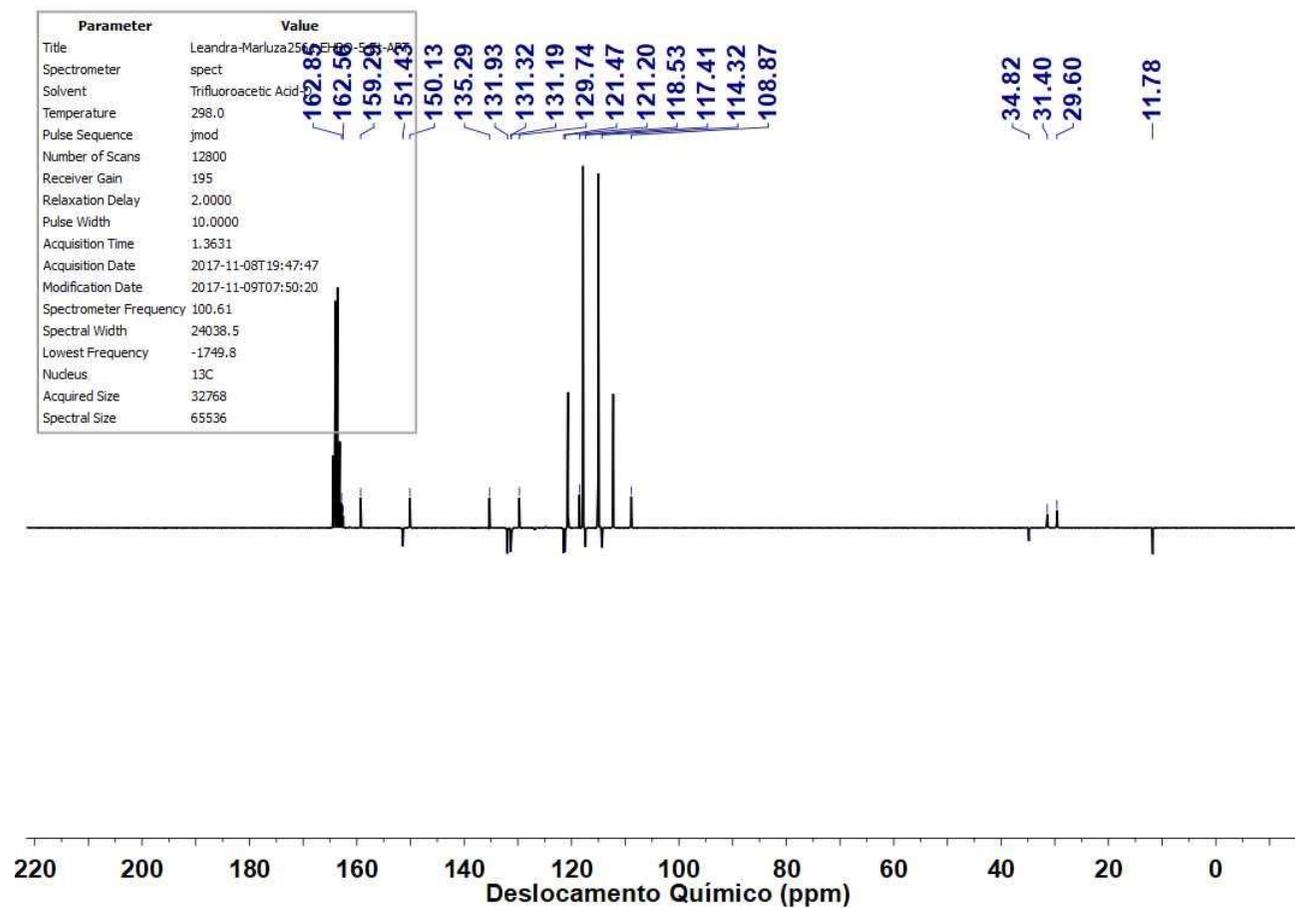
Anexo 14: Espectro de ¹³C-RMN (100 MHz) em ATF-d para 20.



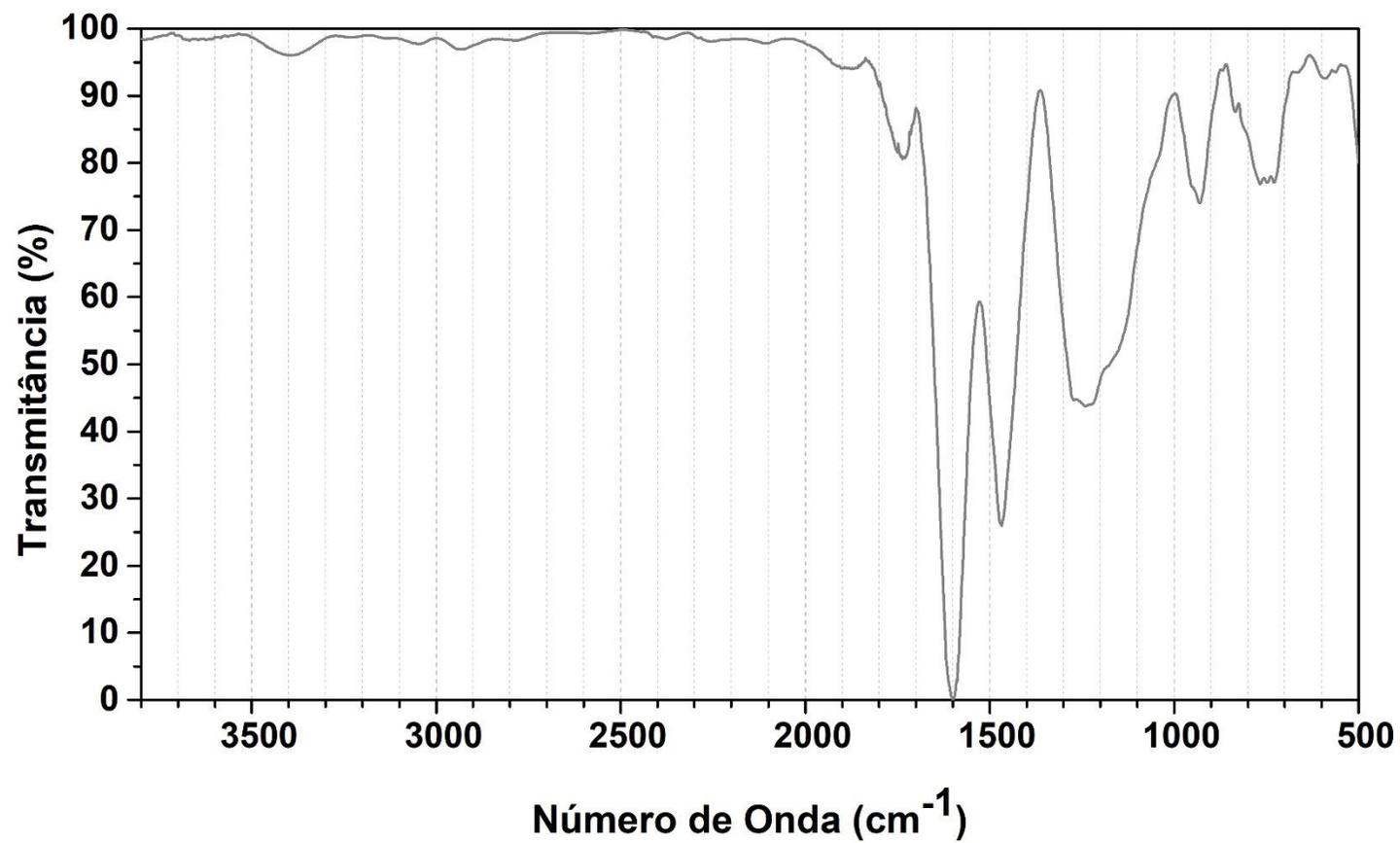
Anexo 15: Espectro de FT-IV em pastilha de KBr para **20**.



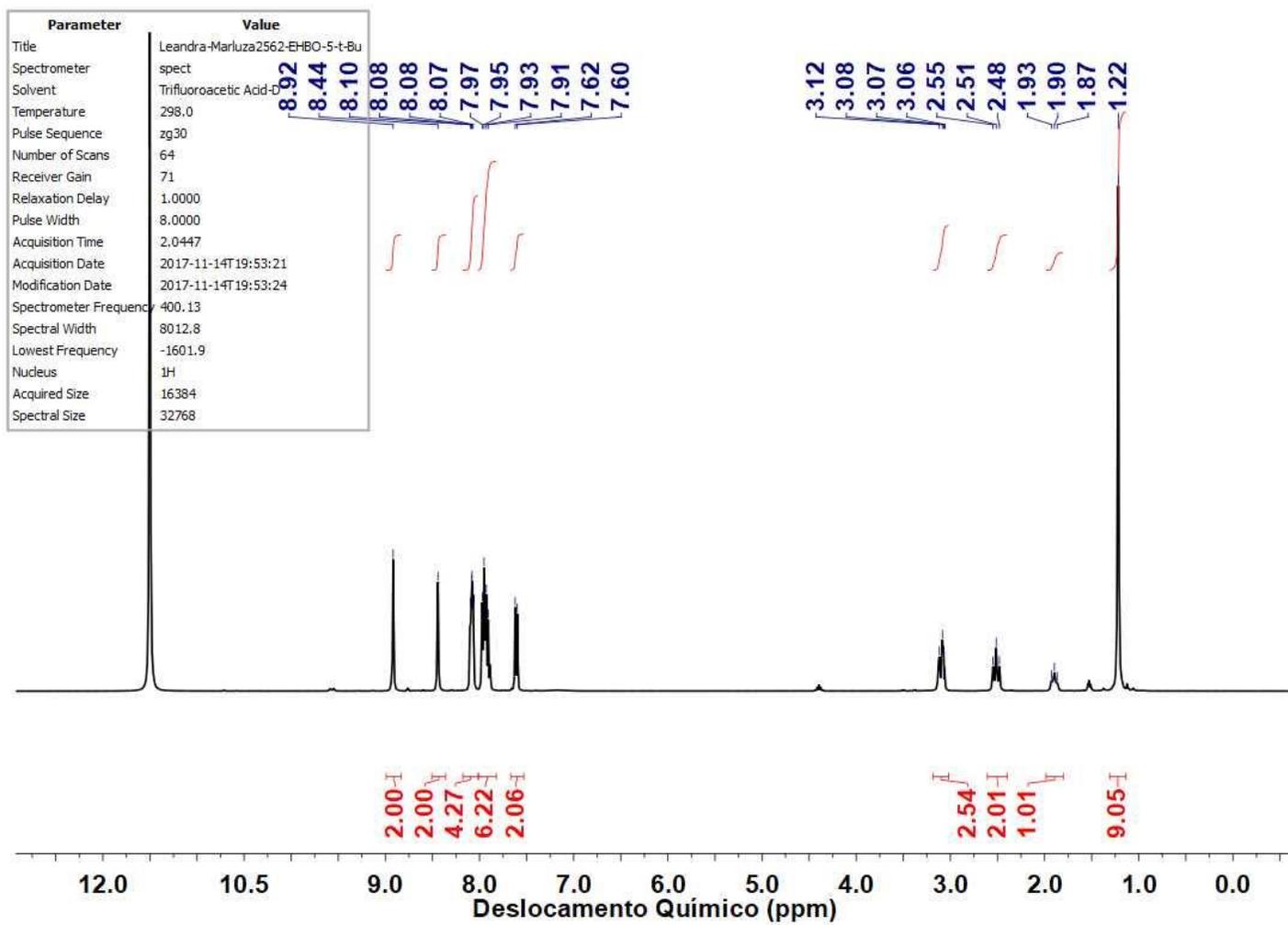
Anexo 16: Espectro de 1H-RMN (400 MHz) em ATF-d para 21.



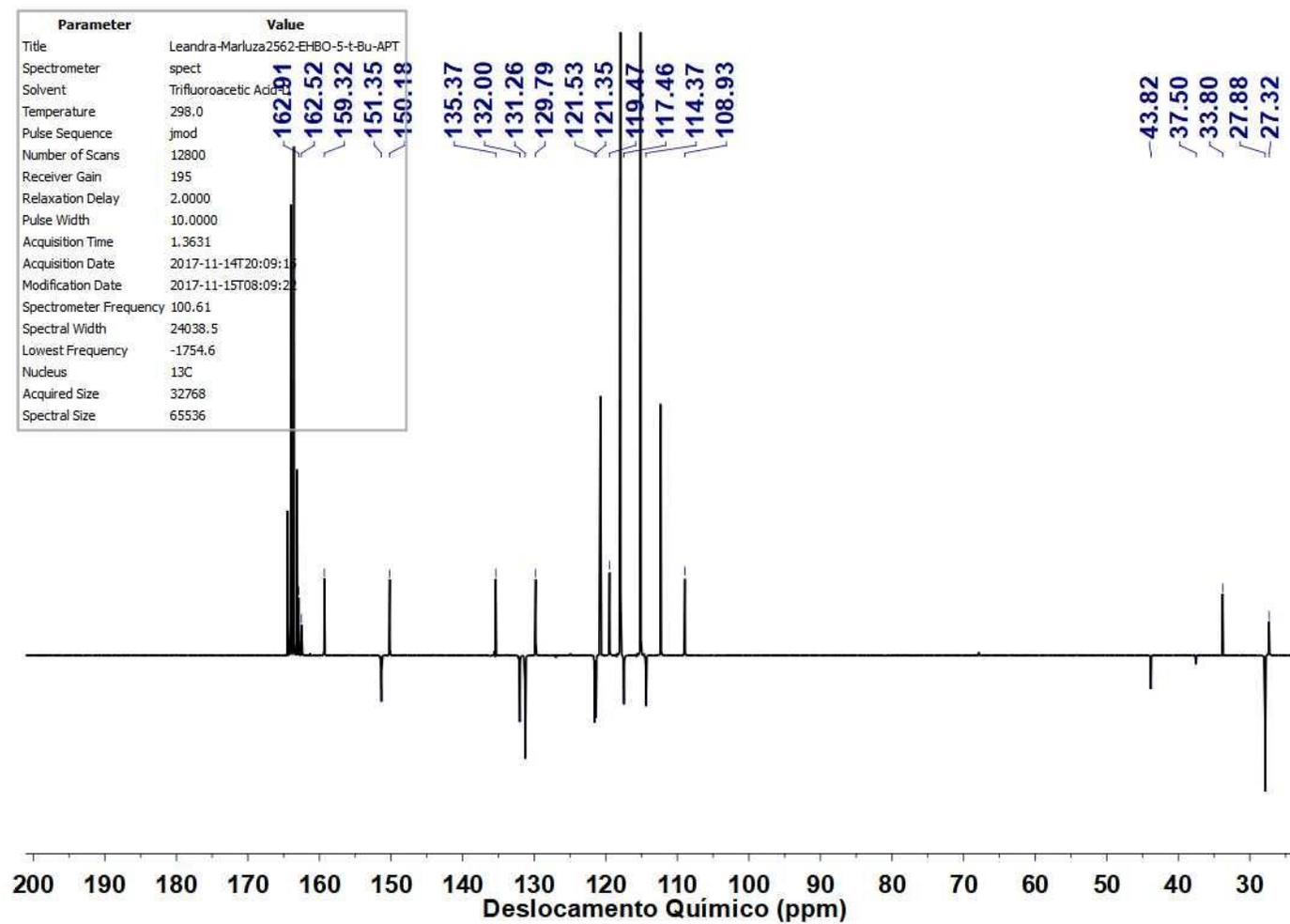
Anexo 17: Espectro de ¹³C-RMN (100 MHz) em ATF-d para 21.



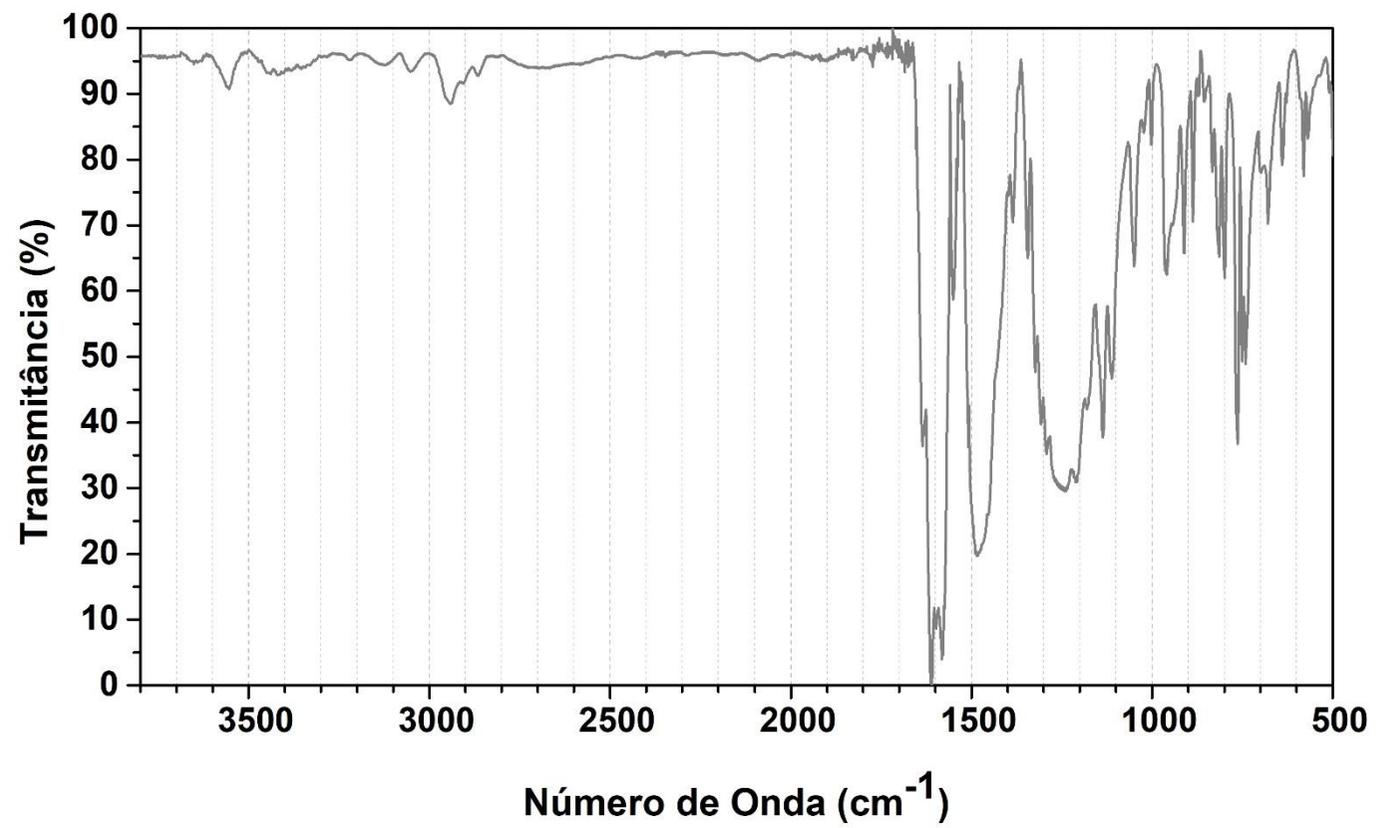
Anexo 18: Espectro de FT-IV em pastilha de KBr para 21.



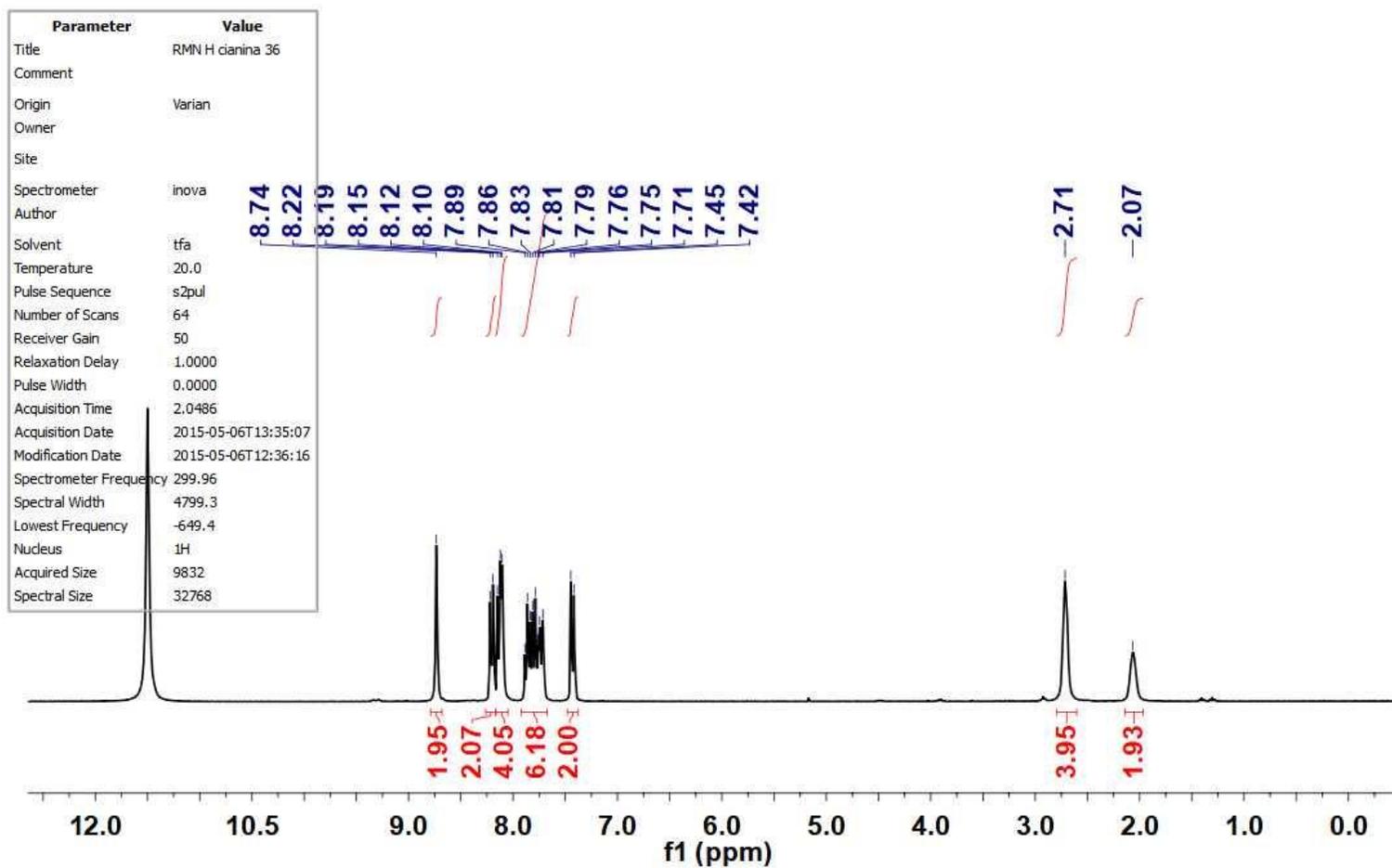
Anexo 19: Espectro de ¹H-RMN (400 MHz) em ATF-d para 22.



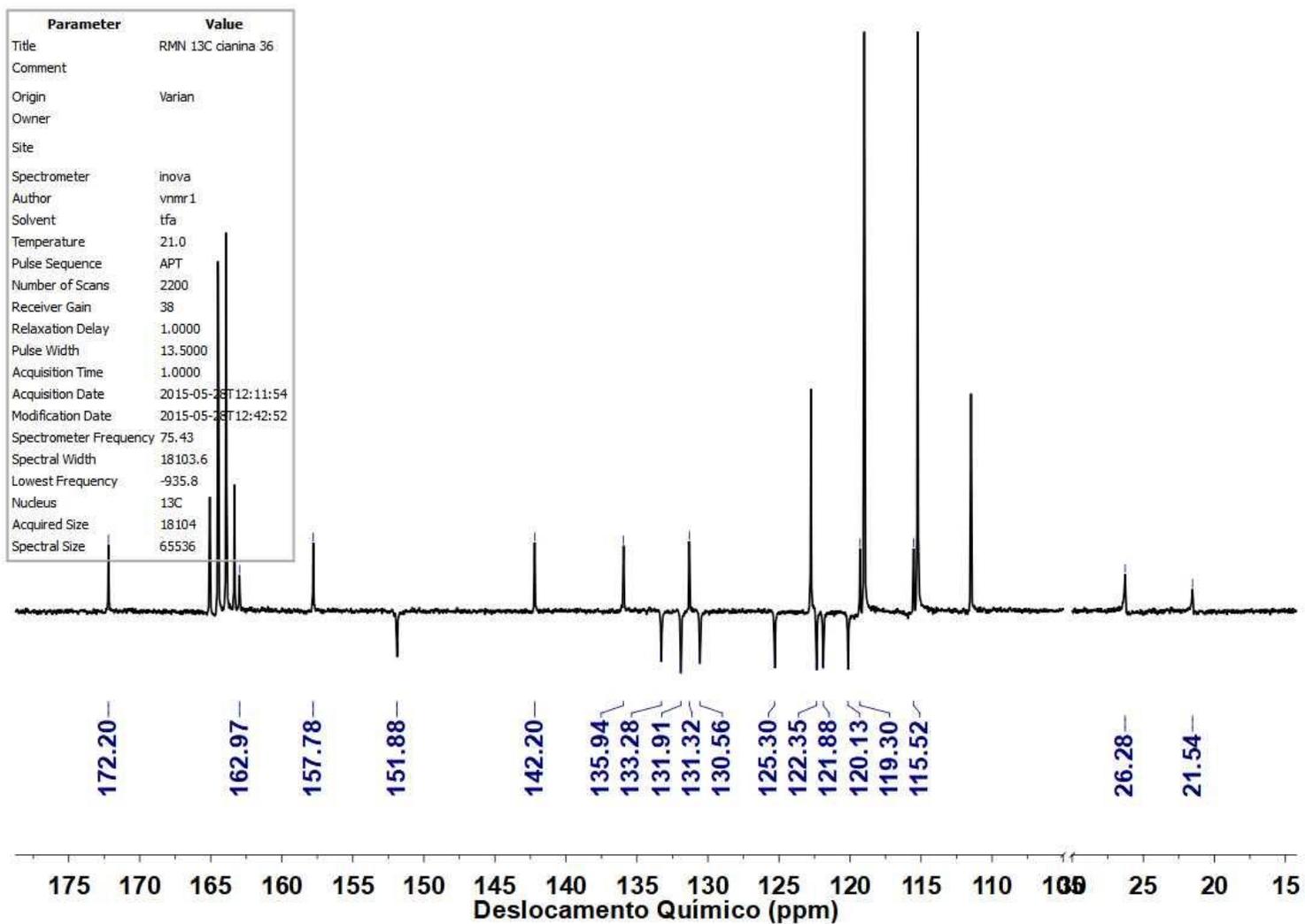
Anexo 20: Espectro de ¹³C-RMN (100 MHz) em ATF-d para **22**.



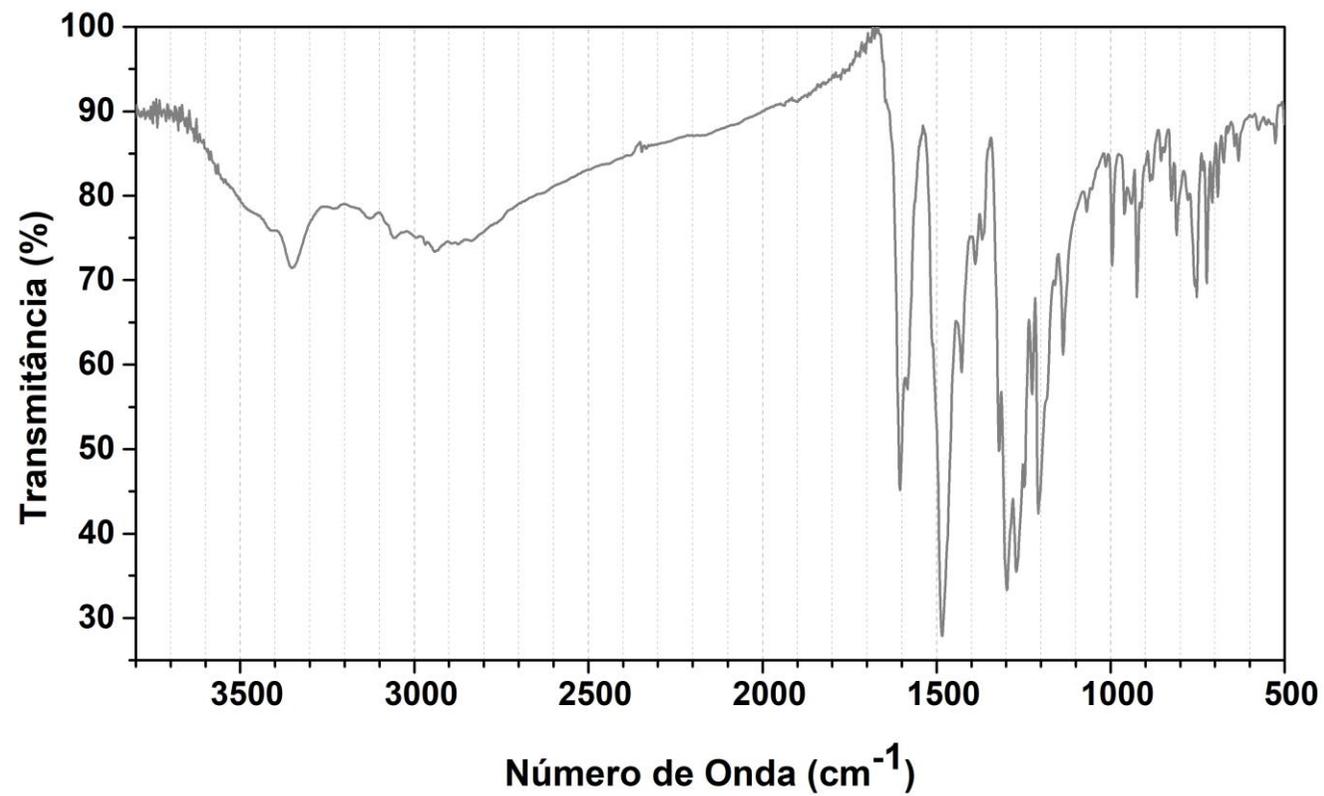
Anexo 21: Espectro de FT-IV em pastilha de KBr para **22**.



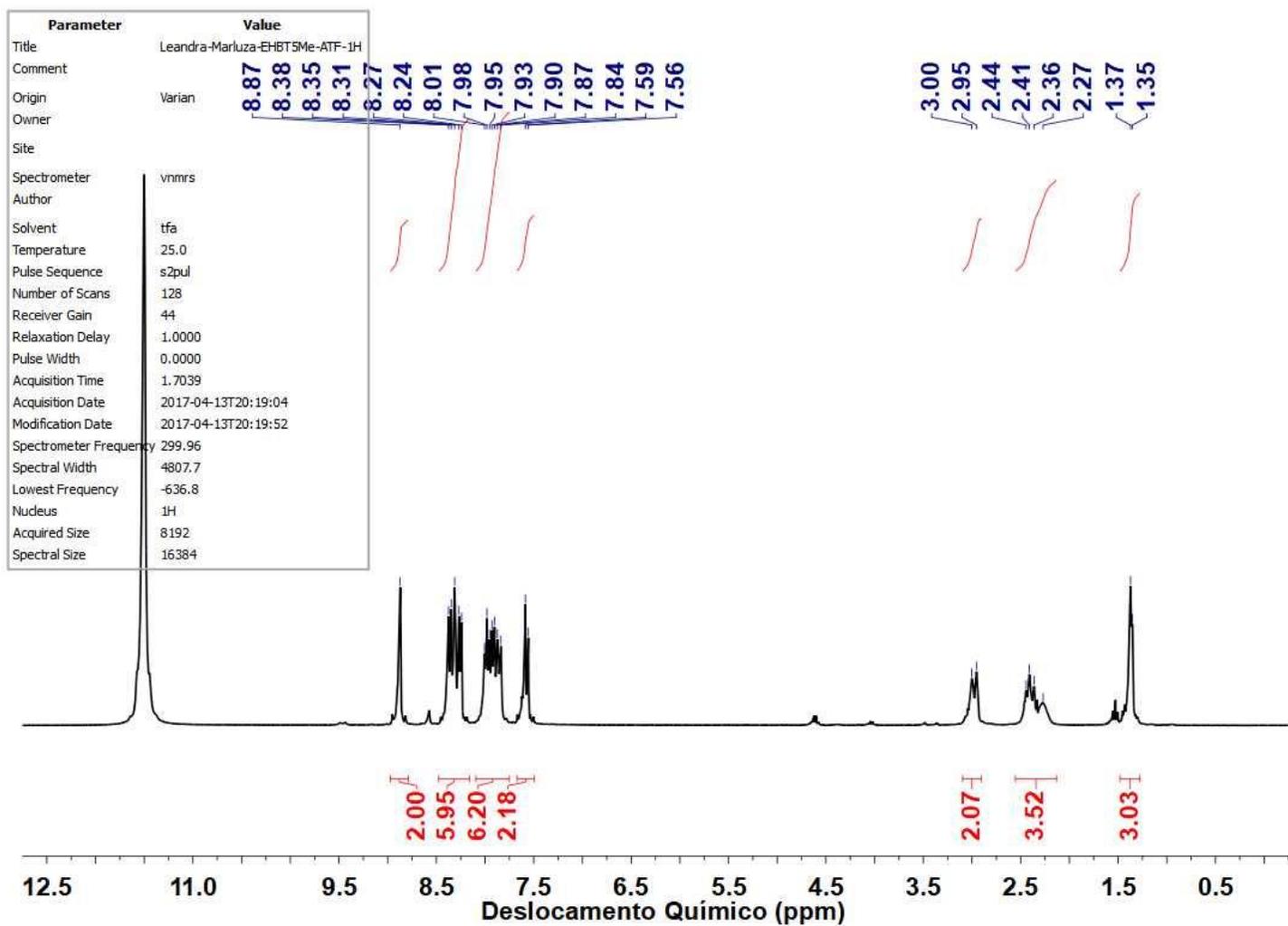
Anexo 22: Espectro de ¹H-RMN (300 MHz) em ATF-d para **23**.



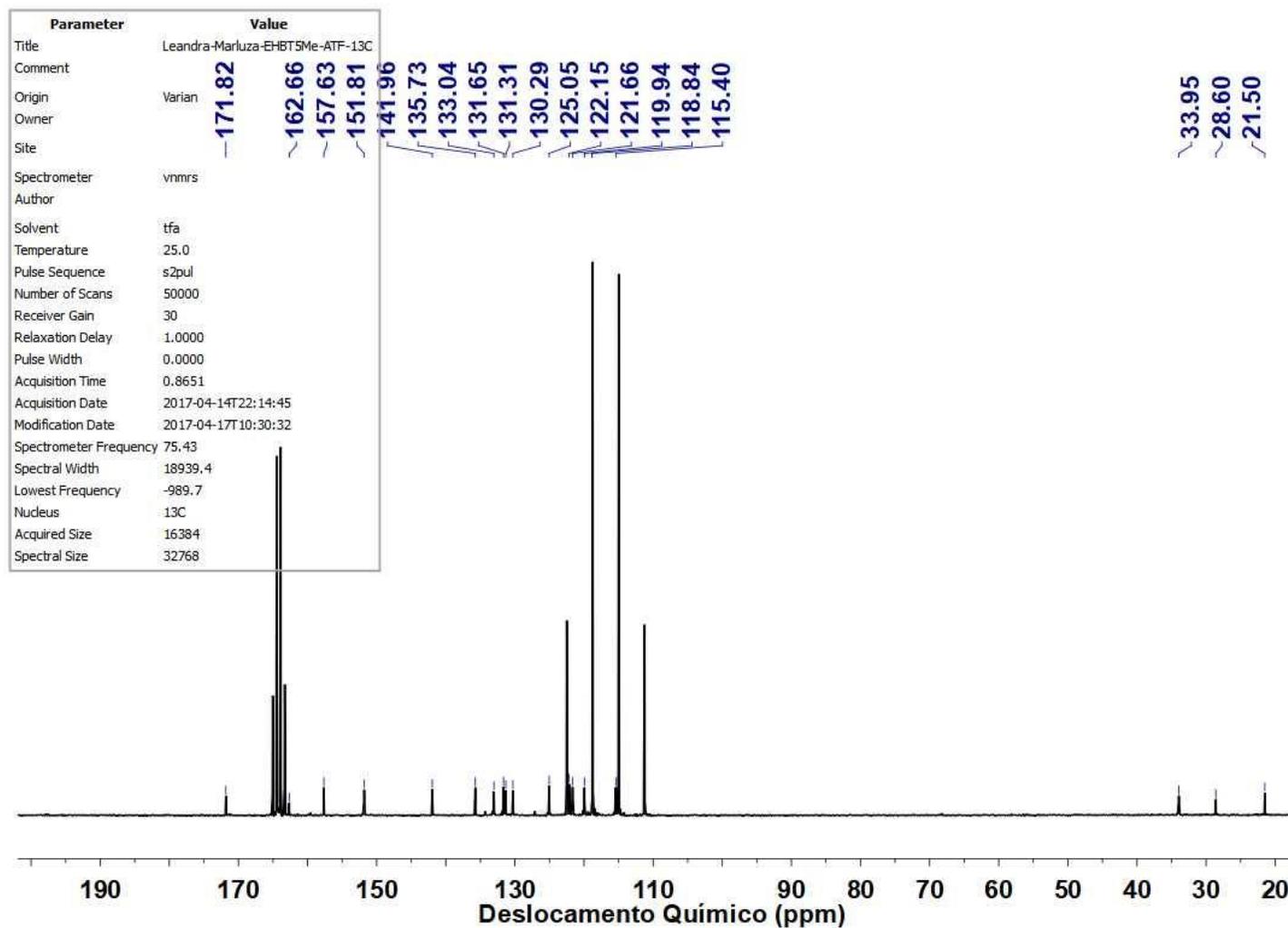
Anexo 23: Espectro de 13C-RMN (75,5 MHz) em ATF-d para 23.



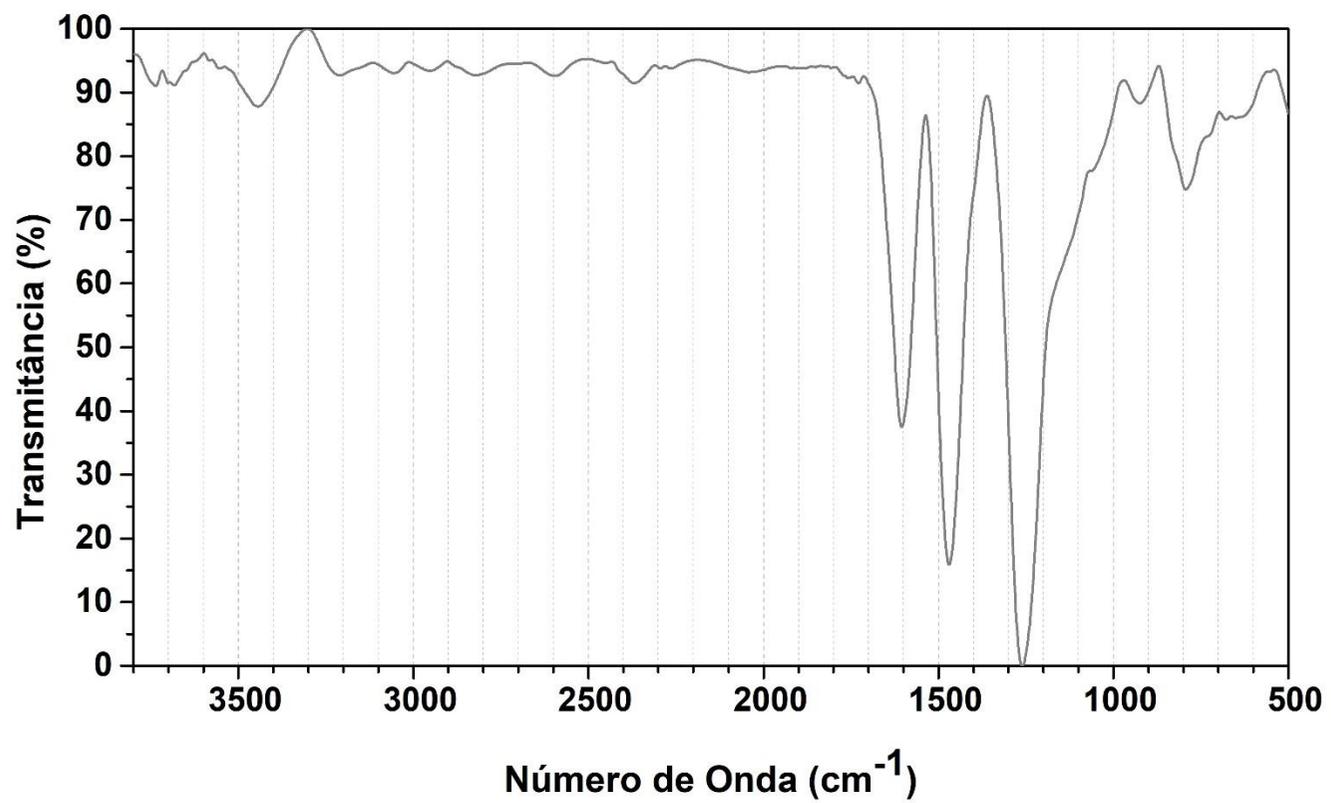
Anexo 24: Espectro de FT-IV em pastilha de KBr para **23**.



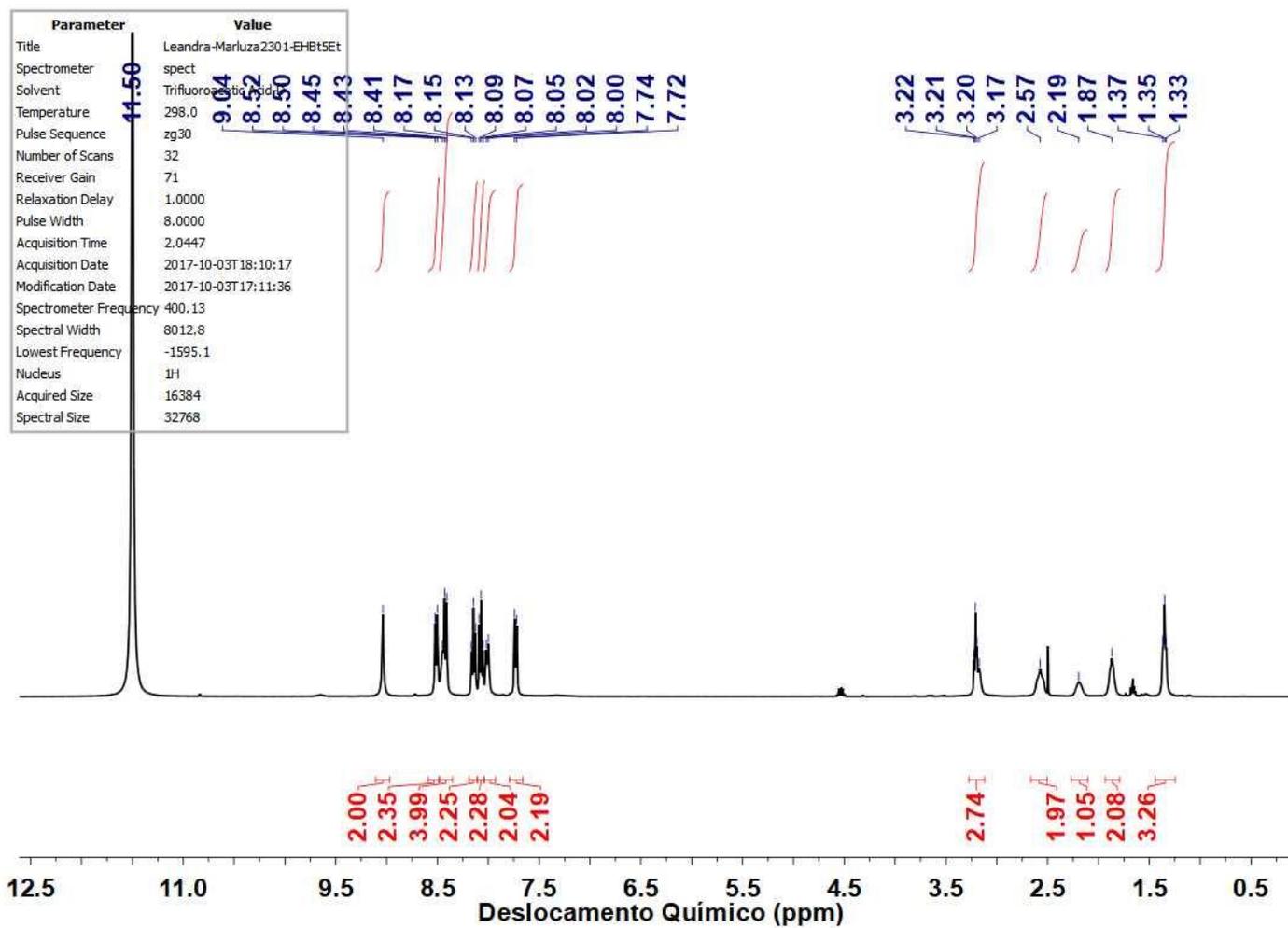
Anexo 25: Espectro de 1H-RMN (300 MHz) em ATF-d para **24**.



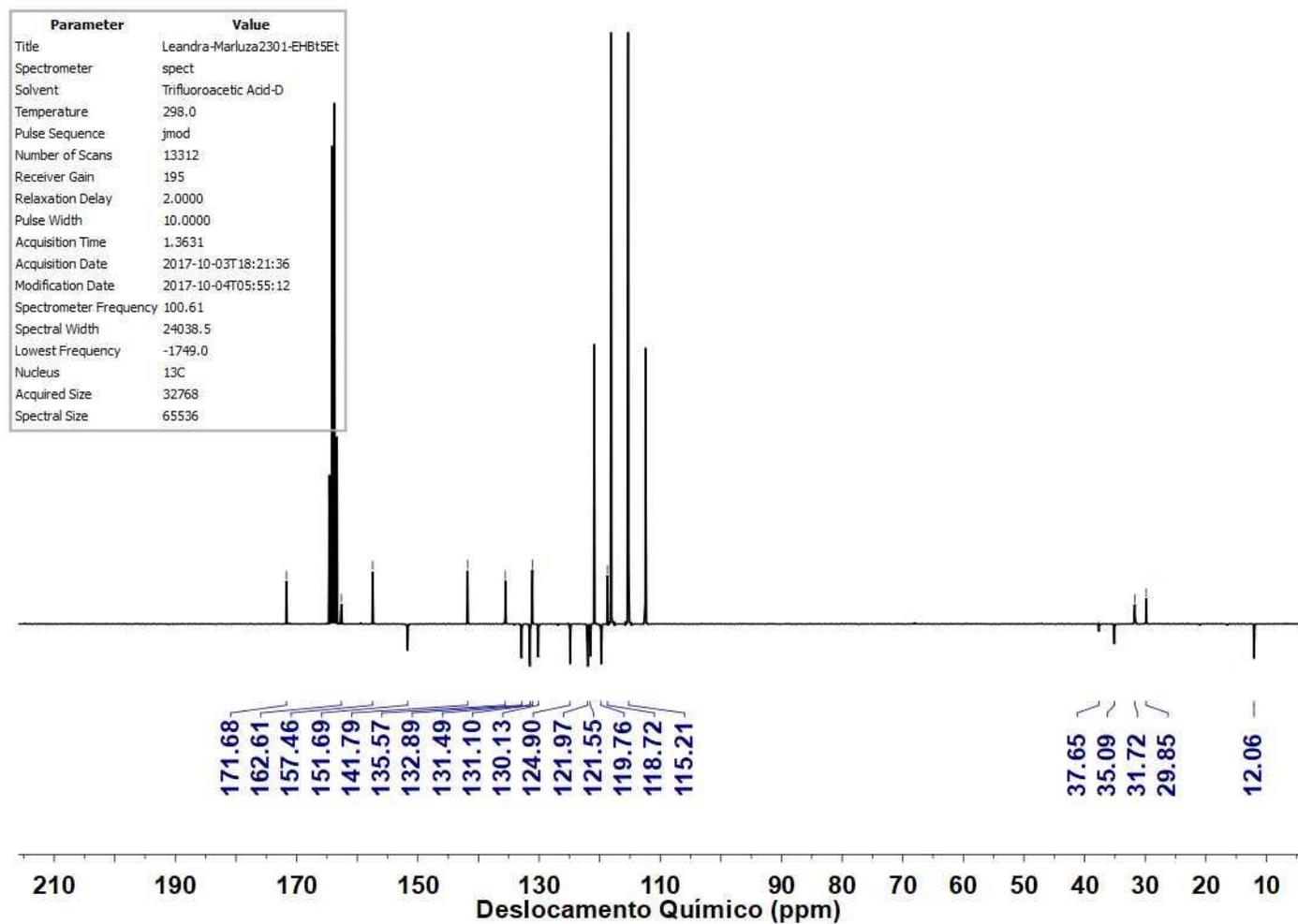
Anexo 26: Espectro de ^{13}C -RMN (75,5 MHz) em ATF-d para **24**.



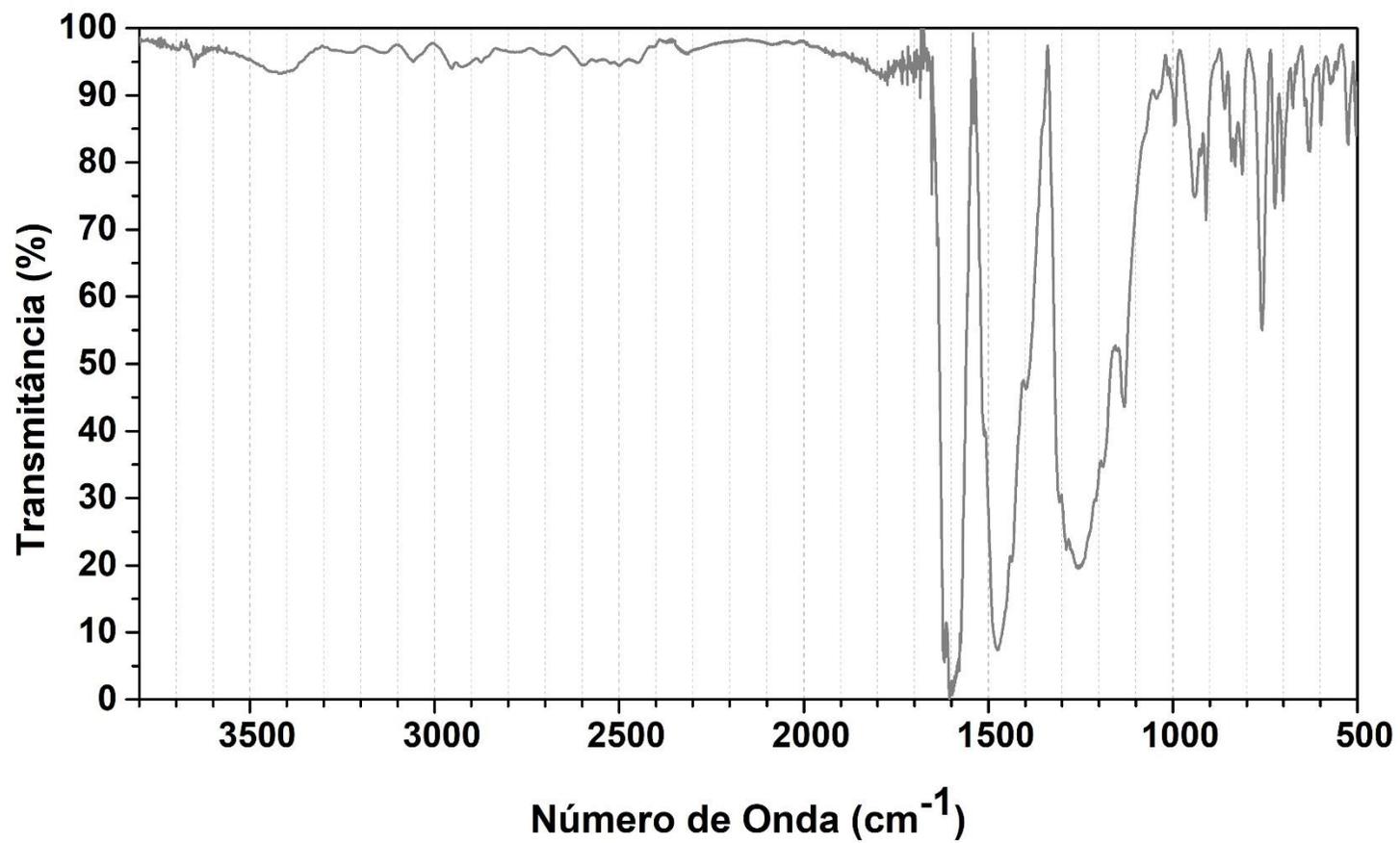
Anexo 27: Espectro de FT-IV em pastilha de KBr para **24**.



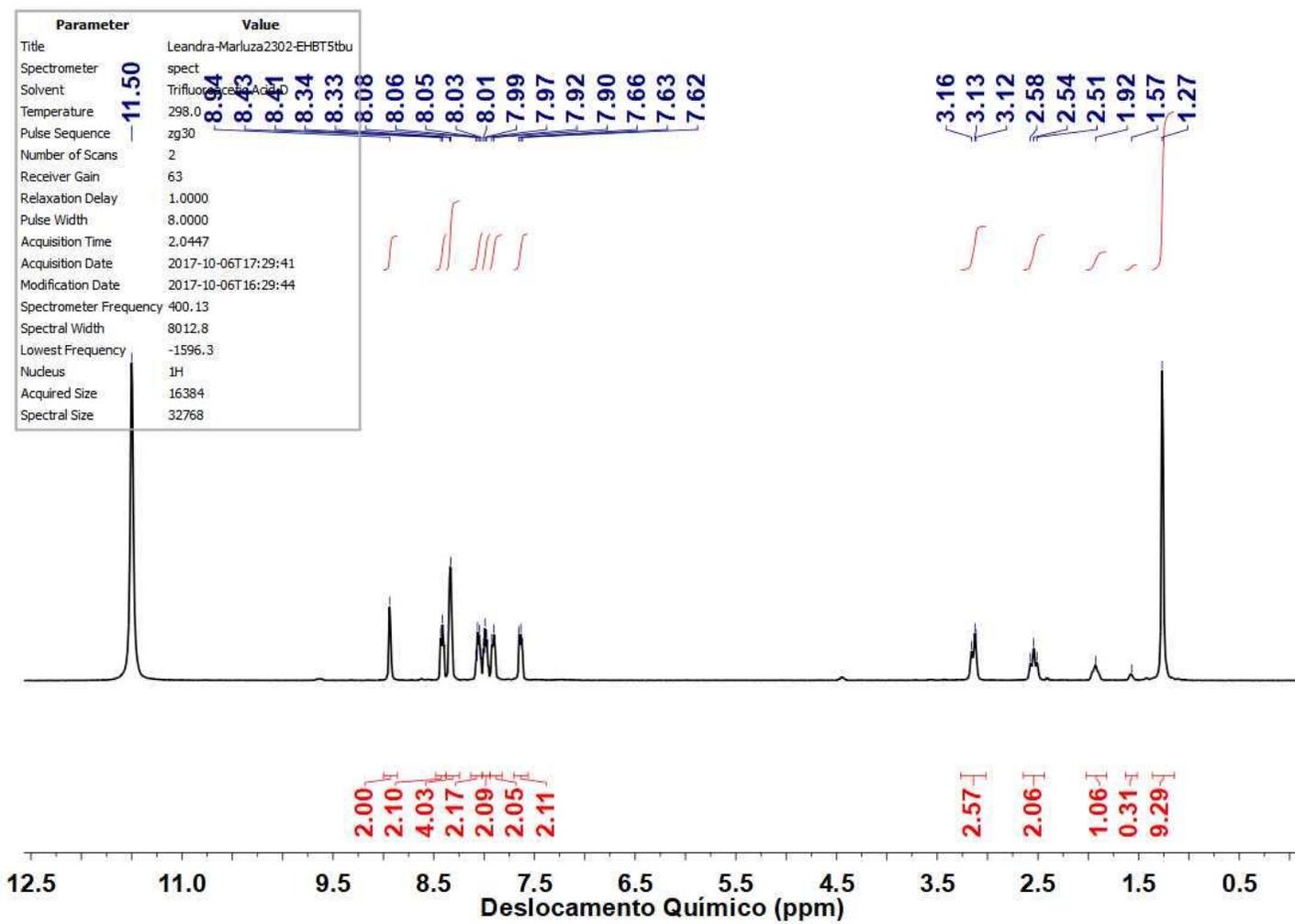
Anexo 28: Espectro de ¹H-RMN (400 MHz) em ATF-d para **25**.



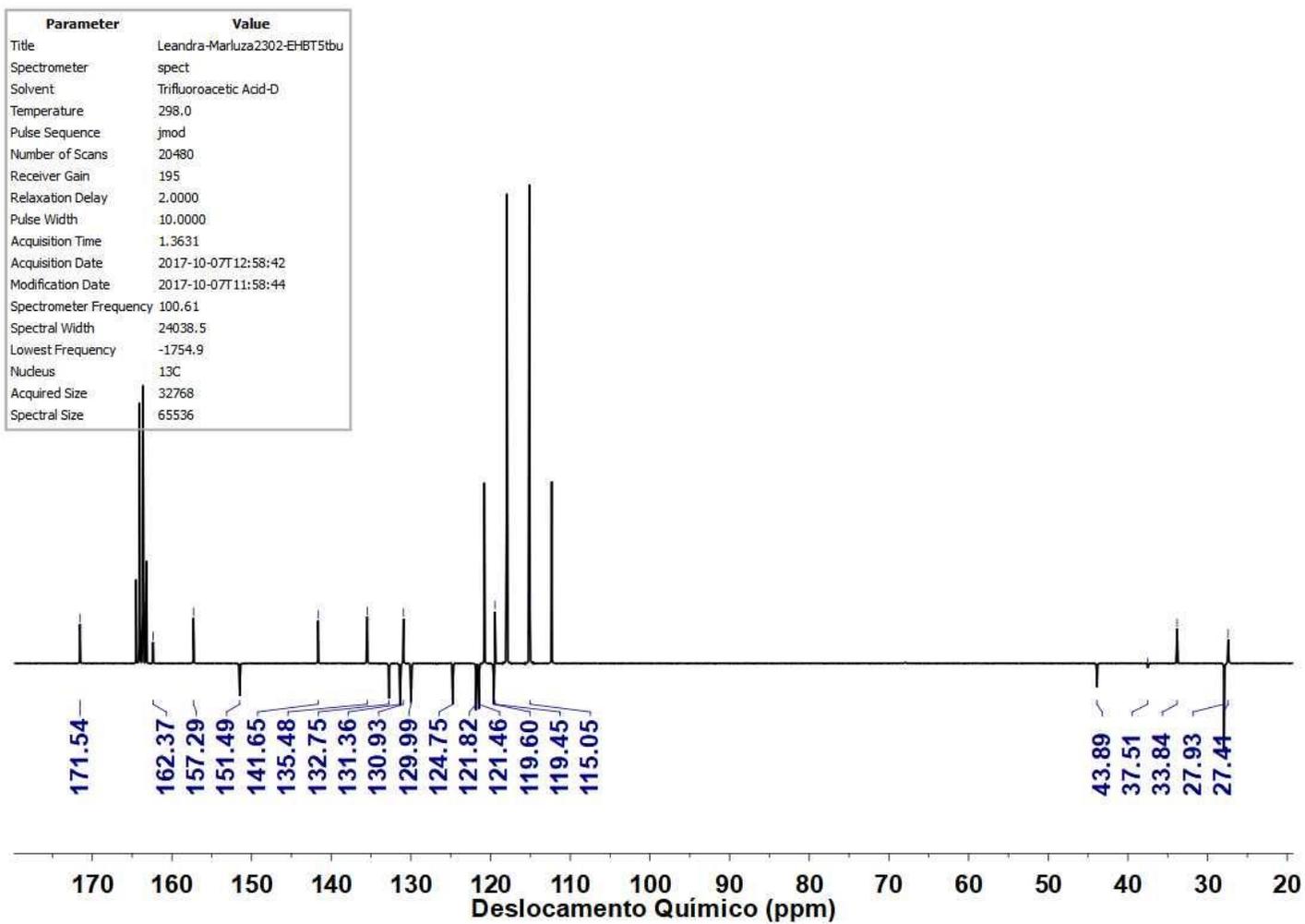
Anexo 29: Espectro de ¹³C-RMN (100 MHz) em ATF-d para **25**.



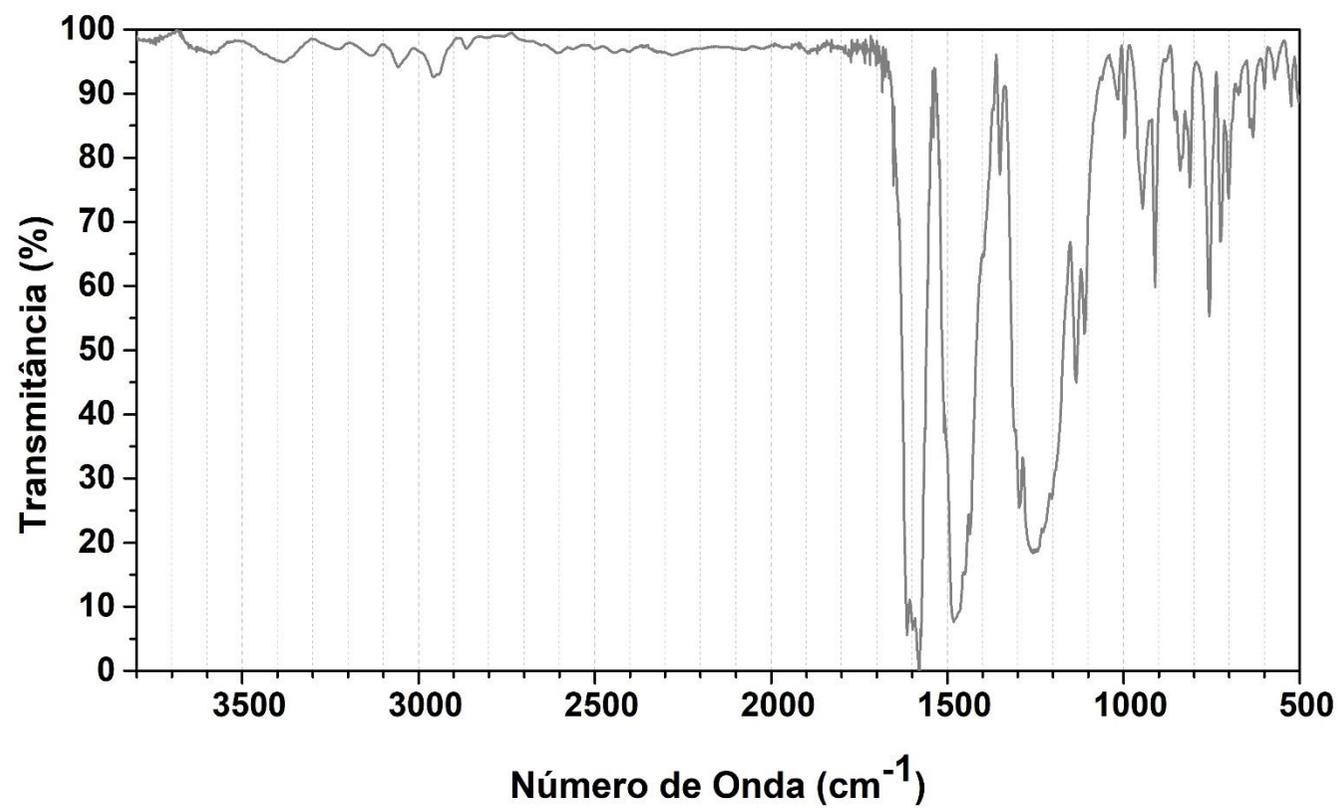
Anexo 30: Espectro de FT-IV em pastilha de KBr para 25.



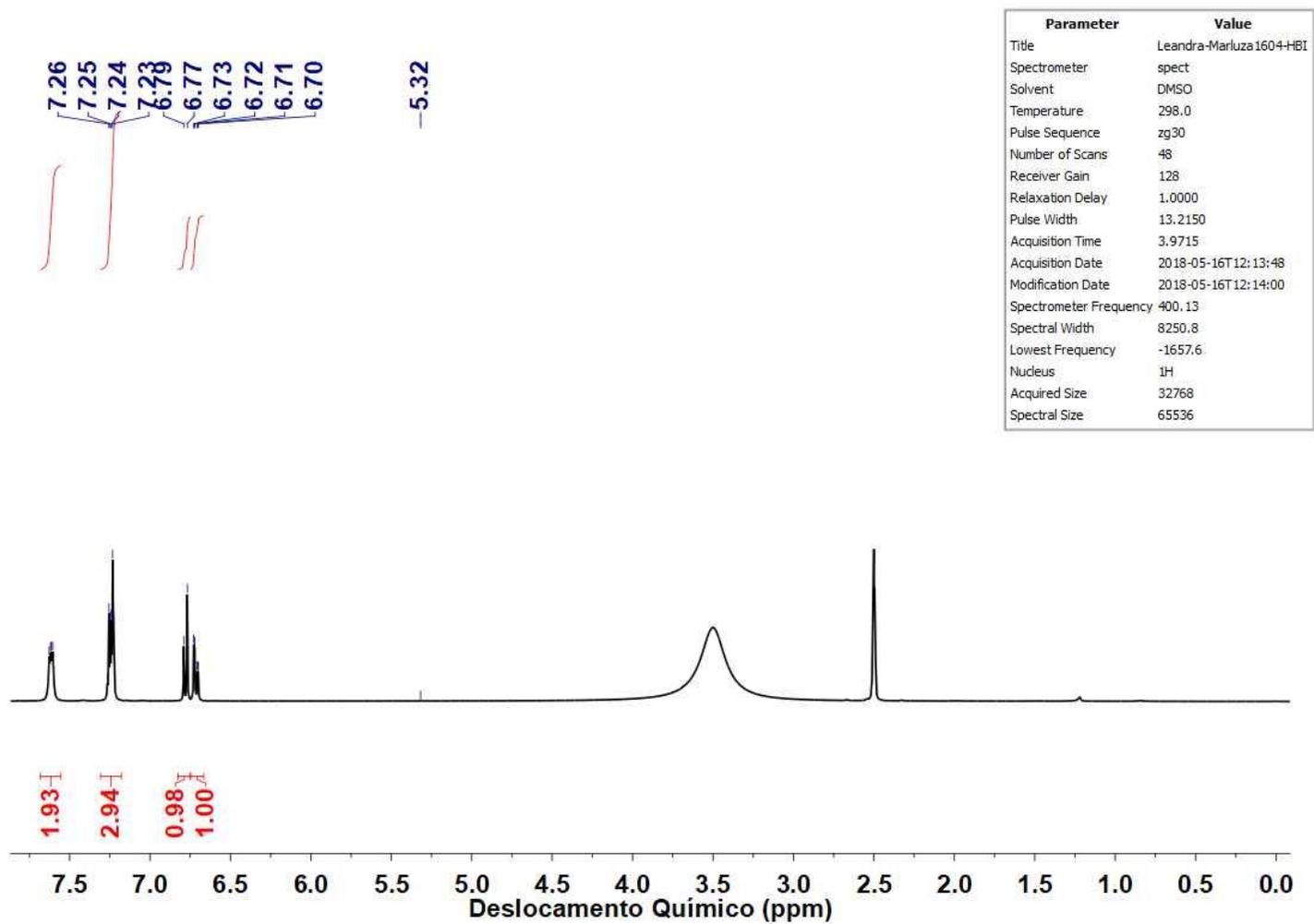
Anexo 31: Espectro de ¹H-RMN (400 MHz) em ATF-d para **26**.



Anexo 32: Espectro de ¹³C-RMN (100 MHz) em ATF-d para **26**.

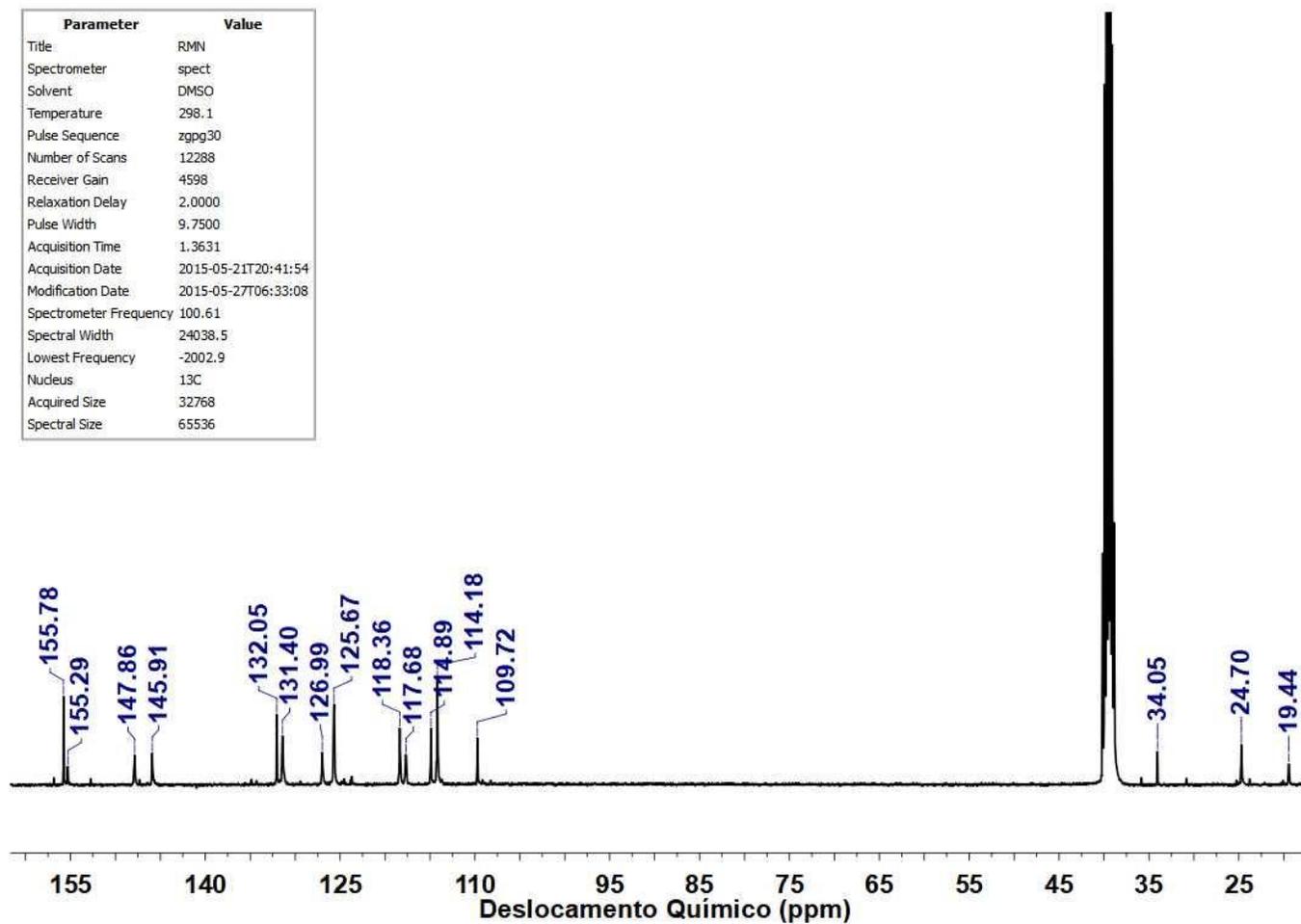


Anexo 33: Espectro de FT-IV em pastilha de KBr para **26**.

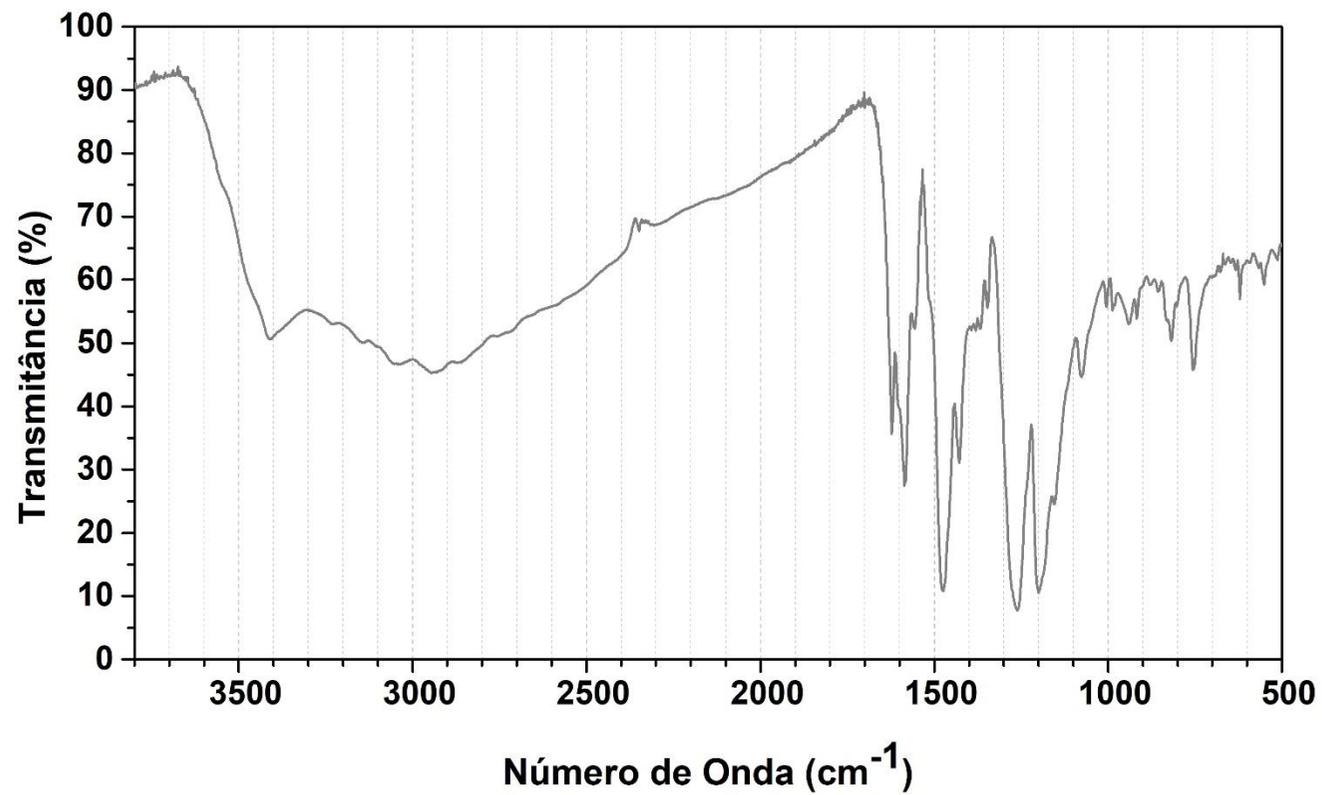


Anexo 34: Espectro de ¹H-RMN (400 MHz) em DMSO-d₆ para **27**.

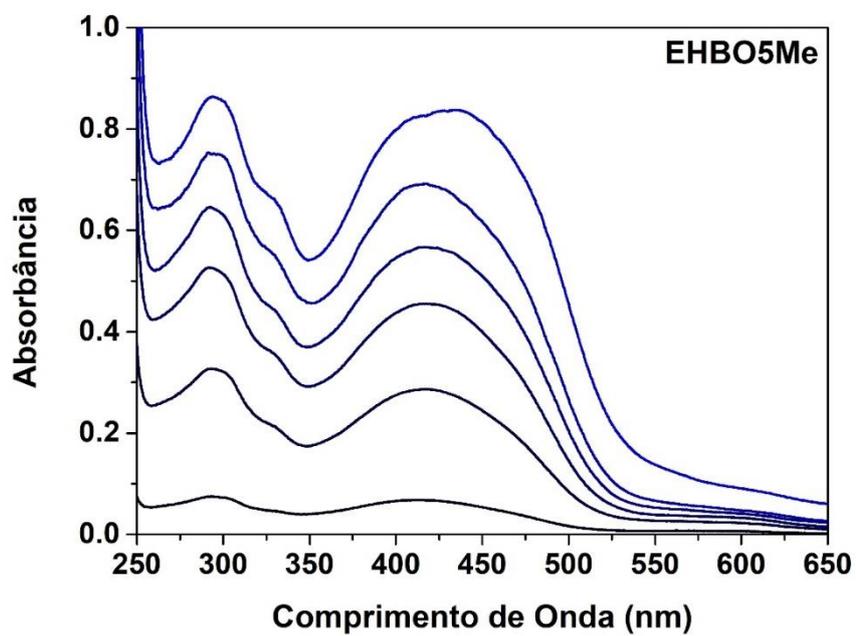
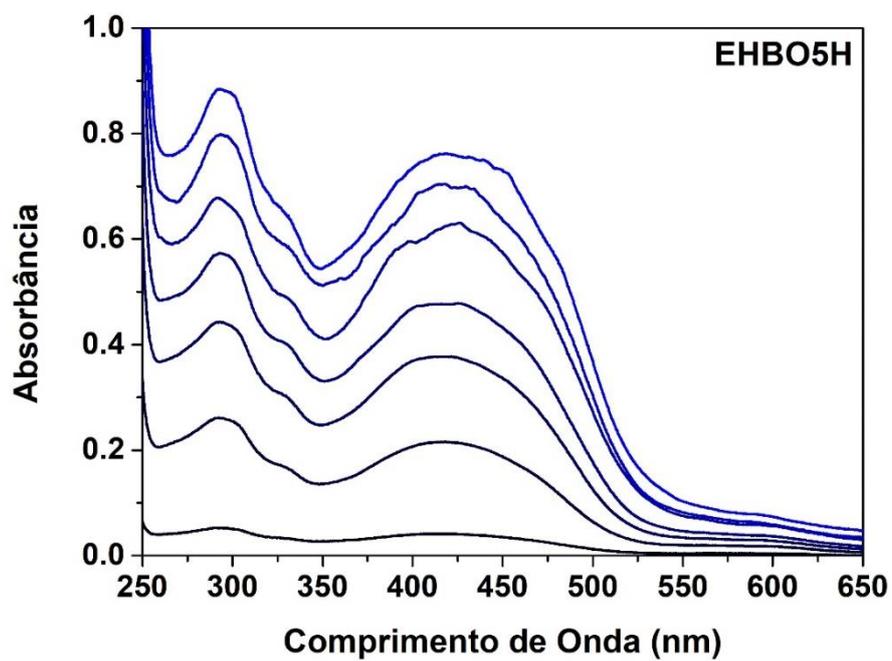
Parameter	Value
Title	RMN
Spectrometer	spect
Solvent	DMSO
Temperature	298.1
Pulse Sequence	zgpg30
Number of Scans	12288
Receiver Gain	4598
Relaxation Delay	2.0000
Pulse Width	9.7500
Acquisition Time	1.3631
Acquisition Date	2015-05-21T20:41:54
Modification Date	2015-05-27T06:33:08
Spectrometer Frequency	100.61
Spectral Width	24038.5
Lowest Frequency	-2002.9
Nucleus	13C
Acquired Size	32768
Spectral Size	65536



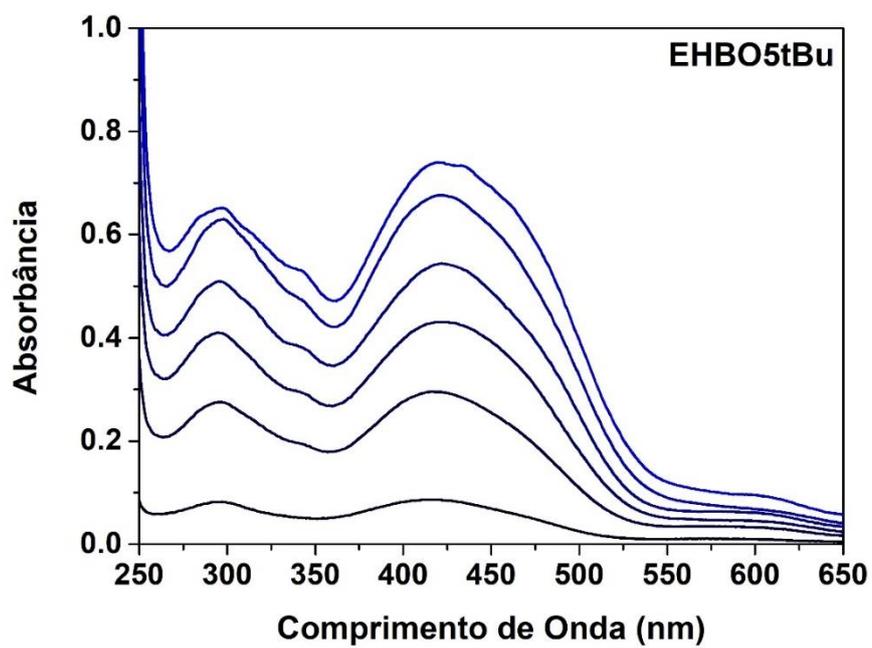
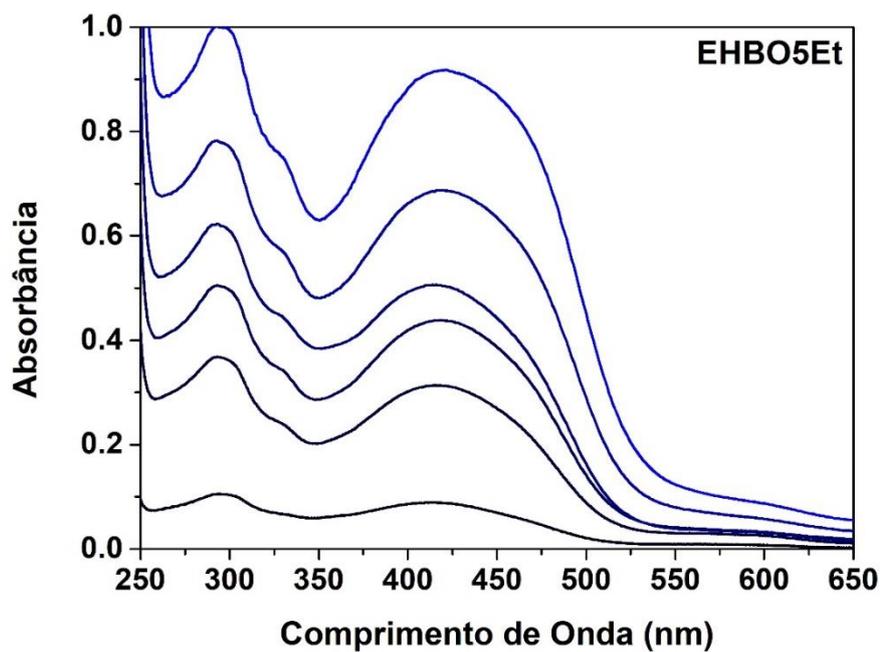
Anexo 35: Espectro de ^{13}C -RMN (100 MHz) em ATF-d para 27.



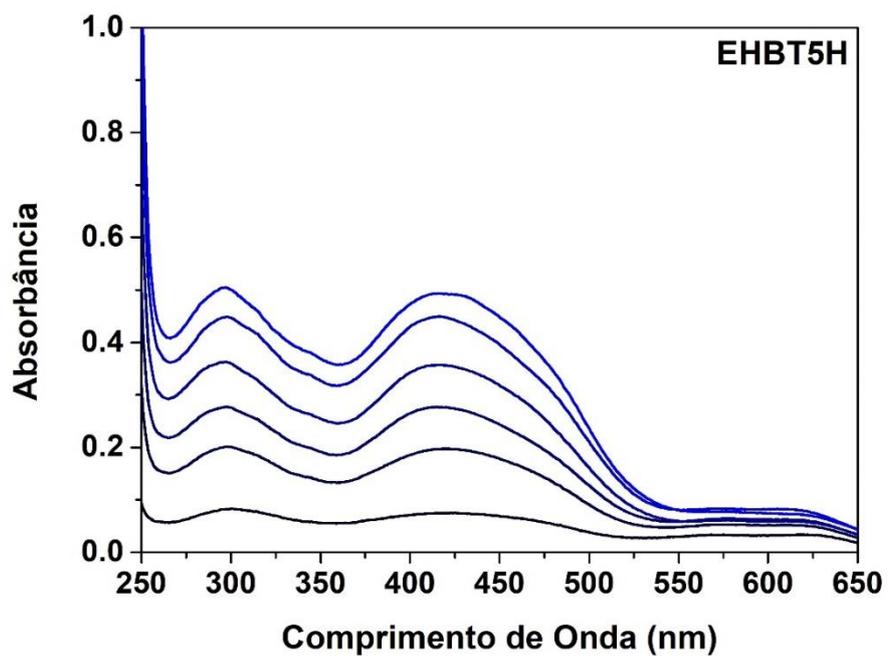
Anexo 36: Espectro de FT-IV em pastilha de KBr para 27.



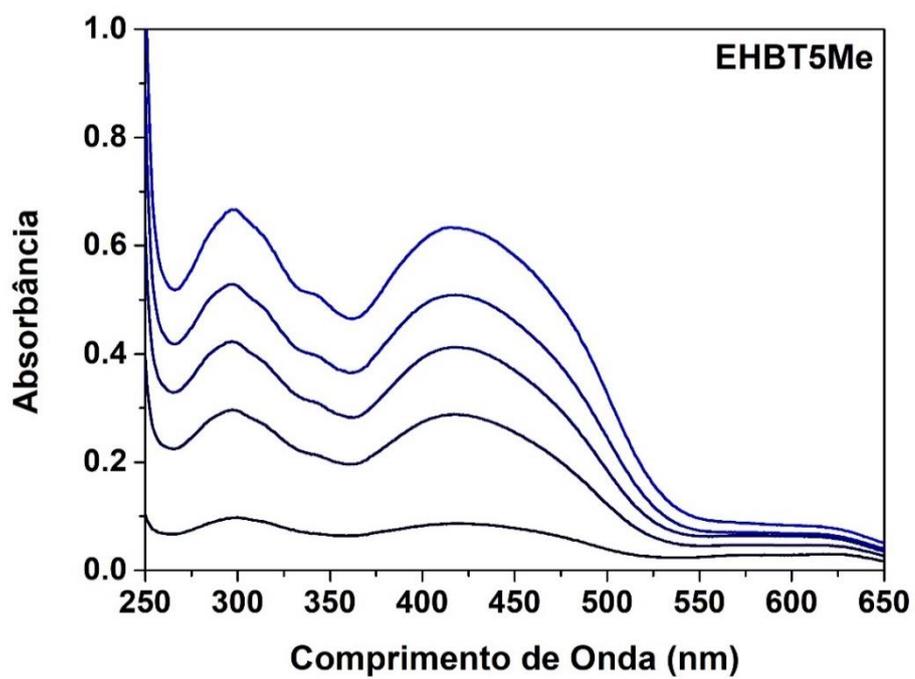
Anexo 37: Espectros de absorção em tampão PBS para 19 (A), 20 (B).



Anexo 38: Espectros de absorção em tampão PBS para 21 (A), 22 (B).

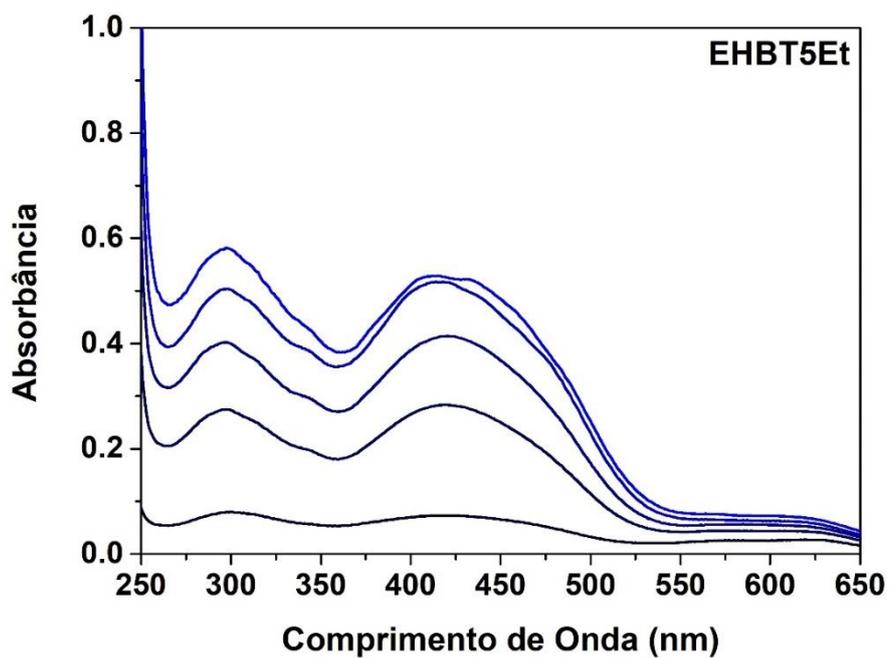


A

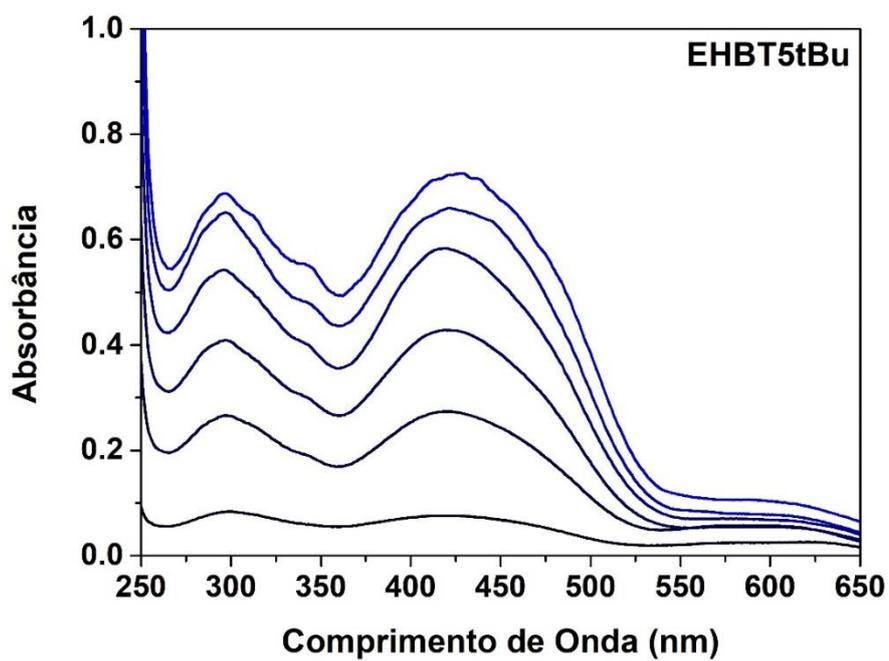


B

Anexo 39: Espectros de absorção em tampão PBS para 23 (A), 24 (B).

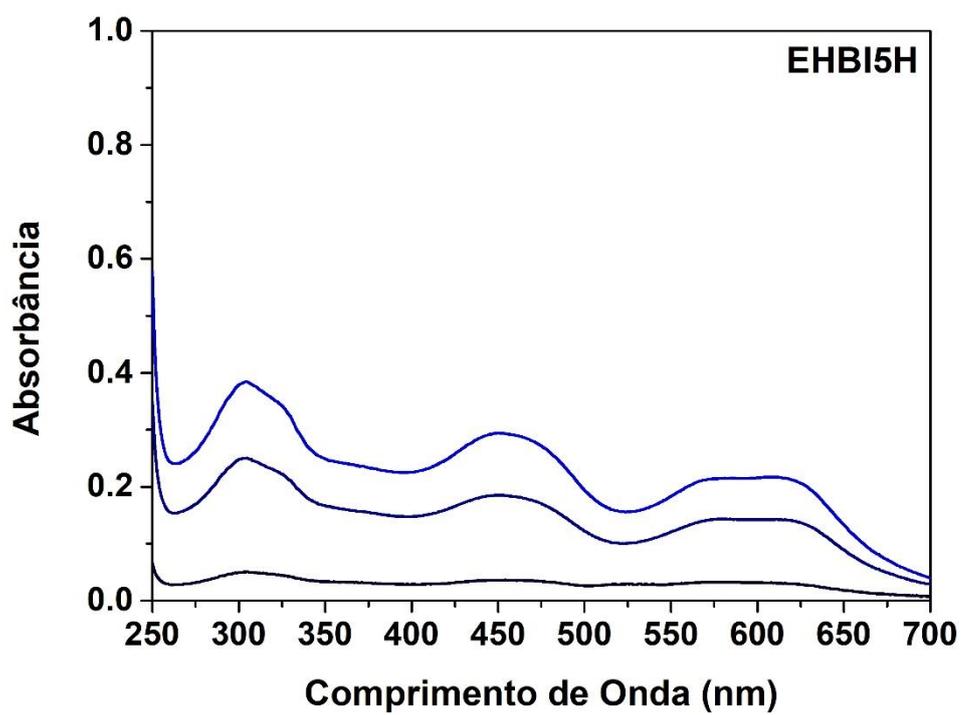


A



B

Anexo 40: Espectros de absorção em tampão PBS para 25 (A), 26 (B).



Anexo 41: Espectros de absorção em tampão PBS para 27.