

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

**“SÍNTESE DE ETIQUETAS FLUORESCENTES COM
TRANSFERÊNCIA PROTÔNICA INTRAMOLECULAR NO ESTADO
EXCITADO”**

**MARCELO GATELLI HOLLER
QUÍMICO INDUSTRIAL**

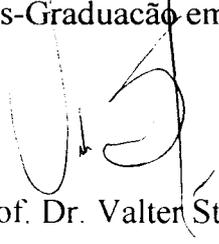
Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Química da
Universidade Federal do Rio Grande do Sul para a obtenção do título de Mestre
em Química

(17/11/1997)

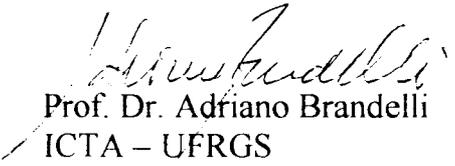
O presente trabalho foi realizado entre março de 1994 e novembro de 1997, no Instituto de Química da UFRGS, sob a orientação do Professor Doutor Valter Stefani, inteiramente pelo autor, salvo eventuais agradecimentos que apareçam no texto.

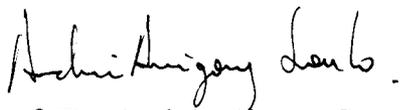

Marcelo Gatteli Holler

Esta Dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de **MESTRE EM QUÍMICA**, e aprovada em sua forma final, pelo Orientador e pela Comissão Examinadora, no Curso de Pós-Graduação em Química.

Orientador: 
Prof. Dr. Valter Stefani

Comissão Examinadora: 
Prof.ª Dr.ª Maria Luiza Ambros Von Holleben
Instituto de Química – UFRGS


Prof. Dr. Adriano Brandelli
ICTA – UFRGS


Prof. Dr. André Añigony Souto
Universidad Complutense de Madrid

Coordenadora do Curso: Prof.ª Dr.ª Elina Bastos Caramão

“Catei os próprios vermes dos livros, para que me dissessem o que havia nos textos roídos por eles.

- Meu senhor, respondeu-me um longo verme gordo, nós não sabemos absolutamente nada dos textos que roemos, nem escolhemos o que roemos, nem amamos ou detestamos o que roemos, nós roemos.”

Machado de Assis,
Dom Casmurro.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Valter Stefani, pela oportunidade de realizar este trabalho.

Ao Prof. Dr. Adriano Brandelli, pela colaboração nas reações com proteínas.

Ao Prof. Dr. Sílvio Luiz de Souza Cunha, pela realização dos espectros de emissão com excitação por laser.

Ao Dr. André A. Souto, pela realização de diversos espectros de absorção e emissão.

À prof. Dr. Maria Luiza Ambros Von Holleben, pelas valiosas sugestões.

À Dione Silveira Corrêa, pela revisão desta dissertação.

Aos colegas do laboratório K-204, pelo companheirismo.

Parte deste trabalho foi apresentada na 19.^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, em Poços de Caldas, em 27 a 30 de maio de 1996, sob o título “SÍNTESE DE NOVOS CORANTES FLUORESCENTES PARA MARCAÇÃO DE PROTEÍNAS”, de autoria de Valter Stefani, Adriano Brandelli e Marcelo Gatelli Holler.

RESUMO

Relata-se a síntese de 3 isotiocianatos heterocíclicos fluorescentes, 2-(2-hidróxi-5'-isotiocianatofenil)benzoxazol, 2-(2-hidróxi-5'-isotiocianatofenil)benzimidazol e 2-(2-hidróxi-5'-isotiocianatofenil)oxazolo[4,5-b]piridina. Estas substâncias apresentam pontes de hidrogênio intramoleculares fortes e um grande deslocamento de Stokes, que presume-se advir de um processo de transferência intramolecular de prótons no estado (eletrônico) excitado. Realizou-se a reação dos isotiocianatos sintetizados com aminas e proteínas e estudou-se as propriedades fotofísicas dos produtos formados, com o intuito de verificar-se a viabilidade de uso daqueles isotiocianatos como etiquetas fluorescentes. Verificou-se a formação de produtos fluorescentes pela reação entre os isotiocianatos e aminas e proteínas, tendo aqueles potencial utilidade como etiquetas fluorescentes.

ABSTRACT

The synthesis of three fluorescent heterocyclic isothiocyanates, 2-(2'-hydroxi-5'-isothiocyanatephenyl)benzoxazole, 2-(2'-hydroxi-5'-isothiocyanatephenyl)benzimidazole and 2-(2'-hydroxi-5'-isothiocyanatephenyl)oxazolo[4,5-b]pyridine is reported. These substances present strong intramolecular hydrogen bonds and a large Stokes shift, wich is thought to be due a excited state intramolecular proton transfer (ESIPT) process. Reactions of those isothiocyanates with amines and proteins have been performed and the photophysical properties of the products have been studied in the aim to prove the feasibility of their use as fluorescent labels. It has been found that the synthesized isothiocyanates form fluorescent products with amines and proteins, having potential utility as fluorescent labels.

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

τ - tempo de decaimento de fluorescência

CLAP - cromatografia líquida de alta pressão

DNA - *deoxyribonucleic acid*

ADN - ácido desoxirribonucléico

FITC - *fluorescein isothiocyanate*

ANS - *anilinonaphthalenesulfonic acid*

TMRITC - *tetramethylrhodamine isothiocyanate*

DANS - *dansyl chloride*

RBITC - *rhodamine B isothiocyanate*

RB 200 SC - *lissamine rhodamine B sulfonyl chloride*

MDFP - *2-methoxy-2,4-diphenyl-3(2H)-furanone*

NTA - *naphthoyltrifluoroacetone*

EDTA - ácido etilenodiaminotetracético

λ - comprimento de onda

ϵ - absorvidade molar

E_{elec} - energia eletrônica

E_{vib} - energia vibracional

E_{rot} - energia rotacional

S - estado singlete

S* - estado singlete excitado

T - estado triplete

η - rendimento quântico absoluto

TPIEE - transferência protônica intramolecular no estado excitado

TPREF - transferência protônica reversa no estado fundamental

RMN ^1H - ressonância magnética nuclear de prótons

APF - ácido polifosfórico

Et - etila

Ph - fenila

DCC - dicicloexilcarbodiimida

R_f - fator de retenção

CCD - cromatografia em camada delgada

THF - tetraidrofurano

p/v - peso sobre volume

IV - infravermelho

UV - ultravioleta

UV-Vis - ultravioleta e visível

DMSO - dimetilsulfóxido

CDCl₃ - clorofórmio deuterado

DMSO-d₆ - dimetilsulfóxido hexadeuterado

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 GENERALIDADES	1
1.2 ETIQUETAS FLUORESCENTES	4
1.3 CONCEITOS TEÓRICOS SOBRE A FLUORESCÊNCIA	10
1.3.1 TIPOS DE ESPECTROS DE FLUORESCÊNCIA	15
1.4 TRANSFERÊNCIA PROTÔNICA INTRAMOLECULAR NO ESTADO ELETRÔNICO EXCITADO	17
1.5 2-(2'-HIDROXIFENIL)BENZAZÓIS	21
1.6 SÍNTESE DE ANÉIS AZÓLICOS CONDENSADOS	24
1.6.1 SÍNTESE DE BENZIMIDAZÓIS	24
1.6.2 SÍNTESE DE BENZOXAZÓIS	29
1.7 SÍNTESE DE ISOTIOCIANATOS	33
2. OBJETIVOS	38
3. EXPERIMENTAL	39
3.1 DESCRIÇÃO GERAL DA METODOLOGIA UTILIZADA:	39
3.2 REAÇÕES DE CONDENSAÇÃO	42
3.3 CONVERSÃO DO GRUPO AMINA EM ISOTIOCIANATO	47
3.4 FORMAÇÃO DE TIOURÉIAS	53
3.5 MARCAÇÃO DE PROTEÍNAS	56
3.6 ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NO ULTRAVIOLETA E VISÍVEL	58
3.7 ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA	60
3.7.1 Espectros de emissão	60
3.7.2 Espectros de excitação	60
3.7.3 Eficiência quântica de fluorescência	61
3.8 ESPECTROSCOPIA DE EMISSÃO (COM EXCITAÇÃO POR LASER)	62
4. CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS:	68
4.1 EQUIPAMENTOS UTILIZADOS	68
4.2 Reagentes utilizados:	69
4.3 CONDIÇÕES SINTÉTICAS:	70
4.3.1 Ácido 5-amino-2-hidroxibenzoico:	70

4.3.2 2-(5'-amino-2'-hidroxifenil)benzoxazol, (1a):	71
4.3.3 2-(5'-amino-2'-hidroxifenil)benzimidazol, (1b):	72
4.3.4 2-(5'-amino-2'-hidroxifenil)oxazolo[4,5-b]piridina, (1c):	73
4.3.5 2-(2'-hidróxi-5'-isotiocianatofenil)benzoxazol, (2a):	74
4.3.6 2-(2'-hidróxi-5'-isotiocianatofenil)benzimidazol, (2b):	76
4.3.7 2-(2'-hidróxi-5'-isotiocianatofenil)oxazolo[4,5-b]piridina, (2c):	77
4.3.8 2-[2'-hidroxi-5'-(<i>N-terc</i> -butiltioureida)fenil]benzoxazol (3a):	78
4.3.9 2-[2'-hidroxi-5'-(<i>N-terc</i> -butiltioureida)fenil]benzimidazol, (3b):	79
4.3.10 2-[2'-hidroxi-5'-(<i>N-terc</i> -butiltioureida)fenil]oxazolo[4,5-b]piridina (3c):	80
4.3.11 2-[2'-hidroxi-5'-(<i>N-iso</i> -propiltioureida)fenil]benzoxazol (4a):	81
4.3.12 Conjugação de proteínas com 2a, 2b e 2c:	82
5. CONCLUSÕES	84
6. BIBLIOGRAFIA	86
7. ESPECTROS DE INFRAVERMELHO	92
8. ESPECTROS DE RMN ¹H	98
9. ESPECTROS DE ABSORÇÃO NO ULTRAVIOLETA E VISÍVEL	109
10. ESPECTROS DE EXCITAÇÃO	115
11. ESPECTROS DE EMISSÃO	117

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1: FÓRMULAS ESTRUTURAIS DE ALGUMAS ETIQUETAS FLUORESCENTES.....	7
FIGURA 2: DIAGRAMA DE JABLONSKI.....	12
FIGURA 3: FÓRMULAS DE ALGUMAS SUBSTÂNCIAS QUE APRESENTAM FOTOTAUTOMERISMO.....	18
FIGURA 4: DIAGRAMA ENERGÉTICO DA TPIEE.....	19
FIGURA 5: MOLÉCULAS DA FAMÍLIA DOS BENZAZOIS.....	21
FIGURA 6: FOTOTAUTOMERISMO DO 2-(2'-HIDROXIFENIL)BENZOXAZOL.....	22
FIGURA 7: ROTÂMEROS DE 2-(2'-HIDROXIFENIL)BENZAZÓIS NO ESTADO EXCITADO.....	23
FIGURA 8: ANEL DE BENZIMIDAZOL E SUA NUMERAÇÃO.....	24
FIGURA 9: TAUTOMERIZAÇÃO NO ANEL BENZIMIDAZÓLICO.....	25
FIGURA 10: SÍNTESE DE PHILLIPS PARA BENZIMIDAZÓIS.....	25
FIGURA 11: SÍNTESE DE BENZAZÓIS EM MEIO DE ACIDO POLIFOSFÓRICO.....	26
FIGURA 12: SÍNTESE DE BENZIMIDAZÓIS USANDO-SE CLORETOS DE ACILA.....	27
FIGURA 13: SÍNTESE DE BENZIMIDAZÓIS PARTINDO DE ADUCTOS DE ALDEIDOS.....	27
FIGURA 14: SÍNTESE DE BENZIMIDAZÓIS PARTINDO DE CLORETOS DE HIDROXIMOILA.....	28
FIGURA 15: SÍNTESE DE BENZIMIDAZÓIS PARTINDO DE CLORIDRATOS DE N-ARILAMIDINAS.....	28
FIGURA 16: ANEL DE BENZOXAZOL E SUA NUMERAÇÃO.....	29
FIGURA 17: SÍNTESE DE BENZOXAZÓIS A PARTIR DE CLORETOS DE HIDROXIMOILA.....	30
FIGURA 18: SÍNTESE DE BENZOXAZÓIS A PARTIR DE CLORETOS DE ACILA.....	30
FIGURA 19: FORMAÇÃO DE BASES DE SCHIFF.....	31
FIGURA 20: OXIDAÇÃO DE BASES DE SCHIFF POR ÓXIDO DE PRATA, GERANDO BENZOXAZÓIS.....	31
FIGURA 21: SÍNTESE DE BENZOXAZÓIS PELA CONDENSAÇÃO DE HALETOS DE ARILA E O-AMINOFENÓIS VIA CARBONILAÇÃO CATALISADA POR PALÁDIO.....	32
FIGURA 22: SÍNTESE DE ISOTIOCIANATOS COM TIOFOSGÊNIO.....	33
FIGURA 23: FORMAÇÃO DE DITIOCARBAMATOS.....	33
FIGURA 24: SÍNTESE DE KALUZA DE ISOTIOCIANATOS.....	34
FIGURA 25: DECOMPOSIÇÃO DO COMPOSTO INTERMEDIÁRIO DA SÍNTESE DE KALUZA.....	34
FIGURA 26: SÍNTESE DE ISOTIOCIANATOS COM 2-CLOROPIRIDÍNIO.....	35
FIGURA 27: SÍNTESE DE ISOTIOCIANATOS DE JOCHIMS.....	35
FIGURA 28: SÍNTESE DE ISOTIOCIANATOS COM REAGENTE DE GRIGNARD.....	36
FIGURA 29: SÍNTESE DE ISOTIOCIANATOS A PARTIR DE DERIVADOS DE IMINOFOSFORANOS.....	36
FIGURA 30: SÍNTESE DE ISOTIOCIANATOS A PARTIR DE NITROALCANOS PRIMÁRIOS E TIOURÉIA NA PRESENÇA DE 4- CLORO-FENILISOCIANATO E UMA QUANTIDADE CATALÍTICA DE TRIETILAMINA.....	36
FIGURA 31: SÍNTESE DE ISOTIOCIANATOS PELA ALQUILAÇÃO OU ACILAÇÃO DO ION TIOCIANATO.....	37
FIGURA 32: SÍNTESE DE ISOTIOCIANATOS PELA SUBSTITUIÇÃO DO GRUPO DIAZÔNIO.....	37
FIGURA 33: REAÇÕES DE CONDENSAÇÃO.....	39
FIGURA 34: FORMAÇÃO DO GRUPO ISOTIOCIANATO.....	40
FIGURA 35: FORMAÇÃO DE TIOURÉIAS.....	40
FIGURA 36: SÍNTESE DE 1A-C.....	42
FIGURA 37: SÍNTESE DO ÁCIDO 5-AMINO-2-HIDROXIBENZÓICO.....	43
FIGURA 38: ESQUEMA SINTÉTICO DAS REAÇÕES DE CONDENSAÇÃO.....	44
FIGURA 39: SÍNTESE DE 2A-C.....	47
FIGURA 40: ESQUEMA DA SÍNTESE DE 2A.....	48
FIGURA 41: SÍNTESE DE 2B E 2C.....	50
FIGURA 42: REAÇÃO DE ISOTIOCIANATOS COM AMINAS PRIMÁRIAS.....	53
FIGURA 43: FORMAÇÃO DAS TIOURÉIAS 3A-C E 4A.....	54
FIGURA 44: ESPECTROS DE ABSORÇÃO (ESQUERDA) E EXCITAÇÃO (DIREITA) DO COMPOSTO 4A.....	61
FIGURA 45: ESQUEMA DO APARELHO UTILIZADO PARA OBTIVER-SE OS ESPECTROS DE EMISSÃO DOS COMPOSTOS ESTUDADOS.....	62

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1: PROPRIEDADES DE ALGUMAS SUBSTÂNCIAS UTILIZADAS COMO ETIQUETAS FLUORESCENTES.....	6
TABELA 2: AMINAS SINTETIZADAS.....	39
TABELA 3: ISOTIOCIANATOS SINTETIZADOS.....	40
TABELA 4: TIOURÉIAS SINTETIZADAS.....	41
TABELA 5: RENDIMENTOS OBTIDOS PARA OS PRODUTOS 1A-C.....	44
TABELA 6: COMPRIMENTOS DE ONDA DE BANDAS DE INFRAVERMELHO IMPORTANTES PARA OS PRODUTOS 1A-C.....	45
TABELA 7: COMPRIMENTOS DE ONDA DE BANDAS DE INFRAVERMELHO PARA OS PRODUTOS 2A-C.....	51
TABELA 8: DADOS OBTIDOS PELA ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NO ULTRAVIOLETA E VISÍVEL PARA OS PRODUTOS 1C, 2A-C, 3A-C E 4A.....	58
TABELA 9: COMPRIMENTOS DE ONDA DOS MÁXIMOS DE EMISSÃO PARA OS COMPOSTOS 2A-C E 4A.....	60
TABELA 10: DADOS OBTIDOS PELA ESPECTROSCOPIA DE EMISSÃO PARA OS COMPOSTOS 1A, 1C, 2A-C, 3A-C.....	63
TABELA 11: DESLOCAMENTOS DE STOKES PARA OS COMPOSTOS 1C, 2A-C, 3A-C.....	66

ÍNDICE DE ESPECTROS

ESPECTRO 1: ESPECTRO DE INFRAVERMELHO DO COMPOSTO 1A, EM PASTILHA DE KBR	93
ESPECTRO 2: ESPECTRO DE INFRAVERMELHO DO COMPOSTO 1B, EM PASTILHA DE KBR	93
ESPECTRO 3: ESPECTRO DE INFRAVERMELHO DO COMPOSTO 1C, EM PASTILHA DE KBR	94
ESPECTRO 4: ESPECTRO DE INFRAVERMELHO DO COMPOSTO 2A, EM PASTILHA DE KBR	94
ESPECTRO 5: ESPECTRO DE INFRAVERMELHO DO COMPOSTO 2B, EM PASTILHA DE KBR	95
ESPECTRO 6: ESPECTRO DE INFRAVERMELHO DO COMPOSTO 2C, EM PASTILHA DE KBR	95
ESPECTRO 7: ESPECTRO DE INFRAVERMELHO DO COMPOSTO 3A, EM PASTILHA DE KBR	96
ESPECTRO 8: ESPECTRO DE INFRAVERMELHO DO COMPOSTO 3B, EM PASTILHA DE KBR	96
ESPECTRO 9: ESPECTRO DE INFRAVERMELHO DO COMPOSTO 3C, EM PASTILHA DE KBR	97
ESPECTRO 10: ESPECTRO DE INFRAVERMELHO DO COMPOSTO 4A, EM PASTILHA DE KBR	97
ESPECTRO 11: ESPECTRO DE RMN ¹ H DO COMPOSTO 1A	99
ESPECTRO 12: ESPECTRO DE RMN ¹ H DO COMPOSTO 1B	100
ESPECTRO 13: ESPECTRO DE RMN ¹ H DO COMPOSTO 1C	101
ESPECTRO 14: ESPECTRO DE RMN ¹ H DO COMPOSTO 2A	102
ESPECTRO 15: ESPECTRO DE RMN ¹ H DO COMPOSTO 2B	103
ESPECTRO 16: ESPECTRO DE RMN ¹ H DO COMPOSTO 2C	104
ESPECTRO 17: ESPECTRO DE RMN ¹ H DO COMPOSTO 3A	105
ESPECTRO 18: ESPECTRO DE RMN ¹ H DO COMPOSTO 3B	106
ESPECTRO 19: ESPECTRO DE RMN ¹ H DO COMPOSTO 3C	107
ESPECTRO 20: ESPECTRO DE RMN ¹ H DO COMPOSTO 4A	108
ESPECTRO 21: ESPECTRO DE ABSORÇÃO NO ULTRAVIOLETA-VISÍVEL DO COMPOSTO 1C	110
ESPECTRO 22: ESPECTRO DE ABSORÇÃO NO ULTRAVIOLETA-VISÍVEL DO COMPOSTO 2A	110
ESPECTRO 23: ESPECTRO DE ABSORÇÃO NO ULTRAVIOLETA-VISÍVEL DO COMPOSTO 2B	111
ESPECTRO 24: ESPECTRO DE ABSORÇÃO NO ULTRAVIOLETA-VISÍVEL DO COMPOSTO 2C	111
ESPECTRO 25: ESPECTRO DE ABSORÇÃO NO ULTRAVIOLETA-VISÍVEL DO COMPOSTO 3A	112
ESPECTRO 26: ESPECTRO DE ABSORÇÃO NO ULTRAVIOLETA-VISÍVEL DO COMPOSTO 3B	112
ESPECTRO 27: ESPECTRO DE ABSORÇÃO NO ULTRAVIOLETA-VISÍVEL DO COMPOSTO 3C	113
ESPECTRO 28: ESPECTROS DE ABSORÇÃO NO ULTRAVIOLETA-VISÍVEL PARA OS COMPOSTOS 2A-C	113
ESPECTRO 29: ESPECTRO DE ABSORÇÃO NO ULTRAVIOLETA-VISÍVEL PARA O COMPOSTO 4A	114
ESPECTRO 30: ESPECTRO DE EXCITAÇÃO DO COMPOSTO 4A	116
ESPECTRO 31: ESPECTRO DE EXCITAÇÃO DO COMPOSTO 2A	116
ESPECTRO 32: ESPECTRO DE EMISSÃO DO COMPOSTO 1A	118
ESPECTRO 33: ESPECTRO DE EMISSÃO DO COMPOSTO 1C	118
ESPECTRO 34: ESPECTRO DE EMISSÃO DO COMPOSTO 2A	119
ESPECTRO 35: ESPECTRO DE EMISSÃO DO COMPOSTO 2B	119
ESPECTRO 36: ESPECTRO DE EMISSÃO DO COMPOSTO 2C	120
ESPECTRO 37: ESPECTRO DE EMISSÃO DO COMPOSTO 3A	120
ESPECTRO 38: ESPECTRO DE EMISSÃO DO COMPOSTO 3B	121
ESPECTRO 39: ESPECTRO DE EMISSÃO DO COMPOSTO 3C	121
ESPECTRO 40: ESPECTRO DE EMISSÃO DE ALBUMINA SÉRICA BOVINA MARCADA COM TRÊS CONCENTRAÇÕES DIFERENTES DO COMPOSTO 2A	122
ESPECTRO 41: ESPECTRO DE EMISSÃO DO COMPOSTO 2A	123
ESPECTRO 42: ESPECTRO DE EMISSÃO DO COMPOSTO 2B	123
ESPECTRO 43: ESPECTRO DE EMISSÃO DO COMPOSTO 2C	124
ESPECTRO 44: ESPECTRO DE EMISSÃO DO COMPOSTO 4A	124

1. INTRODUÇÃO

1.1 GENERALIDADES

O fenômeno da fluorescência já é conhecido de longa data pelo homem. O primeiro relato de observação de fluorescência parece ter sido feito no século XVI pelo médico e botânico espanhol Nicolás Monardes que mencionou uma matiz azulada presente em água que havia sido contida em recipientes feitos de um tipo de madeira conhecida como "lignum nephriticum". No século XVII este fenômeno foi observado e mais claramente descrito por vários cientistas, entre eles Robert Boyle (1626-1691) e Isaac Newton (1624-1727). Boyle relatou que a fluorescência é mais aparente em soluções diluídas e que é grandemente afetada pela adição de ácidos ou bases. Durante os séculos XVII e XVIII foram descobertos muitos outros materiais e soluções fluorescentes, mas pouco progresso foi feito na compreensão do fenômeno ¹.

Em 1852 foi publicado um artigo de grande importância para o assunto da fluorescência ². Seu autor foi George Gabriel Stokes (1820-1903), físico e professor de matemática em Cambridge. Em seu minucioso trabalho, Stokes introduziu o termo fluorescência, previamente chamado "dispersão"; conceituou a fluorescência como emissão de luz; estabeleceu a técnica de observação da fluorescência com 2 filtros coloridos diferentes - um para permitir a passagem do raio de luz de excitação e o outro para filtrar a luz emitida - e enunciou aquela que viria a ser conhecida como lei de Stokes: a luz emitida é sempre de comprimentos de onda maiores do que a luz de excitação. Em seu trabalho subsequente, Stokes estabeleceu a relação entre concentração e intensidade da fluorescência e descreveu a inibição da fluorescência a altas concentrações e pela presença de substâncias estranhas. Ele aparentemente também foi o primeiro a propor, em 1864, o uso da fluorescência como uma ferramenta analítica ¹.

Já ao final do século XIX, mais de 600 substâncias fluorescentes eram conhecidas.

Atualmente, corantes fluorescentes possuem inúmeras aplicações científicas e tecnológicas, que vão desde aquelas mais simples, presentes no cotidiano da sociedade moderna, até as altamente sofisticadas.

Um exemplo de utilização bastante difundida são os branqueadores óticos - corantes fluorescentes que absorvem luz na região do ultravioleta próximo e emitem na região do visível - que são extensamente utilizados como aditivos para a fabricação de papel e detergentes para roupas.

Pode-se, de maneira genérica e sem fazer muito esforço, citar várias outras aplicações, por exemplo: corantes para tecidos, plásticos e tintas; corantes para *lasers*; detecção de defeitos em materiais; coletores solares; *displays* de cristal líquido; aplicações em medicina e biologia; química analítica, etc.

Em química analítica as substâncias fluorescentes possuem grande importância. Os métodos analíticos que exploram o fenômeno da fluorescência, apesar de relativamente simples, são capazes de grande sensibilidade e seletividade.

Podemos chamar de fluoróforo a um fragmento estrutural ou molécula que apresente fluorescência.

Um dos parâmetros mais importantes de um fluoróforo é a sua eficiência quântica, que é definida como a razão entre o número de fótons absorvidos e o número de fótons emitidos pela molécula. Outros parâmetros importantes são: o coeficiente de absorvidade molar no comprimento de onda de excitação e, em certos casos, o tempo de decaimento da fluorescência, τ , que é o tempo após a interrupção da energia de excitação em que a substância continua emitindo luz. O deslocamento de Stokes - definido como a diferença entre os comprimentos de onda dos máximos de absorção e emissão da substância - é também importante para certas aplicações de fluoróforos - em corantes para laser, coletores solares e certas aplicações em bioquímica, é desejado um grande deslocamento de Stokes.

Um grande número de substâncias fluorescentes já foi sintetizado até o momento, porém a busca por novos materiais permanece constante. O principal motivo para isto é que dentro das várias aplicações dos fluoróforos, não apenas uma alta conversão de energia de excitação em luz emitida é necessária, mas também uma gama de outras propriedades, tais como estabilidade térmica e fotoquímica,

emissão de luz em determinada parte do espectro, solubilidade em certos solventes, reatividade química ou inércia frente a outras substâncias, ausência de toxidez, etc.

1.2 ETIQUETAS FLUORESCENTES

Métodos analíticos que se utilizam do fenômeno da fluorescência são amplamente utilizados, tanto em aplicações qualitativas como quantitativas. Tais técnicas geralmente apresentam alta sensibilidade e especificidade e, em muitos casos, relativa simplicidade de uso. As técnicas baseadas na fluorescência estão a tal ponto evoluídas que é possível detectar-se, em certos casos, a fluorescência proveniente de uma única molécula ^{3,4}.

Existem muitas substâncias, orgânicas e inorgânicas, que apresentam fluorescência e podem ser analisadas quantitativamente utilizando-se esta propriedade. Também muitos materiais e amostras biológicas que apresentam fluorescência podem ser estudados valendo-se deste aspecto.

Muitas vezes porém, pode-se obter informações sobre um sistema utilizando-se das propriedades fluorescentes de substâncias extrínsecas a este sistema. Nestes casos, fluoróforos são adicionados ao sistema que se quer estudar.

Como a eficiência quântica dos fluoróforos e também o seu espectro são geralmente bastante sensíveis ao ambiente a que estão sujeitos, pode-se, estudando as mudanças que ocorrem naquelas características de fluoróforos adequados, retirar informações sobre um determinado meio e as transições a que pode estar sujeito. Quando utilizados desta maneira, os fluoróforos normalmente são chamados de **sondas fluorescentes**.

Pode-se quantificar substâncias não fluorescentes, por fluorimetria, utilizando-se fluoróforos capazes de formar conjugados fluorescentes com tais substâncias. Esta técnica é utilizada, por exemplo, em cromatografia líquida de alta pressão (CLAP) ⁵. As substâncias que se quer quantificar podem ser levadas a formar derivados fluorescentes antes ou após passar pela coluna de separação.

Corantes fluorescentes capazes de formar conjugados (aductos) fluorescentes com substratos originalmente não fluorescentes podem ser chamados, genericamente, de **etiquetas fluorescentes**.

Etiquetas fluorescentes possuem inúmeras aplicações tecnológicas. Além de sua utilização em CLAP, já citada, podemos acrescentar diversas outras, como:

eletroforese capilar ⁶, determinação da seqüência de nucleotídeos de DNA ^{7,8} e na técnica chamada de imunofluorescência ⁸⁻¹⁰.

Em medicina e biologia, etiquetas fluorescentes possuem diversas aplicações. Estas geralmente envolvem a ligação de corantes fluorescentes a substâncias, tecidos, células ou microorganismos e a posterior detecção dos conjugados por fluorimetria ou microscopia.

Por meio de técnicas que utilizam fluoróforos, é possível investigar a estrutura de moléculas biológicas complexas, como o DNA, RNA e proteínas. As características da fluorescência de etiquetas fluorescentes ligadas a sítios específicos nos biopolímeros fornecem elementos para a determinação de sua estrutura, assim como permitem determinar a seqüência de nucleotídeos no DNA ¹¹.

A imunofluorescência é uma importante técnica que utiliza etiquetas fluorescentes. No processo da imunofluorescência, a etiqueta fluorescente liga-se a um anticorpo, que posteriormente vai formar um conjugado com um certo antígeno, que então pode ser detectado pela fluorescência do aducto formado.

A imunofluorescência constitui-se de uma ferramenta poderosa para obter-se informações sobre diversos antígenos e possui extenso emprego em ensaios clínicos.

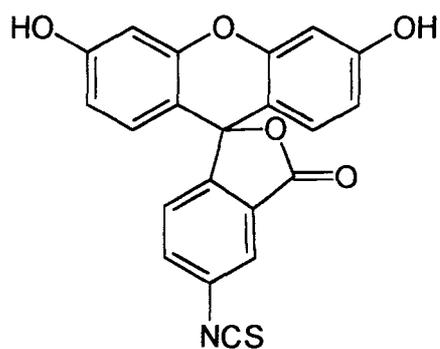
A forma de ligação da etiqueta fluorescente ao substrato desejado é geralmente covalente, mas também pode ser por adsorção. Nas ligações covalentes freqüentemente participam grupos amina, tiol, hidroxila e ácido carboxílico presentes no substrato e grupos isocianato, isotiocianato, N-hidroxisuccinimida, cloretos de acila, aldeído, entre outros, presentes na etiqueta fluorescente.

Diversas substâncias têm sido usadas como etiquetas fluorescentes, em diferentes aplicações. Na **tabela 1** encontram-se listadas propriedades de algumas delas, e a **figura 1** apresenta as estruturas de algumas etiquetas fluorescentes.

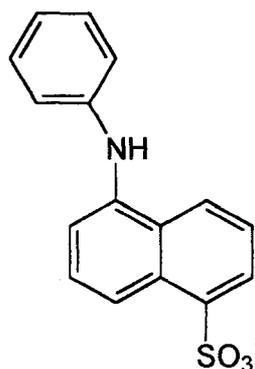
Tabela 1: propriedades de algumas substâncias utilizadas como etiquetas fluorescentes.

fluoróforo	λ (nm)	abs/exc	ϵ (l/mol)	λ emis (nm)	eficiência quântica	τ (ns)
Fluoresceína (FITC)	492		7×10^4	520	0,85	4,5
Rodaminas:						
RBITC	550		$1,2 \times 10^4$	585	0,70	3,0
TMRITC	550		$5,0 \times 10^4$	580		
RB 200 SC	530, 565			595		1,0
Umbeliferona	380		$2,0 \times 10^4$	450		
DANS	340		$3,4 \times 10^4$	480-520	0,30	14,0
ANS	385			471	0,80	16,0
Fluorescamina	394		$6,3 \times 10^4$	475	0,10	7
MDFP	390		$6,4 \times 10^4$	480	0,10	
N-(3-pireno)-maleimida	340		375, 392		100	
Amarelo LúCIFer VS	430			540		
Porfirinas	400-410			619-633		
Clorofilas	430-453			548-669		
Ficobiliproteína	550-620		$7,0 \times 10^4$	580-660	0,50-0,98	
Eu-(β-NTA)₃	340		3×10^4	590; 613		500000
Tb-EDTA-ácido sulfossalicílico	300			490; 545		~ 150 000

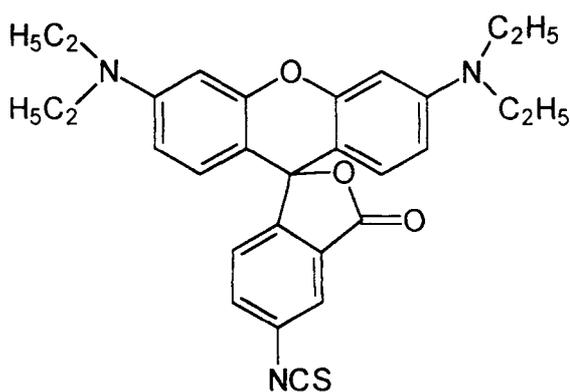
‡ tabela reproduzida da referência ¹⁰.



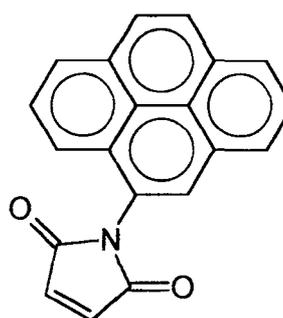
FITC



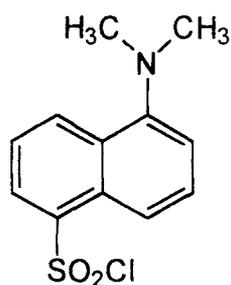
ANS



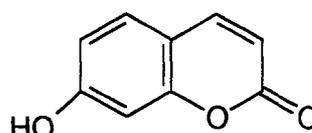
TMRITC



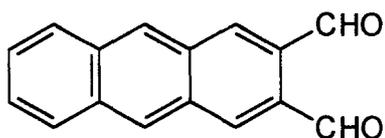
Maleimidilpireno



DANS



Umbeliferona



2,3-dicarboxaldeído-antraceno

FITC: isotiocianatofluoresceína
ANS: ácido anilino-naftalenossulfônico
TMRITC: isotiocianato-tetrametilrodamina
DANS: cloro de dansila

Figura 1: fórmulas estruturais de algumas etiquetas fluorescentes.

Na **tabela 1** observa-se a presença de substâncias de várias classes, como quelatos de metais ¹⁰ e proteínas ^{10,12}, por exemplo.

O fluoróforo a ser utilizado como etiqueta fluorescente deve possuir propriedades adequadas para esta função. Para aumentar a sensibilidade, é desejável que o mesmo tenha uma alta absorvidade molar e eficiência quântica (normalmente acima de 0,1). Deve ser capaz de ligar-se de alguma maneira ao substrato desejado e, ao realizar-se esta ligação, suas propriedades devem manter-se adequadas.

Em aplicações biológicas, fluorescência na região do azul é comum a diversos sistemas, portanto fluoróforos que emitem luz na região do verde ao vermelho são mais adequados.

Um dos problemas que afeta a utilização de etiquetas fluorescentes em certos ambientes é a presença de ruído de *background*, causado por interferentes que também emitam fluorescência, ou por espalhamento de luz ¹⁰. Espalhamento de luz pode causar uma grande interferência em soluções contendo grandes concentrações de proteínas. A fim de se contornar este problema, normalmente são desejáveis etiquetas fluorescentes com um grande deslocamento de Stokes, que permitem, pela seleção conveniente dos comprimentos de onda de excitação e emissão, eliminar os efeitos provenientes do *background* ^{10,13}.

Em aplicações de imunofluorescência, a etiqueta fluorescente mais utilizada é a isotiocianatofluoresceína (FITC). Entre as suas vantagens, encontra-se a alta eficiência quântica, que aproxima-se da unidade. Apresenta, porém, deficiências, como seu pequeno deslocamento de Stokes, o que torna a medição sensível a interferências do meio. Além disso, algumas preparações comerciais contêm dois isômeros da fluoresceína, o que pode causar certos inconvenientes ¹⁰.

Embora haja várias etiquetas fluorescentes largamente conhecidas e utilizadas, continua existindo uma demanda por novas substâncias, com diferentes características.

Atualmente, existe interesse em desenvolver-se etiquetas fluorescentes com comprimentos de onda de absorção e emissão maiores, grande deslocamento de Stokes e com tempo de decaimento de fluorescência (τ) dilatado.

Um longo tempo de decaimento de fluorescência favorece o emprego de técnicas de espectroscopia de fluorescência transiente ¹⁴⁻¹⁶, que podem eliminar as interferências indesejáveis.

Em certos casos deseja-se utilizar simultaneamente duas etiquetas fluorescentes, com comprimentos de onda de emissão diferentes, de maneira que não interfiram entre si, como por exemplo em microscopia de fluorescência ¹⁷.

Por tudo que foi citado, depreende-se que o desenvolvimento de novas etiquetas fluorescentes e suas utilizações é um campo de interesse importante dentro da tecnologia e da ciência e que continua a ser bastante estudado nos dias de hoje.

1.3 CONCEITOS TEÓRICOS SOBRE A FLUORESCÊNCIA

A energia total de uma molécula é a soma de suas energias eletrônica, vibracional e rotacional, cuja magnitude diminui na seguinte ordem: $E_{elec} > E_{vib} > E_{rot}$.

A absorção de radiação eletromagnética na região do visível e ultravioleta por uma molécula induz mudanças na energia eletrônica da molécula, resultante de transições dos elétrons de valência. Estas transições consistem na excitação de um elétron de um orbital ocupado (usualmente um orbital p não ligante ou um orbital π ligante) a um orbital de maior energia (um orbital antiligante π^* ou σ^*). Indica-se a transição de um elétron em um orbital ligante π para um orbital antiligante π^* , por $\pi \rightarrow \pi^*$ e a transição de um elétron em um orbital não ligante para um orbital antiligante π^* por $n \rightarrow \pi^*$ ¹⁸.

No estado fundamental (não excitado), os elétrons que ocupam o mesmo orbital têm spins antiparalelos. O spin resultante, S, da molécula é zero, enquanto a multiplicidade, dada pela quantidade $|2S| + 1$, é igual a um. Tal estado de energia é chamado singleto (S). Se a transição para um estado excitado é acompanhada pela inversão do spin de um dos elétrons, o spin total torna-se um e a multiplicidade três. Tal estado excitado é chamado de tripleto (T). Se a transição para um estado excitado não é acompanhada de qualquer mudança na multiplicidade, tem-se um estado singleto excitado (S^*) ¹⁹.

Além dos níveis de energia principais, relativos a estados eletrônicos, uma molécula possui vários subníveis, associados a movimentos rotacionais e vibracionais da molécula ¹⁹.

Uma molécula em um nível eletrônico excitado pode perder a energia absorvida das seguintes maneiras:

- (a) transições sem radiação: conversão interna e cruzamento intersistemas;
- (b) emissão de radiação: fluorescência e fosforescência;
- (c) reações fotoquímicas.

A conversão interna caracteriza-se pela perda de energia da molécula excitada em colisões com o solvente. Nestas colisões a molécula excitada transfere

energia vibracional para o solvente, decaindo rapidamente vários níveis vibracionais entre os singletos excitados e, eventualmente, chegando ao nível vibracional mais baixo do estado singleto fundamental.

A conversão interna ocorre entre estados de mesma multiplicidade. Quando há a inversão do spin de um elétron, gerando um estado tripleto, o fenômeno recebe o nome de cruzamento intersistemas.

Como já foi citado, a molécula pode perder energia também pela emissão de radiação. Neste caso, há o fenômeno chamado luminescência. A luminescência divide-se em duas modalidades: quando a emissão ocorre de um estado singleto excitado, é chamada fluorescência, quando a partir de um estado tripleto excitado, é chamada fosforescência.

A fosforescência é um fenômeno menos comum em relação à fluorescência e a maioria dos compostos orgânicos só a exibem quando congelados a baixas temperaturas²⁰.

Processos do tipo (a) e (b) estão representados esquematicamente no assim chamado diagrama de Jablonski:

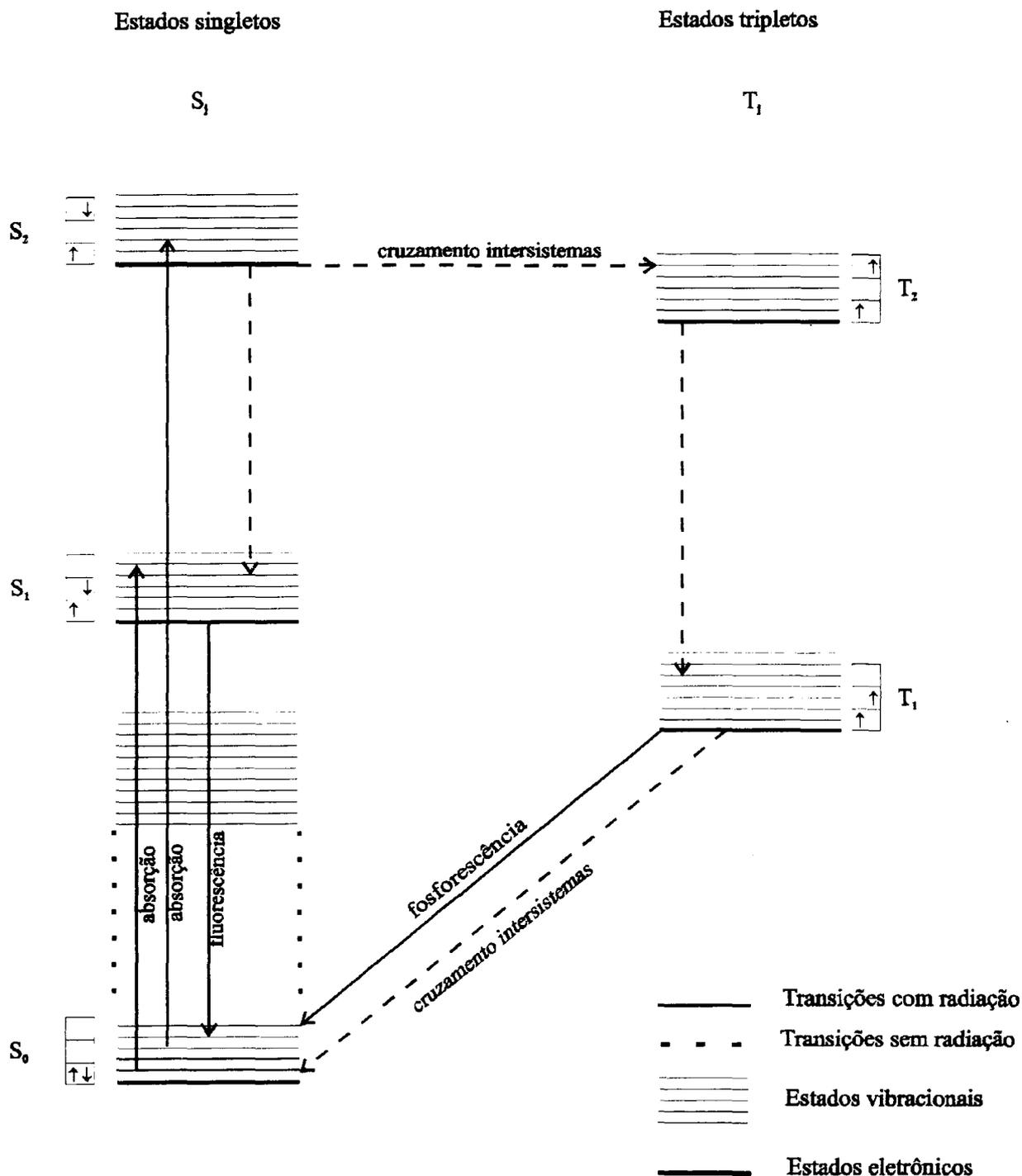


Figura 2: Diagrama de Jablonski.

No diagrama de Jablonski, os níveis vibracionais mais baixos de estados eletrônicos estão representados por linhas horizontais grossas, enquanto as linhas horizontais mais finas são os outros estados vibracionais associados. Uma molécula, ou íon, no estado fundamental S_0 , é levada a um estado excitado singlete, S_1 ou S_2

(ou estados superiores, S_j), por absorção de luz. Transições sem radiação são representadas por linhas tracejadas no diagrama. A conversão interna leva ao estado vibracional mais baixo de determinado estado eletrônico ou pode levar também a estados singletos inferiores. O cruzamento intersistemas (linhas horizontais tracejadas), leva aos estados tripletos. A emissão de radiação da espécie que se encontra no estado vibracional mais baixo de S_1 , passando a seguir a qualquer um dos níveis vibracionais de S_0 , é chamada fluorescência. A radiação emitida pela espécie que se encontra em um estado tripleto, passando ao estado S_0 , é chamada fosforescência. Se ambos os tipos de radiação são observados, ou se não se consegue distinguir entre um ou outro, o termo luminescência é utilizado ²¹.

Como visto na **figura 2**, a absorção de luz ocorre geralmente no estado vibracional mais baixo do estado eletrônico fundamental e leva a um dos estados vibracionais de um estado eletrônico excitado. Antes de ocorrer a emissão de radiação, a molécula, se não estiver isolada em condições especiais, irá sofrer várias colisões com moléculas de solvente. Nestas colisões, perderá parte da energia absorvida, decaindo rapidamente até o estado vibracional mais baixo associado ao estado eletrônico excitado. Desta forma, a fluorescência irá ocorrer sempre a partir do estado vibracional mais baixo do estado singlete excitado (normalmente S_1 ou, em alguns casos, S_2) e resulta na espécie emitente indo a um dos estados vibracionais de S_0 .

Os espectros de absorção e emissão das moléculas orgânicas apresentam-se como estruturas de bandas difusas, devido a presença dos vários níveis vibracionais associados, com um ou vários máximos, dependendo do número de transições eletrônicas associadas.

Devido ao fato de que parte da energia absorvida é liberada vibracionalmente, o espectro de emissão sempre é deslocado para comprimentos de onda maiores em relação ao espectro de absorção. Este deslocamento é chamado de deslocamento de Stokes, em memória a G. G. Stokes (1820-1903), que foi o primeiro a observar tal fenômeno e enunciá-lo como uma regra geral.

O deslocamento de Stokes observado entre os máximos de absorção e emissão da maioria das espécies fluorescentes encontra-se na faixa de 50 a 70 nm. Porém, quando a espécie envolvida sofre mudanças estruturais, (como no caso do

fototautomerismo, que será discutido posteriormente), ao atingir o estado excitado, assumindo uma estrutura de mais baixa energia antes de emitir luz, o deslocamento de Stokes torna-se maior, usualmente na faixa de 150 a 250 nm. Após emitir radiação, a molécula novamente assume a estrutura que possuía no estado fundamental ¹⁹.

O espectro de fluorescência, em casos ideais, é uma imagem especular do espectro de absorção, porém deslocado para comprimentos de onda maiores ²¹.

A regra da simetria especular dos espectros de emissão e absorção foi formulada por Levshin em 1931. Qualquer desvio desta regra é devido a vários processos intra e intermoleculares que podem ocorrer nas espécies químicas quando excitadas, como por exemplo formação de um tautômero no estado excitado ¹⁹.

Muitas moléculas orgânicas são capazes de absorver luz na região do visível ou ultravioleta, mas nem todas são capazes de exibir luminescência. Conhecem-se espécies que fluorescem na região do ultravioleta e infravermelho próximo, mas a maioria absorve e emite na região do visível. Moléculas fluorescentes geralmente apresentam uma estrutura rígida, que dificulta a perda de energia da molécula excitada por movimentos torsionais.

Os compostos fluorescentes mais comuns e intensos geralmente são substâncias aromáticas com transições $\pi \rightarrow \pi^*$ de baixa energia. Compostos fluorescentes alifáticos ou alicíclicos contendo carbonilas e compostos com ligas duplas conjugadas também são conhecidos porém, em menor número ²².

A intensidade da luminescência de uma espécie química depende de certos fatores, entre eles a potência da fonte de excitação e a intensidade da absorção de luz pela espécie. O principal fator determinante da intensidade da luminescência é o *rendimento quântico* (ou *eficiência quântica*), que é definido como a razão entre os quanta emitidos e os quanta absorvidos. O rendimento quântico é independente da potência da fonte de excitação e é determinado, assim como a intensidade de absorção, por características estruturais da espécie química ¹⁹.

Vavilov demonstrou que o rendimento quântico de muitas substâncias permanece constante ao longo de uma ampla faixa de comprimentos de onda da luz de excitação ¹⁹.

O *rendimento quântico absoluto*, η , é o rendimento quântico integrado ao longo de todo o espectro. É expresso como porcentagem ou frações da unidade ¹⁹.

A intensidade da luminescência também pode ser caracterizada pelo *rendimento quântico relativo*, que é a razão entre a intensidade do máximo de emissão da espécie (em solução) a ser investigada e soluções de referência ¹⁹.

As características de emissão e absorção dos luminóforos, quando em solução, são afetadas pelas interações intermoleculares presentes entre solvente e soluto, e também por outras substâncias presentes na solução. Podem ocorrer deslocamento das bandas e mudanças no rendimento quântico. Estas variações são dependentes do tipo de solvente, especialmente da constante dielétrica do solvente¹⁹.

1.3.1 TIPOS DE ESPECTROS DE FLUORESCÊNCIA

Três principais tipos de espectros de fluorescência podem ser obtidos para cada amostra, em função do tipo de informação desejada: o espectro de emissão, o espectro de excitação e o espectro de excitação/emissão sincronizado ²³.

1.3.1.1. Espectro de emissão: Para registrar o espectro de emissão de um composto, irradia-se a amostra com um comprimento de onda de excitação fixo e mede-se a intensidade da luz reemitida, numa faixa espectral definida. O comprimento de onda de excitação ideal para registrar o espectro de emissão de um composto fluorescente determinado é, em geral, escolhido em função do seu espectro de absorção. Na maior parte dos casos, este comprimento de onda corresponde ao máximo de absorção.

1.3.1.2. Espectro de excitação: Para registrar o espectro de excitação, faz-se variar o comprimento de onda de excitação, enquanto o comprimento de onda de observação (ou emissão) é mantido constante. O comprimento de onda de observação ideal é aquele que corresponde à posição do máximo do espectro de emissão do composto considerado. Para um composto puro, a forma do espectro de excitação corrigido deve ser similar, senão idêntica, àquela de seu espectro de absorção e independente do comprimento de onda de observação, se todos os estados excitados produzidos pela absorção se transformam por conversão interna até o nível vibracional mais baixo do primeiro estado singleto excitado.

1.3.1.3. Espectro sincronizado: Os espectros sincronizados são obtidos pela varredura simultânea de uma faixa espectral de comprimentos de onda de excitação e de emissão apresentando um intervalo ($\Delta\lambda$) constante entre eles. O intervalo ($\Delta\lambda$) a ser utilizado para um composto determinado é, em geral, escolhido empiricamente. Quando o espectro de excitação e emissão são simétricos, o melhor ($\Delta\lambda$) é aquele que representa o intervalo, expresso em comprimentos de onda, entre os máximos de excitação e emissão.

1.4 TRANSFERÊNCIA PROTÔNICA INTRAMOLECULAR NO ESTADO ELETRÔNICO EXCITADO

O fenômeno da inibição de fluorescência mostra que moléculas em estados eletrônicos excitados podem sofrer reações que são comparáveis em velocidade, ou mais rápidas, que a emissão de fluorescência, que tem um tempo de decaimento, τ , tipicamente na ordem de 10^{-8} segundos²⁴.

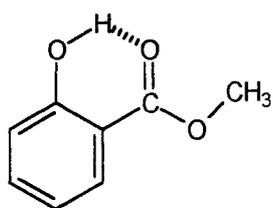
Sabe-se que várias moléculas experimentam mudanças estruturais ultrarrápidas ao atingir um estado eletrônico excitado. Entre essas mudanças se encontra a transferência de prótons, presente em um grande número de substâncias e que vem sendo bastante estudada.

É necessário distinguir pelo menos 3 tipos transferência protônica que ocorrem no estado excitado de moléculas: (1) transferência protônica intermolecular, (2) transferência protônica intramolecular promovida por solvente, (3) transferência protônica intramolecular intrínseca. Neste documento, trataremos apenas do terceiro tipo. Kasha, em seu artigo²⁵, fornece uma revisão sobre o assunto da transferência protônica e suas diferentes classes.

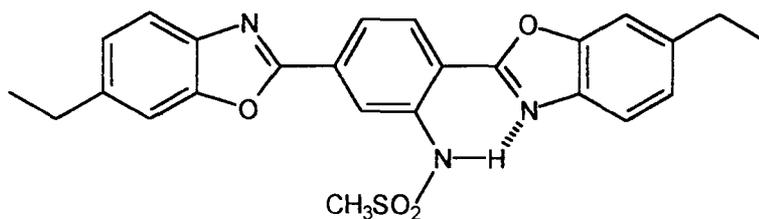
Tem sido observado que as constantes de acidez ou basicidade de aminas aromáticas, álcoois e fenóis mudam em várias ordens de grandeza após excitação eletrônica²⁶. Para que uma molécula possa apresentar o fenômeno de Transferência Protônica Intramolecular no Estado Excitado (TPIEE, ou em inglês, ESIPT), que também pode ser referida como fototautomerismo, deve possuir grupos ácido e básico vizinhos, associados por pontes de hidrogênio intramoleculares.

Muitas moléculas com grupos ácidos e básicos vizinhos são capazes de apresentar TPIEE²⁷. Os grupos doadores de prótons, na maioria das moléculas conhecidas, são hidroxilas, mas podem ser também tosilamidas ou mesilamidas²⁸. Os grupos aceptores de prótons podem ser carbonilas, iminas ou N-heterocíclicos.

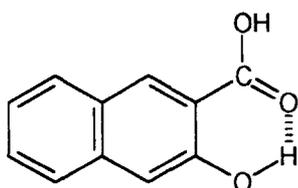
Na **figura 3** estão representadas algumas moléculas que apresentam TPIEE.



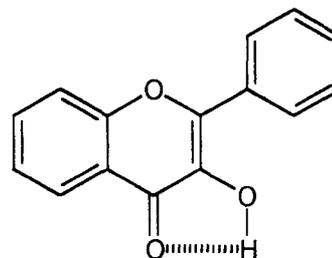
salicilato de metila



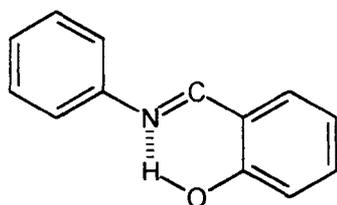
N-[2,5-Bis(5-etil-2-benzoxazolil)fenil]metanosulfonamida



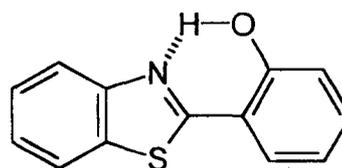
ácido 3-hidróxi-2-naftóico



3-hidróxi-flavona



salicilidenoanilina



2-(2'-hidroxifenil)benzotiazol

Figura 3: fórmulas de algumas substâncias que apresentam fototautomerismo ²⁷⁻³⁰.

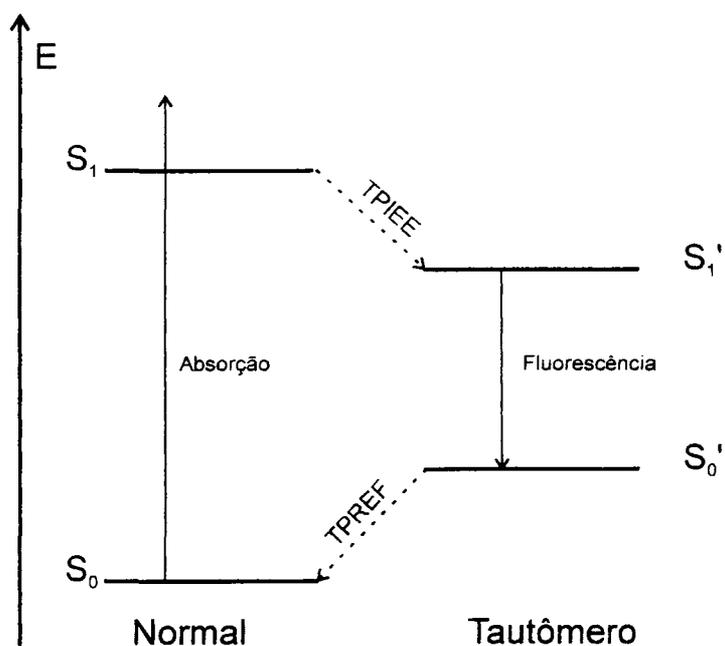
Um grande número de estudos sobre TPIEE já foram relatados. Na maioria dos casos estudados, o rearranjo da forma inicial para a forma tautomérica é extremamente rápido e ocorre sem nenhuma barreira de energia de ativação significativa ³¹. Todavia, são conhecidos casos de moléculas que exibem TPIEE com a presença de uma barreira de ativação ³².

No processo de TPIEE, um próton, que está covalentemente ligado a um átomo **A** no estado fundamental da molécula, migra, no estado excitado da molécula, para um átomo vizinho **B**, ao qual já se encontrava ligado anteriormente por uma ponte de hidrogênio e a uma distancia menor que 2 Å. É formada então uma estrutura diferente da inicial, um fototautômero. Como o processo de transferência do

próton ocorre ao longo de uma ponte de hidrogênio, o processo pode ser representado por uma mudança de $A-H\cdots B$ para $A\cdots H-B$.

O processo, pelo menos quando não está presente uma barreira de ativação, é extremamente rápido e ocorre na escala de tempo abaixo de picossegundos mesmo em meios rígidos e temperaturas abaixo de 4 K. Esta alta velocidade é, presumivelmente, devida a pequena distância que o próton percorre (aproximadamente 1 \AA)³².

A figura 4 apresenta um diagrama energético simplificado do fenômeno da fluorescência em corantes que apresentam TPIEE:



Ao absorver um fóton e passar ao estado excitado S_1 , rapidamente a molécula transfere um próton de um átomo a outro, adquirindo uma configuração que é mais estável, desta maneira alcançando um estado de menor energia eletrônica. A emissão do fóton ocorre então a partir deste fototautômero. Ao atingir o estado fundamental, a espécie com o próton no átomo original passa a ser a mais estável e ocorre a transferência protônica reversa no estado fundamental (TPREF).

Figura 4: diagrama energético da TPIEE.

Como pode-se notar pelo diagrama de energia acima, a formação do fototautômero leva a uma grande redução na diferença de energia entre o estado excitado e o estado fundamental da molécula, o que produz, como resultado final, um grande deslocamento de Stokes em moléculas que apresentam TPIEE. (O deslocamento de Stokes, na maioria dos fluoróforos, encontra-se entre 50 e 70 nm. Em moléculas que apresentam fototautomerismo, este pode atingir mais de 200 nm.)

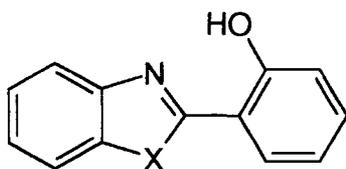
Fluoróforos que apresentam TPIEE possuem, além do grande deslocamento de Stokes, outras características interessantes, como alta estabilidade fotoquímica e eficiência de inversão de população próxima a 100%^{33,34}. As modificações fotofísicas causadas pela TPIEE também são responsáveis pelo fotocromismo presente em certas substâncias³⁴. Fluoróforos que apresentam TPIEE têm sido propostos como eficientes fontes de emissão estimulada de luz sintonizável³³, materiais para proteção contra os raios ultravioletas³³, materiais para armazenar informação ao nível molecular³³, sondas fluorescentes para estudos estruturais de proteínas³⁵ e detectores de radiação ionizante causadas por colisões de partículas subatômicas em aceleradores de partículas²⁸.

1.5 2-(2'-HIDROXIFENIL)BENZAZÓIS

Benzazol é um nome genérico que designa moléculas que possuem os grupos benzoxazolila, benzimidazolila ou benzotiazolila. Há bastante tempo sabe-se que estes grupos são fluoróforos. Os altos rendimentos quânticos e a facilidade de síntese tornaram os benzazóis altamente atrativos para várias aplicações tecnológicas ¹⁹.

Benzazóis com substituintes do tipo 2-hidroxifenila na posição 2 apresentam formação de pontes de hidrogênio intramoleculares. Esta classe de compostos possui como característica um grande deslocamento de Stokes, o que torna possível a preparação de fluoróforos que são incolores a luz do dia, mas que fluorescem nas regiões verde, amarelo e até vermelho do espectro, quando expostos à radiação ultravioleta.

As ligações por ponte de hidrogênio bastante intensas podem ser comprovadas pela presença de bandas de hidroxila fracas e alargadas nos espectros de infravermelho e sinais de hidrogênio da hidroxila finos e a campo baixo, nos espectros de RMN ¹H ³⁶.



X= O 2-(2'-hidroxifenil)benzoxazol
X= S 2-(2'-hidroxifenil)benzotiazol
X= NH 2-(2'-hidroxifenil)benzimidazol

Figura 5: moléculas da família dos benzazóis.

Cohen e Flavian ao observar o deslocamento de Stokes anormalmente grande no espectro de fluorescência do 2-(2'-hidroxifenil)benzoxazol ³⁶, propuseram a formação de um tautômero de estrutura cetônica no estado excitado, gerado pela transferência de um próton:

Elsaesser *et alii*⁴² observaram o espectro de infravermelho do 2-(2'-hidroxifenil)benzotiazol em solventes polares e apolares e puderam concluir que, em solventes apolares, este composto forma fortes pontes de hidrogênio intramoleculares, o que favorece uma estrutura rígida e planar. Por outro lado, em solventes com capacidade de formar pontes de hidrogênio, as pontes de hidrogênio intramoleculares encontram-se enfraquecidas ou desfeitas (devido a formação de pontes de hidrogênio entre o soluto e o próprio solvente) - estes dados são válidos para as moléculas tanto no estado fundamental S_0 como no estado excitado S_1' . Este enfraquecimento das pontes de hidrogênio intramoleculares, quando em solventes com capacidade de formar pontes de hidrogênio intermoleculares, leva a uma estrutura menos rígida e favorece mecanismos de relaxação não fluorescentes das moléculas excitadas. Assim como neste caso estudado, a eficiência quântica de outras moléculas da família dos 2-(2'-hidroxifenil)benzazóis é bastante dependente da capacidade do solvente de formar pontes de hidrogênio intermoleculares.

O mecanismo de transferência protônica intramolecular no estado excitado nesta classe de compostos já foi bastante estudado, tanto em aspectos experimentais como por simulações computacionais. Alguns exemplos são as referências^{26,28,30-34,36,42-51}.

1.6 SÍNTESE DE ANÉIS AZÓLICOS CONDENSADOS

Esta seção trata da síntese de benzazóis 2-substituídos. Embora os métodos de síntese sejam, em muitos casos, similares, a seção foi dividida em síntese de benzimidazóis e síntese de benzoxazóis.

1.6.1 SÍNTESE DE BENZIMIDAZÓIS

Benzimidazóis contém um anel benzênico condensado a um anel imidazol, como indicado na estrutura do benzimidazol (**figura 8**). A figura mostra também o sistema de numeração para o anel de benzimidazol.

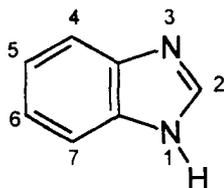


Figura 8: anel de benzimidazol e sua numeração.

Um aspecto importante da química dos benzimidazóis é que o hidrogênio na posição 1, quando presente, pode facilmente tautomerizar, conforme mostrado na **figura 9**.

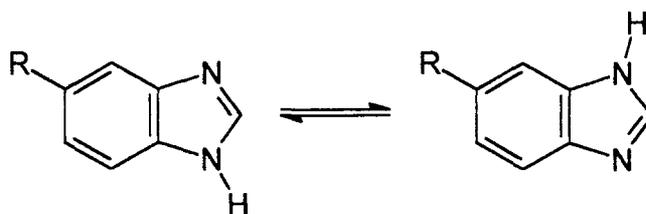


Figura 9: tautomerização no anel benzimidazólico.

Na maior parte dos métodos de síntese de benzimidazóis, o processo envolve a condensação de um *o*-diaminobenzeno ou *o*-nitroanilina com um ácido carboxílico, éster, nitrila, cloreto de acila ou aldeído ⁵².

Muitos ácidos carboxílicos alifáticos reagem, facilmente, com *o*-diaminobenzenos, dando benzimidazóis 2-substituídos. A reação pode ser efetuada pelo aquecimento dos reagentes em refluxo ou em tubo selado ⁵³. Mais usual, porém, é a presença de um catalisador.

Uma das primeiras sínteses importantes de benzimidazóis é a "Síntese de Phillips": nesta técnica, os reagentes - um *o*-diaminobenzeno e um ácido carboxílico - são aquecidos na presença de um ácido mineral diluído (geralmente ácido clorídrico 4 N) ^{53,54}.

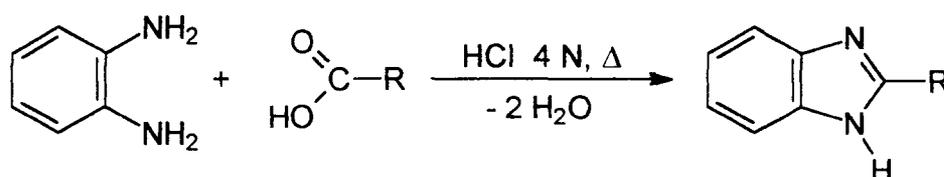


Figura 10: síntese de Phillips para benzimidazóis.

A síntese de Phillips permite obter produtos que não eram possíveis pelo mero aquecimento dos reagentes de partida e funciona geralmente bem com ácidos carboxílicos alifáticos, enquanto ácidos carboxílicos aromáticos normalmente não levam a bons resultados ⁵³.

Um reagente bastante geral para promover a condensação de ácidos carboxílicos tanto alifáticos como aromáticos (e também ésteres, amidas e nitrilas)

com *o*-diaminoarenos (e também com *o*-aminofenóis e *o*-aminotiofenóis) é o ácido polifosfórico (APF) ⁵⁵⁻⁶⁰.

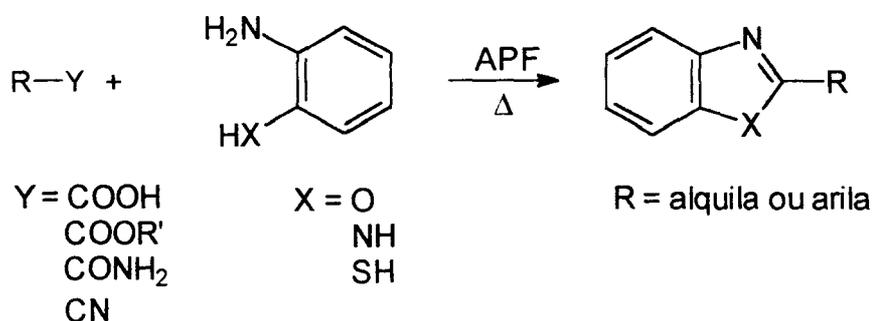


Figura 11: síntese de benzazóis em meio de ácido polifosfórico.

O método de condensação com ácido polifosfórico permite obter grande variedade de heterociclos com bom rendimento. Porém, devido às altas temperaturas utilizadas (geralmente entre 150 e 250 °C) e o meio ácido da reação, este método não funciona bem quando certos grupos funcionais estão presentes. Éteres fenólicos são em grande parte hidrolisados ⁶¹. Foi também relatado que quando grupos nitro estiverem presentes pode ocorrer carbonização dos produtos devido ao efeito oxidante daquele grupo a elevadas temperaturas ⁵⁵.

Além do ácido polifosfórico, existem outros reagentes desidratantes semelhantes que podem promover a condensação entre ácidos carboxílicos e *o*-diaminoarenos. Um exemplo é o polifosfato de etila ⁶².

Benzimidazóis e aza-análogos (em que um grupamento CH aromático é substituído por um átomo de nitrogênio) podem ser obtidos pela reação entre aldeídos e *o*-diaminobenzenos em nitrobenzeno, que age como um oxidante. Yadagiri e Lown ⁶³ relataram a síntese de benzimidazóis e aza-análogos com vários grupos substituintes, obtendo rendimentos de 65-90 %. Nesta reação, a base de Schiff inicialmente formada sofre uma ciclização oxidativa para formar o benzimidazol.

Göker *et alii* ⁶⁴ relataram a síntese de benzimidazóis 2-substituídos pela reação de cloretos de acila e um *o*-diaminoareno, gerando primeiramente uma amida que posteriormente sofre uma desidratação promovida por ZnCl₂ anidro e HCl anidro,

levando ao heterociclo desejado. A **figura 12** apresenta um exemplo extraído do artigo original:

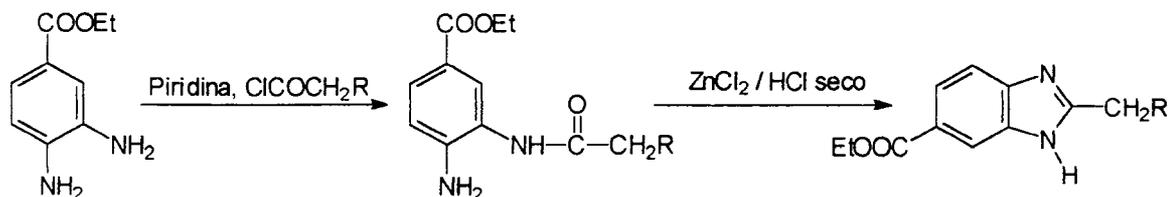


Figura 12: síntese de benzimidazóis usando-se cloretos de acila.

Ridley *et alii*⁶⁵ relataram a síntese de benzimidazóis 2-substituídos pela reação, em uma única etapa, entre aductos de aldeídos e bissulfito de sódio e *o*-diaminoarenos em etanol sob refluxo. A reação envolve condições suaves, oferecendo pouco risco a substituintes lábeis que possam estar presentes. Os autores referiram que na maioria dos casos estudados a reação foi completada em poucos minutos e levou a bons rendimentos. A **figura 13** mostra o mecanismo proposto pelos autores:

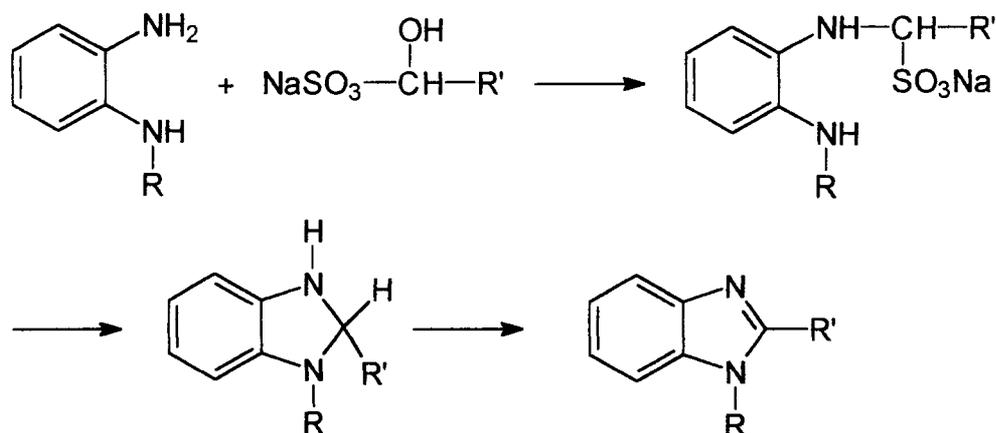


Figura 13: síntese de benzimidazóis partindo de aductos de aldeídos.

A maioria dos métodos de síntese de benzimidazóis envolve altas temperaturas. Hendrickson e Hussoin⁶⁶, porém, relataram a síntese de 2-arylbenzimidazóis com bons rendimentos e a temperatura ambiente a partir de ácidos

carboxílicos e *o*-fenilenodiaminas na presença de anidridos de fosfônio (sob a forma de sais de triflato) e trietilamina. Este método é eficaz também na síntese de benzoxazóis e benzotiazóis, bastando substituir-se as *o*-fenilenodiaminas por *o*-aminofenóis ou *o*-aminotiofenóis.

Outro método que envolve condições suaves e temperatura ambiente foi relatado por Abdelhamid *et alii*⁶⁷. Consiste na reação de um cloreto de hidroximoila com *o*-diaminobenzeno em etanol, a temperatura ambiente:

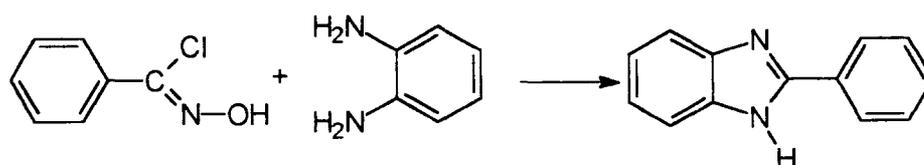


Figura 14: síntese de benzimidazóis partindo de cloretos de hidroximoila.

Os autores referiram a obtenção de rendimentos quantitativos. Esta técnica pode ser utilizada também na síntese de benzoxazóis e benzotiazóis, bastando para isto a substituição do *o*-diaminobenzeno por *o*-aminofenol ou *o*-aminotiofenol.

Benzimidazóis podem ser geradas em condições suaves e com altos rendimentos pela transformação de cloridratos de *N*-arilamidinas com um mol de hipoclorito de sódio e base, conforme relatado por Grenda *et alii*⁵².

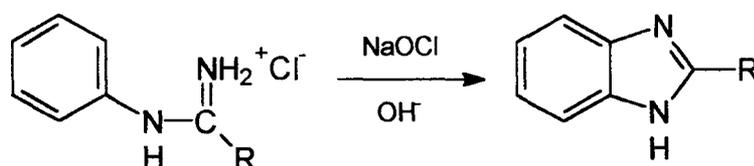


Figura 15: síntese de benzimidazóis partindo de cloridratos de *N*-arilamidinas.

1.6.2 SÍNTESE DE BENZOXAZÓIS

Benzoxazóis possuem um anel oxazol condensado a um anel benzênico. A **figura 16** mostra o benzoxazol e o sistema de numeração do seu anel:

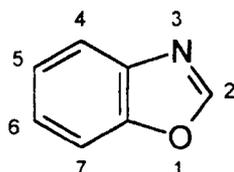


Figura 16: anel de benzoxazol e sua numeração.

Os métodos de síntese de benzoxazóis substituídos são numerosos. Muitos deles são semelhantes aos métodos de síntese de benzimidazóis, assunto anteriormente tratado. Há entretanto diferenças importantes: diversamente dos *o*-diaminoarenos, *o*-aminofenóis não reagem com ácidos carboxílicos alifáticos em meio ácido diluído ¹⁹.

Benzoxazóis podem ser sintetizados pela reação de condensação entre ácidos carboxílicos (ou ésteres, amidas ou nitrilas) e *o*-aminofenol, reação esta promovida pelo ácido polifosfórico ^{55-57,60}, como visto na seção 1.6.1.

Também o polifosfato de etila tem sido utilizado como agente condensante na síntese de benzoxazóis a partir de ácidos carboxílicos e *o*-aminofenóis ^{62,68}, assim como o polifosfato de trimetilsilila ^{69,70}.

Terashima *et alii* relataram que o ácido bórico pode agir como catalisador na síntese de benzoxazóis 2-substituídos a partir da condensação entre ácidos carboxílicos e *o*-aminofenol ^{71,72}.

A reação entre um cloreto de hidroximoíla e *o*-aminofenol a temperatura ambiente permite a obtenção de benzoxazóis com ótimos rendimentos ⁶⁷, como citado na seção anterior.

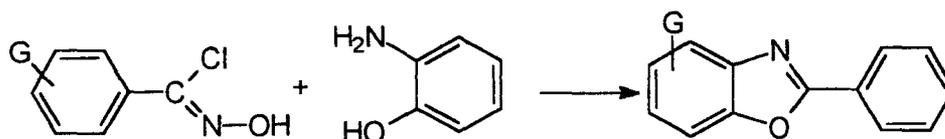


Figura 17: síntese de benzoxazóis a partir de cloretos de hidroximoila.

O método descrito por Hendrickson e Hussoin ⁶⁶, descrito na seção anterior, permite a obtenção de benzoxazóis com bons rendimentos e utiliza condições suaves de reação.

Benzoxazóis podem ser obtidos pela reação de cloretos de acila com *o*-aminofenóis formando primeiramente amidas, que posteriormente são ciclizadas, gerando benzoxazóis.

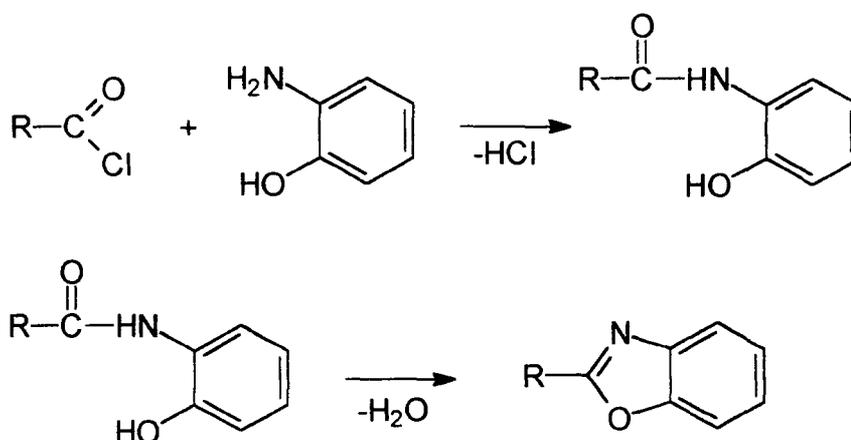


Figura 18: síntese de benzoxazóis a partir de cloretos de acila.

A ciclização das amidas assim geradas pode ser efetuada de diversas maneiras. Por exemplo: aquecimento em *N*-metilpirrolidona ⁷³ ou DMSO ⁷⁴, aquecimento em solvente com a presença de *p*-toluenossulfonato de piridínio - que age como catalisador ⁷⁵ - e aquecimento em ácido polifosfórico ⁵⁹.

Benzoxazóis podem ser sintetizados pela ciclização oxidativa de bases de Schiff com grupos hidroxila em posição orto, as quais são preparadas facilmente pela reação entre aldeídos e *o*-aminofenóis.

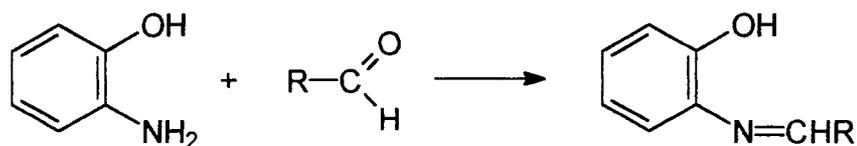


Figura 19: formação de bases de Schiff.

Tem sido relatada a oxidação de bases de Schiff, gerando benzoxazóis, por agentes como tetracetato de chumbo(IV), tetrafosfato de chumbo(IV) e peróxido de níquel ⁷⁶. Yoshifuji *et alii* ⁷⁶ relataram a síntese de benzoxazóis com ótimos rendimentos pela oxidação de bases de Schiff com óxido de prata.

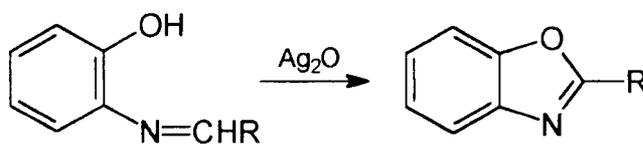


Figura 20: oxidação de bases de Schiff por óxido de prata, gerando benzoxazóis.

Perry *et alii* ⁷⁷ relataram a síntese de benzoxazóis pela condensação de haletos de arila e *o*-aminofenóis via carbonilação catalisada por paládio. Primeiramente são geradas *N*-(2-hidroxifenil)amidas, que posteriormente são ciclizadas levando a benzoxazóis 2-substituídos.

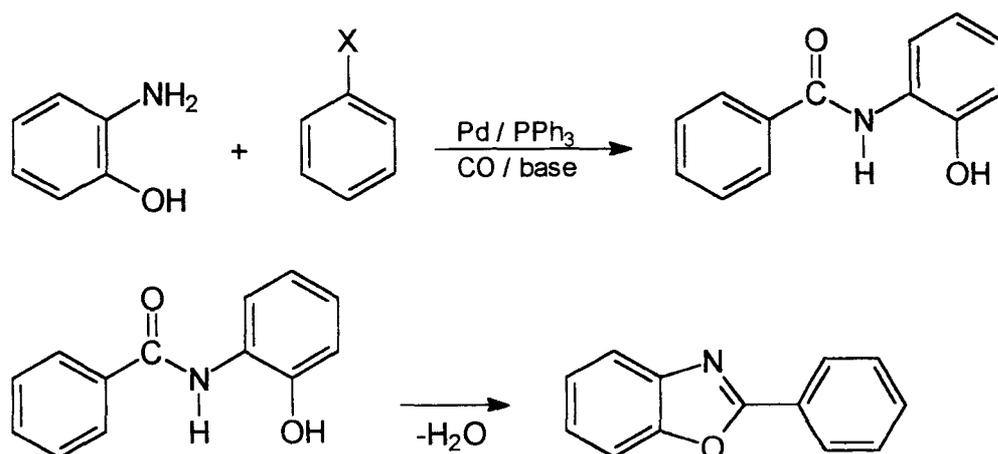


Figura 21: síntese de benzoxazóis pela condensação de haletos de arila e *o*-aminofenóis via carbonilação catalisada por paládio.

Os autores referiram que os seus melhores rendimentos foram obtidos pela desidratação das amidas obtidas em refluxo com tolueno na presença do catalisador ácido *p*-toluenossulfônico ou metanossulfônico.

1.7 SÍNTESE DE ISOTIOCIANATOS

Os métodos de síntese de isotiocianatos mais utilizados são aqueles que partem de aminas, seja pela reação com tiofosfênio ou pela formação de ditiocarbamatos, que posteriormente são convertidos a isotiocianatos.

Bastante utilizado é o método da reação entre aminas e tiofosfênio. Esta técnica tem sido utilizada em escala industrial e parece ser bastante geral na síntese de fenilisotiocianatos, conquanto parece falhar para naftil-isotiocianatos ⁷⁸⁻⁸⁰.



Figura 22: síntese de isotiocianatos com tiofosfênio.

O tiofosfênio apresenta como inconveniente para utilização em laboratório a sua alta toxidez, o que o torna um reagente perigoso em sua manipulação ⁸¹.

Isotiocianatos são amiúde gerados em laboratório pela desidrossulfuração (direta ou indireta) de ditiocarbamatos, que são gerados pela reação entre aminas primárias e dissulfeto de carbono na presença de uma base ⁸².

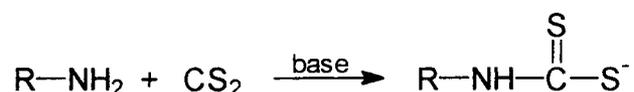


Figura 23: formação de ditiocarbamatos.

A formação dos ditiocarbamatos não ocorre com aminas aromáticas com grupos fortemente elétron-retiradores ⁷⁸.

A conversão dos ditiocarbamatos em isotiocianatos pode ser realizada por vários reagentes, tais como sulfato de cobre ^{83,84}, sulfato ferroso ⁸⁴, sulfato de

zinco⁸⁴, nitrato de chumbo⁸⁵, peróxido de hidrogênio e oxigênio, iodo e hidróxido de potássio em metanol⁸⁶; cloreto férrico⁸⁰, assim como por um hipoclorito alcalino⁸⁶.

Ditiocarbamatos podem ser convertidos em isotiocianatos pela chamada “Síntese de Kaluza”⁸⁷. Neste procedimento, o ditiocarbamato anteriormente gerado é feito reagir com cloroformiato de etila, formando um derivado que posteriormente se decompõe, na presença de uma base, fornecendo o isotiocianato^{78,88}.

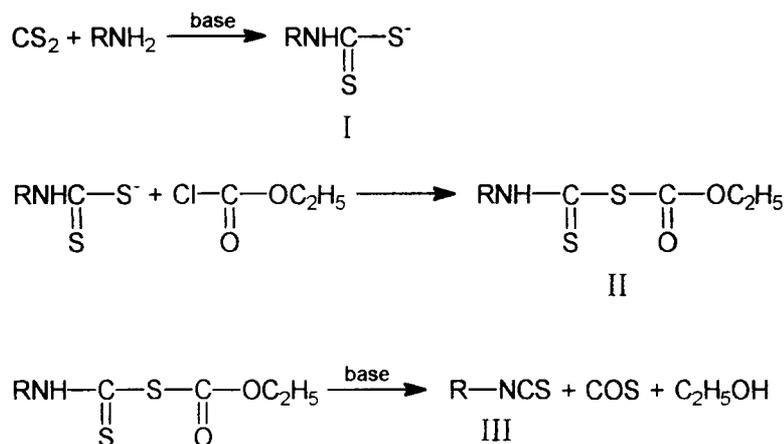


Figura 24: síntese de Kaluza de isotiocianatos.

A decomposição do derivado carboetóxi II é fortemente dependente da alcalinidade do meio. Uma explicação para este fato é que II, em comum com tioamidas não substituídas no nitrogênio ou mono substituídas, é fracamente ácido e reage com bases para dar o ânion IV (vide figura 25), que decompõe-se em III, etanol e oxissulfeto de carbono^{86,89}.

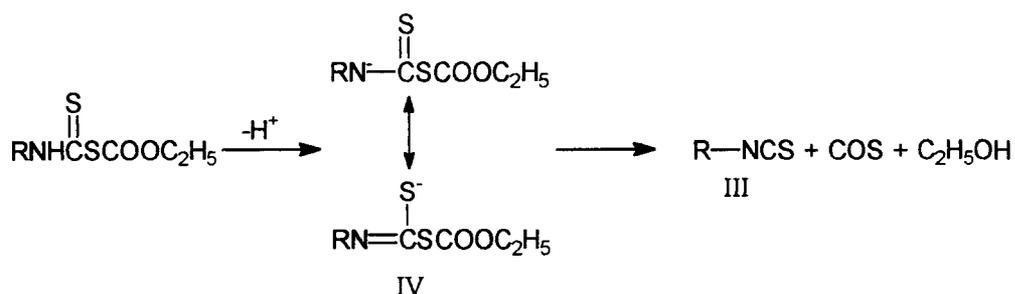


Figura 25: decomposição do composto intermediário da síntese de Kaluza.

Sais de ditiocarbamatos podem ser convertidos a isotiocianatos também por meio da ação de um sal de 2-cloropiridínio⁹⁰:

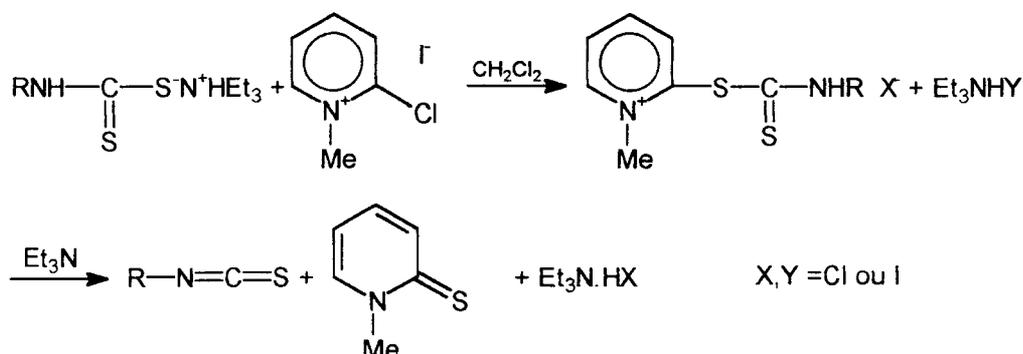


Figura 26: síntese de isotiocianatos com 2-cloropiridínio.

Jochims⁹¹ relatou a síntese de isotiocianatos em um procedimento de uma etapa, pela reação entre aminas primárias, CS₂ e dicitcloexilcarbodiimida (DCC), em piridina. A reação, de acordo com a proposta do autor, deve passar também por um intermediário ditiocarbamato.

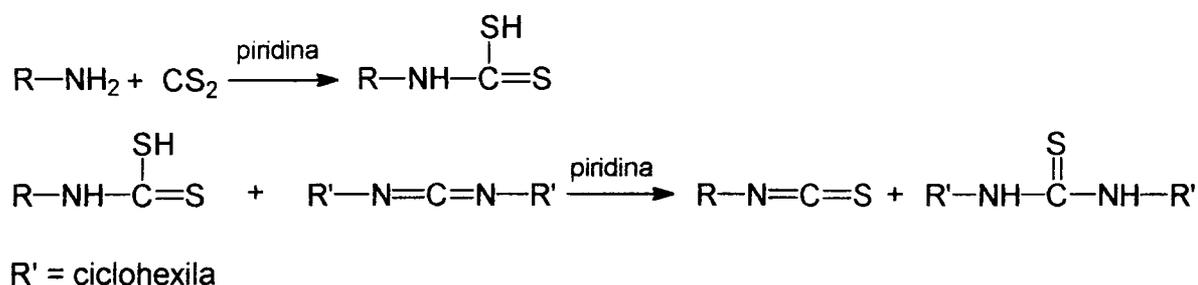


Figura 27: síntese de isotiocianatos de Jochims.

Sayigh *et alii*⁹² relataram a síntese de isotiocianatos em uma etapa pela reação entre arilaminas e cloreto de dietilcarbamoila.

Sakai *et alii*⁹³ relataram a síntese de isotiocianatos por meio da reação entre aminas, dissulfeto de carbono e um reagente de Grignard.

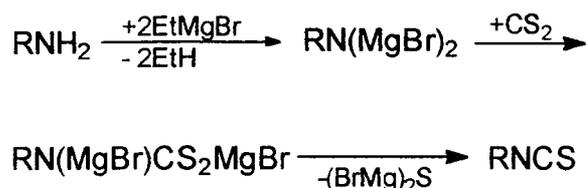


Figura 28: síntese de isotiocianatos com reagente de Grignard.

A síntese de isotiocianatos de alquila e arila através de derivados de iminofosforanos foi relatada ⁸¹. Os derivados iminofosforanos são facilmente obtidos de uma amina primária e dibrometo de trifenilfosfina:

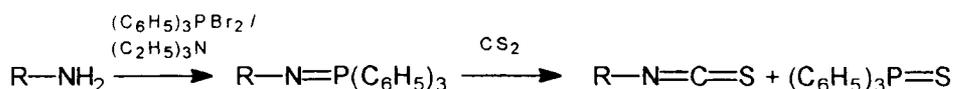


Figura 29: síntese de isotiocianatos a partir de derivados de iminofosforanos.

A reação entre nitroalcanos primários e tiouréia na presença de 4-cloro-fenilisocianato e uma quantidade catalítica de trietilamina em benzeno gera isotiocianatos de alquila e de arila com rendimentos moderados ⁹⁴:

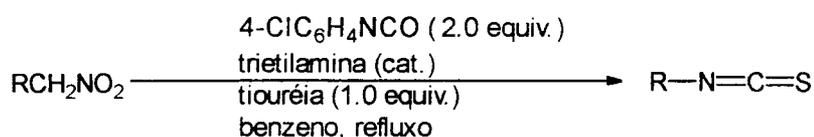


Figura 30: síntese de isotiocianatos a partir de nitroalcanos primários e tiouréia na presença de 4-cloro-fenilisocianato e uma quantidade catalítica de trietilamina.

Isotiocianatos podem ser obtidos pela alquilação ou acilação ^{82,95} do íon tiocianato:

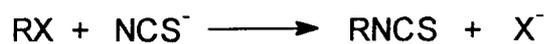


Figura 31: síntese de isotiocianatos pela alquilação ou acilação do íon tiocianato.

Isotiocianatos também podem ser gerados pela substituição do grupo diazônio pelo íon tiocianato:

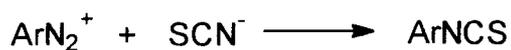


Figura 32: síntese de isotiocianatos pela substituição do grupo diazônio.

Isonitrilas podem ser convertidas a isotiocianatos pelo tratamento com um dissulfeto, tal como PhCOSSCOPh e acetato de tálio(I) ou acetato de chumbo(II) ⁹⁶.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi a síntese de substâncias fluorescentes que apresentem o fenômeno da TPIEE e possuam grupos reativos frente a proteínas, de maneira a ter potencial utilidade como etiquetas fluorescentes para aqueles substratos. Buscou-se desta forma explorar uma característica intrínseca dos fluoróforos que apresentam TPIEE, qual seja, um grande deslocamento de Stokes, o que é uma qualidade desejável para uma etiqueta fluorescente.

A abordagem utilizada para alcançar-se este objetivo foi a incorporação do grupo isotiocianato a estruturas do tipo 2-(2'-hidroxifenil)benzazóis, conhecidas por apresentar TPIEE, ou aza-análogos destas estruturas, em que um dos grupamentos metínicos do anel benzênico condensado é substituído por um átomo de nitrogênio. Moléculas com a estrutura do tipo referido acima têm sido descritas como possuidoras de excelente estabilidade fotoquímica^{33,34}, o que pode vir a se constituir em uma vantagem adicional para o uso de tais compostos como etiquetas fluorescentes, além do deslocamento de Stokes pronunciado.

O grupo isotiocianato é altamente reativo frente a aminas primárias, formando uma ligação do tipo tiouréia⁹⁷ e, como virtualmente qualquer proteína possui grupos amina livres, presentes em fragmentos de lisina, fluoróforos que apresentam o grupo isotiocianato são adequados para formar conjugados fluorescentes com proteínas e também com outros compostos que possuam grupos amina primários.

3. EXPERIMENTAL

3.1 DESCRIÇÃO GERAL DA METODOLOGIA UTILIZADA:

O processo sintético utilizado para se chegar aos isotiocianatos desejados pode ser dividido em 2 etapas principais. Na primeira etapa efetuaram-se reações de condensação entre o ácido 5-amino-2-hidroxi-benzóico e produtos aromáticos *orto*-dissubstituídos, levando a 3 heterociclos amino-substituídos, com a estrutura do tipo 1 e que estão relacionados na tabela 2.

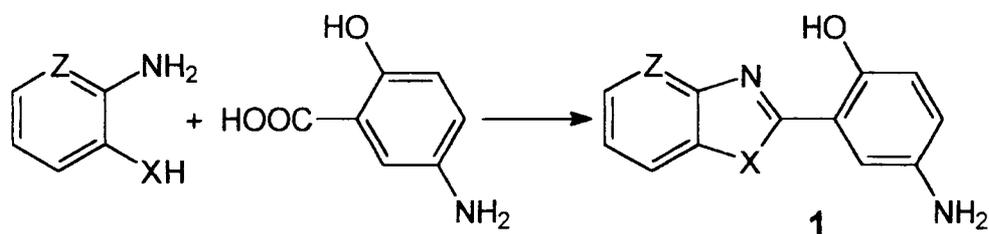


Figura 33: reações de condensação.

Tabela 2: aminas sintetizadas.

código	produto	X	Z
1a	2-(5'-amino-2'-hidroxifenil)benzoxazol	O	CH
1b	2-(5'-amino-2'-hidroxifenil)benzimidazol	NH	CH
1c	2-(5'-amino-2'-hidroxifenil)oxazolo[4,5-b]piridina	O	N

Na segunda etapa, os grupos amina dos produtos 1a-c foram convertidos em grupos isotiocianato, levando às estruturas de tipo 2.

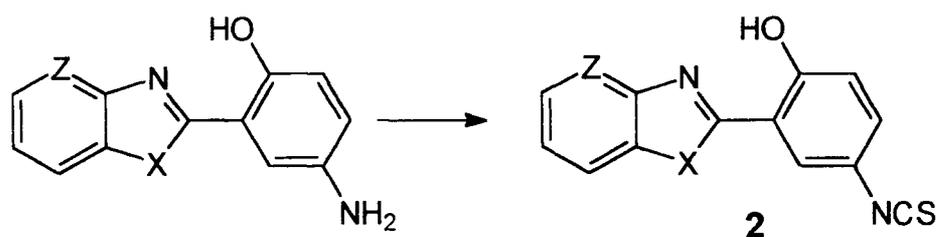
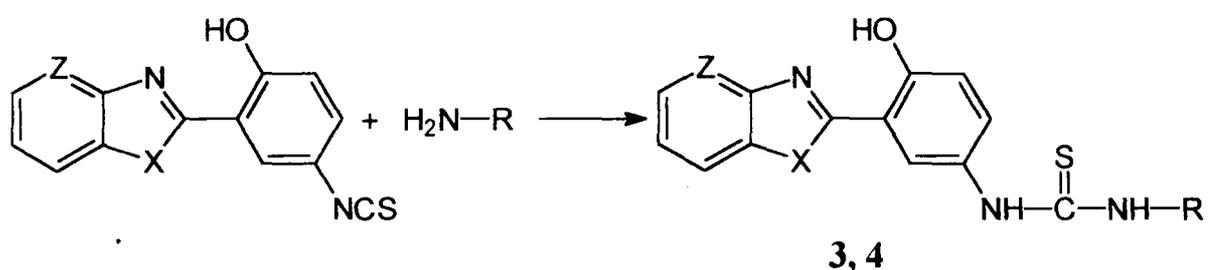


Figura 34: formação do grupo isotiocianato.

Tabela 3: isotiocianatos sintetizados.

código	produto	X	Z
2a	2-(2'-hidróxi-5'-isotiocianatofenil)benzoxazol	O	CH
2b	2-(2'-hidróxi-5'-isotiocianatofenil)benzimidazol	NH	CH
2c	2-(2'-hidróxi-5'-isotiocianatofenil)oxazolo[4,5-b]piridina	O	N

Com o objetivo de comprovar a reatividade de **2a-c** frente a aminas primárias e estudar as propriedades de fluorescência dos produtos formados, os isotiocianatos **2a-c** foram levados a reagir com *terc*-butilamina, gerando tiouréias com a estrutura de tipo **3**. Também realizou-se a reação entre o composto **2a** e a *iso*-propilamina, gerando o produto **4a**.



3 - R= *terc*-butila **4**- R= *iso*-propila

Figura 35: formação de tiouréias.

Tabela 4: tiouréias sintetizadas.

código	produto	X	Z
3a	2-[2'-hidroxi-5'-(N- <i>terc</i> -butiltioureída)fenil]benzoxazol	O	CH
3b	2-[2'-hidroxi-5'-(N- <i>terc</i> -butiltioureída)fenil]benzimidazol	NH	CH
3c	2-[2'-hidroxi-5'-(N- <i>terc</i> -butiltioureída)fenil]oxazolo[4,5-b]piridina	O	N
4a	2-[2'-hidroxi-5'-(N- <i>iso</i> -propiltioureída)fenil]benzoxazol	O	CH

‡ R= *terc*-butila para **3a-c** e *iso*-propila para **4a**.

Visando estudar-se mais especificamente a reatividade dos isotiocianatos frente a proteínas, realizou-se a conjugação de duas proteínas, a albumina sérica bovina e a concanavalina-A, com os isotiocianatos **2a-c**.

Os produtos sintetizados foram caracterizados por espectroscopia no infravermelho, ressonância magnética nuclear de prótons, análise elementar, espectroscopia de absorção no ultravioleta e visível, espectroscopia de emissão, espectroscopia de excitação e ponto de fusão (nem todos os métodos foram aplicados a todos os produtos).

Nas próximas seções, discorrer-se-á mais detidamente sobre cada etapa dos procedimentos experimentais.

3.2 REAÇÕES DE CONDENSAÇÃO

Os produtos **1a-c** foram obtidos pela reação de condensação entre o ácido 5-amino-2-hidroxibenzoico e *o*-aminofenol, *o*-diaminobenzeno e 2-amino-3-hidroxipiridina respectivamente, conforme mostrado na **figura 36**.

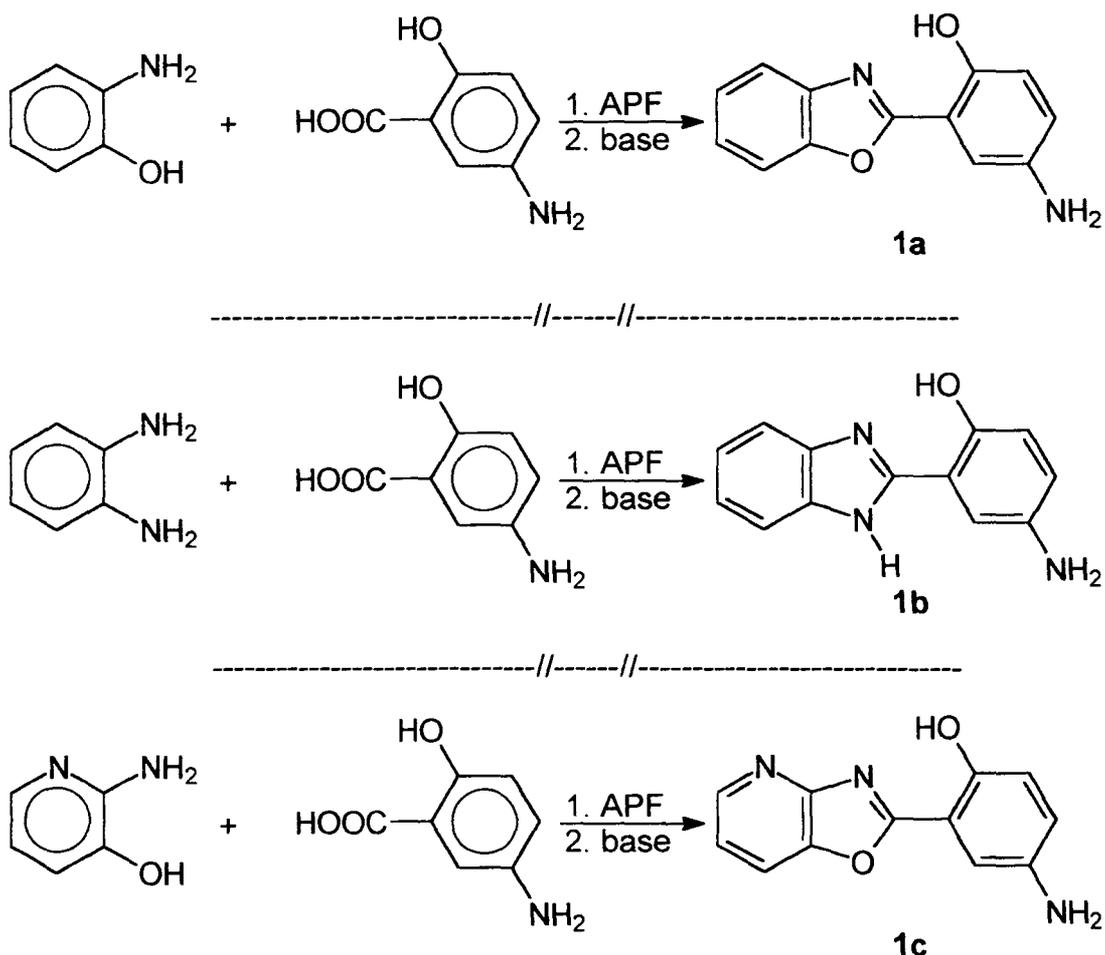


Figura 36: síntese de **1a-c**.

O ácido 5-amino-2-hidroxibenzoico foi obtido a partir do ácido salicílico, de acordo com os procedimentos sintéticos relatados na literatura ⁹⁸. O processo envolve a formação de um azo-composto que posteriormente é reduzido por ditonito

de sódio em meio básico, gerando o ácido 5-amino-2-hidroxibenzoico, conforme visto na **figura 37**.

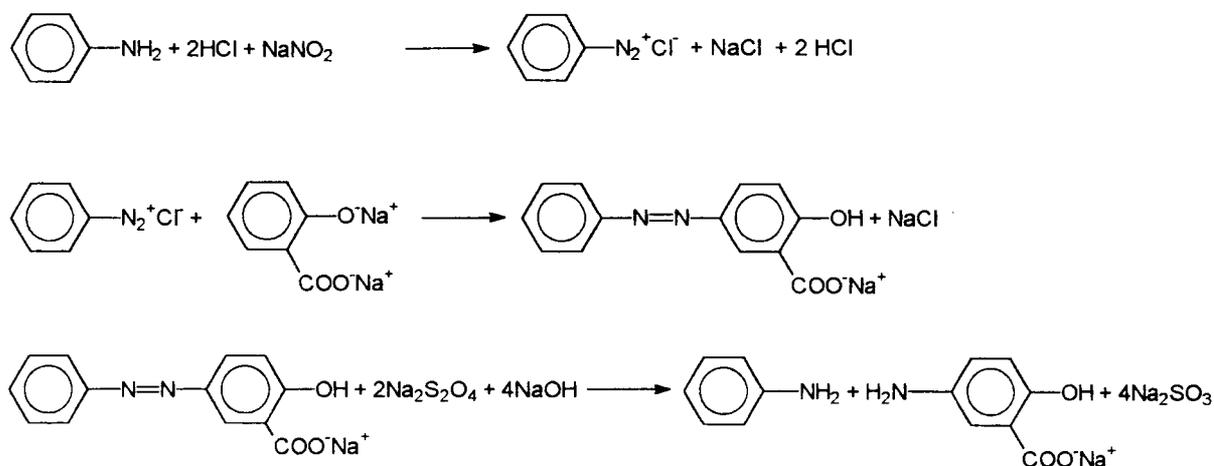


Figura 37: síntese do ácido 5-amino-2-hidroxibenzoico.

As reações de condensação foram efetuadas utilizando-se ácido polifosfórico como agente desidratante, o qual age também como solvente da reação, sob aquecimento (200 °C). Após o término do aquecimento, a mistura reacional é vertida em água e o ácido polifosfórico hidrolisa-se, gerando ácido fosfórico. Os produtos **1a** e **1b** precipitam, sob de sais de amônio. Os precipitados são convertidos a sua forma básica por carbonato de sódio. O produto **1c**, por outro lado, permanece em solução ao verter-se o meio reacional em água. Este precipita ao neutralizar-se o meio reacional com hidróxido de sódio.

O caminho mais provável da reação de condensação entre ácidos carboxílicos e os produtos aromáticos *o*-dissubstituídos envolve primeiramente a formação de um grupo amida^{77,99,100}, que posteriormente leva a formação do heterociclo, conforme pode ser visto na **figura 38**.

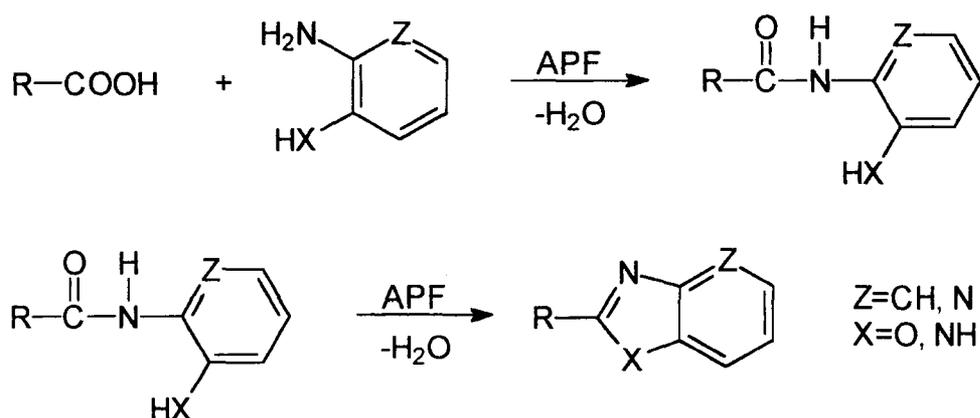


Figura 38: esquema sintético das reações de condensação.

A reação deve iniciar-se pelo grupo amina, mesmo quando estiver presente o grupo hidroxila, pois este é mais nucleofílico do que o grupo hidroxila ²⁹.

As 2 moléculas de água que são formadas na reação combinam-se com o ácido polifosfórico que assim impede a reação inversa de hidrólise.

Os rendimentos brutos obtidos para os produtos encontram-se na **tabela 5**.

Tabela 5: rendimentos obtidos para os produtos 1a-c.

produto	rendimento
1a	74 %
1b	53%
1c	81%

Os produtos **1a** e **1b** foram obtidos contaminados por subprodutos que não foram separados para se levar adiante as próximas etapas sintéticas. Para a obtenção de amostras analíticas, **1a** e **1b** foram purificados por recristalização fracionada em acetona/água.

O produto **1c** foi obtido em forma mais pura e foi recristalizado em tolueno.

Os valores encontrados para a análise elementar dos compostos **1a-c** estão de acordo com as fórmulas moleculares esperadas para estes compostos.

Pode-se observar a presença de bandas características dos grupos funcionais presentes em **1a-c** nos espectros de infravermelho destes produtos.

Nos espectros dos três produtos aparecem duas bandas características de estiramento N—H entre 3425 e 3305 cm^{-1} . Em **1b** existe também a absorção devida ao estiramento de N—H do anel heterocíclico, que encontra-se sobreposta a outra banda de estiramento de N—H em 3312 cm^{-1} .

Bandas de absorção fracas devido ao estiramento O—H dos compostos **1a-c** são encontradas entre 3200 e 3218 cm^{-1} . As frequências em que ocorre a absorção devida ao estiramento O—H nestes compostos evidencia a ocorrência de pontes de hidrogênio, uma vez que as bandas de estiramento de O—H sem pontes de hidrogênio normalmente encontram-se entre 3500 e 3700 cm^{-1} , enquanto que em compostos com pontes de hidrogênio envolvendo a hidroxila, a faixa de absorção desloca-se para frequências menores ¹⁰¹, como neste caso.

Os dados de absorção no infravermelho para as bandas de estiramento de O—H e N—H para os três produtos encontram-se agrupados **tabela 6**.

Tabela 6: comprimentos de onda de bandas de infravermelho importantes para os produtos 1a-c.

	N—H	O—H
1a	3413 e 3332 cm^{-1}	3218 cm^{-1}
1b	3400 e 3312 (2 sobrepostas) cm^{-1}	3217 cm^{-1}
1c	3425 e 3305 cm^{-1}	3200 cm^{-1}

Os espectros de RMN ¹H de **1a** e **1c** foram feitos em clorofórmio deuterado, enquanto **1b** teve seu espectro obtido em solução de dimetilsulfóxido deuterado, por ser pouco solúvel no solvente anterior.

Todos os produtos apresentaram um singleto alargado, referente aos hidrogênios do grupo amina, entre 3,5 e 5,0 ppm. O espectro de **1b** apresenta outro singleto, devido ao hidrogênio ligado ao nitrogênio do anel benzimidazol, em campo alto, acima de 12 ppm.

Os produtos **1a** e **1b** apresentaram sinais devidos aos hidrogênios dos anéis aromáticos na região compreendida entre 6,5 e 8,0 ppm, aproximadamente, enquanto que em **1c** estes sinais estendem-se por uma região maior, entre 6,6 e 8,6 ppm, aproximadamente.

Os três espectros apresentaram singletos, devidos aos hidrogênios dos grupos hidroxila, em campo alto, acima de 10 ppm. Estes singletos, naqueles espectros feitos em clorofórmio deuterado, são estreitos, enquanto no espectro de **1b**, feito em dimetilsulfóxido, encontra-se mais alargado, o que é explicado por efeitos provenientes do intercâmbio entre as moléculas do soluto e do solvente. Os sinais do hidrogênio da hidroxila a campo baixo e estreitos são indicadores da formação de pontes de hidrogênio intramoleculares, como foi dito na seção 1.5.

Todos os três produtos contendo o grupo amina, **1a-c**, apresentam cor na região do laranja-amarelo.

Os três produtos apresentam fluorescência, tanto em estado sólido como em solução, na região do laranja-amarelo.

Em seções subseqüentes, discorrer-se-á sobre os resultados obtidos por espectroscopia de absorção no ultravioleta e visível e espectroscopia de fluorescência.

3.3 CONVERSÃO DO GRUPO AMINA EM ISOTIOCIANATO

Os produtos **2a-c** foram gerados pela conversão dos grupos amina de **1a-c** em grupos isotiocianato.

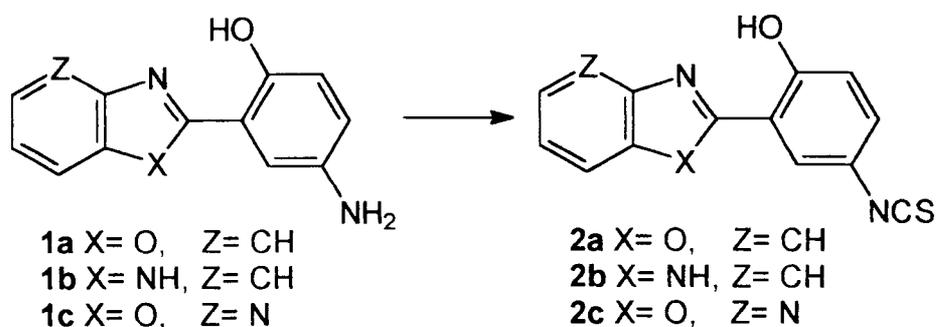


Figura 39: síntese de **2a-c**.

O primeiro método sintético escolhido para efetuar-se a síntese dos isotiocianatos foi a “síntese de Kaluza”, que já foi comentada na seção 1.7.

Utilizando-se esta técnica, foi possível obter-se somente a síntese de **2a**.

A síntese de Kaluza, como visto antes (seção 1.7), envolve 2 etapas. Na primeira delas, a amina, em solução, reage com dissulfeto de carbono, na presença de uma base, para gerar um ditiocarbamato, que é então isolado, dissolvido em clorofórmio ou diclorometano e vai reagir com cloroformiato de etila, gerando um composto intermediário que, na presença de uma base, decompõe-se, levando ao isotiocianato e subprodutos.

Este processo, utilizado para a síntese de **2a**, está representado na **figura 40**.

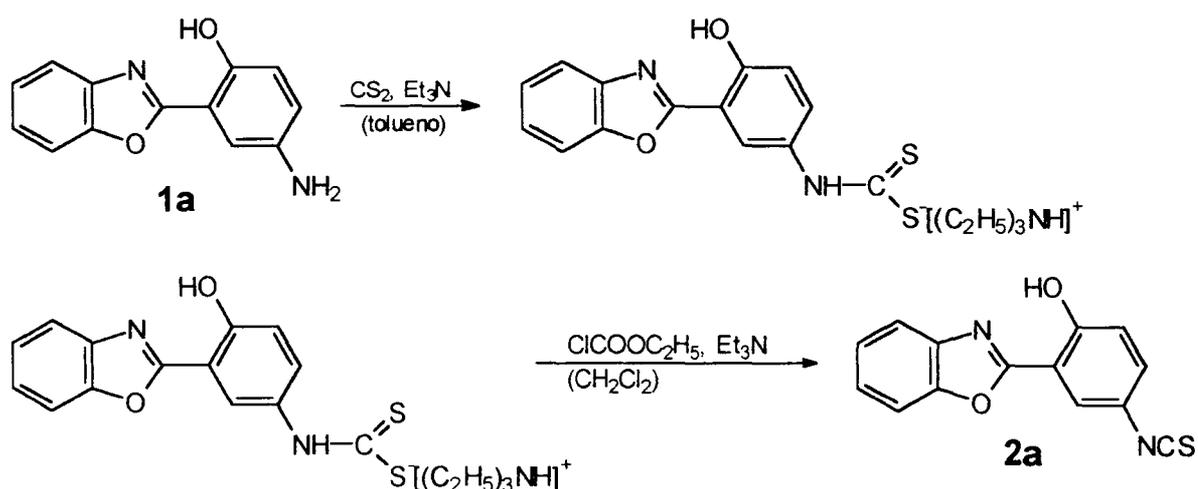


Figura 40: esquema da síntese de 2a.

Para a síntese de **2a**, foram utilizados procedimentos adaptados da literatura⁸⁸.

Na primeira etapa da síntese, a amina **1a** reagiu com dissulfeto de carbono e trietilamina, em tolueno, a temperaturas entre -18 e 0 °C, gerando um ditiocarbamato de trietilamônio, que precipita. Esta etapa foi encerrada após cessar a formação de precipitado, o que durou sete dias. O rendimento bruto obtido foi 87 %.

O ditiocarbamato foi isolado, pesado e dissolvido em diclorometano. Adicionou-se a quantidade equimolar em relação ao sal de ditiocarbamato, mais um excesso de 10 %*, de cloroformiato de etila e, após 10 min, pequena quantidade de trietilamina. A reação foi efetuada em banho de gelo-sal.

Após o término da reação, o isotiocianato foi isolado por cromatografia em coluna, utilizando-se sílica gel como fase estacionária e clorofórmio como fase móvel e posteriormente recristalizado em propanona.

O rendimento global, após todo o processo, foi de 20 %.

O produto obtido mostrou-se puro quando analisado por métodos usuais.

Ao tentar-se aplicar a síntese de Kaluza para a obtenção de **2b** e **2c**, não foram obtidos os resultados esperados.

* Logo nos primeiros experimentos, observou-se que um grande excesso de cloroformiato de etila levava a obtenção principal de um produto rosa, pouco fluorescente, que não era o composto desejado.

Os produtos de partida **1b** e **1c** são muito pouco solúveis em tolueno ou benzeno, desta maneira impossibilitando o uso de tais solventes. Utilizou-se então metanol como solvente para a primeira etapa da síntese de Kaluza. Quando deixados reagir com dissulfeto de carbono e trietilamina, em metanol, observou-se que **1b** e **1c** levaram à produção de precipitados fluorescentes, à temperatura ambiente. O mesmo não ocorreu quando utilizaram-se temperaturas entre -18 e 0 °C. Sabe-se que formação de ditio-carbamatos pela reação de aminas primárias e dissulfeto de carbono na presença de bases já foi relatada em vários solventes, incluindo a água ^{85,86,89,102}.

Os precipitados formados não foram identificados, mas presumiu-se que fossem ditio-carbamatos. Estes foram utilizados para a segunda parte da síntese de Kaluza.

Os precipitados obtidos na primeira etapa da síntese de Kaluza, utilizando-se **1b** e **1c** como produtos de partida, não foram solúveis em diclorometano ou clorofórmio. Tentou-se então utilizar solventes mais polares para completar-se a síntese, mas em nenhum dos casos estudados obteve-se a formação de isotiocianatos. Utilizou-se, como solvente, dimetilsulfóxido, para o precipitado obtido de **1b**, e acetona para o precipitado obtido de **1c**. O precipitado obtido de **1c** também não levou à formação de isotiocianatos quando, suspenso em diclorometano, reagiu com cloroformiato de etila e posteriormente com trietilamina.

Aparentemente o solvente utilizado na segunda etapa da síntese de Kaluza possui uma influência importante na síntese dos compostos estudados. Um outro experimento foi realizado em que trocou-se o solvente utilizado para a segunda etapa da síntese do composto **2a**. Neste caso observou-se que a reação leva ao isotiocianato quando se utilizou diclorometano ou clorofórmio, mas não quando se utilizou a dimetilformamida*.

Para obter-se a síntese de **2b** e **2c** recorreu-se ao método descrito por J. C. Jochims ⁹¹, que já foi referido na seção 1.7.

* Os solventes utilizados não sofreram qualquer tipo de secagem. Sabe-se que o grupo isotiocianato é susceptível a hidrólise, principalmente na presença de ácidos ou bases, mas esta hidrólise normalmente é bastante lenta ⁸². De qualquer forma, talvez a interferência da água, quando utilizaram-se solventes em que esta poderia estar presente em concentração razoável, seja uma possibilidade a ser investigada em relação a não obtenção dos isotiocianatos nos casos relatados.

A “Síntese de Jochims”, quando aplicada aos produtos de partida **1b** e **1c** forneceu os isotiocianatos esperados, **2b** e **2c**.

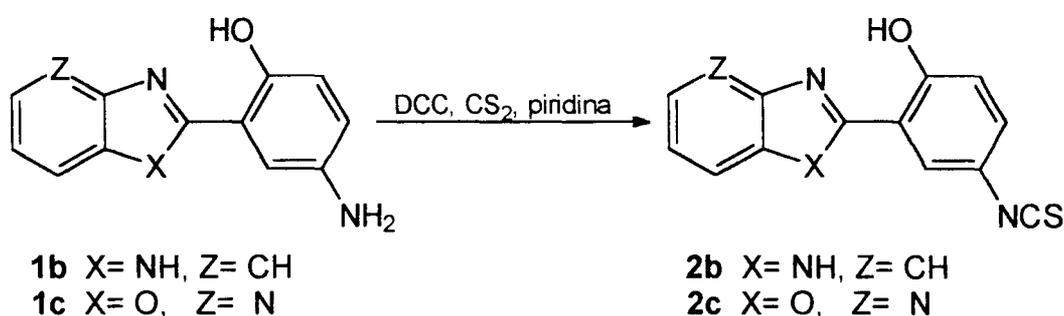


Figura 41: síntese de **2b** e **2c**.

A reação foi efetuada a temperaturas abaixo de 0 °C (banho de gelo e sal e, após 3 horas, em *freezer*) e durou 24 horas*. A solução de piridina foi então vertida em água e os isotiocianatos, misturados ao subproduto dicicloexiltiouréia, precipitaram, foram filtrados e secos.

Os isotiocianatos **2b** e **2c** foram isolados por cromatografia em coluna e posteriormente recristalizados em propanona. A separação dos isotiocianatos **2b** e **2c** do subproduto da reação, a dicicloexiltiouréia, foi bastante trabalhosa, devido ao R_f semelhante entre os produtos. Isto possibilitou o isolamento apenas de pequenas quantidades dos produtos puros, após um demorado processo de cromatografia.

O rendimento obtido para a síntese de **2b** foi de 13 %, após cromatografia e recristalização. O produto mostrou-se puro quando analisado por técnicas usuais.

O rendimento obtido para a síntese de **2c** foi de 20 %, após separação por coluna e recristalização. O produto obtido mostrou-se puro quando analisado por técnicas usuais.

* O procedimento original, relatado na referência ⁹¹, referia reações síntese de isotiocianatos realizadas em banho de gelo e sal por uma hora e mais três horas a temperatura ambiente. Em um primeiro experimento, no qual tentou-se a síntese de **2b** desta forma, observou-se, analisando-se a reação por CCD, que o isotiocianato, que se formou durante a primeira hora de reação, era consumido quando à temperatura ambiente. Desta forma, achou-se conveniente modificar -se o procedimento utilizado para a forma aqui descrita.

Os valores encontrados para a análise elementar dos compostos **2a-c** estão de acordo com as fórmulas moleculares esperadas para estes compostos.

Percebe-se claramente a presença do grupo isotiocianato nos compostos **2a-c**, pelo aparecimento de uma banda característica, por volta de 2100 cm^{-1} , nos espectros de absorção no infravermelho dos três produtos. Ao mesmo tempo, as bandas devidas ao estiramento N—H do grupo amina, que apareciam nos compostos de partida, **1a-c**, não estão mais presentes. A banda de estiramento de N—H do anel heterocíclico de **2b** encontra-se em 3317 cm^{-1} .

Não são facilmente percebíveis as bandas de estiramento de O—H nos três produtos. Isto pode ser devido a presença de pontes de hidrogênio mais fortes entre a hidroxila e o grupo imino com relação aos produtos de partida, **1a-c**, o que deve gerar bandas mais fracas e largas ⁴⁶. A presença de pontes de hidrogênio mais fortes pode ser esperada se considerarmos que houve a troca de um grupo bastante eletrodoador, o grupo amina, pelo grupo isotiocianato, com menor capacidade de doar densidade eletrônica. O grupo doador, no anel aromático, deve aumentar a densidade eletrônica do hidrogênio da hidroxila, tornando-o menos ácido e enfraquecendo as pontes de hidrogênio.

Na **tabela 7** encontram-se dados referentes aos espectros de absorção no infravermelho dos produtos **2a-c**.

Tabela 7: comprimentos de onda de bandas de infravermelho para os produtos 2a-c.

	Vibração assimétrica do grupo -NCS (cm^{-1})
2a	2137
2b	2143
2c	2111

Os espectros de RMN ^1H de **2a** e **2c** foram feitos em clorofórmio deuterado, enquanto **2b** teve seu espectro obtido em solução de dimetilsulfóxido deuterado, por ser pouco solúvel no solvente anterior.

Com relação aos espectros dos produtos de partida, **1a-c**, nota-se o desaparecimento dos singletos provenientes dos hidrogênios do grupo amina, não mais presentes.

Digno de nota é o fato dos singletos devidos ao hidrogênio da hidroxila dos três compostos terem aparecido em campos mais baixos em relação aos produtos que lhes deram origem, **1a-c**. Isto pode indicar a presença de pontes de hidrogênio mais fortes envolvendo a hidroxila, como já foi comentado acima. Há que se fazer a ressalva de que a posição do pico de hidrogênio de hidroxila em fenóis é dependente da temperatura e da concentração, embora este último efeito seja pequeno em compostos com pontes de hidrogênio intramoleculares¹⁸.

Os produtos **2a** e **2c** são incolores, enquanto **2b** apresenta uma fraca coloração amarela. Os três produtos são fluorescentes, tanto em estado sólido como em solução, apresentando emissão na região do verde.

Em seções subseqüentes, discorrer-se-á sobre os resultados obtidos por espectroscopia de absorção no ultravioleta e visível e espectroscopia de fluorescência.

3.4 FORMAÇÃO DE TIOURÉIAS

Como já foi citado anteriormente, o grupo isotiocianato reage facilmente com aminas primárias, formando tiouréias⁹⁷, como se pode ver na **figura 42**.



Figura 42: reação de isotiocianatos com aminas primárias.

Os isotiocianatos **2a-c**, se usados como etiquetas fluorescentes para proteínas, devem ligar-se aos grupos amina das proteínas, formando tiouréias.

Sabe-se que os grupos substituintes em sistemas aromáticos podem influenciar fortemente as propriedades da fluorescência²². Desta forma, se quisermos fazer uma análise das propriedades dos isotiocianatos **2a-c** como etiquetas fluorescentes, é mais conveniente estudar-se as propriedades de tiouréias formadas por estes isotiocianatos que os próprios isotiocianatos, uma vez que quando utilizados como etiquetas fluorescentes, estes estarão ligados às proteínas que se utilizar como substrato sob a forma de tiouréias.

Pelo que foi exposto acima, para verificar a reatividade dos isotiocianatos **2a-c** frente a aminas e estudar as propriedades de absorção e emissão de luz dos aductos formados, fez-se a reação entre os três isotiocianatos sintetizados e *terc*-butilamina. Adicionalmente realizou-se a reação entre o composto **2a** e a *iso*-propilamina. A escolha de uma amina primária que pudesse servir como modelo recaiu sobre a *terc*-butilamina devido a facilidade de obtenção e por ser uma amina com um certo impedimento estéreo que pode mimetizar em certo grau o que seria encontrado em proteínas.

As reações entre as aminas e **2a-c** foram realizadas em solventes como tetraidrofurano, acetona e clorofórmio e procederam instantaneamente a temperatura ambiente, com rendimento quantitativo, (medido por CCD), gerando as tiouréias **3a-c** e **4a**.

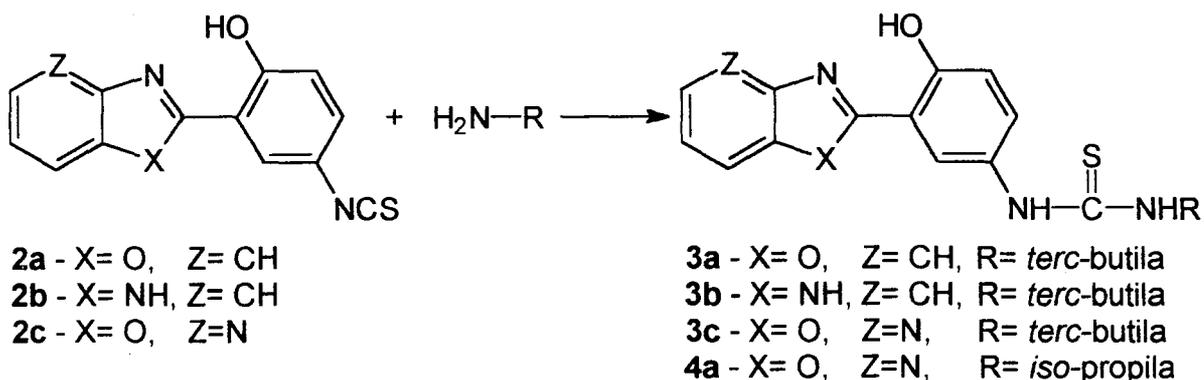


Figura 43: formação das tiouréias 3a-c e 4a. .

Os valores encontrados para a análise elementar dos compostos **3a-c** e **4a** estão de acordo com as fórmulas moleculares esperadas para estes compostos.

Os espectros de infravermelho de **3a-c** e **4a** apresentam diferenças importantes em relação aos espectros dos produtos de origem, **2a-c**, que evidenciam a reação de formação das tiouréias ter ocorrido. As bandas provenientes do grupo isotiocianato não estão mais presentes e em seu lugar surgiram bandas na região compreendida aproximadamente entre 3000 e 3500 cm^{-1} , que devem provir das vibrações de estiramento de N—H do grupo tiouréia. Nesta região ocorre uma sobreposição com as bandas de estiramento de O—H que também devem estar presentes, o que torna difícil o assinalamento da origem destas bandas.

Os espectros de RMN ^1H de **3a** e **4a** foram feitos em clorofórmio deuterado, enquanto **3b** e **3c** tiveram seus espectros obtidos em solução de dimetilsulfóxido deuterado, por serem pouco solúveis no solvente anterior.

Os espectros dos compostos **3a-c** apresentam um singlete na região entre 1,5 e 2 ppm, proveniente dos hidrogênios do grupo *terc*-butila.

Aparecem também singletos em regiões variáveis devidos ao hidrogênios ligados a nitrogênio do grupo tiouréia.

Os compostos **3a**, **3b** e **4a**, apresentam singletos provenientes da hidroxila entre 11,5 e 13,5 ppm, aproximadamente. No composto **3c**, um dos hidrogênios não aparece no espectro (OH ou NH), provavelmente devido ao efeito do intercâmbio de deutério do solvente com o soluto. Não se observou diferenças importantes entre as

posições do singletos correspondentes aos hidrogênios das hidroxilas entre os compostos **2a** e **3a** e **4a**.

No espectro de RMN ^1H do composto **4a** aparece um dubleto por volta de 1,4 ppm devidos aos hidrogênios metílicos do grupo *iso*-propila e um multiplete por volta de 5,8 ppm oriundo do hidrogênio metínico do grupo *iso*-propila.

Os produtos **3a** e **4a** são incolores, enquanto que **3b** é amarelo e **3c** apresenta cor laranja. Os quatro produtos são fluorescentes, tanto em estado sólido como em solução, apresentando emissão na região do verde (**3a**, **4a** e **3b**) ou laranja (**3c**).

Em seções subseqüentes, discorrer-se-á sobre os resultados obtidos por espectroscopia de absorção no ultravioleta e visível e espectroscopia de fluorescência.

3.5 MARCAÇÃO DE PROTEÍNAS

Realizou-se a conjugação de duas proteínas com os isotiocianatos sintetizados: albumina sérica bovina e concanavalina-A. Seguiu-se procedimentos relatados na literatura ¹⁰³.

Como os fluoróforos **2a-c** não são solúveis em água, que é o solvente utilizado para a dissolução de proteínas, o processo utilizado envolve a dissolução dos fluoróforos em solventes orgânicos. Posteriormente, estes solventes são adicionados, em pequenas alíquotas, a uma solução de proteína em um tampão alcalino, cuja função é fazer com que os grupos amina presentes na proteína estejam em sua forma não protonada, que é a forma reativa frente aos isotiocianatos. Após a reação completar-se, o fluoróforo não ligado a proteína é separado por cromatografia de permeação em gel em coluna aberta. Maiores detalhes sobre o procedimento encontram-se na seção 4.

Pôde-se observar que as proteínas foram marcadas pelos corantes fluorescentes, tendo sido gerados conjugados fluorescentes. Feito o espectro de absorção no ultravioleta e visível para a concanavalina-A e para os conjugados formados pela concanavalina-A e os fluoróforos **2a-c**, foi possível observar-se uma banda de absorção característica dos fluoróforos, por volta de 350 nm, nos espectros de absorção da concanavalina-A marcada.

O espectro de emissão obtido para a albumina sérica bovina marcada com diferentes concentrações da etiqueta fluorescente **2a** (10, 50 e 100 µg de fluoróforo por mg de proteína) mostra o aumento da emissão com a concentração de fluoróforo.

Qualitativamente, observou-se uma grande diferença entre as intensidades da fluorescência das duas proteínas marcadas. A albumina sérica bovina apresentou maior fluorescência. Isto pode ter sido causado por diferentes concentrações de fluoróforo nas duas proteínas, mas também pode ser causado pela própria diferença entre as estruturas das proteínas. Já foi comentado, na seção 1.5, que os fluoróforos com estruturas do tipo 2-(2'-hidroxifenil)benzazóis apresentam diminuição em sua eficiência quântica quando em solventes polares com capacidade de formar pontes

de hidrogênio. A maior intensidade de emissão apresentada pelos aductos formados pela albumina sérica bovina pode indicar que na concanavalina-A, o fluoróforo encontra-se circundado por grupos polares da própria proteína, enquanto na albumina sérica bovina o ambiente próximo aos fluoróforos é menos polar. De fato, a albumina sérica bovina é referida como sendo rica em sítios hidrofóbicos ¹⁰⁴.

O fato destes fluoróforos terem a sua eficiência quântica bastante afetada pela polaridade do meio e, especialmente, pela presença de espécies capazes de formar pontes de hidrogênio intermoleculares, sugere que os mesmos poderiam ser utilizados como sondas fluorescentes, sensíveis àqueles fatores.

3.6 ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NO ULTRAVIOLETA E VISÍVEL

Os produtos **1c**, **2a-c**, **3a-c** e **4a** foram submetidos a espectroscopia de absorção no ultravioleta e visível. Utilizou-se um aparelho Beckman DU-600 ou Varian Cary 3E. Os solventes utilizados foram diclorometano, clorofórmio ou tetraidrofurano. Utilizaram-se concentrações de aproximadamente 10^{-5} molar. Na tabela abaixo encontram-se as concentrações utilizadas para cada produto, o solvente utilizado, os comprimentos de onda dos máximos de absorção (λ_{\max}) e os respectivos coeficientes de absorvidade molar (ϵ).

Tabela 8: dados obtidos pela espectroscopia de absorção no ultravioleta e visível para os produtos **1c**, **2a-c**, **3a-c** e **4a**.

	solvente	molaridade	λ_{\max} (nm)	ϵ
1c	diclorometano	$1,76 \times 10^{-5}$	300	$2,4 \times 10^4$
2a	diclorometano	$2,98 \times 10^{-5}$	287	$3,2 \times 10^4$
2b	diclorometano	$0,90 \times 10^{-5}$	229	$6,3 \times 10^4$
2c	diclorometano	$2,20 \times 10^{-5}$	287	$3,3 \times 10^4$
3a	diclorometano	$1,52 \times 10^{-5}$	269	$2,3 \times 10^4$
3b	tetraidrofurano	$1,53 \times 10^{-5}$	292	$2,0 \times 10^4$
3c	diclorometano	$2,10 \times 10^{-5}$	298	$2,0 \times 10^4$
4a	clorofórmio	$1,22 \times 10^{-5}$	270	$3,0 \times 10^4$

Observou-se que os compostos com os mesmos grupos substituintes na posição 5' apresentam espectros de absorção bastante semelhantes.

Os compostos com o grupo amina, **1a-c**, apresentam absorção deslocada para comprimentos de onda maiores, o que evidencia-se pela cor, relativamente intensa, apresentada por estes produtos, na região do amarelo-laranja. Entre os produtos que tiveram seus espectros medidos, o composto **1c** é o que apresenta o máximo de absorção no maior comprimento de onda, 300 nm.

Os compostos com o grupo isotiocianato, **2a-c**, apresentam absorção deslocada para o azul, em relação aos produtos que lhes deram origem, **1a-c**. Entre os isotiocianatos, os espectros de absorção são bastante semelhantes. Os produtos **2a** e **2c** são incolores, enquanto **2b** apresenta uma fraca cor amarela. O composto **2b** é o que apresenta também o maior coeficiente de absorvidade molar.

As tiouréias **3a-c** e **4a** apresentam também espectros semelhantes entre si. Para **3b** e **3c**, observa-se que há um deslocamento do comprimento de onda do máximo de absorção para o vermelho em relação aos isotiocianatos que lhes deram origem, **2b** e **2c**. Estes dois compostos, **3b** e **3c**, apresentam cor amarela. Para os compostos **3a** e **4a**, observa-se um desvio para o azul em relação ao isotiocianato que lhes deu origem, **2a**. Os espectros de absorção de **3a** e **4a** são bastante semelhantes.

No caso das quatro tiouréias, **3a-c** e **4a**, o coeficiente de absorvidade molar é menor em relação aos isotiocianatos **2a-c**. Há que se notar que o espectro de **3b** foi obtido em tetraidrofurano, e não em diclorometano ou clorofórmio, como nos outros compostos e a mudança de solvente pode trazer mudanças nas características do espectro de absorção.

Mais dados sobre máximos locais de absorção dos produtos encontram-se na seção 4.3. Os espectros encontram-se ilustrados na seção 9.

3.7 ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

Foram investigadas as propriedades da fluorescência dos compostos **2a-c** e **4a** em um espectrofluorímetro digital SLM 8000 D.

3.7.1 Espectros de emissão

Os compostos **2a-c** e **4a** foram submetidos à espectroscopia de emissão. Na tabela 9 estão relacionados os comprimentos de onda dos máximos de emissão obtidos, com os respectivos comprimentos de onda de excitação e solventes utilizados. Os espectros de emissão estão reproduzidos na seção 11.

Tabela 9: comprimentos de onda dos máximos de emissão para os compostos **2a-c** e **4a**.

	solvente	λ de excitação	$\lambda_{\text{máx}}$ da emissão
2a	clorofórmio	344 nm	496 nm
2b	clorofórmio	344 nm	477 nm
2c	clorofórmio	344 nm	512 nm
4a	clorofórmio	337 nm	532 nm
2a	diclorometano	339 nm	500 nm
2a	diclorometano	280 nm	498 nm

Observa-se que entre os compostos **2a-c** ocorre um aumento no comprimento de onda de emissão na ordem $2b < 2a < 2c$.

Mais adiante, serão discutidos dados complementares obtidos por espectroscopia de emissão com excitação por laser.

3.7.2 Espectros de excitação

Os compostos **2a** e **4a** foram submetidos a espectroscopia de excitação. Foi observada a correspondência entre os espectros de excitação e absorção destes compostos, conforme pode ser visto, a título de exemplo, na **figura 44**.

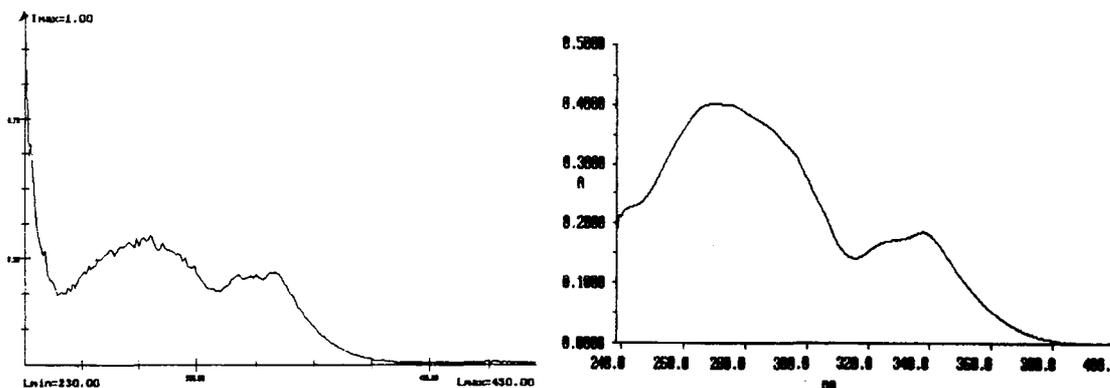


Figura 44: espectros de absorção (esquerda) e excitação (direita) do composto 4a.

A correspondência observada entre os espectros de absorção e excitação destes compostos indica que os mesmos possuem um bom grau de pureza.

Os espectros de excitação estão reproduzidos na seção 10.

3.7.3 Eficiência quântica de fluorescência

O composto **2a** teve a sua eficiência quântica determinada (em relação a uma solução de sulfato de quinina), em diclorometano, utilizando-se a seguinte relação:

$$\varnothing = \frac{\varnothing' \times A' \times S}{S' \times A}$$

\varnothing = eficiência quântica do composto questionado

\varnothing' = eficiência quântica do composto de referência (sulfato de quinina, 0,51)

A' = absorvância da solução do composto de referência

A = absorvância da solução do composto questionado

S = área sob o espectro de emissão do composto questionado

S' = área sob o espectro de emissão do composto padrão

Chegou-se ao resultado de 0,14, que pode ser considerado um valor razoável, já que encontra-se em literatura ¹⁰ que uma eficiência quântica acima de 0,1 normalmente é suficiente para o uso de um corante como etiqueta fluorescente.

3.8 ESPECTROSCOPIA DE EMISSÃO (COM EXCITAÇÃO POR LASER)

Os produtos 1a, 1c, 2a-c, 3a-c foram submetidos a espectroscopia de emissão com excitação por laser. Os produtos foram excitados pela terceira harmônica do laser Nd:YAG ($\lambda=354,7$ nm) e a sua emissão foi medida ao longo dos comprimentos de onda 350 a 700 nm.

A aparelhagem que foi utilizada para a espectroscopia de emissão está esquematizada na **figura 45**.

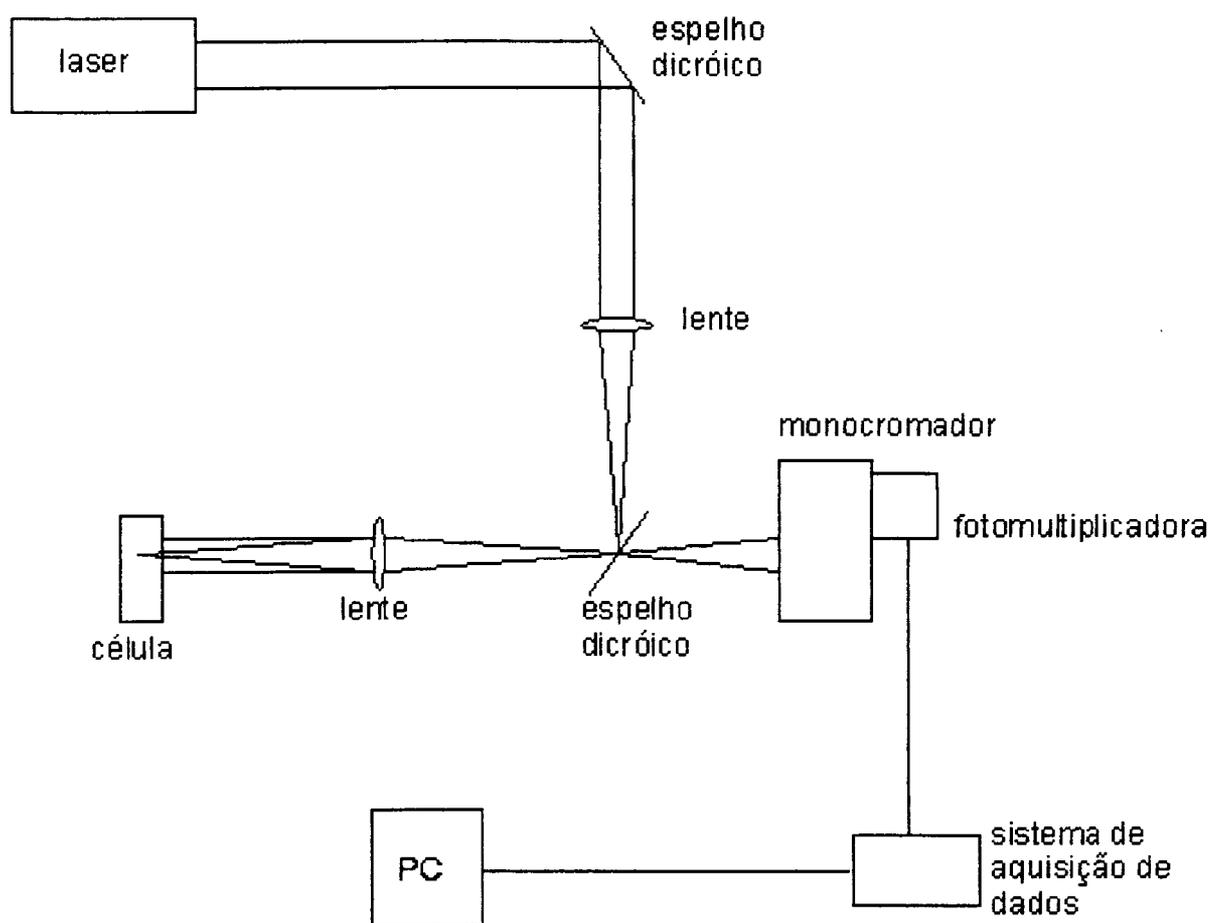


Figura 45: esquema do aparelho utilizado para obter-se os espectros de emissão dos compostos estudados.

O primeiro espelho dicróico permite a passagem de aproximadamente 99 % da potência do laser, desta forma, atenuando a potência do laser que será focalizada sobre a amostra, já que apenas a parte refletida irá atingi-la

Após a amostra ter sido excitada pelo laser, sua emissão foi focalizada por uma lente e passa por um segundo espelho dicróico, que reflete quase a totalidade da luz de comprimentos de onda abaixo de 400 nm, sendo transparente para comprimentos de onda maiores, e então foi coletada sobre a fenda de um monocromador ARC SpectraPro 500. A fluorescência foi amplificada por uma fotomultiplicadora EMI 9871B. O sinal da fotomultiplicadora foi integrado por uma interface digitalizadora de pico e o sinal digitalizado é transferido para um PC.

Na **tabela 10** estão relacionados os comprimentos de onda para os máximos de emissão encontrados para cada produto e também a intensidade relativa dos máximos da emissão (em unidades arbitrárias).

Tabela 10: dados obtidos pela espectroscopia de emissão para os compostos 1a, 1c, 2a-c, 3a-c.

Produtos	solvente	concentração (molar)	intensidade relativa do máximo de emissão	comprimento de onda do máximo de emissão (nm)	intensidade proporcional à concentração molar 10^{-4}
1a	CH ₂ Cl ₂	$1,02 \times 10^{-4}$	237	480	233
1c	CH ₂ Cl ₂	$1,10 \times 10^{-4}$	190	486	173
2a	CH ₂ Cl ₂	$1,01 \times 10^{-4}$	1753	496	1735
2a	THF	$1,01 \times 10^{-4}$	735	494	730
2b	THF	$1,02 \times 10^{-4}$	139	472	136
2c	CH ₂ Cl ₂	$1,01 \times 10^{-4}$	1347	499	1343
3a	CH ₂ Cl ₂	$1,01 \times 10^{-4}$	732	507	725
3b	THF	$1,03 \times 10^{-4}$	4041	475	3924
3c	CH ₂ Cl ₂	$9,93 \times 10^{-5}$	266	529	268

A aparelhagem utilizada é bastante susceptível a ruídos, portanto os valores apresentados estão sujeitos a presença de um erro não estimado. Os valores

apresentados para os máximos de intensidade foram obtidos após tratamento matemático dos pontos obtidos feito em *software* específico para diminuir a contribuição de ruídos.

Considerando-se que a intensidade da emissão deve ser proporcional à concentração no intervalo utilizado, a tabela apresenta a intensidade de emissão que deve ser proporcional à concentração 10^{-4} molar para todos os produtos, a título de comparação.

Pode-se observar, pela **tabela 10**, que os benzazóis (ou oxazolo-piridinas) sintetizados apresentam grandes variações em sua intensidade de luminescência, dependendo do grupo substituinte presente na posição 5'.

Os produtos possuindo o anel oxazol (**1a**, **1c**, **2a**, **2c**, **3a** e **3c**) apresentam comportamento semelhante quanto à dependência da intensidade de emissão em relação ao grupo substituinte. A intensidade de luminescência aumenta de acordo com o grupo substituinte na seguinte ordem:



Os compostos com o grupo amina, **1a** e **1c**, possuem uma intensidade de emissão bastante pequena em relação aos compostos com o grupo isotiocianato, **2a** e **2c**. Há um aumento de aproximadamente 644 % na intensidade de emissão quando se substitui o grupo amina de **1a** pelo grupo isotiocianato, gerando o composto **2a**. Da mesma forma o composto **2c** apresenta um aumento de aproximadamente 676 % em relação ao composto **1c**. Quando os grupos isotiocianato de **2a** e **2c** são convertidos em grupo tiouréia, pela reação com *terc*-butilamina, gerando então os compostos **3a** e **3c**, estes experimentam uma diminuição na intensidade de sua emissão. Esta diminuição, entre os compostos **2a** e **3a**, é de aproximadamente 58 %. Entre os compostos **2c** e **3c** a diminuição de intensidade encontrada é maior, de aproximadamente 80 %.

Comparando-se os compostos da família dos benzoxazóis (**1a**, **2a** e **3a**) com aqueles da família das oxazolo-piridinas (**1c**, **2c** e **3c**), observa-se que os benzoxazóis sintetizados apresentam maior intensidade de emissão em relação às oxazolo-piridinas com o mesmo grupo substituinte, comportamento que é válido para todos grupos substituintes estudados.

O comportamento dos compostos da família dos benzimidazóis é algo distinto daquele apresentado pelos benzoxazóis e oxazolo-piridinas. Enquanto que naqueles compostos anteriormente discutidos ocorria uma diminuição da intensidade de emissão quando trocava-se o grupo isotiocianato pelo grupo tiouréia, para os compostos da família dos benzimidazóis observa-se, ao contrário, um aumento da intensidade de emissão ao trocar-se o grupo isotiocianato de **2b** pelo grupo *terc*-butil-tioureída, gerando o composto **3b**. Este aumento é de aproximadamente 2785 %.

Comparando os compostos da família dos benzimidazóis com aqueles da família dos benzoxazóis e oxazolo-piridinas, observa-se que o isotiocianato **2b** possui uma intensidade de emissão bastante menor que as intensidades observadas para os compostos **2a** e **2c**. Por outro lado, a tiouréia **3b** apresenta uma intensidade de emissão bastante maior que as tiouréias **3a** e **3c**, constituindo-se no composto de maior intensidade de emissão entre os estudados.

Há que se notar que os compostos **2b** e **3b** tiveram seus espectros de emissão obtidos em tetraidrofurano e não diclorometano, como nos outros casos. A troca do solvente deve acarretar mudanças na eficiência quântica dos produtos. Neste caso, espera-se que solventes com capacidade de formar pontes de hidrogênio causem uma diminuição na eficiência quântica, uma vez que favorecem a formação de estruturas menos rígidas neste tipo de compostos, logo, mais propensas a perder energia por conversão interna. Da mesma forma, pontes de hidrogênio entre moléculas do fluoróforo e do solvente podem impedir a ocorrência da TPIEE, como foi discutido na seção 1.5.

Observa-se claramente a influência do solvente ao comparar-se o máximo de intensidade de **2a** quando dissolvido em diclorometano e em tetraidrofurano. O máximo de intensidade de **2a** em tetraidrofurano foi, aproximadamente, 58 % menor que o valor registrado quando se utilizou como solvente o diclorometano. (O tetraidrofurano é um solvente mais polar e possui a capacidade de formar pontes de hidrogênio com o soluto, característica não apresentada pelo diclorometano). Não se pode, porém, generalizar-se este comportamento para todos os compostos sintetizados, uma vez que não foram realizados suficientes experimentos.

Quanto aos comprimentos de onda da luz emitida, observa-se que o substituinte amina leva a emissão a comprimentos de onda maiores em todos os

produtos estudados. Entre o grupo isotiocianato e o grupo tiouréia o deslocamento da região de emissão não é muito pronunciado, porém observa-se um pequeno aumento do comprimento de onda do máximo de emissão para as tiouréias estudadas em relação aos isotiocianatos que lhes deram origem.

Pode-se observar que os produtos em geral apresentam grandes deslocamentos de Stokes, comparando-se seus espectros de absorção e emissão. Na **tabela 11** estão relacionados os máximos de absorção mais deslocados para o vermelho e os máximos de emissão (excitação a 355 nm) para os compostos **1c**, **2a-c** e **3a-c**, assim como o deslocamento de Stokes entre estes máximos.

Tabela 11: deslocamentos de Stokes para os compostos 1c, 2a-c, 3a-c.

	$\lambda_{\text{máx}}$ abs. (nm)	$\lambda_{\text{máx}}$ em. (nm)	deslocamento de Stokes (nm)
1c	379	485	106
2a	348	495	147
2b	335	472	137
2c	351	498	147
3a	337	507	170
3b	339	475	136
3c	343	529	186

Os deslocamentos de Stokes para estes compostos ficam entre 106 e 186 nm, o que pode ser considerado um valor relativamente alto (a título de comparação, o deslocamento de Stokes para a isotiocianatofluoresceína é de apenas 28 nm¹⁰). Este fato sugere a ocorrência de fototautomerismo nos compostos estudados, como seria de fato esperado.

Analisando-se os dados obtidos, quanto a intensidade de emissão de fluorescência, chega-se a conclusão de que o produto **2b** deve ser o mais promissor como etiqueta fluorescente, sob este ponto de vista, pois gera a tiouréia mais intensamente fluorescente entre aquelas estudadas. Por outro lado, o produto **2c** gera a tiouréia menos fluorescente. Há que se ter uma certa cautela quanto a essa afirmação, já que estes compostos sofrem influência marcante da polaridade do meio

em que se encontram e não se pode descartar, no momento, a hipótese de que sofram estas influências em diferentes graus.

O comportamento apresentado pelas tiouréias estudadas pode ser extrapolado para os conjugados formados entre os isotiocianatos **2a-c** com proteínas, pois neste caso também deve ocorrer a formação de grupos tiouréia, ligando os fluoróforos e as proteínas.

4. CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS:

4.1 EQUIPAMENTOS UTILIZADOS

Pontos de fusão:

Os pontos de fusão foram medidos em um aparelho Thermolyne e não estão corrigidos.

Análise Elementar:

Os dados de análise elementar foram obtidos em um aparelho PERKIN-ELMER 2400.

Espectroscopia de Absorção no Infravermelho:

Os espectros de absorção no infravermelho foram obtidos em um aparelho FTIR Mattson 3020 ou Perkin Elmer 1430.

Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear :

Os espectros de RMN ^1H foram obtidos em um aparelho Varian VXR-200 (200 MHz).

Espectroscopia de Absorção no Ultravioleta e Visível:

Os espectros de absorção no ultravioleta e visível foram obtidos em um aparelho Beckman DU-600 ou Varian Cary 3E.

Espectroscopia de Emissão no Ultravioleta e Visível:

Utilizou-se um espectrofluorímetro SLM 8000 D ou o aparelho descrito na seção 3.7.

4.2 Reagentes utilizados:

- Anilina :Merck
- Nitrito de Sódio: Vetec, p.a.
- Ácido Salicílico: Synth, p.a.
- Ditionito de Sódio: Synth, p.a.
- Ácido Polifosfórico: Merck, para síntese; ou sintetizado como descrito na literatura¹⁰⁵
- *o*-Amino-fenol: Scharlaw, >97%
- Carbonato de Sódio: Nuclear, para análise
- 1,2-Fenilenodiamina: Merck, > 99%
- Acetona: Merck, para análise
- 2-Amino-3-hidroxipiridina: Aldrich, 98 %
- Hidróxido de sódio: Merck, para análise
- Tolueno: Merck, para análise
- Trietilamina: Vetec, para síntese
- Dissulfeto de carbono: Grupo Química, para análise
- Clorofórmio: Synth, para análise
- Cloroformiato de etila: Merck, para síntese
- Ácido clorídrico: Merck, para análise
- Sílica-gel: Merck (sílica-gel 60, 70-230 mesh)
- Dicicloexilcarbodiimida: Fluka, 99 %
- Piridina: Merck, para análise
- Tetraidrofurano: Nuclear, para análise
- *terc*-Butilamina: Merck, destilada
- *iso*-Propilamina: I.C.I., 70 %

4.3 CONDIÇÕES SINTÉTICAS:

4.3.1 Ácido 5-amino-2-hidroxibenzóico:

Fez-se uma solução com 18,6 gramas (0,2 mol) de anilina, 45 mL de ácido clorídrico concentrado e 45 mL de água. Esta foi resfriada a 0 °C em banho de gelo e sal. Adicionou-se, vagorosamente e com agitação, de maneira que a temperatura não aumentasse além de 2 °C, uma solução de 14 gramas de nitrito de sódio (NaNO₂) em 40 mL de água. Continuou-se a agitação por mais 10 min e adicionou-se 4 gramas de carbonato de sódio. A solução resultante foi então adicionada vagorosamente a uma solução, previamente resfriada e com agitação, de 28 gramas de ácido salicílico (0,2 mol mais 0,4 gramas em excesso), 33 mL de NaOH 35% (m/v), 67 mL de água e 2 gramas de carbonato de sódio. A temperatura foi mantida sempre abaixo de 5 °C. Após toda solução do sal de diazônio haver sido adicionada, a agitação foi mantida por 5-6 horas. Obteve-se uma pasta amarela.

A pasta obtida foi tratada com 80 mL de solução de hidróxido de sódio 36% (m/v) e a mistura foi aquecida a 80 °C. Durante 15 min, 80 gramas de ditonito de sódio foram adicionados, com agitação, a uma temperatura de 80-90 °C. (A reação deve ser realizada em capela devido aos vapores tóxicos de anilina que são liberados). A solução começa a tornar-se mais clara e é completamente descolorida alguns minutos após o término da adição do ditonito de sódio. (A persistência de cor após 15 min indica que o ditonito de sódio utilizado não era de boa qualidade. Neste caso, mais ditonito de sódio deve ser adicionado até que a solução seja incolor). Se necessário, mais hidróxido de sódio deve ser adicionado a mistura, de maneira a manter a solução com uma reação fortemente alcalina frente a fenolftaleína durante todo o tempo. Após a descoloração da solução, a anilina formada foi separada através de destilação por arraste de vapor ou, alternativamente, por extração com éter de petróleo. Após toda a anilina haver sido removida, a solução residual foi filtrada e ao filtrado adicionou-se, vagorosamente e com agitação, ácido clorídrico concentrado até se obter uma reação fracamente ácida frente ao papel de tornassol. O ácido *p*-amino-salicílico separou-se na forma

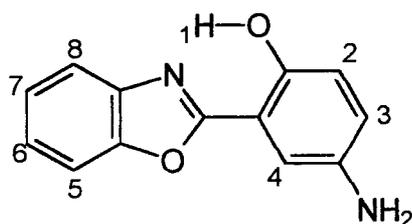
de um precipitado cinza. (Um excesso de ácido deve ser evitado, pois assim o produto tornaria a dissolver-se).

4.3.2 2-(5'-amino-2'-hidroxifenil)benzoxazol, (1a):

Uma mistura composta por 2,000 gramas de ácido 5-amino-2-hidroxibenzoico (13,06 mmol), 1,424 gramas de *o*-amino-fenol (13,06 mmol) e 10 mL de ácido polifosfórico, foi aquecida à temperatura de 200 °C por 4 horas, com agitação. Após, a mistura reacional foi vertida em 400 mL de água destilada. Filtrou-se a mistura, e o precipitado cinza obtido foi agitado com solução de carbonato de sódio 10 % (p/v), tomando uma cor amarelo-claro. Filtrou-se novamente, e lavou-se o precipitado com água destilada. Secou-se o precipitado sem aquecimento.

O rendimento bruto obtido foi de 74%.

O produto obtido foi utilizado em forma bruta para a próxima etapa sintética, ou purificado por recristalização fracionada em acetona/água para ser analisado.



IV (espectro 1, KBr), $\nu(\text{cm}^{-1})$: 3413; 3332; 1545; 1498; 1234.

RMN de ^1H (espectro 11, 200 MHz, CDCl_3 , ppm): δ 10,94 (s, 1 H, OH); 6,74-7,83 (7 H, 7 \times CH); 3,54 (s, 2 H, NH_2)

Análise elementar (calculado para C₁₃H₁₀N₂O₂):

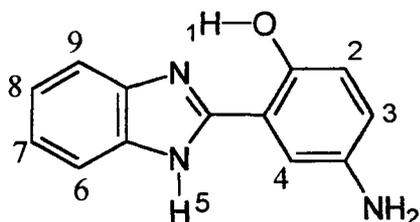
	C	H	N
Percentual teórico:	69,02 %	4,46 %	12,38 %
Resultados experimentais:	69,06 %	4,56 %	12,06 %
Desvio:	00,04 %	00,10 %	00,32 %

4.3.3 2-(5'-amino-2'-hidroxifenil)benzimidazol, (1b):

Uma mistura composta por 2,000 g de ácido 5-amino-2-hidroxi-benzóico (13,06 mmol), 1,412 g de 1,2-fenilenodiamina (13,06 mmol) e 10 mL de ácido polifosfórico foi aquecida a temperatura de 200 °C durante 4 horas, com agitação. Após, a mistura reacional foi vertida em 400 mL de água. O precipitado obtido foi filtrado a vácuo e em seguida agitado com solução de carbonato de sódio 10% (p/v), com o que toma uma cor amarela. Filtrou-se novamente e lavou-se o precipitado com água destilada. Secou-se o produto a 60 °C.

O rendimento bruto obtido foi de 53%.

O produto obtido foi utilizado em forma bruta para a próxima etapa sintética ou purificado por recristalização fracionada em acetona/água para ser analisado.



Ponto de fusão: produto se decompõe sem fundir, acima de 260 °C.

IV (espectro 2, KBr), $\nu(\text{cm}^{-1})$: 3400; 3312; 1504; 1257.

RMN de ^1H (espectro 12, 200 MHz, DMSO- d_6 , ppm): δ 13,12 (s, largo, 1H, NH ou OH); 10,28 (s, largo, 1H, NH ou OH); 7,71 (m, 2H, 2 \times CH); 7,33 (m, 3H, 3 \times CH); 6,88 (m, 2H, 2 \times CH); 4,80 (s, largo, 2H, NH_2)

Análise elementar (calculado para $\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}$):

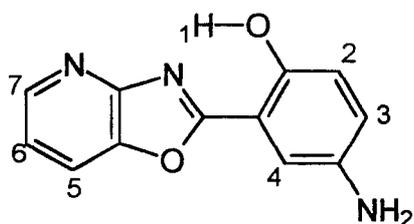
	C	H	N
Percentual teórico	69,32 %	4,92 %	18,65 %
Resultados experimentais	69,03 %	4,79 %	18,26 %
Desvio:	00,29 %	00,13 %	00,39 %

4.3.4 2-(5'-amino-2'-hidroxifenil)oxazolo[4,5-b]piridina, (1c):

Uma mistura composta por 2,000 g de ácido 5-amino-2-hidroxibenzoico (13,06 mmol), 1,438 g de 2-amino-3-hidroxipiridina (13,06 mmol) e 10 mL de ácido polifosfórico foi aquecida, com agitação, a temperatura de 200 °C por 3 horas. A mistura foi então vertida em 400 mL de água destilada e filtrada. O filtrado foi neutralizado com solução concentrada de NaOH, e o precipitado amarelo formado foi recolhido por filtração e seco a 60 °C.

O rendimento bruto obtido foi de 81%.

O produto obtido foi utilizado em forma bruta para a próxima etapa sintética ou recristalizado em tolueno para ser analisado.



Ponto de fusão: 218-220 °C

IV (espectro 3, KBr), $\nu(\text{cm}^{-1})$: 3425; 3305; 3200; 1543; 1406.

RMN de ^1H (espectro 13, 200 MHz, CDCl_3 , ppm): δ 10,56 (s, 1 H, OH); 8,48-8,52 (dd, $J_1=4,8$, $J_2=1,4$, H^7 ,); 7,79-7,78 (dd, $J_1=8,2$, $J_2=1,4$, H^5); 7,19-7,29 (m, 2 H, $2\times\text{CH}$); 6,08-6,95 (m, 2 H, $2\times\text{CH}$); 3,48 (s, largo, 2 H, NH_2).

UV-Vis (espectro 21, diclorometano, λ , ϵ): 235 nm (18.194); 300 nm (24.170); 313 nm (21.529); 379 nm (9.213)

Análise elementar (calculado para $\text{C}_{12}\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_2$):

	C	H	N
Percentual teórico	63,43 %	3,99 %	18,49 %
Resultados experimentais	62,89 %	3,69 %	18,11 %
Desvio:	00,54 %	00,30 %	00,38 %

4.3.5 2-(2'-hidróxi-5'-isotiocianatofenil)benzoxazol, (2a):

aqui Dissolveu-se 0,500 g de **1a** (1,86 mmol) na quantidade mínima de tolueno. Adicionou-se 0,5 mL de trietilamina e 0,5 mL de dissulfeto de carbono. A mistura reacional foi mantida a temperaturas abaixo de 0 °C, sob agitação, durante 7 dias. (A reação foi efetuada em um *freezer*, aproximadamente a -18 °C, com agitação ocasional).

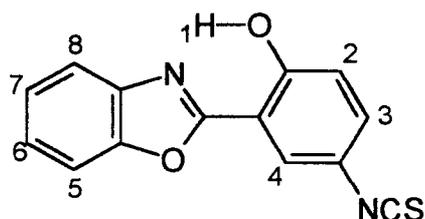
Formou-se um precipitado que consistia em um ditiocarbamato de trietilamônio, de massa molecular 403,56, que foi filtrado, lavado com tolueno e seco ao ar.

Pesou-se o precipitado e este foi dissolvido na quantidade mínima de clorofórmio. A solução resultante foi resfriada em banho de gelo e sal e adicionou-se, sob agitação, a quantidade equimolar (em relação ao sal de ditiocarbamato obtido) e mais um excesso de 10%, de cloroformiato de etila. Após 10 min, adicionou-se quantidade equimolar de trietilamina, aguardou-se mais 10 min e deixou-se a

solução a temperatura ambiente por mais 1 hora, sempre sob agitação. Após isso, o extrato orgânico foi lavado 3 vezes com 10 mL de HCl 3 M, seco com Na₂SO₄ anidro e concentrado em evaporador rotativo.

O isotiocianato produzido foi isolado por cromatografia em coluna aberta, utilizando sílica-gel como fase estacionária e clorofórmio como fase móvel. O produto foi recristalizado em propanona.

O rendimento obtido foi de 20%.



Ponto de fusão: 169-171 °C

IV (espectro 4, KBr), $\nu(\text{cm}^{-1})$: 2137, (NCS); 1492; 1227; 735,.

RMN de ¹H (espectro 14, 200 MHz, CDCl₃, ppm): δ 11,65 ppm (s, 1 H, OH); 7,84-7,85 (d, J=2,4, H⁴); 7,24-7,75 (m, H³, H⁵, H⁶, H⁷, H⁸); 7,05-7,09 (d, J=9,0; H²).

UV-Vis (espectro 22, diclorometano, λ , ϵ): 232 nm (20.590); 275 nm (28.357); 287 nm (32.468); 302 nm (17.300); 348 nm (11.344)

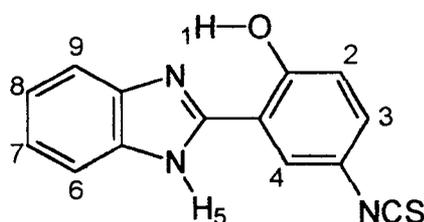
Análise elementar (calculado para C₁₄H₈N₂O₂S):

	C	H	N
Percentual teórico	62,68 %	3,00 %	10,44 %
Resultados experimentais	62,74 %	3,10 %	10,18 %
Desvio:	00,06 %	0,10 %	00,26 %

4.3.6 2-(2'-hidróxi-5'-isotiocianatofenil)benzimidazol, (2b):

Fez-se uma solução com 0,458 g de dicitloexilcarbodiimida (1,88 mmol) em 10 mL de CS₂. Esta foi resfriada em banho de gelo-sal e adicionou-se, lentamente e com agitação, uma solução de 0,500 g de **1b** (1,88 mmol) em 10 mL de piridina. Manteve-se a temperatura abaixo de 0 °C por 24 horas (efetuou-se a reação a -18-0 °C). A mistura reacional foi então vertida em 400 mL de água destilada, obtendo-se um precipitado, que foi filtrado e seco a 50 °C. A massa do precipitado foi 1,002 g. Separou-se **2b** por cromatografia em coluna aberta utilizando sílica-gel como fase estacionária e tolueno como fase móvel. O produto foi posteriormente recristalizado em propanona.

O rendimento obtido foi de 13%, após recristalização.



Ponto de fusão: 288-292 °C

IV (espectro 5, KBr), $\nu(\text{cm}^{-1})$: 2143 (NCS); 3317 (NH); 1496; 1265.

RMN de ¹H (espectro 15, 200 MHz, DMSO-d₆, ppm): δ 13,49 (s , largo, 2 H, OH e NH); 8,26-8,27 (d , J=2,6, H⁴); 7,38-7,78- (m, H², H⁵, H⁷, H⁸, H⁹); 7,15-7,19 (d, J=9,0, H²,).

UV-Vis (espectro 23, diclorometano, λ , ϵ): 229 nm (63.226); 276 nm (54.529); 288 nm (56.503); 301 nm (34.297); 335 nm (29.813)

Análise elementar (calculado para C₁₄H₉N₃OS):

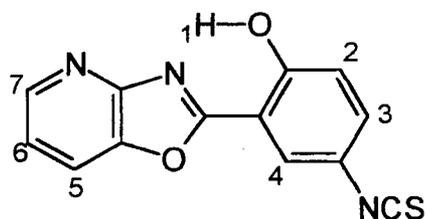
Fórmula molecular: C₁₄H₉N₃OS

	C	H	N
Percentual teórico	62,91 %	3,39 %	15,72 %
Resultados experimentais	62,91 %	3,30 %	15,56 %
Desvio:	00,00 %	0,09 %	00,16 %

4.3.7 2-(2'-hidróxi-5'-isotiocianatofenil)oxazolo[4,5-b]piridina, (2c):

Fez-se uma solução com 0,453 g de DCC (1,86 mmol) em 10 mL de CS₂. Esta foi resfriada em banho de gelo-sal e adicionou-se, lentamente e com agitação, uma solução de 0,500 g de **1c** (1,86 mmol) em 20 mL de piridina. Manteve-se a temperatura abaixo de 0 °C por 24 horas (efetuou-se a reação a -18-0 °). A mistura reacional foi então vertida em 400 mL de água destilada, obtendo-se um precipitado, que foi filtrado e seco a 50 °C. A massa do precipitado foi 0,482 g. Separou-se **2c** por cromatografia em coluna aberta utilizando sílica-gel como fase estacionária e tolueno como fase móvel. O produto foi recristalizado em propanona.

O rendimento obtido foi de 22%, após separação cromatográfica.



Ponto de fusão: 181-183 °C

IV (espectro 6, KBr), $\nu(\text{cm}^{-1})$: 2111 (NCS); 1489; 1406; 1223.

RMN de ^1H (espectro 16, 200 MHz, CDCl_3 , ppm): δ 11,30 (s, 1 H, OH); 8,66-8,63 ppm (dd, $J_1=5,0$, $J_2=1,4$, H^7); 7,96-8,01 (dd, $J_1=8,0$, $J_2=1,4$, H^5); 7,91-7,92 (d, $J=2,8$, H^4); 7,31-7,46 (m, 2 H, $2\times\text{CH}$); 7,12-7,16 (d, $J=9,0$, H^2).

UV-Vis (espectro 24, diclorometano, λ , ϵ): 234 nm (15.738); 287 nm (33.384); 307 nm (28.192); 351 nm (14.603)

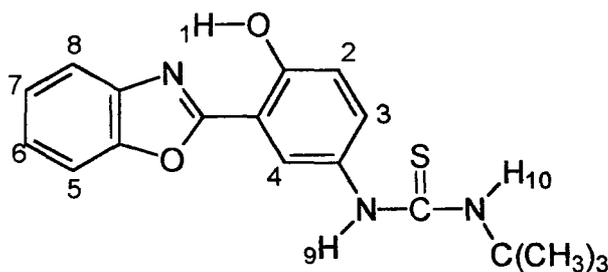
Análise elementar (calculado para $\text{C}_{13}\text{H}_7\text{N}_3\text{O}_2\text{S}$):

	C	H	N
Percentual teórico	57,99 %	2,62 %	15,60 %
Resultados experimentais	58,36 %	2,48 %	15,65 %
Desvio:	00,37 %	0,14 %	00,05 %

4.3.8 2-[2'-hidroxi-5'-(*N*-*terc*-butiltioureída)fenil]benzoxazol (3a):

Dissolveu-se 50 mg de **2a** em quantidade mínima de tetraidrofurano. Adicionou-se um excesso de *terc*-butilamina ($\approx 0,2$ mL) e, após 5 min, o produto da reação foi reprecipitado com água. O precipitado foi filtrado, lavado com água e seco ao ar.

Obteve-se rendimento quantitativo (medido por CCD antes da precipitação em água).



Ponto de fusão: 166-167 °C

IV (espectro 7, KBr), $\nu(\text{cm}^{-1})$: 3256; 3047; 1538; 1247.

RMN de ^1H (espectro 17, 200 MHz, CDCl_3 , ppm,): δ 11,61 (s, 1 H, OH); 7,10-7,90 (m, 8 H, 7 \times CH e NH); 5,88 (s, 1 H, NH); 1,52 (s, 9H, 3 \times CH₃).

UV-Vis (espectro 25, diclorometano, λ , ϵ): 269 nm (23.741); 337 nm (11.792)

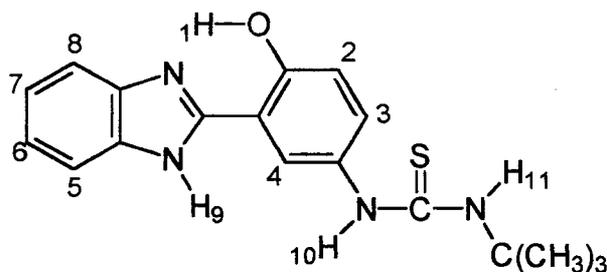
Análise elementar (calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_2\text{S}$):

	C	H	N
Percentual teórico	63,32 %	5,61 %	12,31 %
Resultados experimentais	63,36 %	5,46 %	11,71 %
Desvio:	00,04 %	0,15 %	00,50 %

4.3.9 2-[2'-hidroxi-5'-(*N*-terc-butiltioureída)fenil]benzimidazol, (3b):

Dissolveu-se 20 mg de **2b** em propanona a quente e adicionou-se excesso de *terc*-butilamina (\approx 0,2 mL). Após 15 min o solvente e o excesso de *terc*-butilamina foram evaporados a 50 °C.

Obteve-se rendimento quantitativo (medido por CCD).



Ponto de fusão: > 350 °C.

IV (espectro 8, KBr), $\nu(\text{cm}^{-1})$: 3381; 3303; 3153; 2965; 1502.

RMN de ^1H (espectro 18, 200 MHz, DMSO- d_6 , ppm, TMS): δ 13,30 (s, largo, 1 H, H^1 ou H^9); 13,18 (s, largo, 1 H, H^1 ou H^9); 9,20 (s, 1 H, H^{10} ou H^{11}); 8,08-8,09 (d, $J=2,6$, H^4); 7,80 (s, largo, 1 H, CH); 7,71 (s, largo, 1 H, CH); 7,35-7,40 (4 H, $3\times\text{CH}$ e NH); 7,06-7,11 (d, $J=8,8$, H^2); 1,59 (s, 9 H, $3\times\text{CH}_3$).

UV-Vis (espectro 25, tetraidrofurano, λ , ϵ): 292 nm (20.341); 339 nm (11.227)

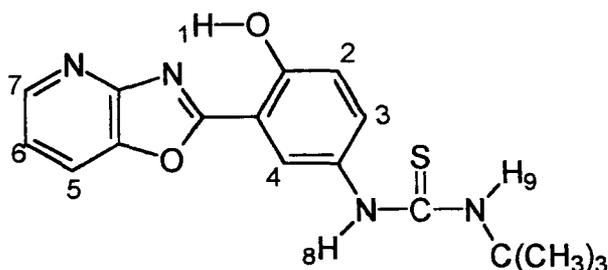
Análise elementar (calculado para $\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_2\text{S}$):

	C	H	N
Percentual teórico	61,98 %	5,20 %	12,76 %
Resultados experimentais	62,27 %	5,38 %	12,05 %
Desvio:	00,29 %	0,18 %	00,71 %

4.3.10 2-[2'-hidroxi-5'-(*N*-*terc*-butiltioureída)fenil]oxazolo[4,5-*b*]piridina (3c):

Dissolveu-se 20 mg de **2c** em clorofórmio e adicionou-se um excesso de *terc*-butilamina ($\approx 0,2$ mL). Após 15 min o solvente e o excesso de *terc*-butilamina foram evaporados a 50 °C.

Obteve-se rendimento quantitativo (medido por CCD).



Ponto de fusão: 186-189 °C (a temperaturas por volta de 150 °C e acima, começa a ocorrer uma mudança no produto, evidenciada pelo aparecimento de fluorescência verde, intensa, sob luz UV, enquanto o composto originalmente apresentava fluorescência laranja, fraca).

IV (espectro 8, KBr), $\nu(\text{cm}^{-1})$: 3370; 3171; 2975; 1532; 1408.

RMN de ^1H (espectro 19, 200 MHz, DMSO- d_6 , ppm): δ 9,27 (s, largo, OH ou NH); 8,55-8,58 (d, $J=5,6$, H^7); 8,28-8,32 (d, $J=8,6$, H^5); 8,18-8,19 (d, $J=2,61$, H^4); 7,43-7,53 (m, H^3 , H^6 , NH); 7,05-7,09 (d, $J=8,8$, H^2); 1,49 (s, 9 H, $3\times\text{CH}_3$).

Obs: um dos prótons (OH ou NH) não aparece devido ao intercâmbio com solvente.

UV-Vis (espectro 26, diclorometano, λ , ϵ): 261 nm (17.681); 298 nm (20.753); 343 nm (11.927)

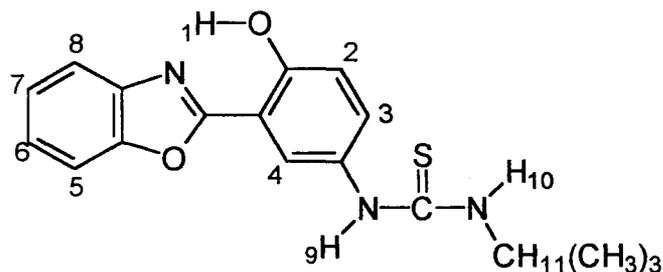
Análise elementar (calculado para $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_2\text{S}$):

	C	H	N
Percentual teórico	59,63 %	5,30 %	16,36 %
Resultados experimentais	59,43 %	5,16 %	16,40 %
Desvio:	00,20 %	0,14 %	00,04 %

4.3.11 2-[2'-hidroxi-5'-(*N*-*iso*-propiltioureída)fenil]benzoxazol (4a):

Dissolveu-se 50 mg de **2a** em quantidade mínima de tetraidrofurano. Adicionou-se um excesso de *iso*-propilamina ($\approx 0,2$ mL), e após 5 min o produto da reação foi reprecipitado com água. O precipitado foi filtrado, lavado com água e seco ao ar.

Obteve-se rendimento quantitativo (medido por CCD antes da precipitação em água).



Ponto de fusão: 179-180 °C

IV (espectro 10, KBr), $\nu(\text{cm}^{-1})$: 3368; 3161; 2967; 1897; 898.

RMN de ^1H (espectro 20, 200 MHz, CDCl_3 , ppm): δ 11,86 (s, H^1); 8,13-8,14 (d, $J=2,4$, H^4); 7,50-8,01 (m, H^3 , H^5 , H^6 , H^7 , H^8 , H^9); 7,39-7,43 (d, $J=8,8$, H^2); 5,85-5,89 (d, $J=8,0$, H^{10}); 4,6-5,0 (m, H^{11}); 1,44-1,47 (d, $2 \times \text{CH}_3$)

UV-Vis (espectro 29 clorofórmio, λ , ϵ): 270,0 nm ($3,0 \times 10^4$); 337,6 ($1,4 \times 10^4$)

Análise elementar (calculado para $\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_2\text{S}$):

	C	H	N
Percentual teórico	61,98 %	5,20 %	12,76 %
Resultados experimentais	62,27 %	5,38 %	12,50 %
Desvio:	00,29 %	0,18 %	00,26 %

4.3.12 Conjugação de proteínas com 2a, 2b e 2c:

Fez-se uma solução do fluoróforo (**2a**, **2b** ou **2c**), de concentração 10 mg/mL em DMSO/Dioxano 1:1. Adicionou-se alíquotas desta solução, vagarosamente e com agitação, a 1 mL de uma solução da proteína (albumina sérica bovina ou concanavalina-A), de concentração 5 mg/mL em carbonato de sódio 0,1 M (pH 9).

Foram utilizadas concentrações de 10, 20, 50, 100 e 200 μg de isotiocianato por mL de solução de proteína. Incubou-se a mistura por 60 min a temperatura ambiente, com agitação. Adicionou-se 20 μl de cloreto de amônio 1 M. A mistura de reação foi submetida a cromatografia em coluna com Sephadex G-50 para separar a proteína marcado do fluoróforo livre que poderia estar presente. A coluna foi equilibrada e eluída em tampão fosfato salino (10 mM fosfato, 150 mM NaCl, pH 7,4).

5. CONCLUSÕES

1. Neste trabalho foi relatada a síntese e caracterização de 10 substâncias heterocíclicas fluorescentes. Três destas, que se constituíram no objetivo principal do trabalho, possuem o grupo isotiocianato, capaz de ligar-se covalentemente a proteínas e aminas primárias em geral. São os compostos: 2-(2'-hidróxi-5'-isotiocianatofenil)benzoxazol (**2a**), 2-(2'-hidróxi-5'-isotiocianatofenil)benzimidazol (**2b**) e 2-(2'-hidróxi-5'-isotiocianatofenil)oxazolo[4,5-b]piridina (**2c**), que foram obtidos em alto grau de pureza.
2. Os três isotiocianatos sintetizados apresentam pontes de hidrogênio intramoleculares e possuem estruturas de tipo reconhecido por apresentar fototautomerismo, apresentando grandes deslocamentos de Stokes.
3. Os três isotiocianatos reagiram rapidamente com aminas primárias, gerando conjugados fluorescentes, e da mesma forma com proteínas, ao utilizar-se metodologia adequada.
4. O produto que deu origem aos conjugados mais intensamente fluorescentes com aminas e proteínas foi o isotiocianato **2b**, enquanto **2c** gerou conjugados com baixa intensidade de fluorescência e **2a** gerou conjugados com intensidade de fluorescência intermediária entre os dois já citados.
5. Os resultados obtidos pressupõem que os isotiocianatos **2a-c** têm potencial utilidade como etiquetas fluorescentes para proteínas ou outros substratos e em especial **2a** e **2b**, que apresentam maior intensidade de emissão de luz ao formar aductos com aminas (ou proteínas). Os produtos sintetizados apresentam como vantagem em relação a outras etiquetas fluorescentes o seu grande deslocamento de Stokes e, possivelmente, boa estabilidade fotoquímica, como já foi relatado para compostos semelhantes.
6. A síntese de **2b** e **2c**, feita pelas técnicas aqui expostas, mostrou-se particularmente trabalhosa e demorada, devido às dificuldades de isolamento dos produtos finais. Sabe-se porém que existem outras técnicas de síntese de isotiocianatos, que não foram por nós tentadas, que talvez levem a termo a síntese e o isolamento de **2b** e **2c** com menor dificuldade.

7. As condições experimentais das sínteses não foram otimizadas e em certos casos os rendimentos obtidos neste trabalho referem-se a um único experimento.
8. Os produtos sintetizados podem servir como protótipos de uma nova família de etiquetas fluorescentes em que parâmetros como o coeficiente de absorvidade molar, eficiência quântica, comprimentos de onda dos máximos de absorção e emissão, podem ser modificados, pela síntese de compostos com diferentes grupos substituintes.
9. As possibilidades de aplicação dos corantes fluorescentes sintetizados e descritos neste trabalho não se esgotam na que foi originalmente proposta, ou seja, como etiquetas fluorescentes, uma vez que corantes fluorescentes possuem uma infinidade de usos tecnológicos e científicos.

6. BIBLIOGRAFIA

- (1) O'Haver, T. C. *J. Chem. Educ.* **1978**, *55*, 423-428.
- (2) Stokes, G. G. *Phil. Trans.* **1852**, *142*, 463
- (3) Barnes, M. D.; Whitten, W. B.; Ramsey, J. M. *Anal. Chem.* **1995**, 418 A-423 A.
- (4) Keller, R. A.; Dinh, N. C.; Martin, J. C.; Jett, J. H. *Anal. Chem.* **1987**, *59*, 2158-2161.
- (5) Lingeman, H.; Underberg, W. J. M.; Takadate, A.; Hulshoff, A. *J. Liq. Chromatogr.* **1985**, *8*, 789-874.
- (6) Flanagan, J. H.; Legendre, B. L., Jr.; Hammer, R. P.; Soper, S. A. *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 341-347.
- (7) Shealy, D. B.; Lohrmann, R.; Ruth, J. R.; Narayanan, N.; Sutter, S. L.; Casay, G. A.; Evans III, L.; Patonay, G. *App. Spectrosc.* **1995**, *49*, 1815-1820.
- (8) Diamandis, E. P. *Anal. Chem.* **1993**, *65*, 454R-459R.
- (9) Fudenberg, H. H.; Stites, D. P.; Caldwell, J. L.; Wells, J. V. *Imunologia Básica e Clínica*; Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 1980; pp 336-373.
- (10) Hemmilä, I. *Clin. Chem.* **1985**, *31*, 359-370.
- (11) Christie, R. M. *Rev. Prog. Coloration* **1993**, *23*, 1-18.
- (12) Kronick, M. N. *J. of Immunol. Methods* **1986**, *92*, 1-13.
- (13) Haugland, R. P. *Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals*; Ed. Molecular Probes Inc. Eugene, 1992;
- (14) Bright, F. V. *Anal. Chem.* **1988**, *60*, 1031A-1039A.
- (15) Bright, F. V.; Vickers, G. H.; Hieftje, G. M. *Anal. Chem.* **1986**, *58*, 1225-1227.
- (16) Bright, F. V.; McGown, L. B. *Analytica Chimica Acta* **1984**, *162*, 275-283.
- (17) Titus, J. A.; Haugland, R.; Sharrow, S. O.; Segal, D. M. *J. Immunol. Methods* **1982**, *50*, 193-204.

- (18) Silverstein, R. M.; Bassler, G. C.; Morrill, T. C. *Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos*; Guanabara Koogan, Rio de Janeiro 1994; pp 263-283.
- (19) Krasovitskii, B. M.; Bolotin, B. M. *Organic Luminescent Materials*; VCH: Weinheim, 1988; pp 88-93.
- (20) Griffiths, J. *Colour and Constitution of Organic Molecules*; Academic Press: London, 1976; pp 57-58.
- (21) Zollinger, H. *Color Chemistry - Syntheses, Properties and Applications of Organic Dyes and Pigments*; VCH: Weinheim, 1991; pp 24-26.
- (22) Skoog, D. A.; West, D. M. *Principles of Instrumental Analysis*; Holt, Rinehart and Winston, Inc. New York, 1971; pp 222-240.
- (23) Sierra, M. M. S.; Giovanela, M.; Donard, O. F. X.; Belin, C. *Quím. Nova* **1996**, *19*, 294-301.
- (24) Weller, A. *Progr. React. Kinet.* **1961**, *10*, 187-214.
- (25) Kasha, M. *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 2* **1986**, *82*, 2379-2392.
- (26) Dey, J.; Dogra, S. K. *Can. J. Chem.* **1991**, *69*, 1539-1547.
- (27) Schwartz, B. J.; Peteanu, L. A.; Harris, C. B. *J. Phys. Chem.* **1992**, *96*, 3591-3598.
- (28) Kauffman, J. M.; Bajwa, G. S. *J. Heterocyclic Chem.* **1993**, *30*, 1613-1621.
- (29) Souto, A. A. *Síntese de Corantes para Laser de Transferência Protônica: 2,5-Bis(2'-benzazolil)hidroquinona e Compostos Relacionados*. **1992**, UFRGS, Mestrado.
- (30) Becker, R. S.; Lenoble, C.; Zein, A. *J. Phys. Chem.* **1987**, *91*, 3517-3524.
- (31) Mordzinski, A.; Grabowska, A. *Chem. Phys. Letters* **1984**, *111*, 383-388.
- (32) Das, K.; Sarkar, N.; Ghosh, A. K.; Majundar, D.; Nath, D. N.; Bhattacharyya, K. *J. Phys. Chem.* **1994**, *98*, 9126-9132.
- (33) Douhal, A.; Amat-Guerri, F.; Lillo, M. P.; Acuña, A. U. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **1994**, *78*, 127-138.
- (34) Woolfe, G. J.; Melzig, M.; Schneider, S.; Dörr, F. *Chem. Phys.* **1983**, *77*, 213-221.
- (35) Sytnik, A.; Kasha, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 8627-8630.

- (36) Grabowska, A.; Mordzinski, A. *Chem. Phys. Letters* **1982**, *90*, 122-127.
- (37) Elsaesser, T.; Kaiser, W. *Chem. Phys. Letters* **1986**, *128*, 231-237.
- (38) Brewer, W. E.; Martinez, M. L.; Chou, P. T. *J. Phys. Chem.* **1990**, *94*, 1915-1918.
- (39) Stephan, J. S.; Grellmann, K. H. *J. Phys. Chem.* **1995**, *99*, 10066-10068.
- (40) Williams, D. L.; Heller, A. *J. Phys. Chem.* **1970**, *74*, 4473-4480.
- (41) Al-Soufi, W.; Grellmann, K. H.; Nickel, B. *Chem. Phys. Letters* **1990**, *174*, 609-616.
- (42) Elsaesser, T.; Schmetzer, B.; Lipp, M.; Bäuerle, R. *J. Chem. Phys. Letters* **1988**, *148*, 112-118.
- (43) Itoh, M.; Fujiwara, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 1561-1565.
- (44) Laermer, F.; Elsaesser, T.; Kaiser, W. *Chem. Phys. Letters* **1988**, *148*, 119-124.
- (45) Krishnamurthy, M.; Dogra, S. K. *J. Photochem.* **1986**, *32*, 235-242.
- (46) Grabowska, A.; Mordzinski, A.; Kühnle, W.; Krówczyński, A. *Chem. Phys. Letters* **1983**, *101*, 291-296.
- (47) Mordzinski, A. *J. Mol. Struct.* **1988**, *177*, 385-391.
- (48) Grabowska, A.; Mordzinski, A.; Tamai, N.; Yoshihara, K. *Chem. Phys. Letters* **1988**, *153*, 389-392.
- (49) Nakagaki, R.; Kobayashi, T.; Nagakura, S. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1978**, *51*, 1671-1675.
- (50) Potter, C. A. S.; Brown, R. G. *Chem. Phys. Letters* **1988**, *153*, 7-12.
- (51) Domingues Jr., N. S.; Krug, C.; Livotto, P. R.; Stefani, V. *J. Chem. Soc., Perkin Trans 2* **1997**, 1861-1866.
- (52) Grenda, V. J.; Jones, R. E.; Gal, G.; Sletzinger, M. *J. Org. Chem.* **1965**, 259-261.
- (53) Wright, J. B. *Chem. Rev.* **1951**, 397-541.
- (54) Phillips, M. A. *J. Chem. Soc.* **1928**, 2393-2399.
- (55) Hein, D. W.; Alheim, R. J.; Leavitt, J. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 427-429.

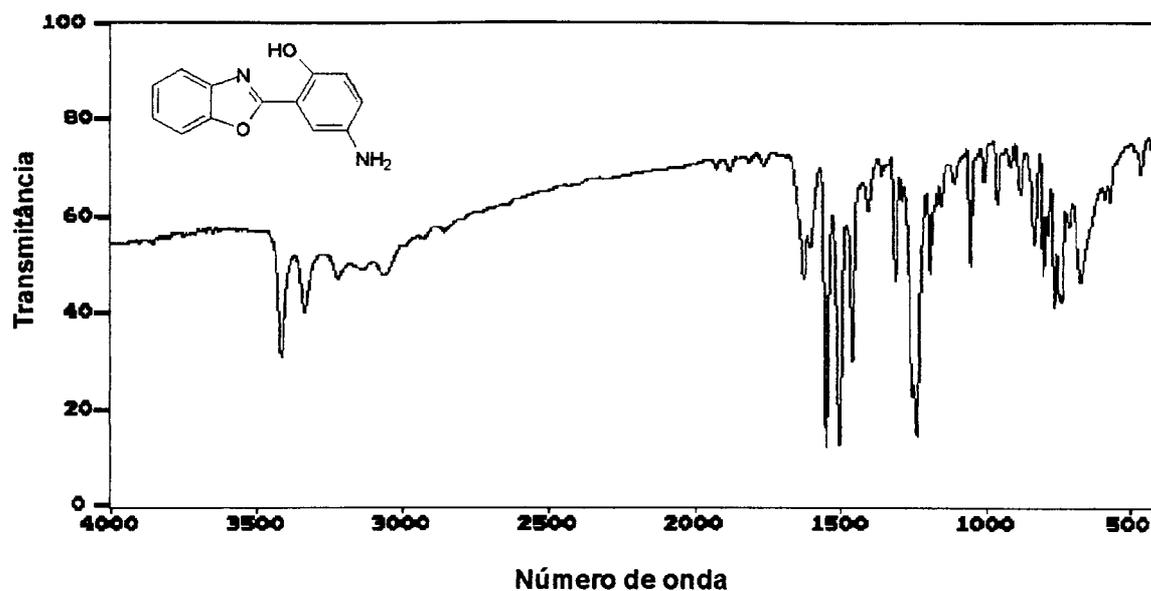
- (56) Stefani, V.; Souto, A. A.; Acuña, A. U.; Amat-Guerri, F. *Dyes and Pigments* **1992**, *20*, 97-107.
- (57) Barni, E.; Savarino, P.; Marzona, M.; Piva, M. *J. Heterocyclic Chem.* **1983**, *20*, 1517-1521.
- (58) Sluka, J.; Novák, J.; Budesinsky, Z. *Collection Czechoslov. Chem. Commun.* **1976**, *41*, 3628-3634.
- (59) Viscardi, G.; Savarino, P.; Barni, E.; Carpignano, R.; Montoneri, E.; Quagliotto, P. *J. Heterocyclic Chem.* **1992**, *29*, 835-839.
- (60) Nyilas, E.; Pinter, J. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, *82*, 609-611.
- (61) Orlando, D. M.; Wirth, J. G.; Heath, D. R. *J. Org. Chem.* **1970**, *35*, 3147
- (62) Yalçın, I.; Ören, I.; Sener, E.; Akin, A.; Uçartük, N. *Eur. J. Med. Chem.* **1992**, *27*, 401-406.
- (63) Yadagiri, B.; Lown, J. W. *Synthetic Communications* **1990**, *20*, 955-963.
- (64) Göker, H.; Ertan, R. *Arch. Pharm.* **1991**, *324*, 283-286.
- (65) Ridley, H. F.; Spickett, R. G. W.; Timmis, G. M. *J. Heterocyclic Chem.* **1965**, *2*, 453-456.
- (66) Hendrickson, J. B.; Hussoin, S. *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 1144-1149.
- (67) Abdelhamid, A. O.; Párkányi, C.; Rashid, S. M. K.; Lloyd, W. D. *J. Heterocyclic Chem.* **1988**, *25*, 403-405.
- (68) Reddy, G. S.; Reddy, K. K. *Indian J. Chem.* **1977**, *15B*, 84-85.
- (69) Aizpurua, J. M.; Palomo, C. *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1984**, *II*, 142-144.
- (70) Flouzat, C.; Guillaumet, G. *J. Heterocyclic Chem.* **1991**, *28*, 899-906.
- (71) Terashima, M.; Ishii, M. *Synthesis* **1982**, 484-485.
- (72) Rangnekar, D. W.; Mavlankar, S. V. *J. Heterocyclic Chem.* **1991**, *28*, 1449-1451.
- (73) Despax, B.; Paillous, N.; Latters; Paillous, A. *J. Appl. Poly. Sci.* **1982**, *27*, 225
- 74) Stefani, V.; Silveira, D. C. 1997; *comunicação privada*
- (75) Goldstein, S. W.; Dambek, P. J. *J. Heterocyclic Chem.* **1990**, *27*, 336

- (76) Yoshifuji, M.; Nagase, R.; Inamoto, N. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1982**, *55*, 873-876.
- (77) Perry, R. J.; Wilson, B. D.; Miller, R. J. *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 2883-2887.
- (78) Sandler, S. R.; Karo, W. *Organic Functional Group Preparations*; Wasserman, H. H. Ed. Academic Press: San Diego, 1983; pp 359-375.
- (79) Martvon, A.; Surá, J.; Cernayová, M. *Collection Czechoslov. Chem. Commun.* **1974**, *39*, 1356-1365.
- (80) Smolik, S. *Chem. Abstr.* **1966**, *66*, (Abstract)
- (81) Molina, P.; Alajarin, M.; Arques, A. *Synthesis* **1982**, 596-597.
- (82) March, J. *Advanced Organic Chemistry*; John Wiley & Sons: New York, 1985;
- (83) Losanitsch *Ber.* **1891**, *24*, 3021
- (84) Dains, F. B.; Brewster R. Q.; Olander, C. P. *C. A.* **1923**, *17*, 543
- (85) Dains, F. B.; Brewster, R. Q.; Olander, C. P. *Org. Synth. Collect.* 1948; pp 447-449.
- (86) Hodgkins, J. E.; Ettlinger, M. G. *J. Org. Chem.* **1955**, *21*, 404-405.
- (87) Kaluza *Monatsh.* **1912**, *33*, 363
- (88) Hodgkins, J. E.; Reeves, W. P. *J. Org. Chem.* **1964**, *29*, 3098-3099.
- (89) Hodgkins, J. E.; Reeves, W. P.; Yao-Ting, L. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1961**, *83*, 2532-2536.
- (90) Shibamura, T.; Shiono, M.; Mukaiyama, T. *Chem. Lett.* **1977**, 573-574.
- (91) Jochims, J. C. *Chem. Ber.* **1968**, *101*, 1746-1752.
- (92) Sayigh, A. A. R.; Ulrich, H.; Potts, J. S. *J. Org. Chem.* **1965**, *30*, 2465-2466.
- (93) Sakai, S.; Fujinami, T.; Aizawa, T. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1975**, *48*, 2981-2982.
- (94) Kim, J. N.; Song, J. H.; Ryu, E. K. *Synthetic Communications* **1994**, *24*, 1101-1105.
- (95) Douglass, I. B.; Dains, F. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1934**, *56*, 719-721.
- (96) Tanaka, S.; Uemura, S.; Okano, M. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1977**, *50*, 2785

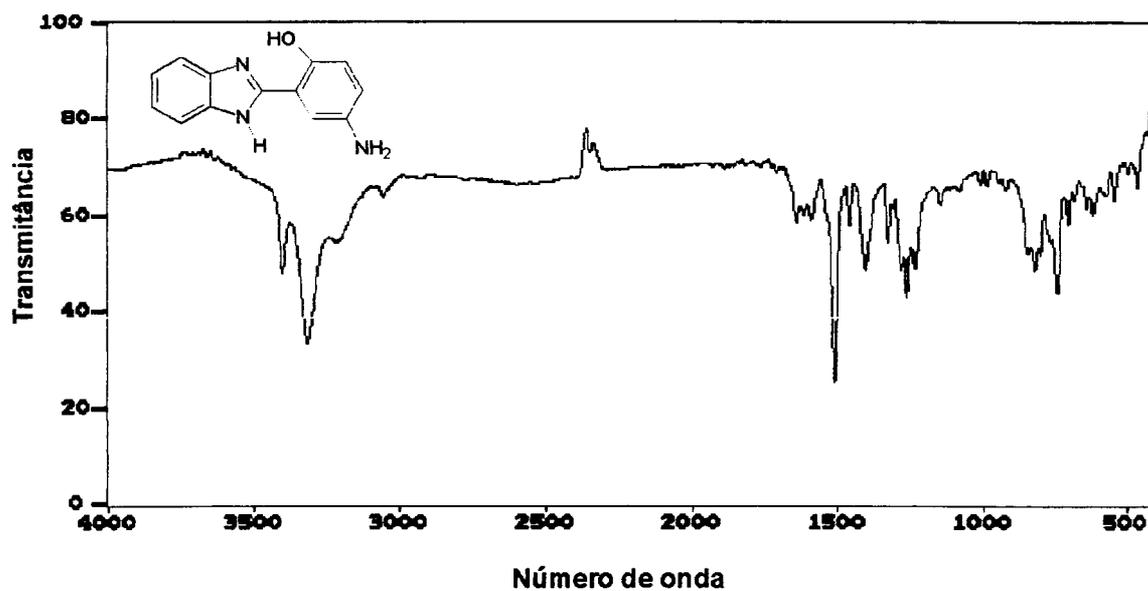
- (97) Siggia, S. *Quantitative Organic Analysis via Functional Group*; John Wiley and sons, Inc. New York, 1949; pp 104-105.
- (98) Fierz-David, H. E.; Blangey, L. A. *Fundamental Processes of Dye Chemistry*; Interscience Publishers: New York, 1949; pp 156-158.
- (99) McCoy, G.; Day, A. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1943**, *65*, 2159-2162.
- (100) Green, H.; Day, A. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1942**, *64*, 1167-1173.
- (101) Bellamy, L. J. *The Infrared Spectra of Complex Molecules*; Chapman and Hall: London, 1975; pp 107-125.
- (102) Castro, E. A.; Pena, S. A.; Santos, J. G.; Vega, J. C. *J. Org. Chem.* **1984**, *49*, 863-866.
- (103) Harlow, E.; Lane, D. *Antibodies: A Laboratory Manual*; Cold Spring Harbor: New York, 1988;
- (104) Edelman, G. M.; McClure, W. O. *Acc. Chem. Res.* **1968**, *1*, 65-70.
- (105) Tietze, L. F.; Eicher, T. *Reactions and Syntheses in the Organic Chemistry Laboratory*; 1989; pp 226-296.

7. ESPECTROS DE INFRAVERMELHO

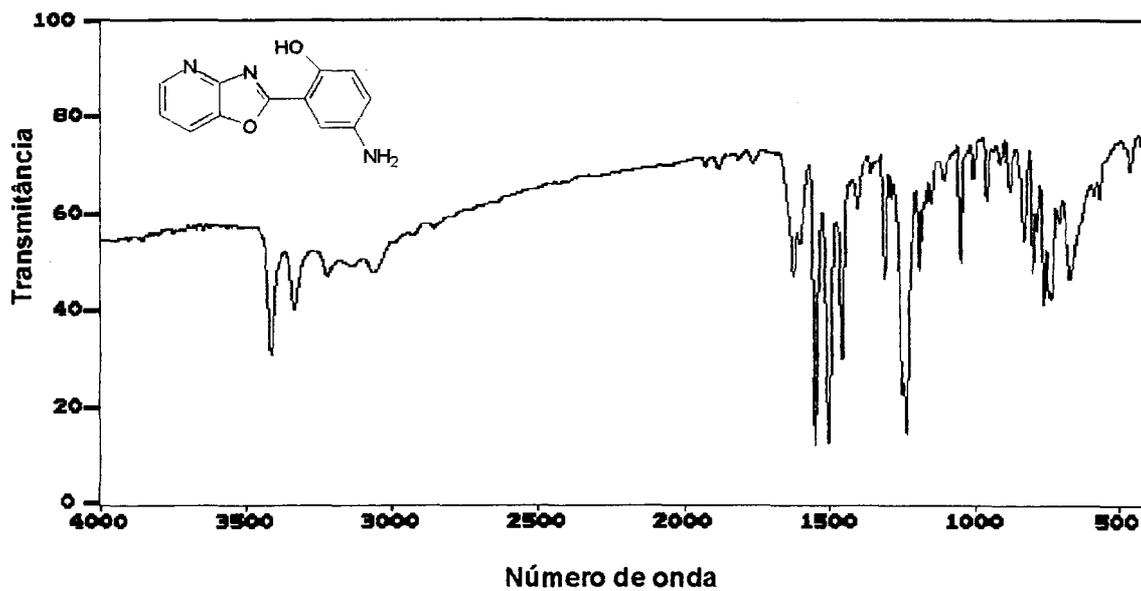
Os espectros 1 a 9 foram obtidos em um espectrômetro FTIR 3020 Mattson. O espectro 10 foi obtido em um espectrômetro Perkin Elmer 1430.



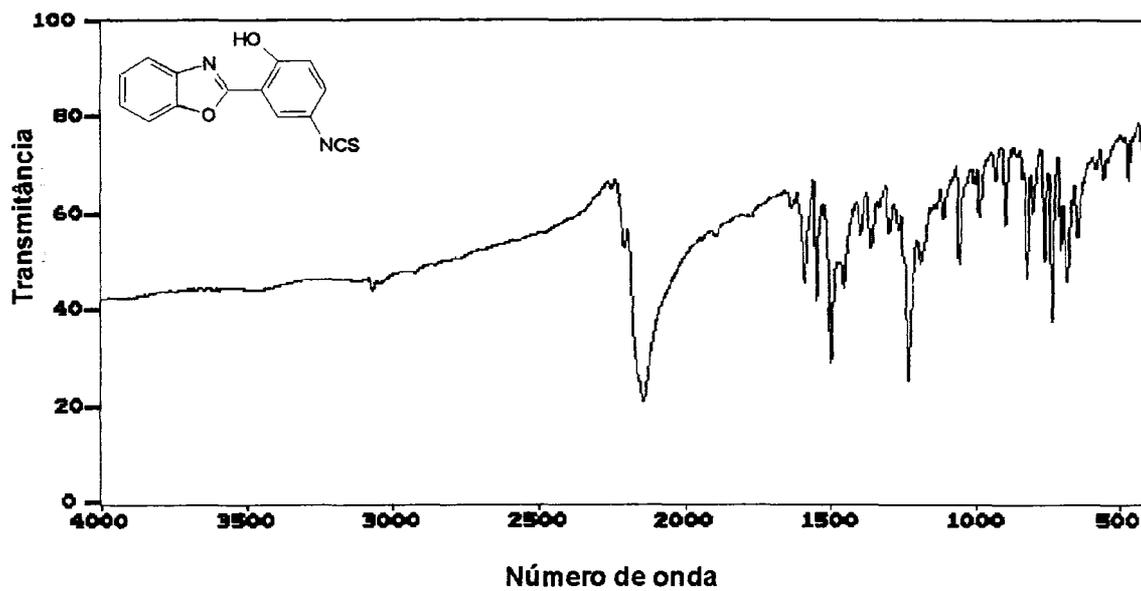
Espectro 1: espectro de infravermelho do composto 1a, em pastilha de KBr.



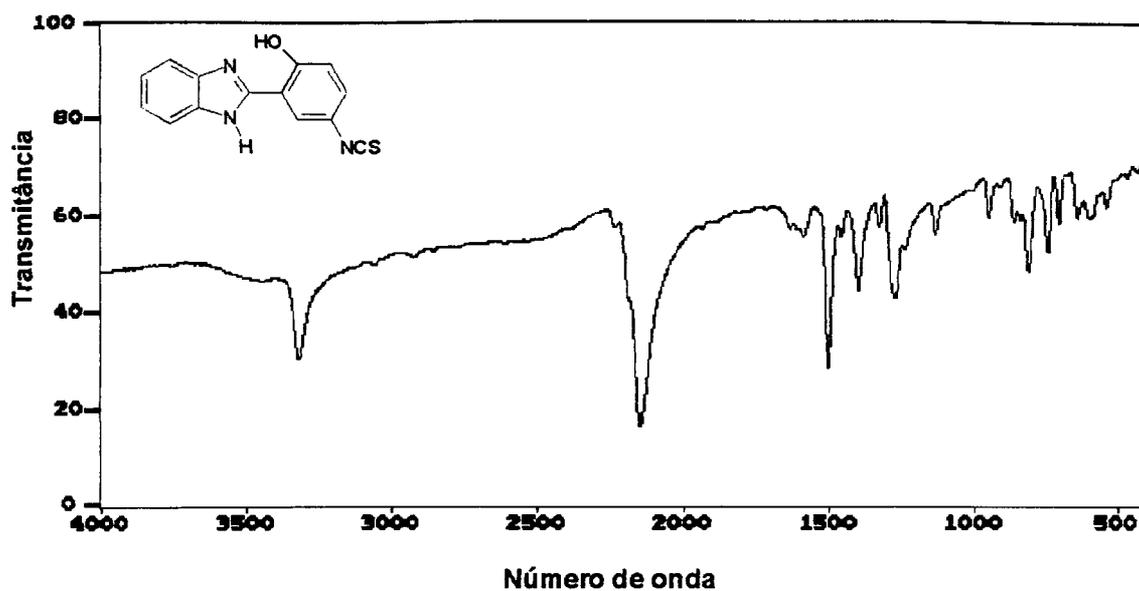
Espectro 2: espectro de infravermelho do composto 1b, em pastilha de KBr.



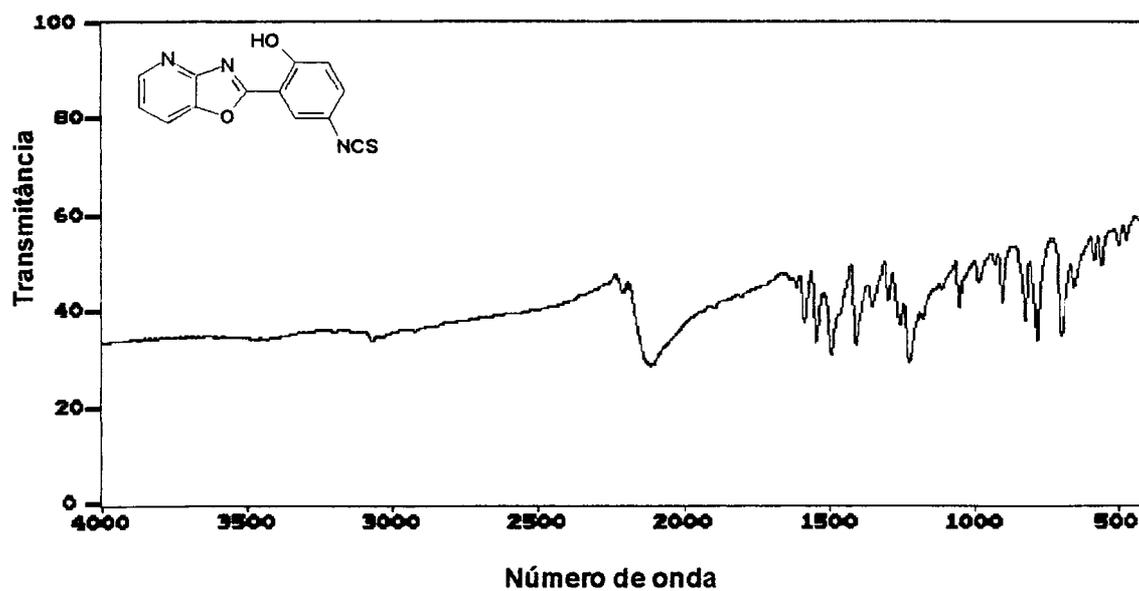
Espectro 3: espectro de infravermelho do composto 1c, em pastilha de KBr.



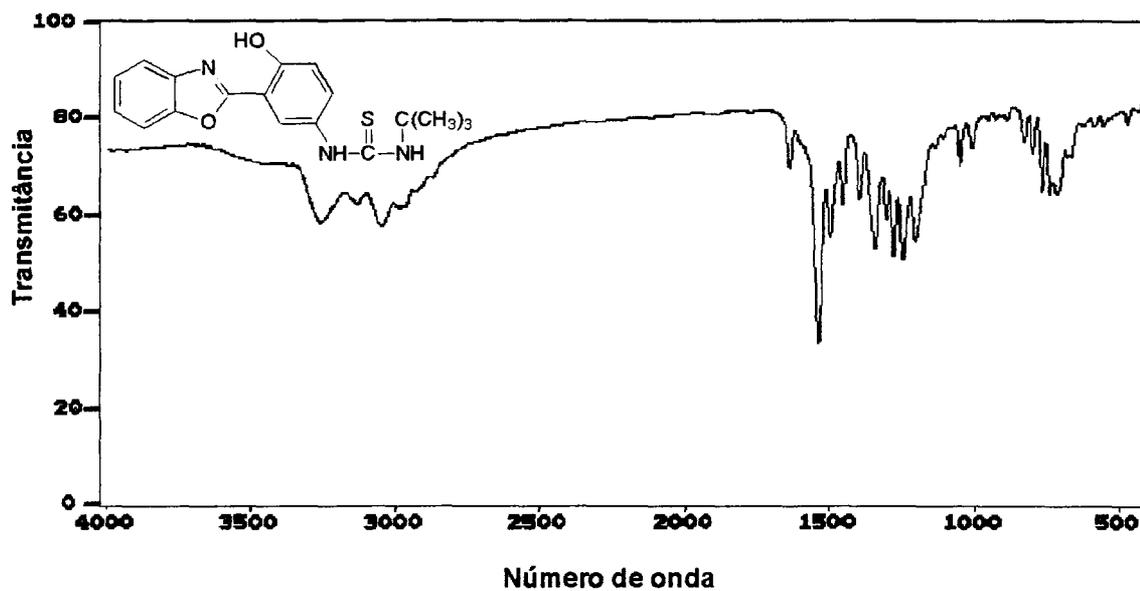
Espectro 4: espectro de infravermelho do composto 2a, em pastilha de KBr.



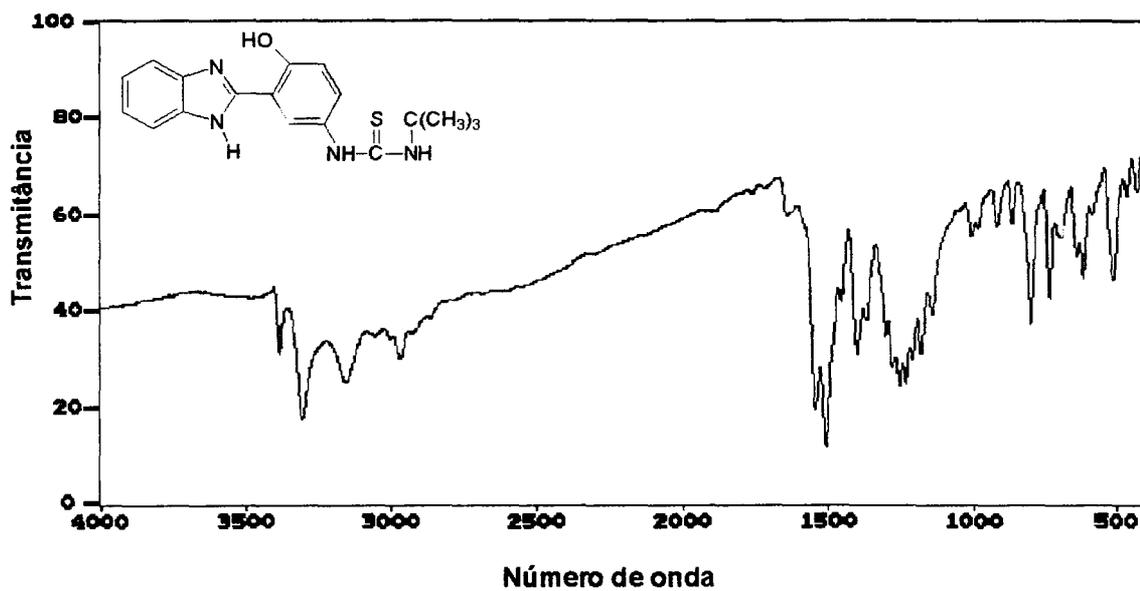
Espectro 5: espectro de infravermelho do composto 2b, em pastilha de KBr.



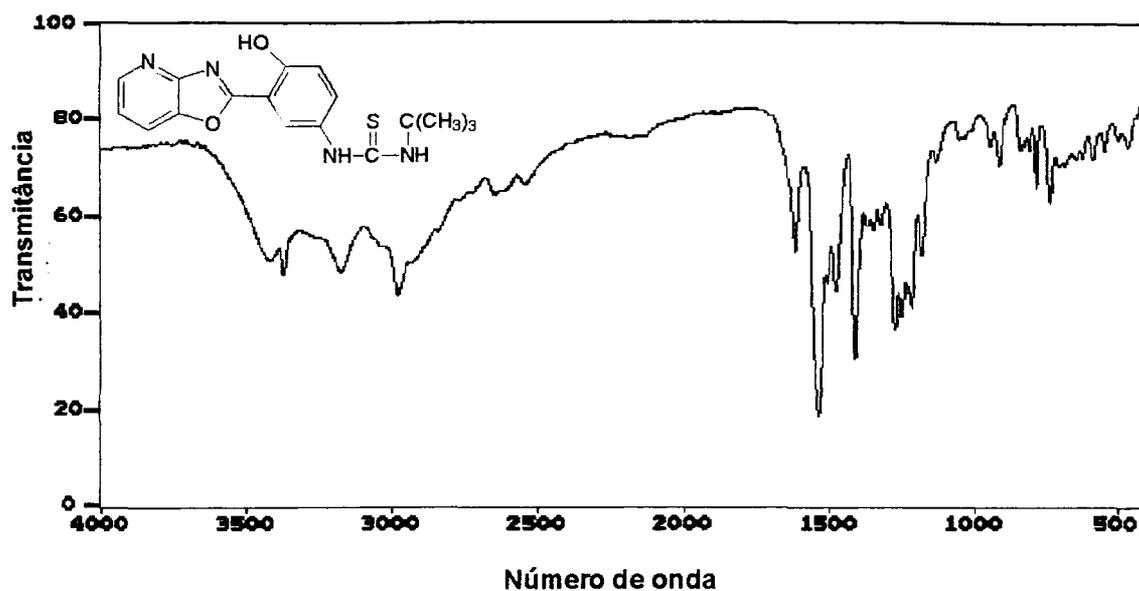
Espectro 6: espectro de infravermelho do composto 2c, em pastilha de KBr.



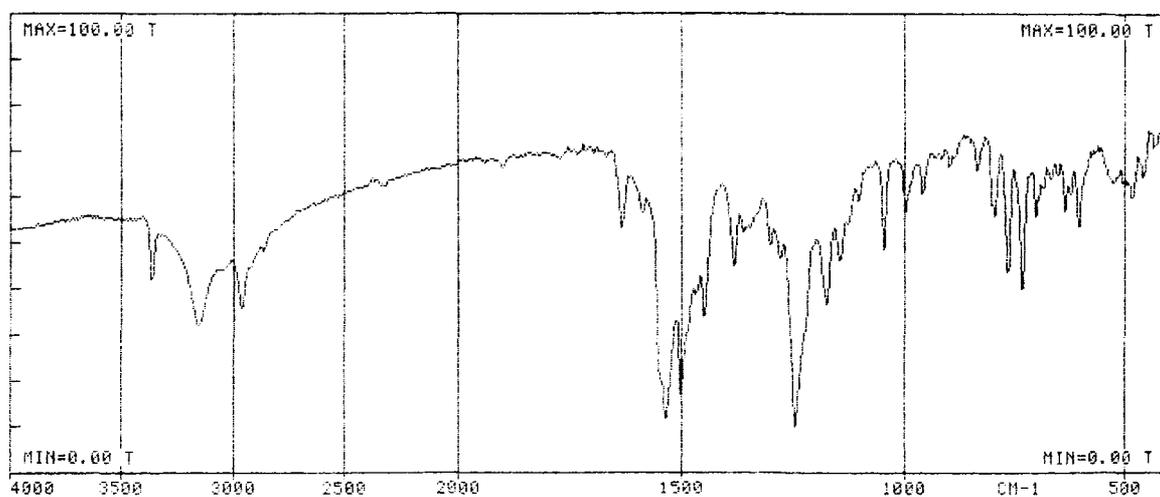
Espectro 7: espectro de infravermelho do composto 3a, em pastilha de KBr.



Espectro 8: espectro de infravermelho do composto 3b, em pastilha de KBr.

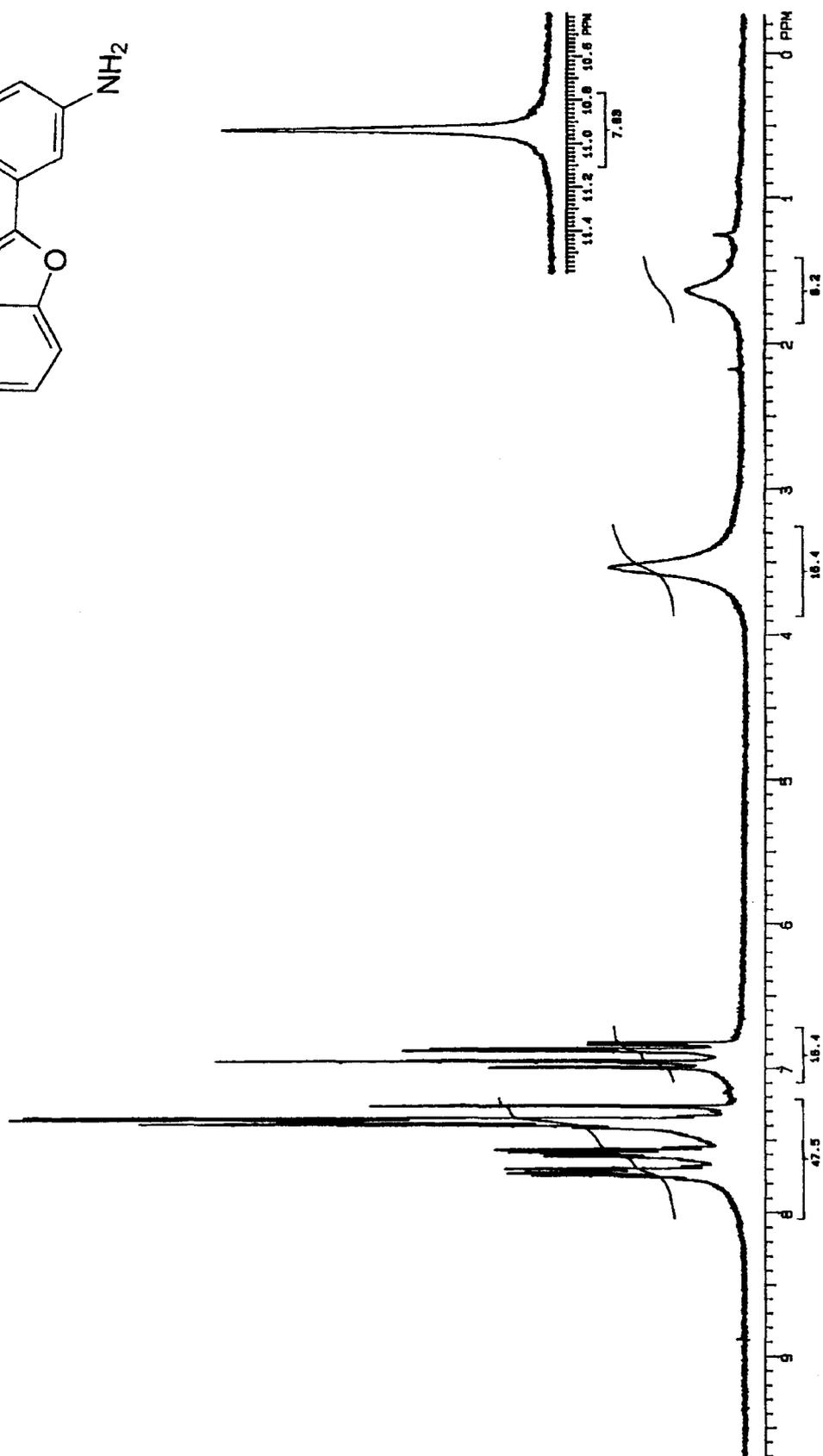
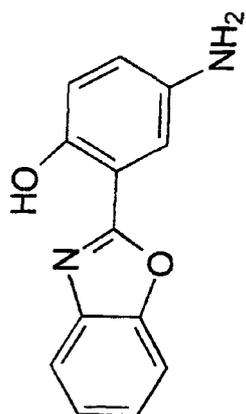


Espectro 9: espectro de infravermelho do composto 3c, em pastilha de KBr.

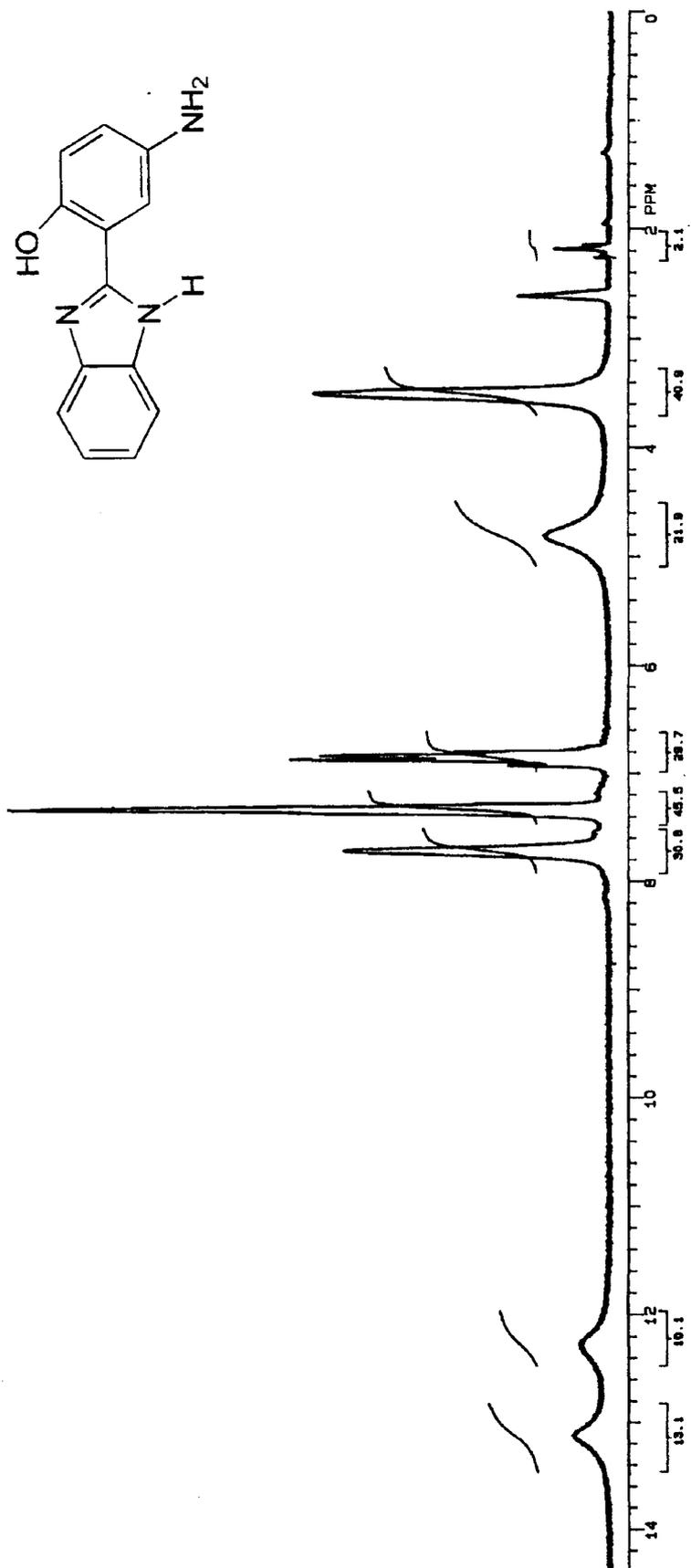


Espectro 10: espectro de infravermelho do composto 4a, em pastilha de KBr.

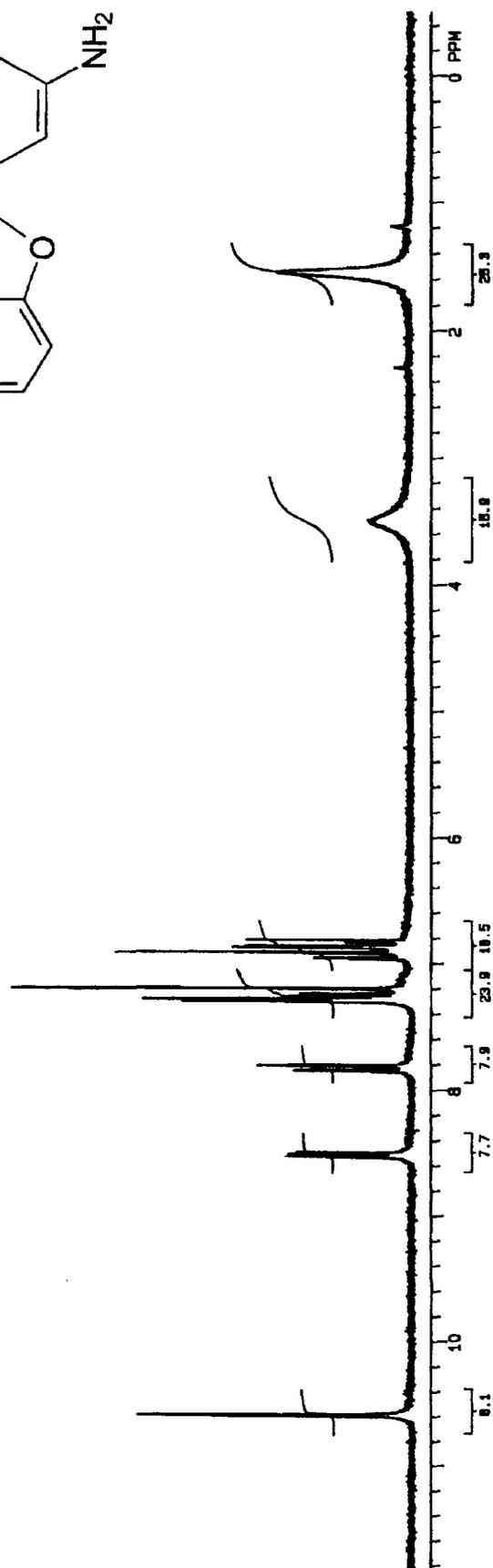
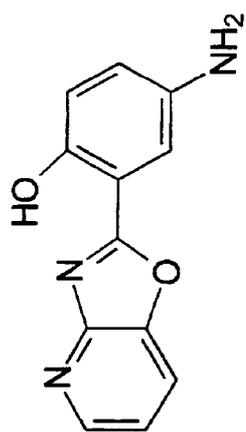
8. ESPECTROS DE RMN ^1H



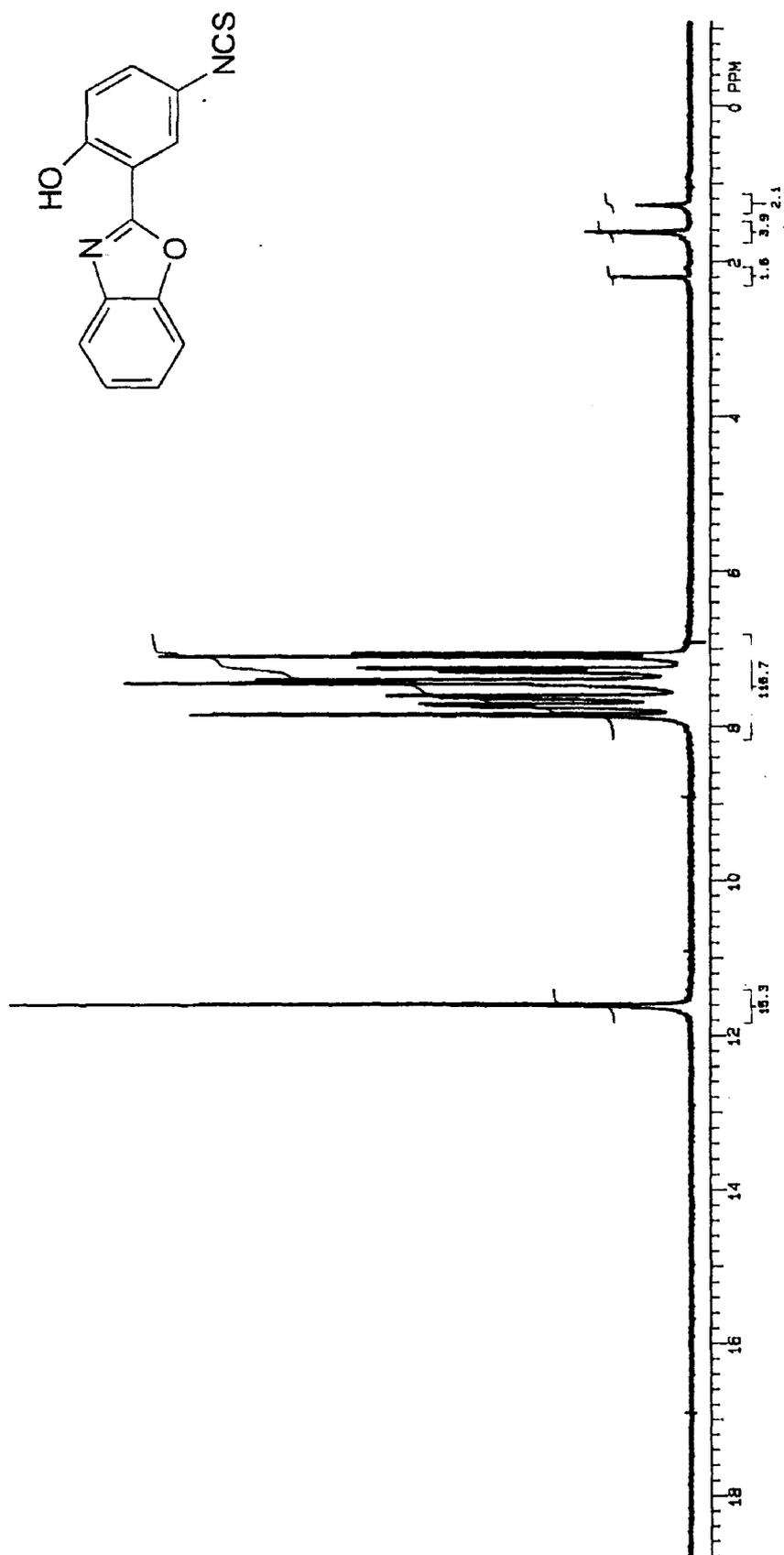
Espectro 11: espectro de RMN ¹H do composto 1a.



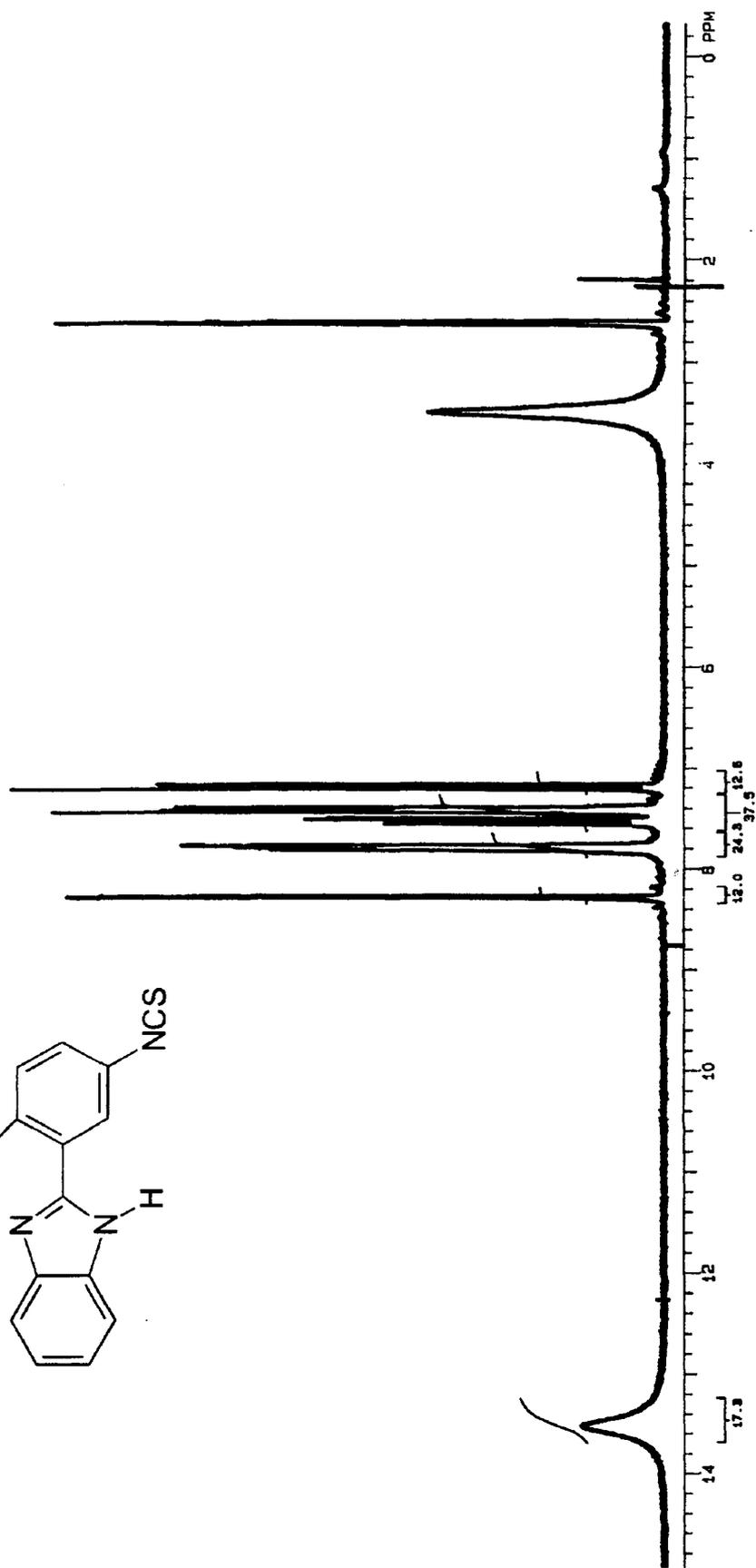
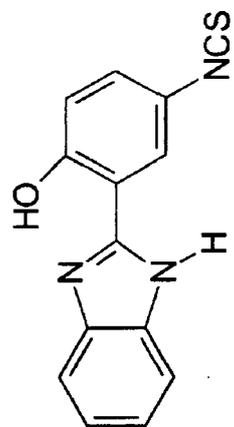
Espectro 12: espectro de RMN ¹H do composto 1b.



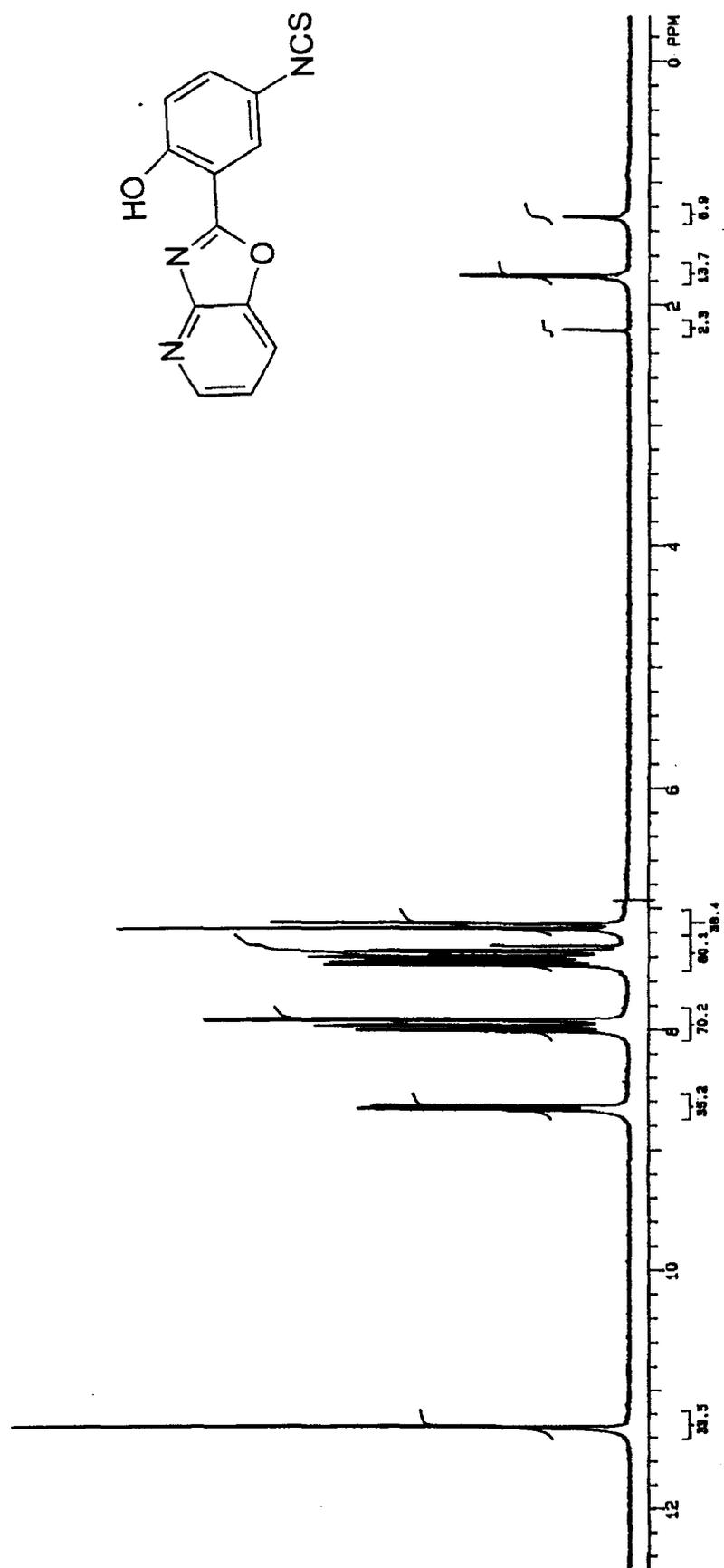
Espectro 13: espectro de RMN ¹H do composto 1c



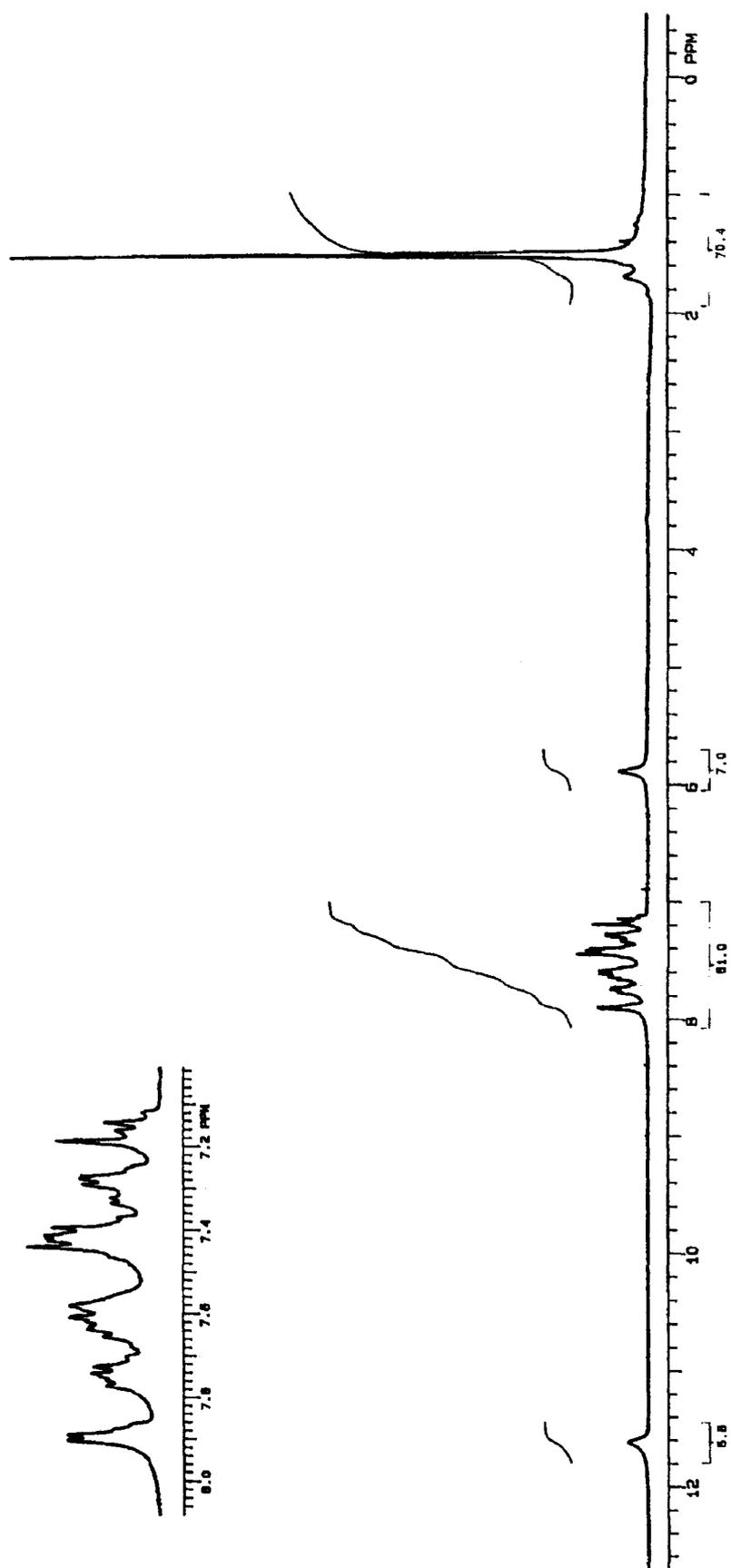
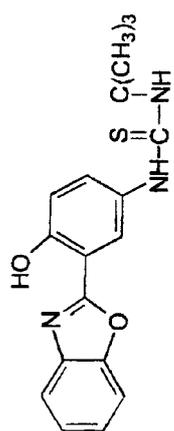
Espectro 14: espectro de RMN ¹H do composto 2a.



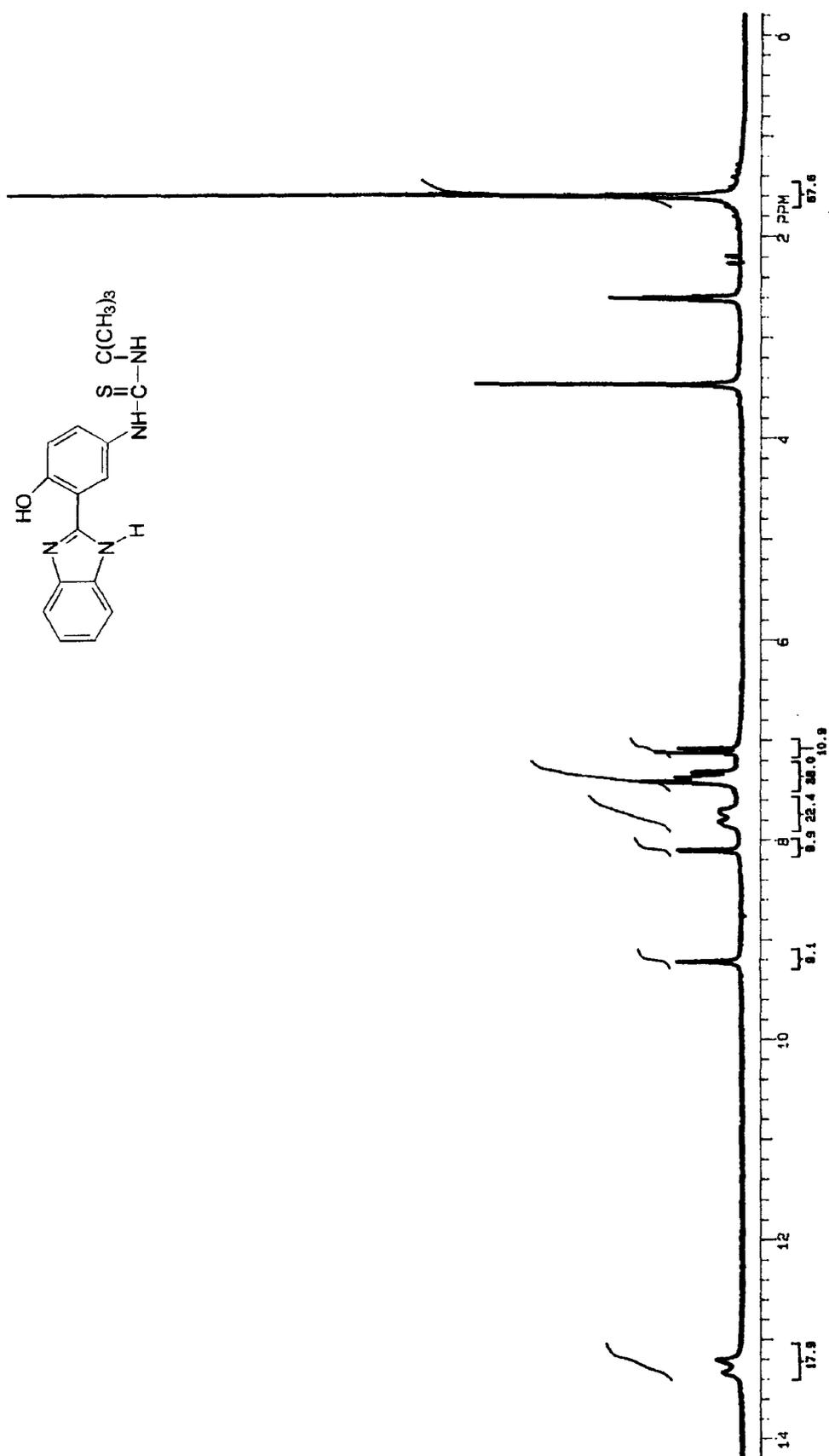
Espectro 15: espectro de RMN ^1H do composto 2b.



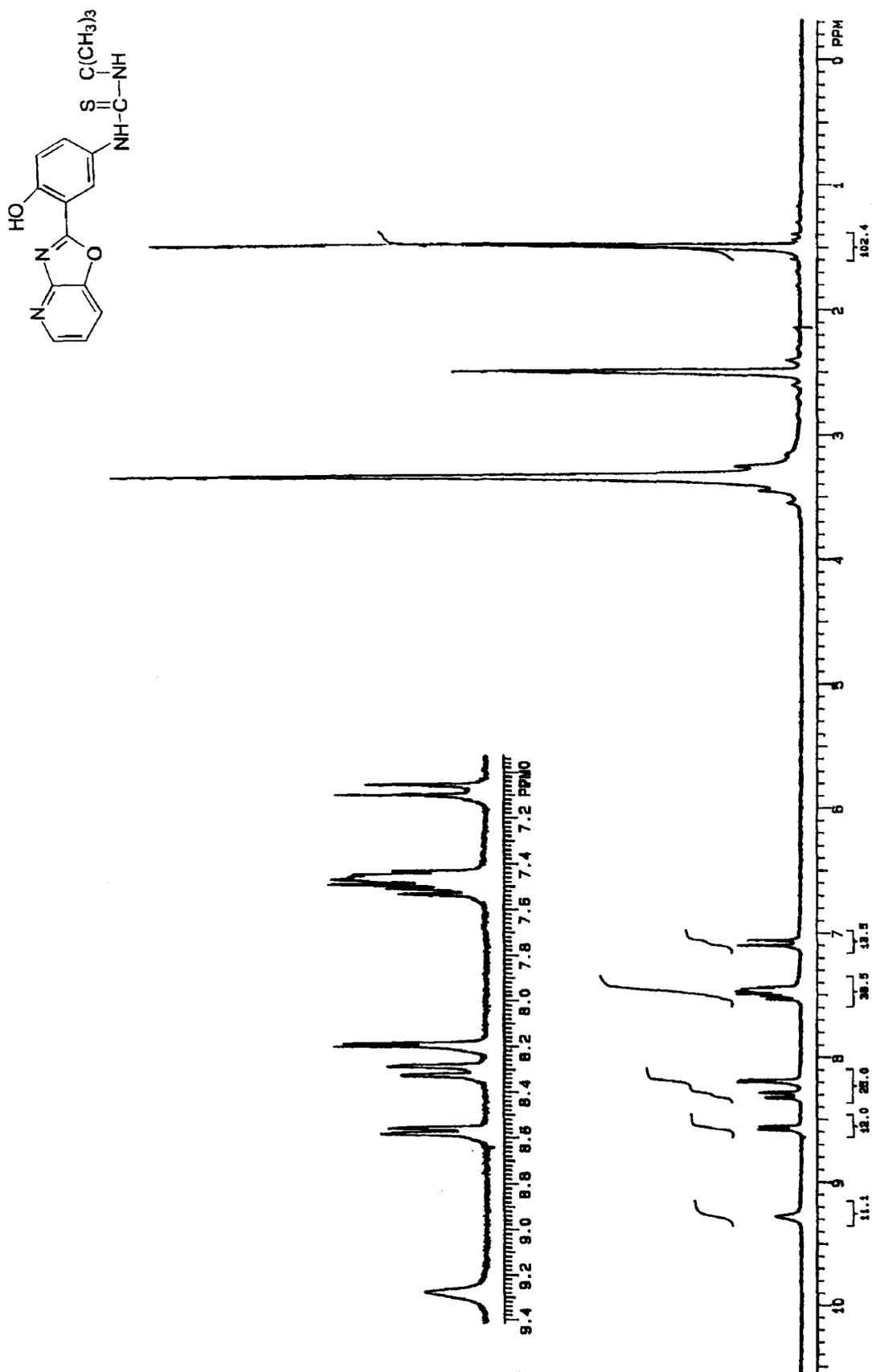
Espectro 16: espectro de RMN ¹H do composto 2c.



Espectro 17: espectro de RMN ^1H do composto 3a.



Espectro 18: espectro de RMN ¹H do composto 3b.



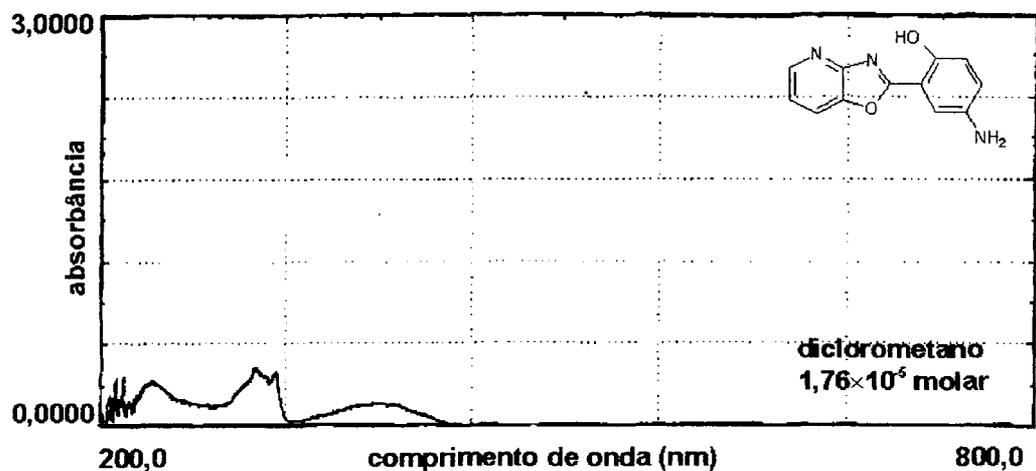
Espectro 19: espectro de RMN ¹H do composto 3c.

9. ESPECTROS DE ABSORÇÃO NO ULTRAVIOLETA E VISÍVEL

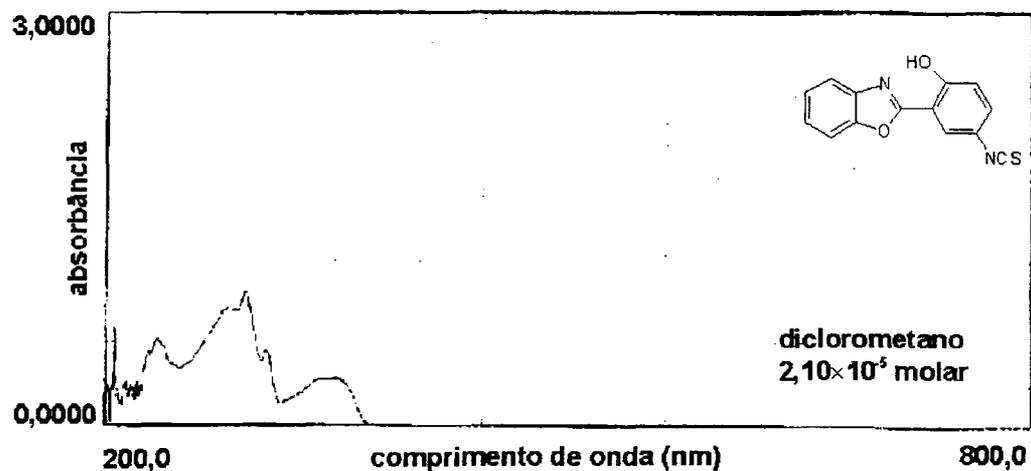
Os espectros de absorção 21-27 foram obtidos em um espectrofotômetro BECKMAN DU-600.

Os espectros 28-29 foram obtidos em um espectrofotômetro Varian Cary 3E.

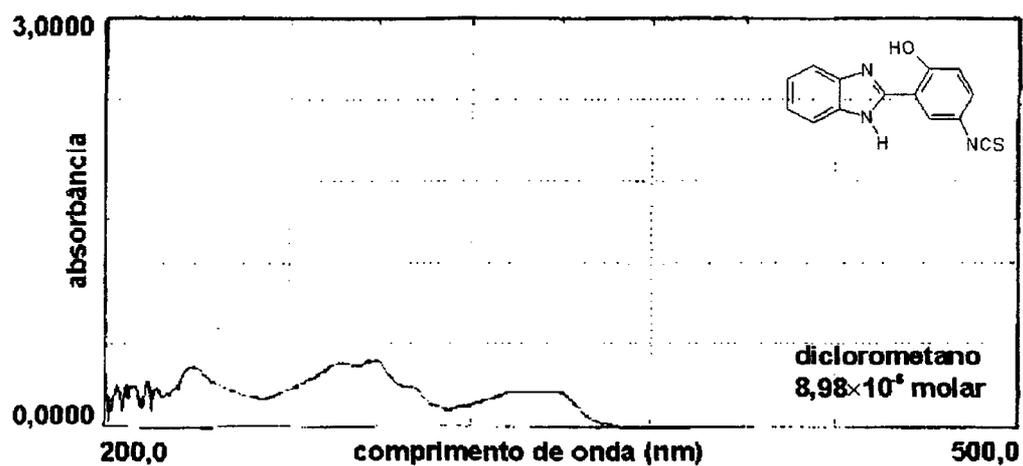
Os solventes utilizados e as concentrações estão indicados para cada espectro.



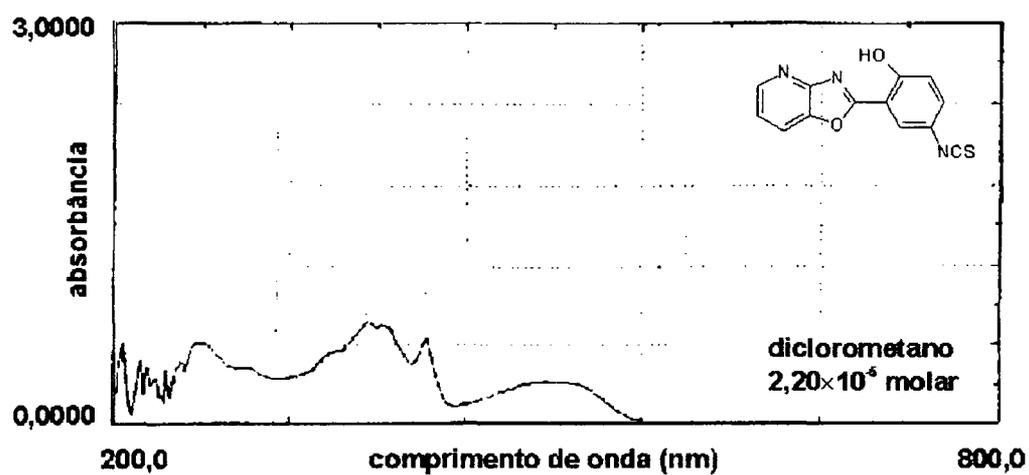
Espectro 21: espectro de absorção no ultravioleta-visível do composto 1c.



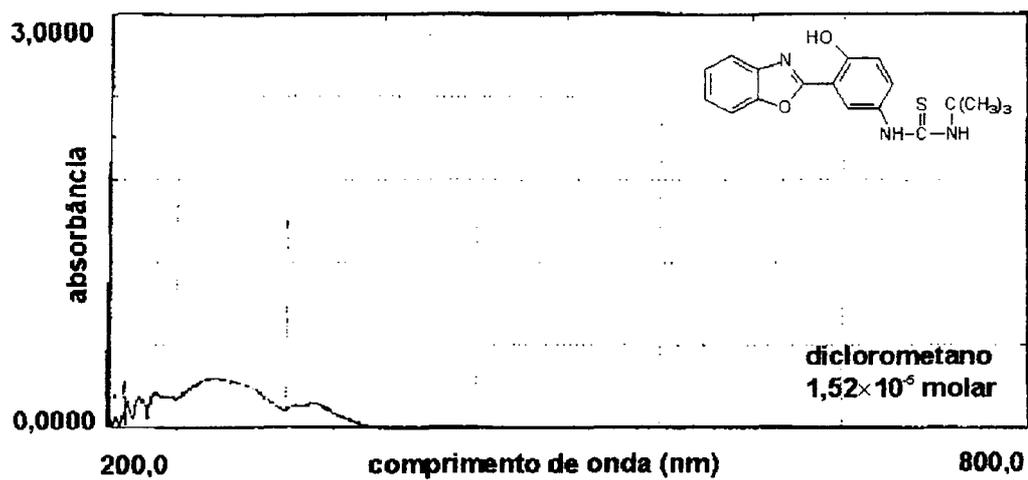
Espectro 22: espectro de absorção no ultravioleta-visível do composto 2a.



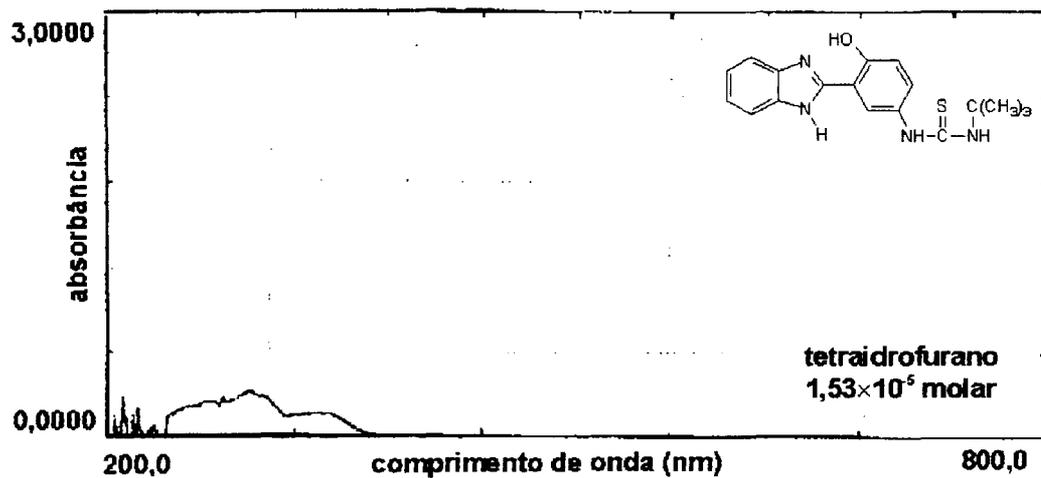
Espectro 23: espectro de absorção no ultravioleta-visível do composto 2b.



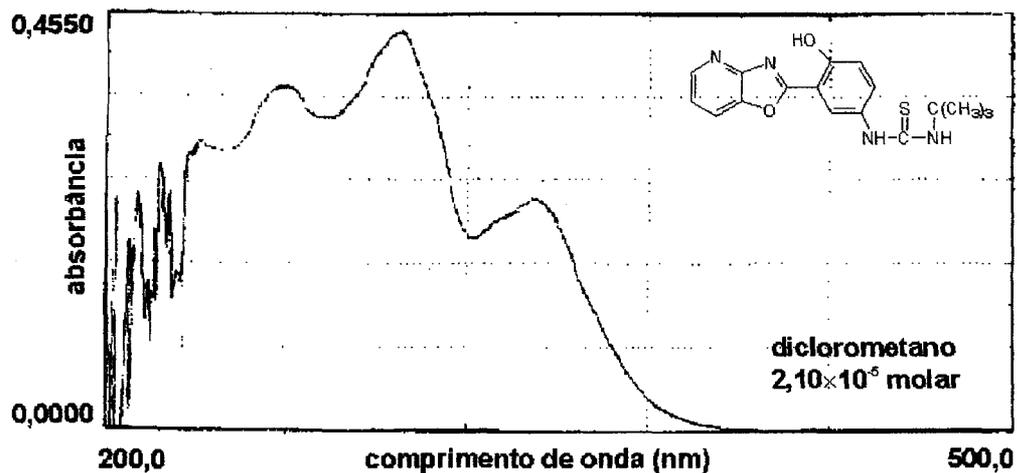
Espectro 24: espectro de absorção no ultravioleta-visível do composto 2c.



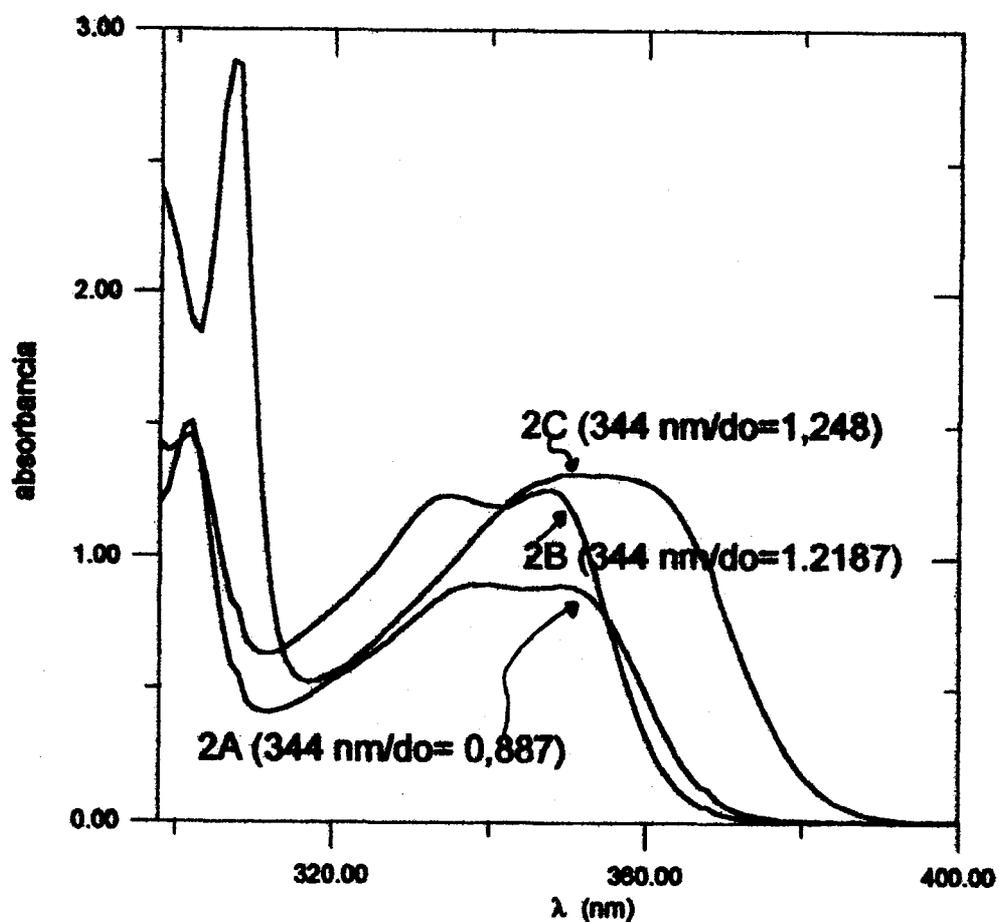
Espectro 25: espectro de absorção no ultravioleta-visível do composto 3a.



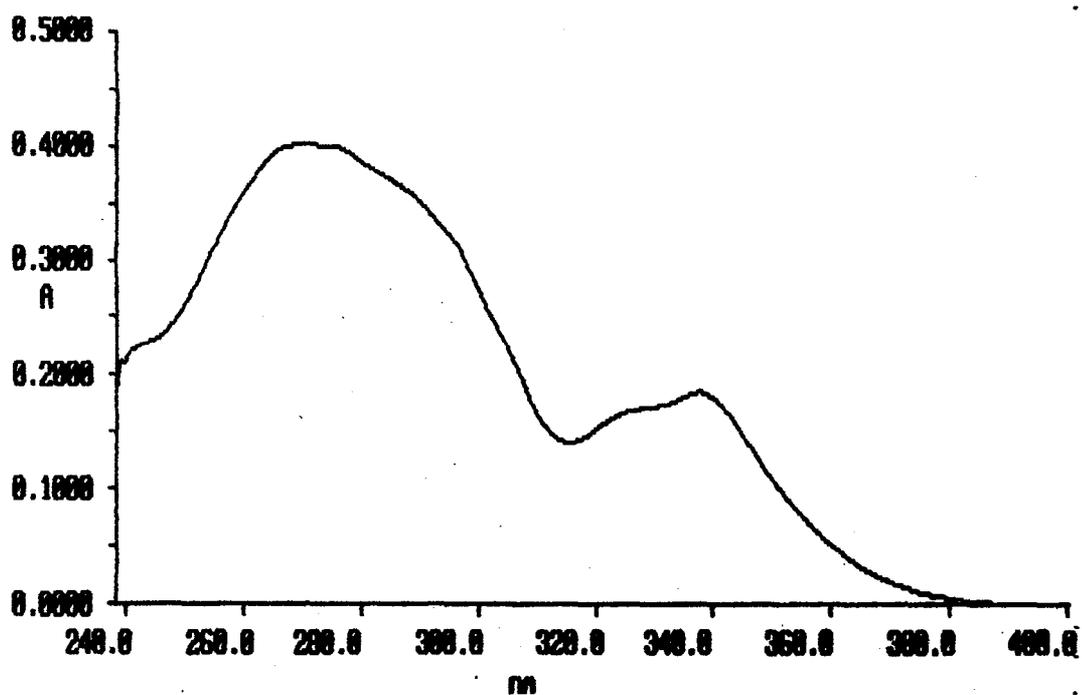
Espectro 26: espectro de absorção no ultravioleta-visível do composto 3b.



Espectro 27: espectro de absorção no ultravioleta-visível do composto 3c.



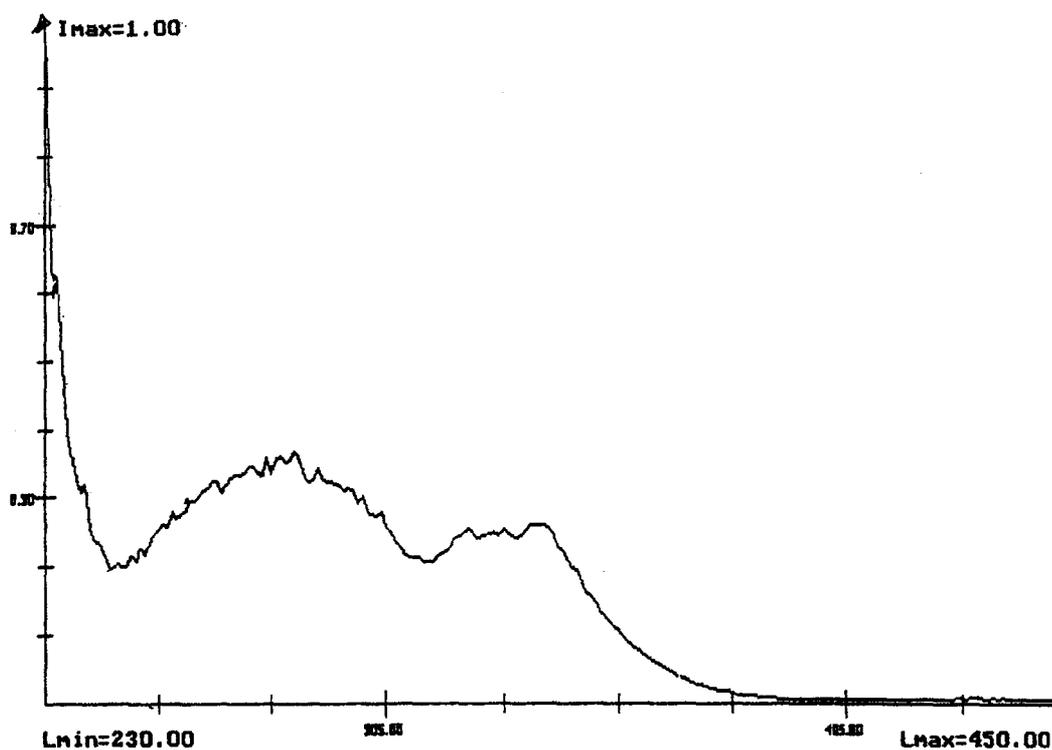
Espectro 28: espectros de absorção no ultravioleta-visível para os compostos 2a-c. O solvente é diclorometano. As absorbâncias no comprimento de onda de 344 nm estão indicadas na figura.



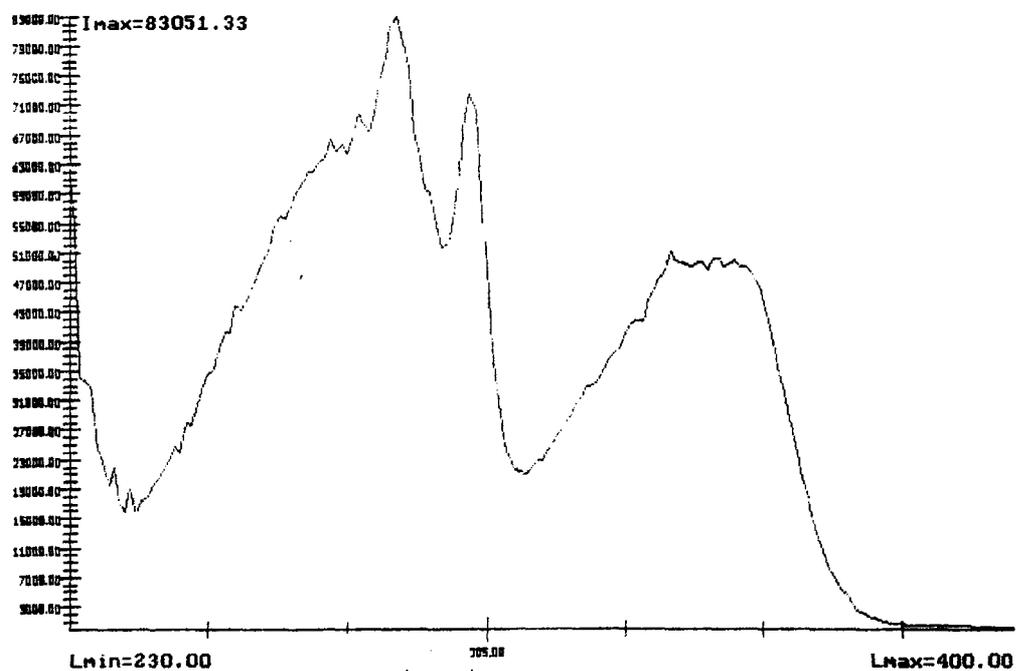
Espectro 29: espectro de absorção no ultravioleta-visível para o composto 4a. O solvente utilizado foi clorofórmio e a concentração $1,22 \times 10^{-5}$ molar.

10. ESPECTROS DE EXCITAÇÃO

Os espectros de excitação foram obtidos em um espectrofluorímetro digital SLM 8000 D.



Espectro 30: espectro de excitação do composto 4a. O solvente é clorofórmio. O comprimento de onda de leitura é 532 nm.

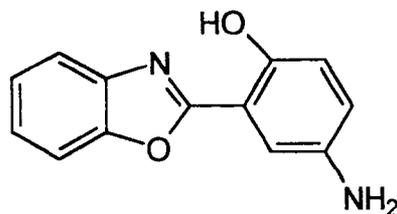
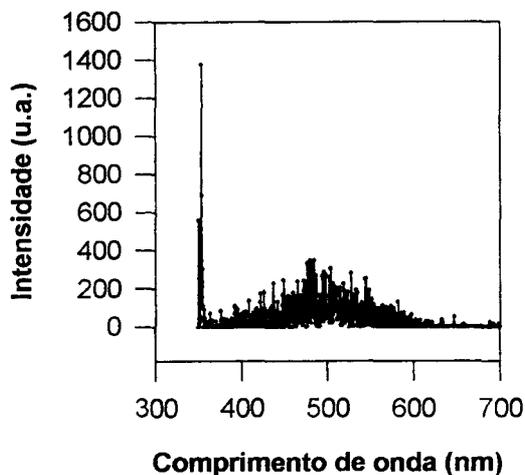


Espectro 31: espectro de excitação do composto 2a. O solvente foi diclorometano. O comprimento de onda de leitura foi 498 nm.

11. ESPECTROS DE EMISSÃO

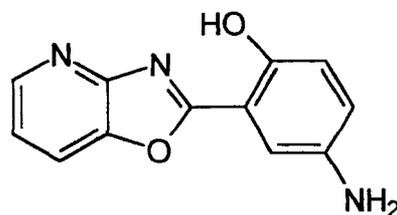
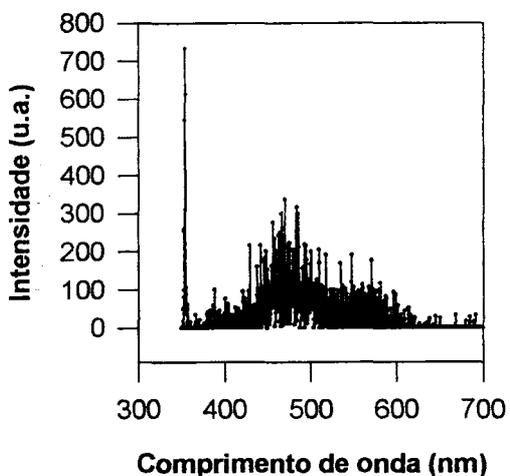
Os espectros 32-39 foram obtidos pela excitação das soluções pelo terceira harmônica do laser de Nd-YAG, comprimento de onda de 354,7 nm, utilizando-se aparelho descrito na seção 3.8. As unidades de intensidade são arbitrárias.

Os espectros 40-44 foram obtidos em um espectrofluorímetro SLM 8000 D. As unidades de intensidade são arbitrárias.



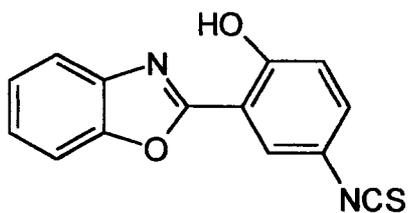
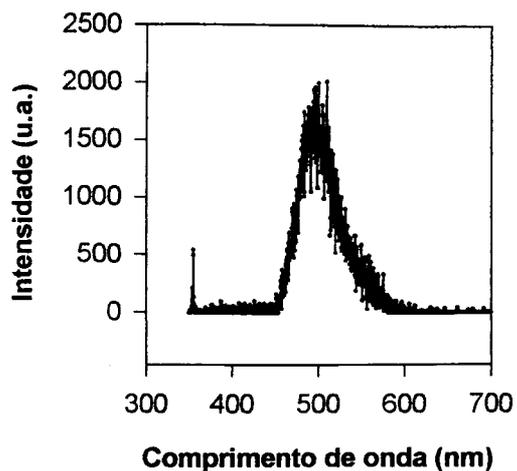
Solvente: diclorometano
Concentração: $1,02 \times 10^{-4}$ molar

Espectro 32: espectro de emissão do composto 1a.



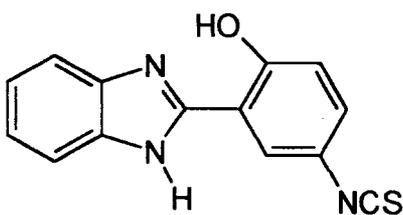
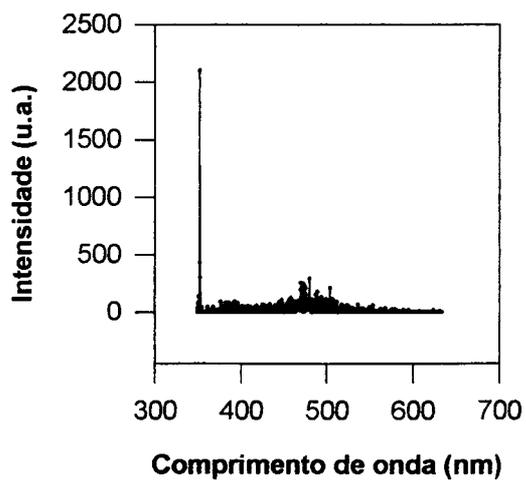
Solvente: diclorometano
Concentração: $1,10 \times 10^{-4}$ molar

Espectro 33: espectro de emissão do composto 1c.



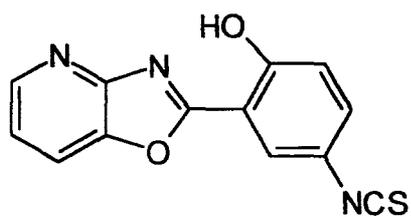
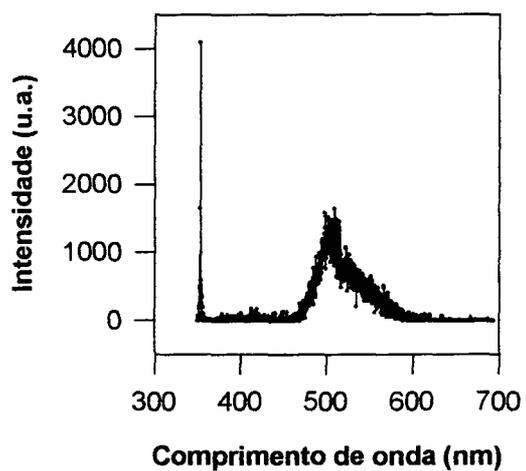
Solvente: diclorometano
 Concentração: $1,01 \times 10^{-4}$ molar

Espectro 34: espectro de emissão do composto 2a.



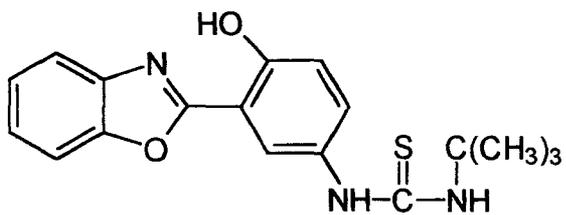
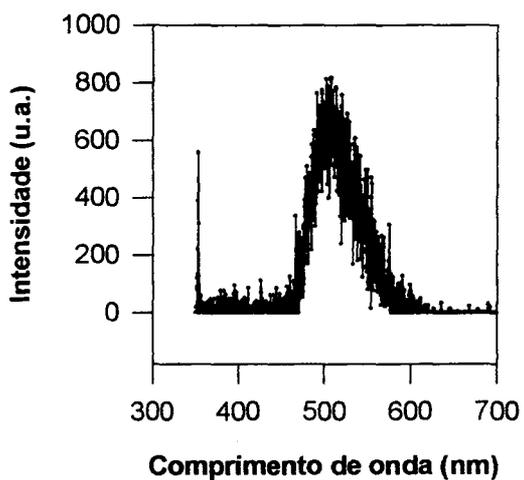
Solvente: tetraidrofurano
 Concentração: $1,02 \times 10^{-4}$ molar

Espectro 35: espectro de emissão do composto 2b.



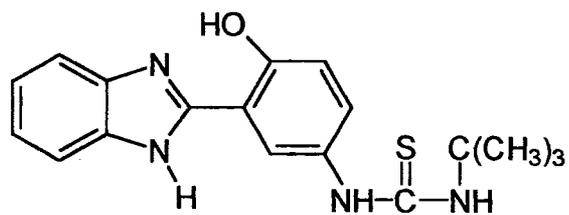
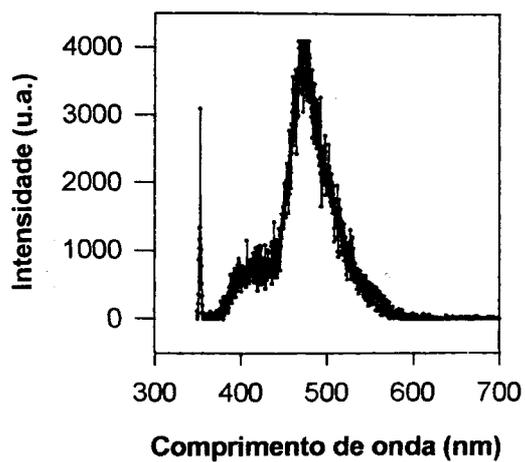
Solvente: diclorometano
 Concentração: $1,01 \times 10^{-4}$ molar

Espectro 36: espectro de emissão do composto 2c.



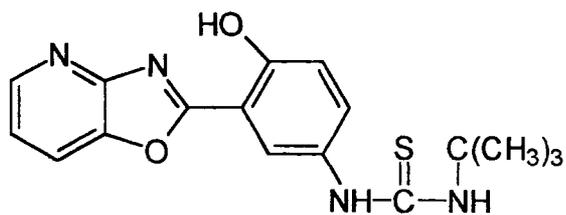
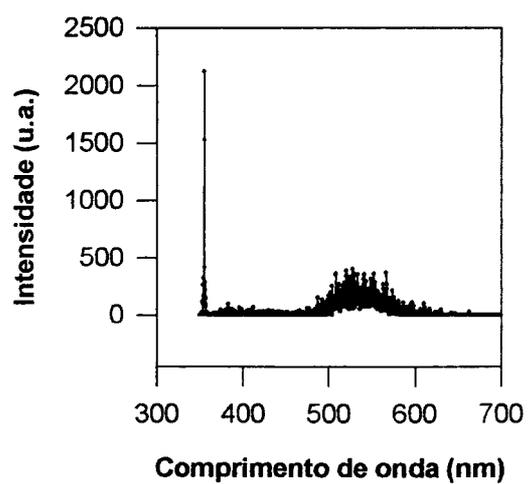
Solvente: diclorometano
 Concentração: $1,01 \times 10^{-4}$ molar

Espectro 37: espectro de emissão do composto 3a.



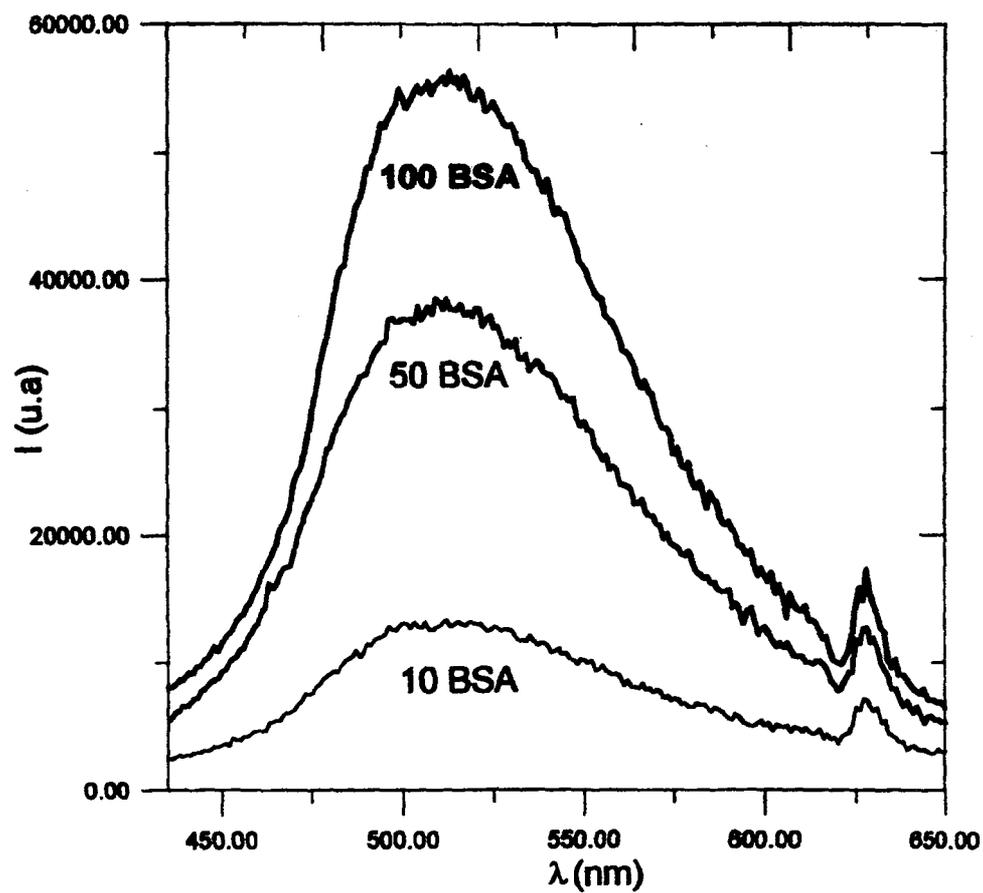
Solvente: tetraidrofurano
 Concentração: $1,03 \times 10^{-4}$ molar

Espectro 38: espectro de emissão do composto 3b.

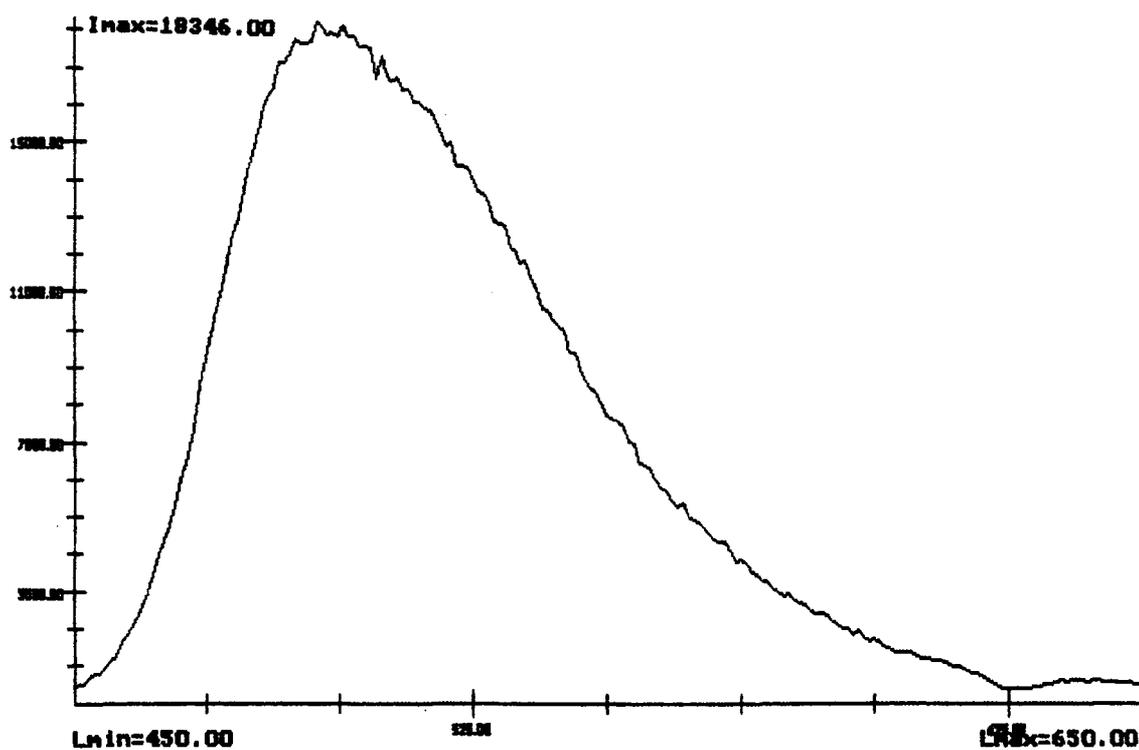


Solvente: diclorometano
 Concentração: $9,93 \times 10^{-5}$ molar

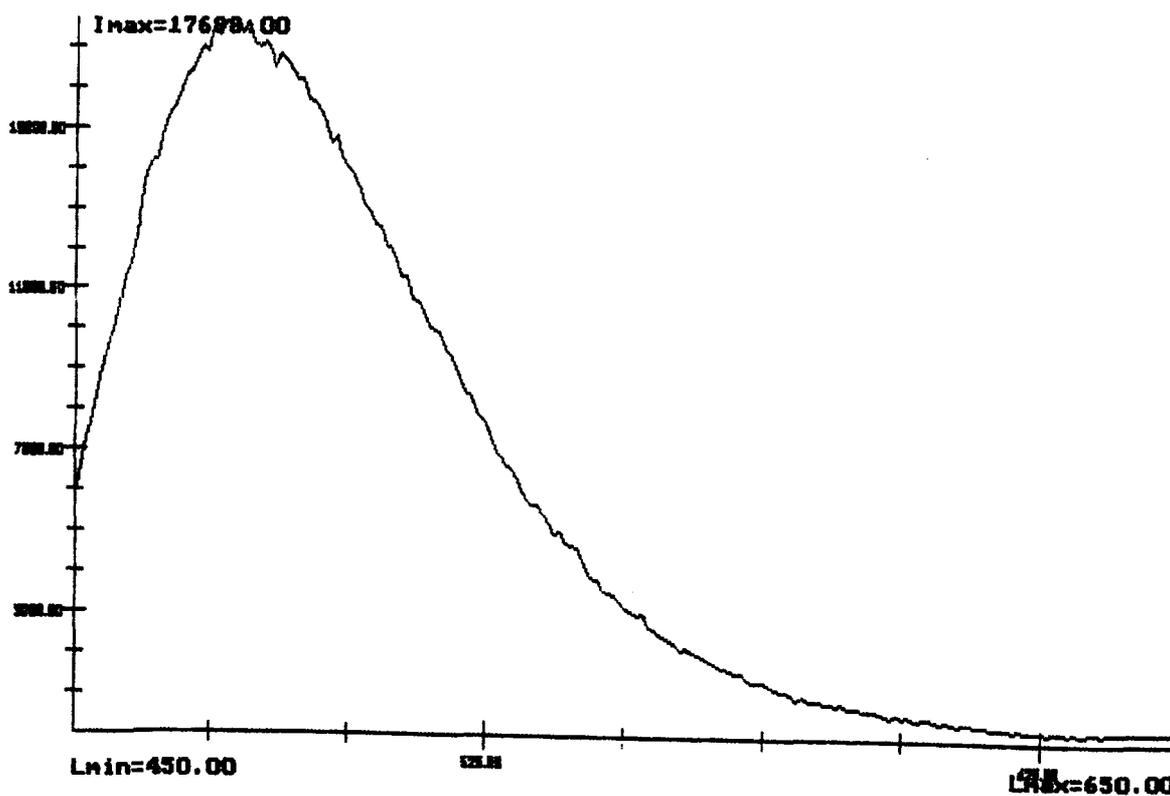
Espectro 39: espectro de emissão do composto 3c.



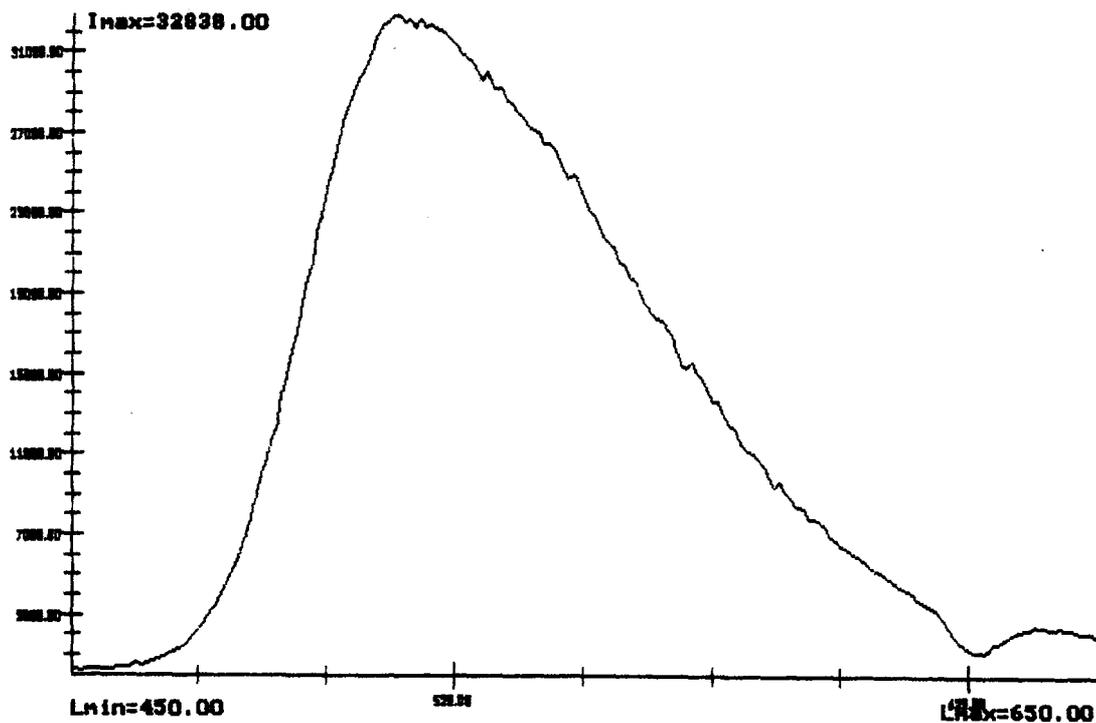
Espectro 40: espectro de emissão de albumina sérica bovina marcada com três concentrações diferentes do composto 2a por mg de proteína: 10 $\mu\text{g}/\text{mg}$, 50 $\mu\text{g}/\text{mg}$ e 100 $\mu\text{g}/\text{mg}$.



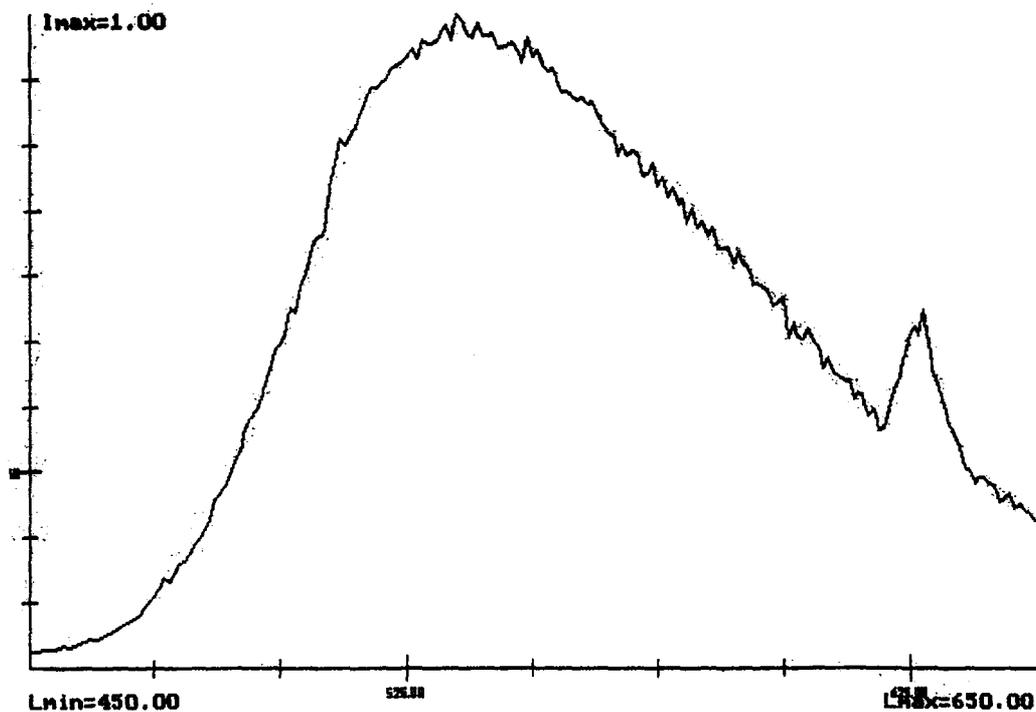
Espectro 41: espectro de emissão do composto 2a. O solvente é clorofórmio, o comprimento de onda de excitação é 344 nm e o comprimento de onda do máximo de emissão é 496 nm.



Espectro 42: espectro de emissão do composto 2b. O solvente é clorofórmio, o comprimento de onda de excitação é 344 nm e o comprimento de onda do máximo de emissão é 477 nm.



Espectro 43: espectro de emissão do composto 2c. O solvente é clorofórmio, o comprimento de onda de excitação é 344 nm e o comprimento de onda do máximo de emissão é 512 nm.



Espectro 44: espectro de emissão do composto 4a. O solvente é clorofórmio, o comprimento de onda de excitação é 337 nm e o comprimento de onda do máximo de emissão é 532 nm.