



**UnB**

**Universidade de Brasília  
Instituto de Química  
Programa de Pós-Graduação em Química**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO FOTOFÍSICO  
DE POTENCIAIS SENSORES FLUORESCENTES DERIVADOS DE CUMARINA**

FELIPE MARQUES NOGUEIRA

ORIENTADOR: PROF. DR. WENDER ALVES DA SILVA

Brasília, DF  
2019



**UnB**

**Universidade de Brasília  
Instituto de Química  
Programa de Pós-Graduação em Química**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO FOTOFÍSICO  
DE POTENCIAIS SENSORES FLUORESCENTES DERIVADOS DE CUMARINA**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Química.

FELIPE MARQUES NOGUEIRA

ORIENTADOR: PROF. DR. WENDER ALVES DA SILVA

Área de concentração: Química Orgânica

Brasília, DF  
Fevereiro de 2019

## **FOLHA DE APROVAÇÃO**

Comunicamos a aprovação da Defesa de Dissertação do (a) aluno (a) **Felipe Marques Nogueira**, matrícula nº **17/0093778**, intitulada “*Síntese, caracterização e estudo fotofísico de potenciais sensores fluorescentes derivados de cumarina*”, apresentada no (a) Auditório Azul do Instituto de Química (IQ) da Universidade de Brasília (UnB) em 21 de fevereiro de 2019.

Prof. Dr. Wender Alves da Silva

Presidente de Banca (IQ/UnB)

Prof. Dr. Angelo Henrique de Lira Machado

Membro Titular (IQ/UnB)

Prof.<sup>a</sup> Dra. Maria Márcia Murta

Membro Titular (IQ/UnB)

Prof. Dr. Mauro Vicentini Correia

Membro Suplente (IQ/UnB)

Em 21 de fevereiro de 2019.

*Sucesso é ter consciência  
que sucesso é caminhada  
e que no fim a chegada  
é só uma consequência.  
O sucesso é paciência  
pois toda vez que tropeço  
me levanto e recomeço  
com o dobro da vontade.  
Quem não tem felicidade  
não sabe o que é sucesso.*

Bráulio Bessa

## Agradecimentos

A Deus por me garantir saúde física e emocional durante a execução deste projeto de mestrado.

Aos meus pais, Francisca e Robiston, pelo incentivo, apoio e paciência nestes últimos anos e, principalmente, por terem batalhado desde cedo para que eu recebesse a melhor base educacional possível e por fazerem de tudo para que minha trajetória de vida adulta e profissional seja mais amena que a que tiveram.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Wender Alves da Silva, por ter me acolhido, acreditado no meu potencial, me guiado no meio científico de maneira inspiradora e leve e por me mostrar que, nas várias esferas da vida, #everydayporrada nos torna mais fortes.

Aos atuais e precedentes companheiros de laboratório e membros da União da Orgânica: Thaíssa, Fernanda, Michele, Julia, Gisele, Veronica, Kadu, Saulo, Lennine, Paula, Najla, João, Angélica, George, Thiago, Robson, Diana, José, Terezinha, Luana, Gabi e André, que em meio de reações, plaquinhas, colunas, destilações, secagem de solvente, falta de solvente, crise das geladeiras quebradas e muito café contribuíram com minha formação de químico orgânico e tornaram minha jornada do mestrado muito divertida e prazerosa.

Aos meus amigos de quando nem conhecíamos a Química, Karine, Rebecca, Pedro, Neves e Toru e aos meus amigos Hebetinhos, Adilson, Amanda, Ana, Crô, Hellen, José, Lari, Lary, Lorena, Nati, PP, Vanessa, Vitória por colaborarem com o balanceamento entre a vida acadêmica e a vida pessoal.

Aos técnicos da CAIQ, Lennine, Alan, Luiz e Cleber pelas análises realizadas e pela ótima companhia no tempo em que passei nas análises de UV-Vis e espectrofluorimetria. A Angélica, Saulo, Fernanda e Julia pela contribuição nas análises de RMN.

Aos professores do Instituto de Química pelo conhecimento que me foi concedido durante minha graduação e pós-graduação, especialmente ao Prof. Dr. Peter Bakuzis, Prof. Dr. Guilherme Dotto Brand e à Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Aline Lima de Oliveira Paterno que tiveram grande participação neste período de pós-graduação. Aos membros da minha banca examinadora Prof. Dr. Angelo Henrique de Lira Machado, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Marcia Murta e Prof. Dr. Mauro Vicentini Correia por aceitarem o convite de participar na contribuição deste trabalho científico, assim como da minha vida profissional.

O presente trabalho foi realizado com apoio do CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil e com apoio parcial da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível de Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, através do Edital DPG/UnB N° 04/2018 – Auxílio Financeiro a Discentes de Pós-Graduação para o Desenvolvimento de Dissertações e de Teses.

# Sumário

1.	Introdução .....	1
1.1.	Luminescência e suas propriedades básicas .....	3
1.2.	Cumarina .....	5
1.2.1.	Métodos de preparação de derivados de cumarinas .....	8
1.3.	Sensores moleculares fluorescentes .....	11
2.	Objetivos .....	23
2.1.	Objetivos gerais .....	23
2.2.	Objetivos específicos .....	23
3.	Resultados e discussões .....	24
3.1.	Síntese dos derivados de cumarina .....	24
3.2.	Síntese dos derivados biscumarínicos .....	32
3.2.1.	Síntese dos derivados amídicos .....	32
3.2.2.	Síntese dos derivados imínicos .....	44
3.3.	Estudo fotofísico .....	48
3.4.	Avaliação de seletividade .....	54
4.	Conclusões e perspectivas .....	59
5.	Referências bibliográficas .....	60
6.	Materiais e métodos .....	62
7.	Parte experimental .....	64
8.	Anexos .....	69

## Índice de Esquemas

Esquema 1. Esquematização geral deste projeto.....	2
Esquema 2. Via biossintética da cumarina. ....	6
Esquema 3. Rota sintética do carbonotioato de O-(4-metil-2-oxo-2H-cromen-7-ila) O-fenila.....	7
Esquema 4. Transformação de composto fluorescente desativando e reativando sua fluorescência... 8	
Esquema 5. Esquema geral da reação de Pechmann. ....	8
Esquema 6. Proposta mecanística para reação de Pechmann por Stirling e Daru.....	9
Esquema 7. Rota sintética dos derivados de cumarina-oxazol-5-onas.....	9
Esquema 8. Proposta mecanística para a condensação de Knoevenagel. ....	10
Esquema 9. Síntese de ácidos cumarina-3-carboxílicos.....	11
Esquema 10. Síntese de sensor derivado de cumarina seletivo a Fe <sup>2+</sup> . ....	11
Esquema 11. Rota sintética da 7-(dietilamino)-2-oxo-N-(piridin-2-ilmetil)-2H-cromeno-3-carboxamida. 12	
Esquema 12. Síntese da 7-hidroxi-N-((piridin-2-il)metil)-2H-cromen-2-ona-3-carboxiamida. ....	15
Esquema 13. Síntese do 3,3'-(1E,1'E)-(etano-1,2-diilbis(azanililideno))bis(metanililideno))bis(7-(dietilamino)-2H-cromen-2-ona. ....	16
Esquema 14. Síntese da (E)-7-(dietilamino)-3-(1-(2-(piridin-2-il)hidrazono)etil)-2H-cromen-2-ona ( <b>54</b> ) e da (E)-7-(dietilamino)-3-((2-(piridin-2-il)hidrazono)metil)-2H-cromen-2-ona ( <b>55</b> ). ....	17
Esquema 15. Síntese do sensor para Ag <sup>+</sup> <b>58</b> . ....	19
Esquema 16. Síntese da 7-(dietilamino)-3-(pirimidin-4-il)-2H-cromen-2-ona. ....	20
Esquema 17. Síntese do sensor para Zn <sup>2+</sup> <b>62</b> . ....	21
Esquema 18. Síntese do ácido de Meldrum. ....	24
Esquema 19. Síntese do derivado <b>Cum1</b> . ....	24
Esquema 20. Proposta mecanística para formação de <b>Cum1</b> . ....	25
Esquema 21. Síntese do composto <b>Cum2</b> . ....	30
Esquema 22. Proposta mecanística de formação do composto <b>Cum2</b> . ....	31
Esquema 23. Síntese do derivado <b>Cum3</b> . ....	32
Esquema 24. Síntese de biscumarinas com o auxílio de pyBOP. ....	32
Esquema 25. Proposta mecanística para acoplamento via pyBOP. ....	33
Esquema 26. Síntese de <b>Cam1</b> via DIC/DMAP. ....	37
Esquema 27. Rota sintética de <b>Cam3</b> via cloreto de ácido formado por cloreto de oxalila.....	40
Esquema 28. Segunda rota sintética de <b>Cam3</b> via cloreto de ácido formado por cloreto de oxalila. ..	40
Esquema 29. Rota sintética de <b>Cam3</b> via cloreto de ácido formado por cloreto de tionila. ....	41
Esquema 30. Sensor de Kim e colaboradores e seu análogo. ....	43
Esquema 31. Rota sintética de <b>mCam1</b> . ....	44
Esquema 32. Rota sintética teste de <b>Cim3</b> . ....	44

## Índice de Figuras

Figura 1. Esquema simplificado de um quimiossensor, adaptado de Valeur. ....	1
Figura 2. Diagrama de Jablonski, adaptado de Lakowicz. ....	3
Figura 3. Exemplos de moléculas fluorescentes.....	4
Figura 4. Estrutura básica de cumarina. ....	5
Figura 5. Exemplos de cumarinas e suas ações terapêuticas.....	6
Figura 6. Espectros de a) absorção de <b>48</b> (20 $\mu\text{M}$ ) e b) emissão de <b>48</b> (5 $\mu\text{M}$ ) com adição de sais de cloreto de $\text{Ag}^+$ , $\text{Ba}^{2+}$ , $\text{Cd}^{2+}$ , $\text{Co}^{2+}$ , $\text{Cs}^+$ , $\text{Cu}^{2+}$ , $\text{Fe}^{2+}$ , $\text{Hg}^{2+}$ , $\text{Li}^+$ , $\text{Mn}^{2+}$ , $\text{Ni}^{2+}$ , $\text{Pb}^{2+}$ , $\text{Rb}^+$ , $\text{Sr}^{2+}$ , $\text{Zn}^{2+}$ e ( $\text{Cu}^{2+}$ + outros íons) (500 $\mu\text{M}$ ) e de $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{K}^+$ , $\text{Mg}^{2+}$ e $\text{Na}^+$ (5 mM) em solução aquosa (HEPES:DMSO) com excitação em 430 nm. ....	13
Figura 7. a) Variação na intensidade de fluorescência em 479 nm de <b>48</b> (5 $\mu\text{M}$ ) com e sem $\text{Cu}^{2+}$ (10 eq.) em função do pH. b) Gráfico de Job de <b>48</b> e $\text{Cu}^{2+}$ .....	13
Figura 8. Espectros de emissão de <b>48</b> (5 $\mu\text{M}$ ) com adição de $\text{CuCl}_2$ (0 – 50 $\mu\text{M}$ ) com excitação em 430 nm.....	14
Figura 9. Imagens de microscopia de fluorescência confocal de $\text{Cu}^{2+}$ em células LLC-MK2. a) Imagem de campo claro. b) Imagem de fluorescência de LLC-MK2 incubadas com <b>48</b> (5 $\mu\text{M}$ ). Em seguida incubada com adição de várias concentrações de $\text{CuCl}_2$ c) 5, d) 10 e e) 20 eq. f) Sensor livre com adição de EDTA (500 $\mu\text{M}$ ).....	15
Figura 10. Intensidades de emissão relativas em 447 nm de <b>50</b> com íons metálicos, sob excitação em 385 nm, adaptado de Kharkar e Warrior. ....	15
Figura 11. Variação na intensidade de fluorescência em 498 nm com e sem $\text{Cr}^{3+}$ em função do pH. ....	17
Figura 12. Espectro de emissão a) <b>54</b> (10 $\mu\text{M}$ ) e b) <b>55</b> (10 $\mu\text{M}$ ) ambos sob adição de íons metálicos 3 eq.....	18
Figura 13. Intensidade de fluorescência relativa de <b>54</b> (10 $\mu\text{M}$ ) para $\text{Zn}^{2+}$ na ausência (primeira barra) e presença (segunda barra) de vários íons competidores (30 $\mu\text{M}$ ), sob excitação em 432 nm.....	18
Figura 14. b) Variação de intensidade de fluorescência de <b>58</b> e <b>58</b> + $\text{Ag}^+$ em 600 s.....	20
Figura 15. Espectros de a) absorção e b) emissão (excitação de 445 nm) de <b>59</b> na presença de 10 eq. de diferentes íons metálicos ( $\text{Cd}^{2+}$ , $\text{Co}^{2+}$ , $\text{Cu}^{2+}$ , $\text{Cr}^{3+}$ , $\text{Fe}^{2+}$ , $\text{Fe}^{3+}$ , $\text{Hg}^{2+}$ , $\text{Mn}^{2+}$ , $\text{Ni}^{2+}$ , $\text{Pb}^{2+}$ e $\text{Zn}^{2+}$ ), adaptado de Goswani e colaboradores.....	21
Figura 16. Respostas de UV-vis e fluorescência em titulação de <b>62</b> com $\text{Zn}^{2+}$ (0 -1 eq.), sob excitação em 410 nm.....	22
Figura 17. Espectro de RMN $^1\text{H}$ 300 MHz (em $\text{CDCl}_3$ ) do composto <b>Cum1</b> . ....	26
Figura 18. Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ 75,46 MHz (em $\text{CDCl}_3$ ) do composto <b>Cum1</b> . ....	27
Figura 19. Espectro de RMN-HSQC corrigido 600 MHz (em $\text{CDCl}_3$ ) do composto <b>Cum1</b> . ....	28
Figura 20. Espectro de RMN-HMBC corrigido 600 MHz (em $\text{CDCl}_3$ ) do composto <b>Cum1</b> . ....	29
Figura 21. Espectro de RMN $^1\text{H}$ 600MHz (em $\text{CDCl}_3$ ) do composto <b>Cam1</b> com sinais de resíduos de pyBOP. ....	34

Figura 22. Espectro de RMN <sup>1</sup> H 600MHz (em CDCl <sub>3</sub> ) do composto <b>Cam1</b> .	35
Figura 23. Espectro de RMN <sup>1</sup> H 600MHz (em CDCl <sub>3</sub> ) do composto <b>Cam1</b> obtido via acoplamento por DIC/DMAP (em azul, espectro do sólido precipitado e em vermelho espectro do sólido obtido da solução reacional).	38
Figura 24. Sinais referente a impurezas prováveis do pyBOP nos espectros de RMN <sup>1</sup> H de <b>Cam1</b> e <b>Cam2</b> .	39
Figura 25. Espectro de massas de <b>Cam1</b> .	39
Figura 26. Espectro de massas da dietilenotriamina recém destilada.	42
Figura 27. Espectros de a) <b>Cum3</b> e b) <b>Cim1</b> -simplificado com resquício de <b>Cum3</b> .	46
Figura 28. Solvatograma de <b>Cam1</b> .	49
Figura 29. Solvatograma de <b>Cam2</b> .	50
Figura 30. Solvatograma de <b>mCam1</b> .	51
Figura 31. Curvas de Lippert-Mataga de a) <b>Cam1</b> , b) <b>Cam2</b> e c) <b>mCam1</b> .	52
Figura 32. Variação na intensidade de fluorescência em função do pH de a) <b>Cam1</b> e b) <b>mCam1</b> .	53
Figura 33. Curvas de a) absorção e b) emissão de <b>Cam1</b> com 1 eq. de íons metálicos em CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , excitação em 421 nm.	54
Figura 34. Curvas de a) absorção e b) emissão de <b>Cam1</b> com 1 eq. de íons metálicos em EtOH, excitação em 424 nm.	55
Figura 35. Curvas de a) absorção e b) emissão de <b>Cam2</b> com 1 eq. de íons metálicos em EtOH, excitação em 421 nm.	55
Figura 36. Curvas de a) absorção e b) emissão de <b>Cam1</b> com 1 eq. de íons metálicos em água deionizada, excitação em 422 nm. c) Intensidades de fluorescência relativas de <b>Cam1</b> com 1 eq. de íons metálicos em 473 nm. d) Intensidade de fluorescência em replicata para <b>Cam1</b> e <b>Cam1</b> +Cu <sup>2+</sup> .	56
Figura 37. a) Curvas de emissão de <b>Cam1</b> com 10 eq. de íons metálicos em água deionizada, excitação em 422 nm. b) Intensidades de fluorescência relativas de <b>Cam1</b> com 10 eq. de íons metálicos em 473 nm.	57
Figura 38. a) Curvas de emissão de <b>Cam2</b> com 1 eq. de íons metálicos em água deionizada, excitação em 409 nm. b) Intensidades de fluorescência relativas de <b>Cam2</b> com 1 eq. de íons metálicos em 488 nm.	57
Figura 39. a) Curvas de emissão de <b>mCam1</b> com 1 eq. de íons metálicos em água deionizada, excitação em 430 nm. b) Intensidades de fluorescência relativas de <b>mCam1</b> com 1 eq. de íons metálicos em 479 nm.	58

## Índice de Tabelas

Tabela 1. Constantes de ligação de <b>54</b> e <b>55</b> . <sup>27</sup> .....	18
Tabela 2. Atribuição dos sinais do espectro de RMN <sup>1</sup> H aos H's correspondentes de <b>Cum1</b> . .....	26
Tabela 3. Correlações heteronucleares <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C observadas no espectro de RMN-HSQC. ....	28
Tabela 4. Correlações heteronucleares <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C observadas no espectro de RMN-HMBC. ....	29
Tabela 5. Avaliação metodológica na síntese de <b>Cum2</b> . .....	30
Tabela 6. Estudo metodológico para finalização da síntese de <b>Cam1</b> . .....	36
Tabela 7. Metodologia aplicada e rendimentos obtidos. ....	36
Tabela 8. Testes metodológicos para síntese de <b>Cam1</b> via cloreto de ácido. ....	42
Tabela 9. Condições experimentais testadas para síntese de <b>Cim3</b> . ....	45
Tabela 10. Novas condições experimentais testadas para síntese de <b>Cim3</b> -simplificado. ....	46
Tabela 11. Estudo metodológico da síntese de <b>Cim1</b> -simplificado. ....	47
Tabela 12. Estudo metodológico da síntese de <b>Cim1</b> . ....	48
Tabela 13. Parâmetros de polaridade de Reichardt. ....	48
Tabela 14. Dados de absorção e emissão do solvatograma de <b>Cam1</b> . ....	49
Tabela 15. Dados de absorção e emissão do solvatograma de <b>Cam2</b> . ....	50
Tabela 16. Dados de absorção e emissão do solvatograma de <b>mCam1</b> . ....	51
Tabela 17. Correlações lineares dos compostos. ....	52
Tabela 18. Rendimentos qunânticos obtidos para os compostos. ....	53

## Lista de Abreviaturas e Acrônimos

<b>APA</b>	Agência de Proteção Ambiental
<b>CCD</b>	Cromatografia de camada delgada
<b><math>\text{CDCl}_3</math></b>	Clorofórmio- <i>d</i>
<b>DCC</b>	Diciclohexilcarbodiimida
<b>DETA</b>	Dietilenotriamina
<b>DIC</b>	Diisopropilcarbodiimida
<b>DIEA</b>	Diisopropiletilamina
<b>DMAP</b>	4-dimetilaminopiridina
<b>D-<math>\pi</math>-A</b>	Conjugação doador-sistema $\pi$ -aceptor
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiaminotetracético
<b><math>E_T^N</math></b>	Coeficiente de polaridade de Reichardt
<b>ESI-MS</b>	Espectrometria de massas com ionização por eletrospray
<b>GRE</b>	Grupo retirador de elétrons
<b>HEPES</b>	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfônico
<b>HepG2</b>	Linhagem celular de câncer de fígado humano
<b>HOBt</b>	1-hidroxibenzotriazol
<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde
<b>PyBOP</b>	Hexafluorofosfato benzotriazol-1-il-oxi-tris-(pirrolidino)-fosfônio
<b>RMN <math>^1\text{H}</math></b>	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
<b>RMN <math>^{13}\text{C}</math></b>	Ressonância magnética nuclear de carbono
<b><math>S_0</math></b>	Estado fundamental
<b><math>S_1</math></b>	Primeiro estado excitado singleto
<b><math>S_2</math></b>	Segundo estado excitado singleto
<b><math>T_1</math></b>	Primeiro estado excitado tripleto
<b>TCLM</b>	Transferência de carga ligante-metal
<b>TEF</b>	Transferência de elétrons fotoinduzida
<b>TERF</b>	Transferência de energia de ressonância por fluorescência
<b>TCI</b>	Transferência de carga interna
<b>TMS</b>	Trimetilsilano

## Resumo

Os sensores moleculares fluorescentes, ou quimiosensores fluorescentes, são sistemas moleculares cujas propriedades fotofísicas são modificadas a partir da interação com um analito. Essas ferramentas analíticas apresentam boa seletividade e sensibilidade e dispensam métodos sofisticados. Os quimiosensores são constituídos de uma unidade de reconhecimento e uma unidade responsável pela resposta analítica, o fluoróforo. As cumarinas são compostos heterocíclicos do grupo dos benzopiranos e os seus derivados podem apresentar fluorescência devido a certos grupos substituintes através processo de transferência de carga interna. Neste estudo, os derivados cumarínicos foram utilizados como fluoróforos na construção de potenciais quimiosensores fluorescentes para íons metálicos. Esses potenciais quimiosensores foram baseados na dimerização de núcleos cumarínicos, três deles foram obtidos por acoplamento amídico em bons rendimentos (50 – 71%) e os demais foram tentados por reação de condensação, mas não se obteve sucesso. Os testes de seletividade para íons metálicos foram realizados em água com 19 íons metálicos, mas nenhuma seletividade foi observada.

**Palavras-chave:** quimiosensor fluorescente, sensor de íon metálico, cumarina.

## Abstract

Fluorescent molecular sensors, or fluorescent chemosensors, are molecular systems whose photophysical properties are modified from the interaction with an analyte. These analytical tools presents good selectivity and sensitivity, dispensing sophisticated methods. The chemosensors consist in a unit of recognition and a unit responsible for the analytical response, the fluorophore. Coumarins are heterocyclic compounds of benzopyrans group and their derivatives may display fluorescence due to certain substituent groups by the internal charge transfer process. In this study, coumarin derivatives were used as the fluorophore in construction of potential fluorescent chemosensors for metal ions. These potential chemosensors were based on dimerization of coumarin nuclei, three of them were obtained by amide coupling in good yields (50 – 71 %) and the others were attempt by condensation reaction without success. The selectivity tests for metal ions were carried out in water with 19 metal ions, but no selectivity was observed.

**Keywords:** fluorescent chemosensor, metal ion sensor, coumarin.

## 1. Introdução

Os metais constituem a maior parte dos elementos existentes na Terra, sendo desde componentes de minerais da crosta terrestre a elementos essenciais na manutenção de processos biológicos. Além da manutenção biológica, os íons metálicos estão relacionados ao desenvolvimento de desordens biológicas como câncer, diabetes e doenças neurodegenerativas quando suas concentrações celulares sofrem alterações.<sup>1</sup> Os íons de cobre, Cu(I) e Cu(II), por exemplo, são encontrados no organismo humano em metaloproteínas e enzimas, sendo essenciais nos processos redox, na respiração celular e na absorção de ferro; porém, o desequilíbrio de cobre pode ocasionar doenças neurodegenerativas como doenças de Menkes, Wilson e Alzheimer.<sup>2,3</sup>

Os íons metálicos podem ser detectados por métodos analíticos como espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado, espectroscopia de absorção atômica, ressonância paramagnética eletrônica e análises eletroquímicas.<sup>4</sup> A detecção de íons metálicos por métodos fluorimétricos surgiu com a utilização de derivados fluorescentes na síntese de moléculas capazes de agir como sensores para determinadas espécies metálicas. A utilização de quimiossensores ganhou destaque por apresentarem algumas vantagens em relação aos métodos analíticos tradicionais em termos de sensibilidade, seletividade e boa resolução espacial e temporal, viabilizando a determinação da acumulação, tráfico e função ou toxicidade de determinados analitos em tempo real e em sistemas vivos.<sup>1,4</sup>

O desenvolvimento de sensores fluorescentes é baseado em duas unidades, das quais a unidade fluorogênica é responsável pela resposta analítica do sensor, tendo como exemplos mais comuns a fluoresceína, a rodamina e a cumarina (cf. Figura 3, p. 4); e a unidade de reconhecimento do analito, que pode estar integrada ao fluoróforo ou estar ligado a ele por um espaçador, devendo respeitar às características ácido-base de Pearson referentes à espécie de interesse (Figura 1).<sup>5</sup>



Figura 1. Esquema simplificado de um quimiossensor, adaptado de Valeur.<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Domaille, D. W.; Que, E. L.; Chang, C. J. *Nat. Chem. Biol.*, **2008**, *4*, 168.

<sup>2</sup> Mergu, N.; Kim, M; Son, Y. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectroc.*, **2018**, *188*, 571.

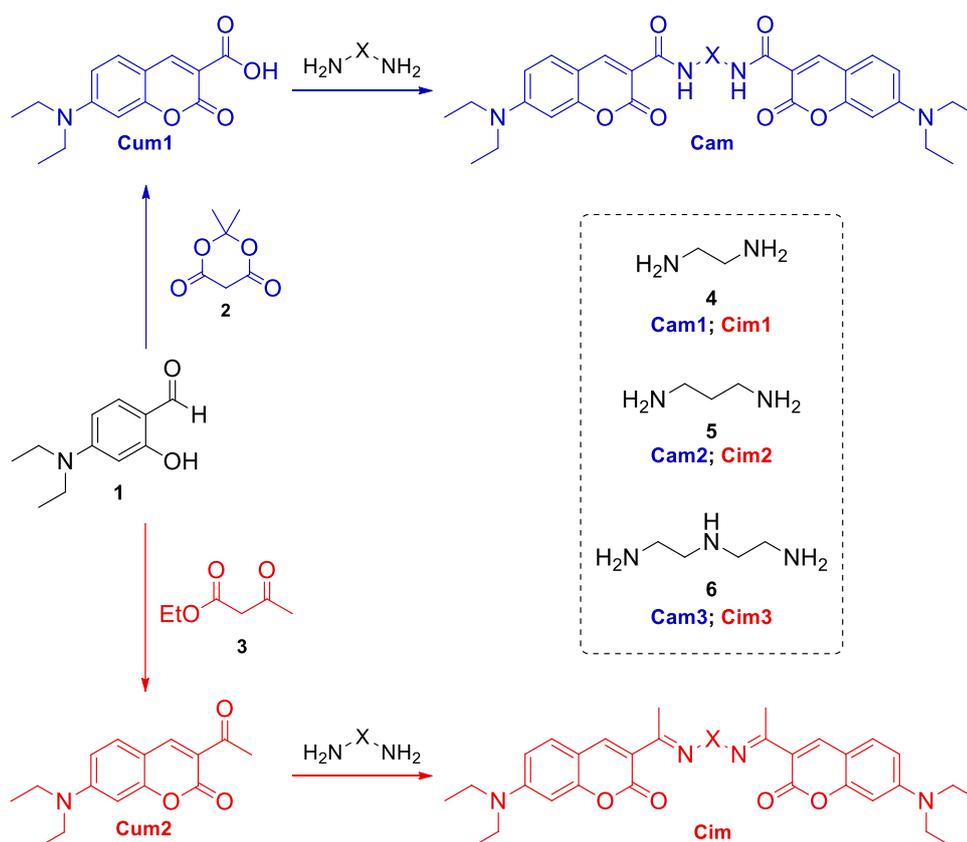
<sup>3</sup> Lee, J. D. Grupo 11: o grupo do cobre. In: *Química Inorgânica Não Tão Concisa*. São Paulo, Brasil: Edgard Blucher, **1999**, 423.

<sup>4</sup> He, G.; Liu, X.; Xu, J.; Ji, L.; Yang, L.; Fan, A.; Wang, S. Wang. Q. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectroc.*, **2018**, *190*, 116.

<sup>5</sup> Valeur, B. Fluorescent molecular sensor of ions and molecules. In: *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH, **2001**, 273.

Dentre os fluoróforos citados, a cumarina é definida como um composto heterocíclico do grupo químico dos benzopiranos e apresenta variadas funções terapêuticas, sua fluorescência ocorre quando seus grupos substituintes provocam o fenômeno de *push-pull* através de seu sistema  $\pi$ -conjugado, desencadeando o mecanismo de estabilização do estado excitado de transferência de carga interna (TCI).

Em nosso grupo de pesquisa, LaPSCA (Laboratório de Planejamento e Síntese de Compostos Ativos), uma das frentes de pesquisa é baseada em derivados de cumarina fluorescentes (**Cum1** e **Cum2**), em que o derivado carboxílico **Cum1** é obtido através da condensação do 4-(*N,N*-dietilamino)salicilaldeído (**1**) com o ácido de Meldrum (**2**), enquanto o derivado cetônico **Cum2** é obtido através da condensação de **1** com o acetoacetato de etila (**3**). Com base nesse núcleo fluorescente já conhecido, foi concebida a ideia de desenvolver derivados biscumarínicos como potenciais quimiossensores fluorescentes para íons metálicos. A preparação destes derivados é baseada na dimerização de derivados de cumarina com diaminas terminais, visando a formação de derivados amídicos, denominadas de derivados **Cams**, e derivados imínicos, os derivados **Cims**, como esquematizado no Esquema 1.



Esquema 1. Esquematização geral deste projeto.

O intuito de dimerizar o núcleo fluorescente é a ampliação da sensibilidade do potencial sensor ao aumentar seu rendimento quântico, diminuindo-se a concentração necessária para sua futura aplicação. A utilização de diaminas como espaçadores na dimerização foi embasada na adição de

átomos de Nitrogênio às biscumarinas, devido a atuação do Nitrogênio como base de Lewis e sua tendência a formar compostos de coordenação com diversos íons metálicos, constituindo-se, assim, a unidade de coordenação/reconhecimento do potencial sensor.

Foram selecionadas duas diaminas, a etilenodiamina (4) e a propilenodiamina (5), com a intenção de avaliar a influência do ângulo de quelação na seletividade dos potenciais sensores. Também foi selecionada uma triamina, a dietilenotriamina (6), que, além de proporcionar um aumento do ângulo, possui um átomo de nitrogênio a mais, sendo este apto a se coordenar mais efetivamente com íons metálicos.

### 1.1. Luminescência e suas propriedades básicas

Luminescência é o fenômeno de emissão de luz a partir do estado eletronicamente excitado de uma substância, o qual pode ser alcançado por uma fonte de energia luminosa ou através da energia fornecida por uma reação química.<sup>6</sup> A natureza do estado excitado define o tipo de luminescência a ser observada. A fluorescência ocorre a partir do estado excitado singlete, caracterizado pelo emparelhamento entre os *spins* dos estados excitado e fundamental. Já a fosforescência ocorre a partir do estado excitado tripleto, que possui *spins* desemparelhados.<sup>6</sup>

O emparelhamento dos elétrons do estado excitado singlete torna a relaxação radiativa favorável, tendo-se um tempo de vida curto na escala de 10 ns. No estado excitado tripleto, devido ao desemparelhamento dos elétrons, tem-se que a relaxação deve acontecer com inversão do *spin*, desfavorecendo a relaxação cineticamente. Com isso, a emissão de luz na fosforescência ocorre em um período maior, na faixa de 1 ms – 1 s.<sup>6</sup>

Além das relaxações radiativas de um elétron excitado, processos não-radioativos ocorrem entre a absorção e emissão de luz e são apresentados no diagrama de Jablonski simplificado (Figura 2), no qual os estados fundamental, primeiro e segundo estados excitados singletos são representados por  $S_0$ ,  $S_1$  e  $S_2$ , respectivamente, e o primeiro estado excitado tripleto por  $T_1$ .<sup>6</sup>

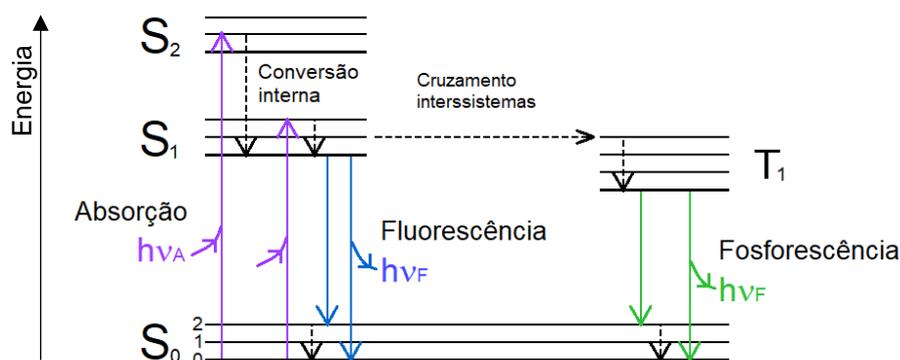


Figura 2. Diagrama de Jablonski, adaptado de Lakowicz.<sup>6</sup>

<sup>6</sup> Lakowicz, J. R. Introduction to Fluorescence. In: *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. USA: Springer, 2006. 1.

Observa-se que cada nível eletrônico de energia possui mais de um nível vibracional. A molécula, ao ser excitada, pode se deslocar para níveis vibracionais mais altos de  $S_1$  ou  $S_2$ , sendo rapidamente relaxada para o nível vibracional mais baixo de  $S_1$ . O processo de relaxação de um nível vibracional para um estado eletrônico de mais baixa energia é denominado de conversão interna. Há também a possibilidade de acontecer a conversão de um *spin* de  $S_1$  para  $T_1$ , processo denominado de cruzamento intersistemas, dando-se seqüência à fosforescência.<sup>6</sup>

A partir do diagrama de Jablonski simplificado é possível observar que a energia de absorção ( $h\nu_A$ ) é maior que a energia de emissão ( $h\nu_F$ ) devido às perdas de energia que se têm no estado excitado através da relaxação vibracional e da estabilização da molécula excitada pelas moléculas vizinhas de solvente. Esta diferença de energia define o deslocamento de Stokes, em que o comprimento de luz emitido pela fluorescência é maior do que o da luz absorvida (Equação 1).<sup>6</sup>

$$h \frac{c}{\lambda_{\text{abs}}} > h \frac{c}{\lambda_{\text{em}}}$$

Equação 1. Relação entre as energias de absorção e emissão.

Dentre as espécies orgânicas capazes de absorver luz, apenas aquelas que se enquadram em determinados requisitos estruturais são capazes de dissipar a energia absorvida em forma de luz. Características como rigidez estrutural, planaridade, ligações  $\pi$ -conjugadas, grupos aromáticos e anéis condensados, são responsáveis por diminuir a taxa de relaxação não-radiativa e, assim, favorecer a fluorescência. Como exemplos de moléculas fluorescentes com tais características estruturais, temos as apresentadas na Figura 3.<sup>6</sup>

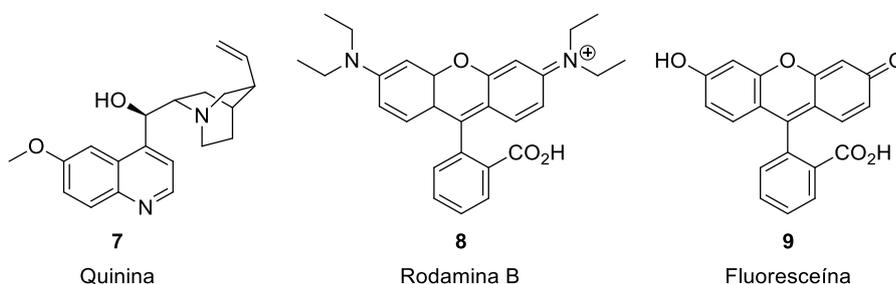


Figura 3. Exemplos de moléculas fluorescentes.<sup>6</sup>

O rendimento quântico ( $\phi$ ) é uma característica de fluorescência e é definido como a razão entre moléculas que fluorescem e moléculas que foram excitadas, como mostrado na Equação 2, na qual  $\Gamma$  é a taxa de emissão de luz e  $K_{nr}$  é a taxa de decaimento não-radiativo.<sup>7</sup>

$$\phi = \frac{\text{moléculas fluorescentes}}{\text{moléculas excitadas}} = \frac{\Gamma}{\Gamma + K_{nr}}$$

Equação 2. Rendimento quântico.

<sup>7</sup> Skoog, D. A.; West, D. M.; Holler, F. J.; Crouch, S. R. Espectroscopia de Fluorescência Molecular. In: *Fundamentos de Química Analítica*. São Paulo: Cengage Learning, 2013. 782.

Em termos práticos, o rendimento quântico é determinado a partir de um fluoróforo de referência com rendimento quântico pré-estabelecido. Para determinar o rendimento quântico de uma substância é necessário utilizar os mesmos parâmetros experimentais utilizados na determinação do rendimento da referência para a substância em questão, como comprimento de onda de excitação e largura de fenda de excitação e de detecção. O rendimento é calculado através da Equação 3, na qual o termo  $\phi_{\text{ref}}$  é o rendimento quântico de referência, o termo  $I$  se refere à área integrada da curva de emissão e  $\eta$ , ao índice de refração do solvente utilizado.

$$\phi = \phi_{\text{ref}} \frac{I}{I_{\text{ref}}} \frac{\eta^2}{\eta_{\text{ref}}^2}$$

Equação 3. Rendimento quântico calculado.

## 1.2. Cumarina

As cumarinas, ou *2H*-cromen-2-ona (Figura 4), são compostos heterocíclicos pertencentes ao grupo químico dos benzopiranos e constituem uma classe de metabólitos secundários encontrados em diversas plantas, como canela, morango, cumaru, entre outras,<sup>8</sup> sendo suas maiores concentrações encontradas nas flores e frutos.<sup>9</sup> Suas principais funções estão relacionadas à defesa da planta, apresentando atividades antimicrobiana e propriedades inibitórias de germinação e de ataque de pragas.<sup>8</sup>

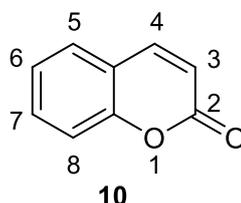


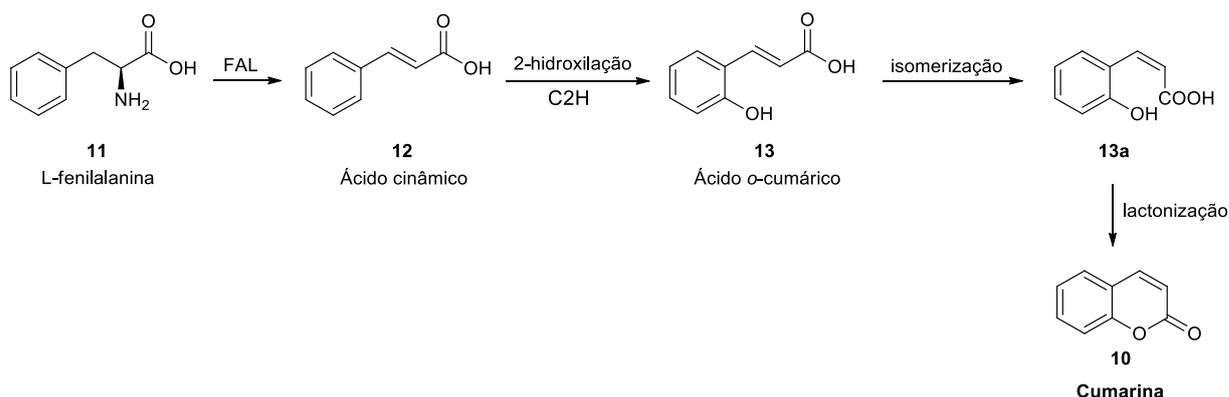
Figura 4. Estrutura básica de cumarina.

Bioquimicamente, as cumarinas são derivadas do ácido cinâmico, proveniente do metabolismo da *L*-fenilalanina (Esquema 2). Inicialmente, a fenilalanina (**11**) sofre uma desaminação pela enzima fenilalanina amonialiase (FAL), formando o ácido *trans*-cinâmico (**12**). O ácido cinâmico pode sofrer uma hidroxilação nas posições 2 e 4 pelas enzimas cinamato 2-hidroxilase (C2H) e cinamato 4-hidroxilase (C4H), resultando nos ácidos *o*-cumárico (**13**) e *p*-cumárico, respectivamente. O ácido *o*-cumárico passa por uma isomerização, via ácido hidroxicinâmico isomerases, e por fim uma lactonização mediada por enzimas, formando a cumarina (**10**).<sup>10</sup>

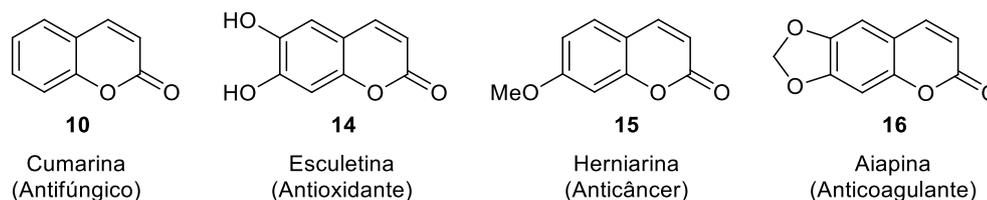
<sup>8</sup> Santos, W. H.; Siqueira, M. S.; Silva-Filho, L. C. *Quim. Nova.* **2013**, 36, 1303.

<sup>9</sup> Croteau, R.; Kutchan, T. M.; Lewis, N. G. *Natural Products (Secondary Metabolites)*. In: Buchanan, B.; Grisse, W.; Jones, R. *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. USA: Wiley Blackwell, **2015**. 1308.

<sup>10</sup> Dewick, P. M. *The Shikimate Pathway: Aromatic amino acids and phenylpropanoids*. In: *Medicinal Natural Products - A Biosynthetic Approach*. England: John Wiley & Sons, **2002**. 142.

Esquema 2. Via biossintética da cumarina.<sup>9</sup>

Além das propriedades defensivas citadas acima, propriedades terapêuticas como anticâncer, antioxidante, anticoagulante, anti-inflamatória, antibiótica, antiviral, imunomodulatórias e broncodilatadoras fizeram com que os derivados de cumarinas fossem amplamente aplicadas em tratamentos médicos (Figura 5). Suas aplicações se estendem na indústria alimentícia, em cosméticos e área de novos materiais, sendo utilizadas como corantes sensibilizadores de células solares e lasers.<sup>9</sup>

Figura 5. Exemplos de derivados de cumarina e suas ações terapêuticas.<sup>11</sup>

A versatilidade de aplicação desta classe de moléculas em variados segmentos da ciência e tecnologia ampliou as linhas de pesquisa baseadas nos derivados de cumarina. Atualmente, uma das vertentes mais investigadas é a dos derivados fluorescentes, por apresentarem um elevado rendimento quântico, ótima solubilidade em solventes polares, razoável estabilidade e por apresentar uma síntese convergente em condições brandas.<sup>12</sup>

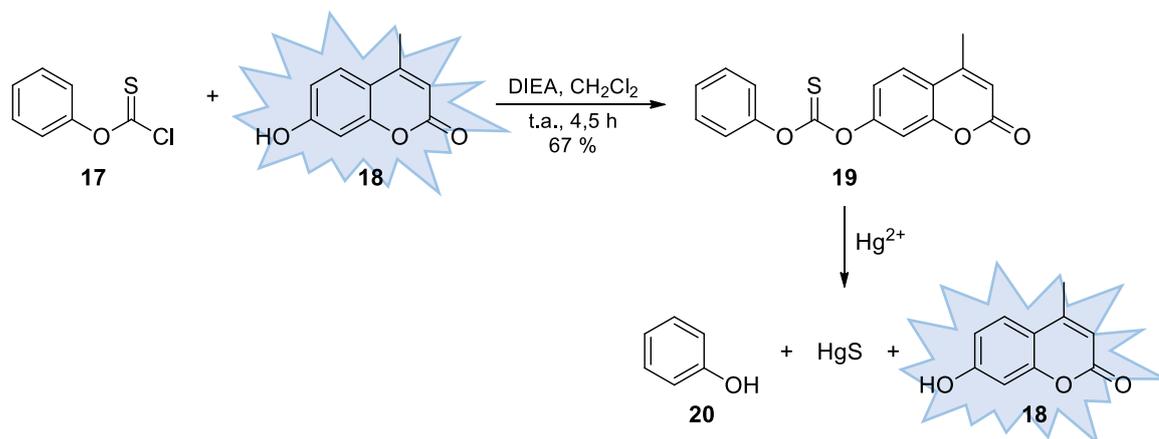
A fluorescência de derivados de cumarinas é dependente dos grupos substituintes no núcleo benzopirano, sendo influenciada pelo fenômeno de transferência de carga interna (TCI). As interações de carga interna são descritas como mecanismos de estabilização molecular interna na qual a densidade de carga negativa de um grupo doador (D) é deslocalizada através de um sistema- $\pi$  conjugado para um grupo aceptor (A), fenômeno denominado de *push-pull* ou  $D-\pi-A$ .<sup>13</sup>

<sup>11</sup> Cunha, S.; Lunes, C. E. M.; Oliveira, C. C.; Santana, L. L. B. *Quim. Nova.* **2015**, 38, 1125.

<sup>12</sup> Ghouili, A.; Dusek, M.; Petricek, V.; Ben Ayed, T.; Ben Hassen, R. J. *Phy. Chem. Solids.* **2014**, 75, 188.

<sup>13</sup> Setsukinai, K.; Urano, Y.; Kikuchi, K.; Higuchi, T.; Nagano, T. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2.* **2000**, 2453.

A influência dos grupos substituintes de cumarina na sua fluorescência pode ser exemplificado com o derivado não-fluorescente **19**, sintetizado por Yang e colaboradores,<sup>14</sup> que ao reagir com  $\text{Hg}^{2+}$  passa a fluorescer (Esquema 3), tornando-o um sensor de  $\text{Hg}^{2+}$ . É possível observar que o grupo hidroxila na posição-7 da cumarina de partida **18** proporciona uma boa taxa de emissão radiativa, devido à sua contribuição para o fenômeno de *push-pull*. Percebe-se que esta fluorescência é suprimida com a formação do grupo carbonotioato, devido ao seu predominante perfil retirador de elétrons, que desfavorece a estabilização do estado excitado por TCI.



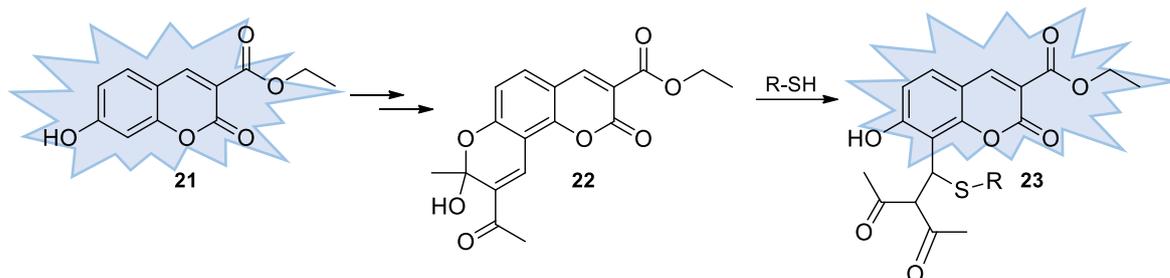
Esquema 3. Rota sintética do carbonotioato de O-(4-metil-2-oxo-2H-cromen-7-ila) O-fenila.<sup>14</sup>

O mecanismo de detecção de  $\text{Hg}^{2+}$  por **19** foi atribuído à afinidade do  $\text{Hg}^{2+}$  por enxofre, pela qual o íon metálico se coordena ao enxofre do carbonotioato e desencadeia a reação de dessulfurização, desprotegendo a hidroxila da cumarina **18** e reestabelecendo a sua fluorescência.<sup>14</sup>

Outro exemplo é o sensor de tiol desenvolvido por Long, Zang e colaboradores,<sup>15</sup> que anteciparam a inibição do processo de TCI da 7-hidroxi-2-oxo-2H-cromeno-3-carboxilato de etila (**21**) através da introdução de um grupo retirador de elétrons na posição-8 da cumarina e ao mascarar o perfil doador da hidroxila na posição-7, formando o derivado não-fluorescente **22**. O mecanismo de detecção de tiol é baseado na suscetibilidade da cetona  $\alpha,\beta$ -insaturada à adição de Michael por um tiol. A adição do tiol desencadeia a quebra do grupo hemicetal, recompondo a hidroxila, assim como a perda do perfil retirador de elétron do substituinte na posição-8, e restabelecendo a fluorescência no composto **23** (Esquema 4).

<sup>14</sup> Pang, B.; Li, Q.; Li, C.; Yang, Z. *J. Lumin.* **2019**, *205*, 446.

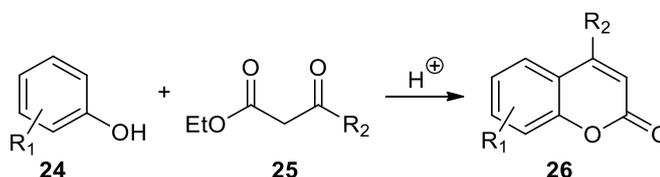
<sup>15</sup> Long, L.; Zhou, L.; Wang, L.; Meng, S.; Gong, A.; Du, F.; Zhang, C. *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 8214.

Esquema 4. Transformação de composto fluorescente desativando e reativando sua fluorescência.<sup>15</sup>

### 1.2.1. Métodos de preparação de derivados de cumarinas

Os derivados de cumarinas podem ser obtidos através de metodologias sintéticas clássicas, variando-se o padrão de substituição de acordo com a metodologia abordada, das quais se destacam as reações de Pechmann e a de Knoevenagel.<sup>16</sup>

A reação de Pechmann, Esquema 5, é a metodologia mais empregada na síntese de cumarinas devido a acessibilidade dos reagentes iniciais e obtenção dos produtos em bons rendimentos. Esta reação envolve a condensação de um fenol com um composto de metileno ativo, geralmente um β-cetoéster, na presença de uma componente ácida, podendo esta ser um ácido de Brønsted (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, HClO<sub>4</sub>, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, CF<sub>3</sub>COOH), heteropoliácidos, uma solução aquosa de líquidos iônicos ou um ácido de Lewis (AlCl<sub>3</sub>, ZnCl<sub>2</sub> ou InCl<sub>3</sub>).<sup>16</sup>

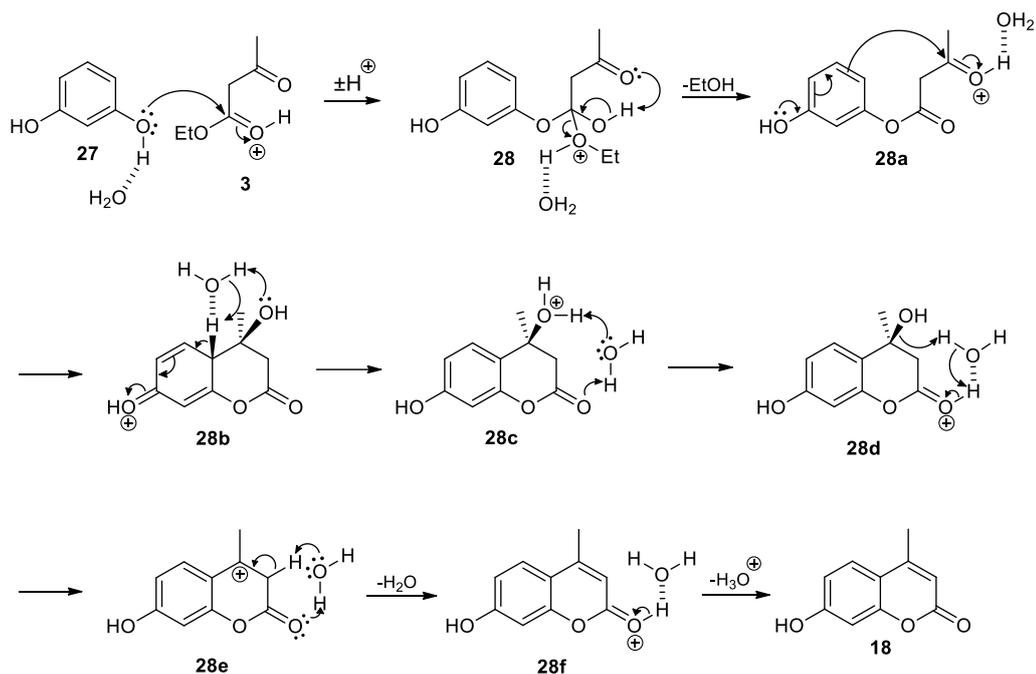


Esquema 5. Esquema geral da reação de Pechmann.

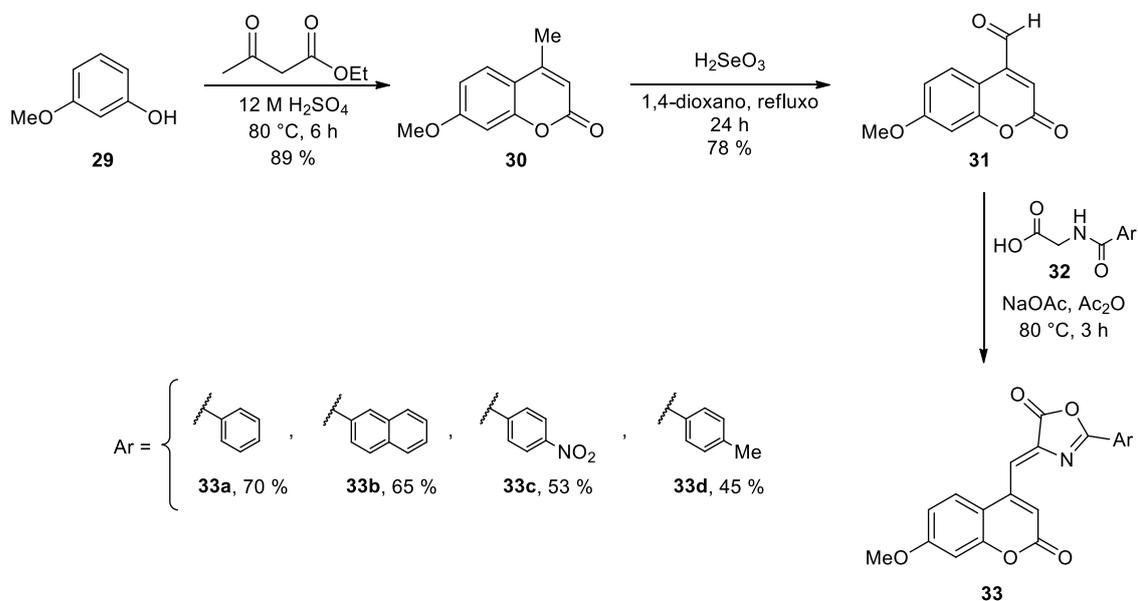
Uma das propostas mecanísticas para a reação de Pechmann foi sugerida por Ahmad e Desai<sup>17</sup> e posteriormente sustentada pelos cálculos teóricos de Stirling e Daru,<sup>16</sup> pela qual a reação se inicia com uma transesterificação, seguida por uma etapa de ciclização (**28a**) através de um ataque eletrofílico aromático à cetona e seguido de uma desidratação (**28d**), formando uma cumarina 4-substituída, como demonstrado no Esquema 6.

<sup>16</sup> Daru, J.; Stirling, A. *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 8749.

<sup>17</sup> Ahmad, Z. S.; Desai, R. D. *Heterocycl. Compd.* **1937**, *3*, 6.

Esquema 6. Proposta mecanística para reação de Pechmann por Stirling e Daru.<sup>16</sup>

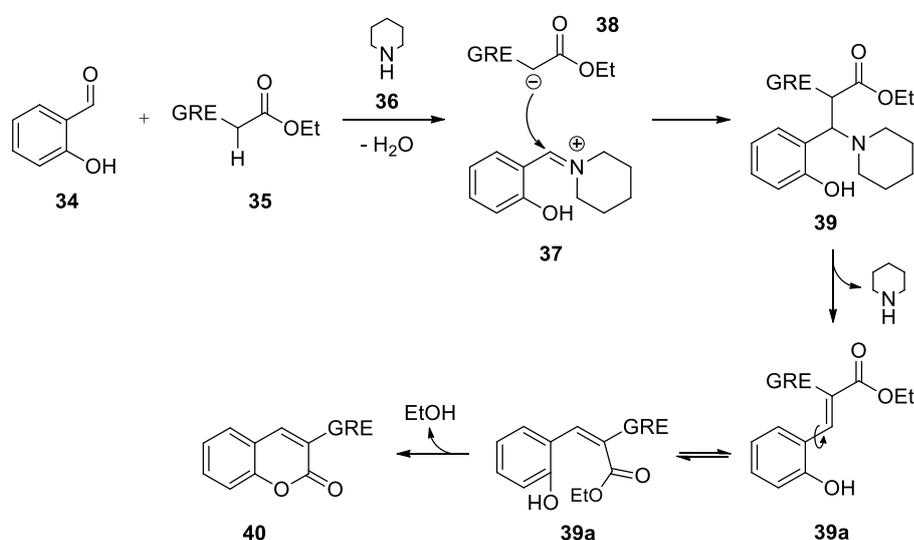
A reação de Pechmann pode ser visualizada na síntese do 7-metoxi-4-metil-2*H*-cromen-2-ona (**30**) por Topkaya e Alp<sup>18</sup>, que a modificaram e a submeteram à condensação com núcleos oxazol-5-onas (Esquema 7) com a intenção de combinar as vantagens farmacêuticas e fotofísicas dos dois núcleos heterocíclicos, tendo como objetivo avaliar suas atividades biológicas e aplicações químicas da série de híbridos sintetizados.

Esquema 7. Rota sintética dos derivados de cumarina-oxazol-5-onas.<sup>18</sup>

<sup>18</sup> Topkaya, D.; Alp, S. *J. Fluoresc.* **2017**, *27*, 1413.

A reação de Knoevenagel é baseada na condensação entre um composto carbonílico com um composto de metileno ativo, geralmente representado por um composto 1,3-dicarbonílico, em catálise básica, formando uma espécie carboxílica  $\alpha,\beta$ -insaturada.<sup>19</sup> Já a formação de cumarinas pela reação de Knoevenagel ocorre quando a espécie carbonílica é representada por um 2-hidroxibenzaldeído, cuja hidroxila é responsável pela ciclização e formação do núcleo benzopirano.

De acordo com Bednarsz e Bogdal,<sup>20</sup> a proposta mecanística para a reação é iniciada pela formação do íon imínio **37** pela condensação entre uma amina secundária (catalisador básico) e um aldeído (Esquema 8). O hidrogênio ácido do composto de metileno ativo é abstraído formando o carbânion **38**, que ataca o intermediário imínio **37**. A formação da ligação- $\pi$  em **39a** se dá com a reconstituição do catalisador e o intermediário **39a** é posteriormente ciclizado, formando a cumarina 3-substituída **40**.



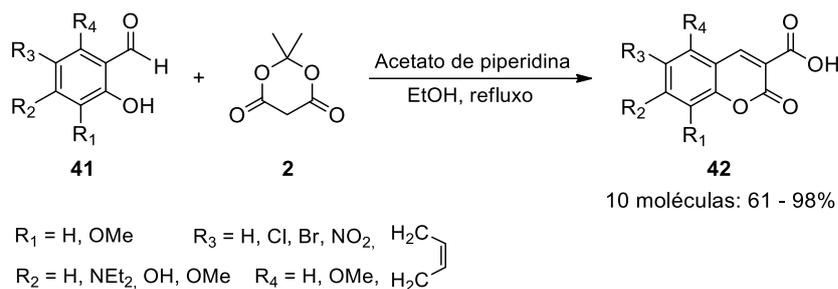
Esquema 8. Proposta mecanística para a condensação de Knoevenagel.<sup>20</sup>

A metodologia de Knoevenagel foi utilizada por Lam e colaboradores<sup>21</sup> na síntese de uma série de ácidos cumarina-3-carboxílicos, com o propósito de encontrarem sondas fluorescentes para peptídeos. Utilizaram o ácido de Meldrum (**2**) como componente 1,3-dicarbonílico e variaram as substituições do salicilaldeído (**41**), tendo o acetato de piperidina como catalisador (Esquema 9).

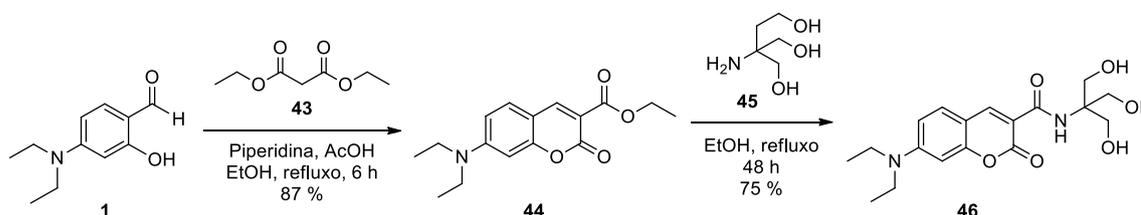
<sup>19</sup> Kürti, L.; Czakó, B. Knoevenagel Condensation. In: *Strategic Applications of Named Reactions in Organic Synthesis*. USA: Elsevier, **2005**, 242

<sup>20</sup> Bednarsz, S.; Bogdal, D. *Int. J. Chem. Kinet.* **2009**, *41*, 589.

<sup>21</sup> Song, A.; Wang, X.; Lam, K. S. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 1755.

Esquema 9. Síntese de ácidos cumarina-3-carboxílicos.<sup>21</sup>

No trabalho de García-Beltrán e colaboradores<sup>22</sup> também foi utilizado a reação de Knoevenagel para sintetizar a 7-dietilamino-2*H*-cromone-2-ona-3-carboxilato de etila (**44**). A partir desta cumarina prepararam a amida **46** ao adicionar o 2-amino-2-(hidroximetil)propano-1,3-diol (**45**) ao éster, formando um sensor fluorescente e seletivo para a espécie  $\text{Fe}^{2+}$  (Esquema 10).

Esquema 10. Síntese de sensor derivado de cumarina seletivo para  $\text{Fe}^{2+}$ .<sup>22</sup>

### 1.3. Sensores moleculares fluorescentes

Sensores moleculares fluorescentes, ou quimiossensores, são definidos por um sistema molecular cujas propriedades fotofísicas são modificadas a partir da interação com um analito, provocando uma resposta analítica detectável. Os principais tipos de respostas são baseados na variação da intensidade de fluorescência e no deslocamento do comprimento de onda de excitação e/ou emissão.<sup>5</sup>

As espécies químicas e bioquímicas que podem ser detectadas por estes métodos de fluorescência abrangem cátions, ânions, moléculas neutras e gases, tornando-os aplicáveis em diferentes ramos científicos.<sup>5</sup> A detecção de íons metálicos, por exemplo, é de grande interesse para pesquisadores de diversas áreas devido ao envolvimento destas espécies em funções celulares, desenvolvimento de doenças e de condições patológicas, assim como em casos de intoxicação por metais pesados.<sup>23</sup>

<sup>22</sup> García-Beltrán, O.; Mena, N.; Yañez, O.; Caballero, J.; Vargas, V.; Nuñez, M. T.; Cassels, B. K. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, 67, 60.

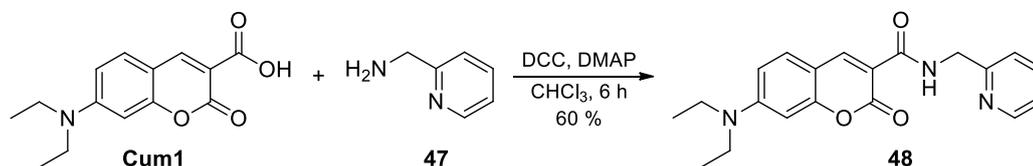
<sup>23</sup> Warrier, S.; Kharkar, P. S. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2018**, 188, 659.

Assim, sensores fluorescentes ganharam interesse em grupos de pesquisa devido, principalmente, às suas vantagens em relação aos métodos tradicionais, como métodos espectroscópicos e eletroquímicos, em termos de sensibilidade, seletividade, análise não-destrutiva, tempo curto de resposta e boa resolução espacial, podendo-se dispensar equipamentos sofisticados, preparação laboriosa de amostras e habilidades específicas de um operador.<sup>23</sup>

Os sensores fluorescentes são constituídos por duas unidades principais: uma responsável pela resposta óptica na presença de um analito, o *fluoróforo*; e uma responsável pelo reconhecimento do analito, que, quando se trata de um íon, é denominado de *ionóforo*, o qual pode estar integrado ao fluoróforo ou estar a ele ligado por um espaçador. No caso dos sensores de íons, a interação do íon com o ionóforo pode desencadear processos fotoinduzidos como de transferência de elétrons, de carga ou de energia, além de facilitar a formação de exímero e exciplexo, sendo, respectivamente, um dímero e um complexo de transferência de carga, ambos formados no estado excitado.<sup>5</sup>

O desenvolvimento de sensores de íons metálicos precisa seguir certos requisitos, considerando a aplicação destes em sistemas biológicos, sendo a principal condição a seletividade para um íon metálico específico diante dos cátions biologicamente abundantes como Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup> e Ca<sup>2+</sup>, para evitar interferências na detecção do analito-alvo. Os sensores devem apresentar compatibilidade com sistemas biológicos, apresentando boa solubilidade em água e nenhuma toxicidade. É tido como vantagem um sensor que apresente uma resposta com aumento de intensidade de fluorescência ou deslocamento no perfil de excitação/emissão em vez de uma resposta de supressão de fluorescência, por causa da maximização da resolução espacial em métodos microscópicos. Além disso, são desejáveis fluoróforos que possuam excitação e emissão de luz visível por minimizar os danos na amostra biológica e também os que possuem alto brilho óptico, por diminuir a quantidade necessária de sensor em suas aplicações e minimizar a potencial alteração da distribuição celular endógena.<sup>1</sup>

Um exemplo de sensor para íon metálico é o desenvolvido por Kim e colaboradores,<sup>24</sup> que apresentou uma boa seletividade para Cu<sup>2+</sup>. O sensor foi preparado a partir do acoplamento amídico do ácido 7-(*N,N*-dietilamino)-2-oxo-2*H*-cromeno-3-carboxílico (**Cum1**) com a 2-(aminometil)piridina (**47**), utilizando DCC como agente de acoplamento (Esquema 11).



Esquema 11. Rota sintética da 7-(dietilamino)-2-oxo-*N*-(piridi-2-ilmetil)-2*H*-cromeno-3-carboxamida.

<sup>24</sup> Jung, H. S.; Lee, J. Y.; Joo, T.; Kim, J. S.; et al. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 2008.

As respostas ópticas do composto **48** foram analisadas em soluções de HEPES/DMSO (9:1, v/v) com adição de alguns íons metálicos. As curvas de absorção (Figura 6a) mostram um deslocamento de 15 nm na absorção máxima do composto **48** na presença de  $\text{Cu}^{2+}$ . As curvas de emissão, (Figura 6b) mostram a completa supressão de fluorescência, em 479 nm, do composto **48** promovida pelo  $\text{Cu}^{2+}$ , além disso, mostram que esta resposta não sofre grande interferência na coexistência de outras espécies metálicas, mesmo em altas concentrações. A supressão de fluorescência apresentada foi associada à transferência de energia de excitação e à transferência de carga ligante-metal (TCLM) entre os elétrons deslocalizados do núcleo cumarina com a camada 3d semi-preenchida do íon de cobre, induzindo um canal de desativação não-radiativa predominante.<sup>24</sup>

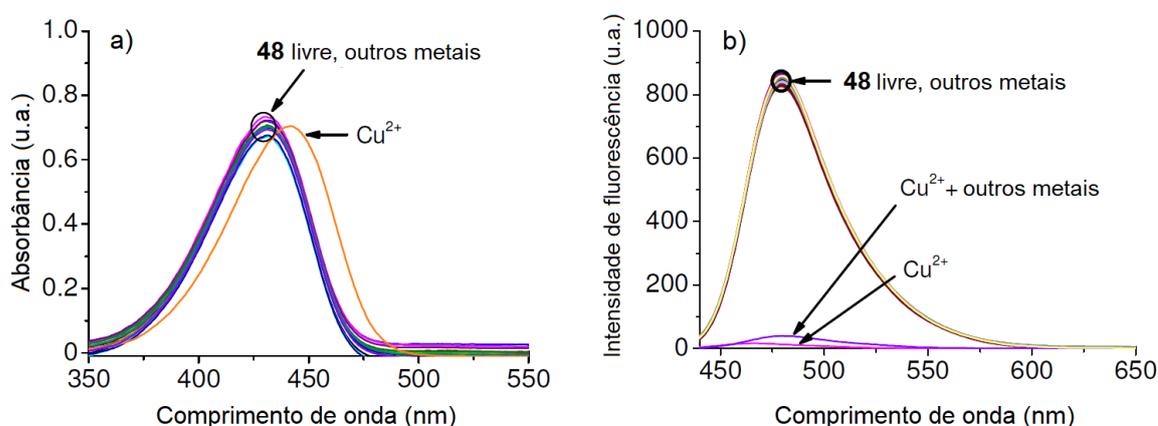


Figura 6. Espectros de a) absorção de **48** (20  $\mu\text{M}$ ) e b) emissão de **48** (5  $\mu\text{M}$ ) com adição de sais de cloreto de  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cs}^+$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Rb}^+$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  e ( $\text{Cu}^{2+}$  + outros íons) (500  $\mu\text{M}$ ) e de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  e  $\text{Na}^+$  (5 mM) em solução aquosa (HEPES:DMSO) com excitação em 430 nm.<sup>24</sup>

Tendo em vista a aplicação do sensor em sistemas biológicos, avaliaram o comportamento de **48** e **48**+ $\text{Cu}^{2+}$  em diferentes pH (Figura 7a) e observaram que na faixa de pH 4 – 10 a supressão de fluorescência se mostrou eficiente, provando que o sensor possui aplicabilidade em sistemas biológicos.<sup>24</sup>

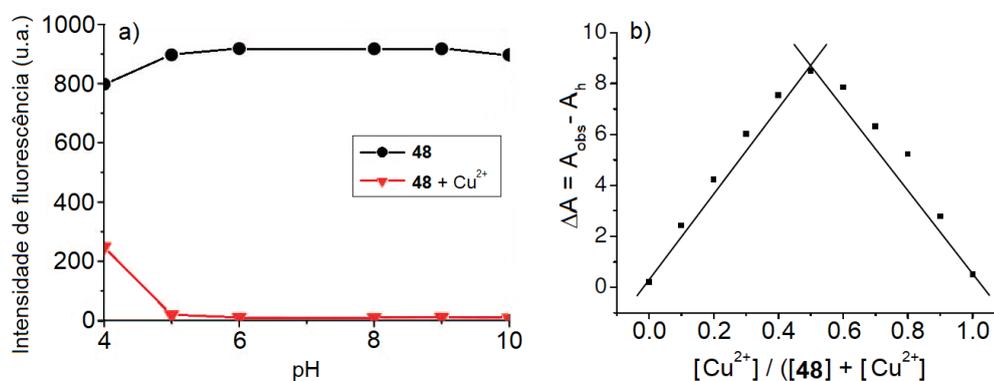


Figura 7. a) Variação na intensidade de fluorescência em 479 nm de **48** (5  $\mu\text{M}$ ) com e sem  $\text{Cu}^{2+}$  (10 eq.) em função do pH. b) Gráfico de Job de **48** e  $\text{Cu}^{2+}$ .<sup>24</sup>

A estequiometria do complexo **48**-Cu<sup>2+</sup> foi determinada como 1:1, através do método de variação contínua, ou método de Job (Figura 7b).<sup>24</sup> O método de Job é utilizado para determinar a estequiometria de um evento de associação, baseando-se na variação de um parâmetro físico-químico, como por exemplo, a absorvância de uma molécula, desde que esta respeite a lei de Beer-Lambert. A estequiometria de coordenação é determinada a partir de soluções com volume total e número de mols total constantes, variando-se a fração molar de 0 a 1, tendo no máximo ou mínimo da curva formada a indicação da proporção estequiométrica.<sup>25</sup>

O limite de detecção foi determinado como 0,5 µM a partir de uma curva de titulação (Figura 8) com concentração variável de CuCl<sub>2</sub> de 0 a 50 µM. Com o limite de detecção determinado e estabilidade em pH de 4 – 10, o sensor possui aplicabilidade na determinação de Cu<sup>2+</sup> em água potável, cuja concentração limite estipulada pela Agência de Proteção Ambiental (APA) é de aproximadamente 20 µM e também pode ser aplicado em amostras de sangue, cuja concentração média normal é de 15,6 – 23,6 µM. A partir da curva de titulação, também determinaram a constante de ligação  $K_a = (1,17 \pm 0,29) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ , baseando na equação de Benesi-Hildebrand (Equação 4), na qual o termo F se refere à intensidade de fluorescência para determinada concentração de analito, F<sub>0</sub>, à intensidade de fluorescência inicial antes da adição do analito, F<sub>máx</sub>, à intensidade máxima e K<sub>a</sub>, à constante de associação.<sup>24</sup>

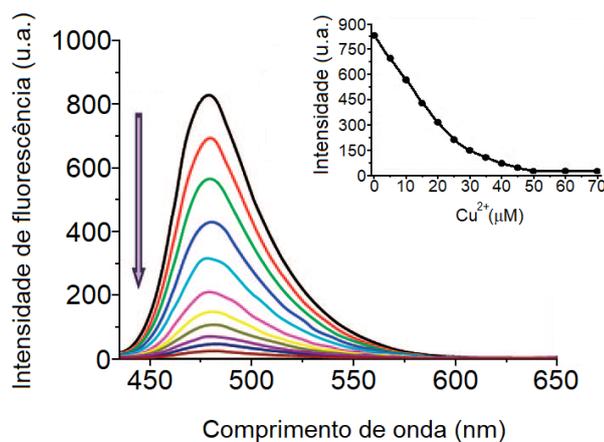


Figura 8. Espectros de emissão de **48** (5 µM) com adição de CuCl<sub>2</sub> (0 – 50 µM) com excitação em 430 nm.<sup>24</sup>

$$\frac{1}{F - F_0} = \frac{1}{K_a(F_{\text{máx}} - F_0)[M^{n+}]} + \frac{1}{(F_{\text{máx}} - F_0)}$$

Equação 4. Equação de Benesi-Hildebrand.

<sup>25</sup> Fraceto, L. F.; Gonçalves, M. M.; Moraes, C. M.; Araújo, D. R.; Zanella, L. Paula., E.; Pertinhez, T. A. *Quim. Nova*, **2007**, 30, 1203.

O sensor foi, então, aplicado no imageamento de células de fígado (NCTC) e de rins (LLC-MK2), que incubadas com **48** apresentaram intensa emissão na região do azul (Figura 9), a qual foi suprimida devido à incubação com  $\text{CuCl}_2$  20 eq. Avaliaram também a boa reversibilidade da formação do complexo **48**- $\text{Cu}^{2+}$  utilizando EDTA.<sup>24</sup>

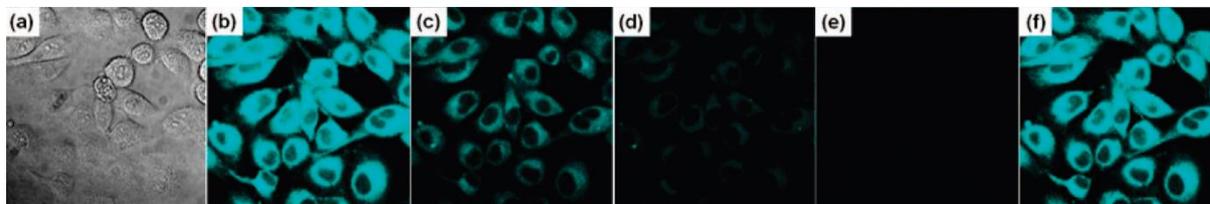
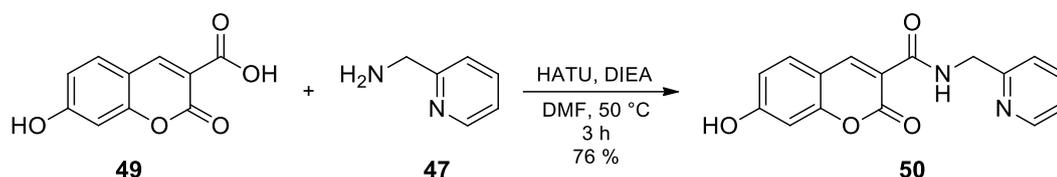


Figura 9. Imagens de microscopia de fluorescência confocal de  $\text{Cu}^{2+}$  em células LLC-MK2. a) Imagem de campo claro. b) Imagem de fluorescência de LLC-MK2 incubadas com **48** (5  $\mu\text{M}$ ). Em seguida incubada com adição de várias concentrações de  $\text{CuCl}_2$  c) 5, d) 10 e e) 20 eq. f) Sensor livre com adição de EDTA (500  $\mu\text{M}$ ).<sup>24</sup>

Recentemente, Kharkar e Warriar<sup>23</sup> sintetizaram um sensor similar ao preparado por Kim e colaboradores, que também apresentou resposta analítica baseada na supressão de fluorescência, apresentando uma modificação estrutural apenas no grupo substituinte da posição-7 da cumarina. A troca do grupo *N,N*-dietilamino por uma hidroxila foi suficiente para alterar a seletividade do sensor de  $\text{Cu}^{2+}$  para  $\text{Fe}^{3+}$ . O sensor foi preparado a partir do acoplamento amídico, mediado por HATU, entre o ácido 7-hidroxi-2-oxo-2*H*-cromeno-3-carboxílico (**49**) e a 2-(aminometil)piridina (**47**) (Esquema 12).



Esquema 12. Síntese da 7-hidroxi-N-((piridin-2-il)metil)-2H-cromen-2-ona-3-carboxiamida.

Nas análises de absorção molecular do sensor **50**, em solução aquosa, com alguns íons metálicos, apenas com  $\text{Fe}^{3+}$  foi possível observar uma diminuição considerável na absorbância em 385 nm. Nas análises de fluorescência, sob excitação em 385 nm, observaram uma diminuição da intensidade de fluorescência em 447 nm diante dos íons  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Hg}^{2+}$  e uma supressão mais pronunciada na presença de  $\text{Fe}^{3+}$  (Figura 10). Kharkar e Warriar atribuíram a supressão de fluorescência de **50**- $\text{Fe}^{3+}$  à transferência de carga ligante-metal (TCLM).<sup>23</sup>

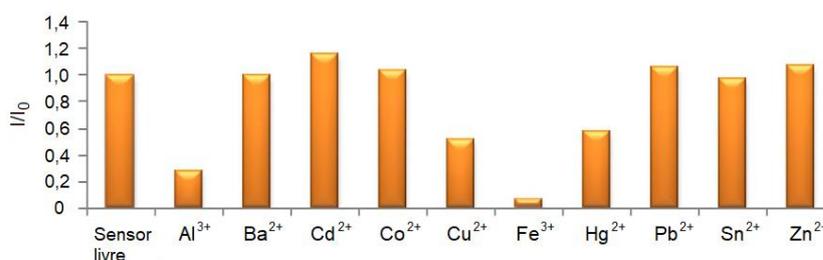
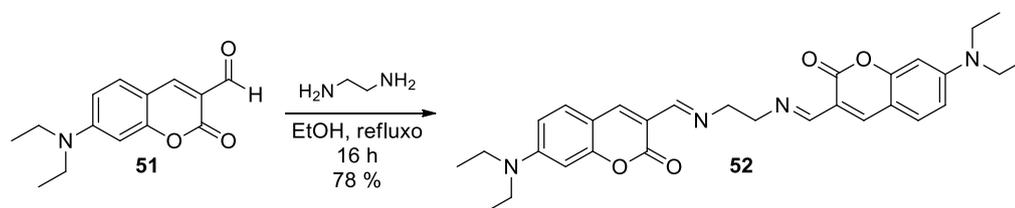


Figura 10. Intensidades de emissão relativas em 447 nm de **50** com íons metálicos, sob excitação em 385 nm, adaptado de Kharkar e Warriar.<sup>23</sup>

A avaliação de interferência de outros íons metálicos juntos ao  $\text{Fe}^{3+}$  mostrou que a supressão causada pelo  $\text{Fe}^{3+}$  não sofria alteração. O sensor se mostrou estável na faixa de pH de 1 – 8 e o limite de detecção foi estipulado como  $0,76 \mu\text{M}$  através de uma titulação com concentração de  $\text{Fe}^{3+}$  variando de 0 –  $10 \mu\text{M}$ . Considerando que a Organização Mundial da Saúde (OMS) estabeleceu a concentração limite de  $\text{Fe}^{3+}$  em água potável como  $5 \mu\text{M}$ , o sensor apresenta uma boa sensibilidade para ser aplicado. Além disso, o sensor foi utilizado no imageamento celular de células renais (LLC-MK2), apresentando uma resposta satisfatória quando submetidas a pequenas concentrações de  $\text{Fe(III)}$ .<sup>23,23</sup>

Além dos exemplos de sensores com resposta analítica definida pela supressão de fluorescência, alguns exemplos de sensores são reportados com uma resposta baseada no aumento da intensidade de fluorescência, como no caso do sensor de  $\text{Cr}^{3+}$  desenvolvido por Feng e colaboradores.<sup>26</sup> O sensor **52** foi preparado a partir da reação de condensação entre o 7-(*N,N*-dietilamino)-2-oxo-2*H*-cromeno-3-carbaldeído (**51**) e a etilenodiamina (Esquema 13).



Esquema 13. Síntese do 3,3'-(1*E*,1'*E*)-(etano-1,2-diilbis(azanililideno))bis(metanililideno))bis(7-(diethylamino)-2*H*-cromen-2-ona).

A baixa fluorescência do derivado **52** foi atribuída aos fenômenos de transferência de elétrons fotoinduzida (TEF) da ligação C=N para o núcleo cumarínico e à isomerização da ligação C=N, que contribuem para que o decaimento não-radiativo seja predominante. Com a coordenação dos átomos de N do sensor com  $\text{Cr}^{3+}$ , o fenômeno de TEF se torna menos expressivo. Além disso, a coordenação do sensor com  $\text{Cr}^{3+}$  torna a rotação da ligação C=N restrita, suspendendo sua isomerização. Com o bloqueio dos dois principais fenômenos de decaimento não-radiativo, o fenômeno de fluorescência ( $\lambda_{em} = 498 \text{ nm}$ ) do complexo **52**- $\text{Cr}^{3+}$  se torna predominante.<sup>26</sup>

Ao analisar a interferência de outros íons metálicos na resposta analítica do sensor, observaram que  $\text{Al}^{3+}$  e  $\text{Hg}^{2+}$  apresentaram um pequeno aumento de fluorescência, mas que o aumento causado por  $\text{Cr}^{3+}$  foi mais acentuado. Além disso, a resposta analítica do sensor não apresentou interferência com a coexistência de outros cátions juntos ao  $\text{Cr}^{3+}$ .<sup>26</sup>

A avaliação do efeito do pH indicou que o sensor **52** pode ser utilizado na detecção de  $\text{Cr(III)}$  na faixa de pH 7 – 8 (Figura 11). A estequiometria do complexo foi determinada como 1:1 através do método de Job. O limite de detecção foi estipulado em  $0,79 \mu\text{M}$  através de uma titulação variando a concentração de  $\text{Cr(III)}$  de 0 –  $16 \mu\text{M}$ , sendo um limite dentro da concentração máxima de  $\text{Cr(III)}$  em água potável estipulada pela APA ( $\leq 1,92 \mu\text{M}$ ). Além disso, a constante de ligação foi determinada

<sup>26</sup> Jia, H.; Feng, C.; Tian, C. *Anal. Sci.* **2018**, *34*, 1079.

como  $2,89 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ , a partir da equação de Benesi-Hildebrand e dos dados obtidos da curva de titulação. O sensor foi aplicado no imageamento de células de câncer de mama (MCF-7) apresentando uma fluorescência no verde quando incubadas com o sensor e  $\text{Cr(III)}$ .<sup>26</sup>

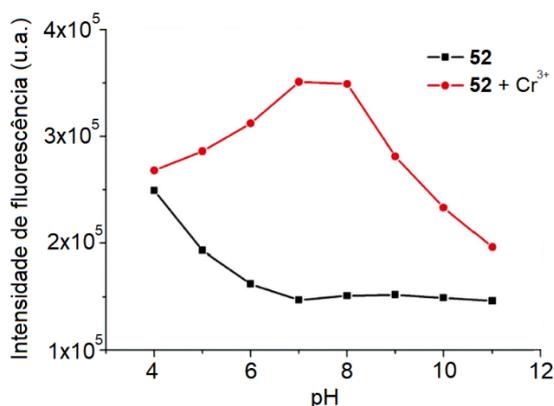
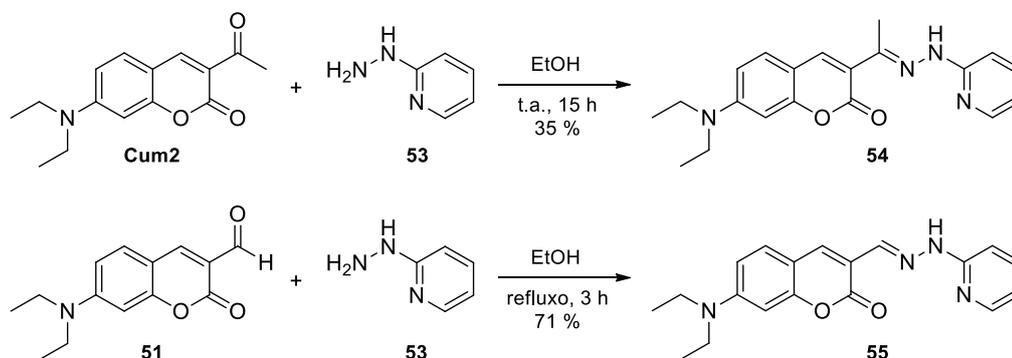


Figura 11. Variação na intensidade de fluorescência de **52** em 498 nm com e sem  $\text{Cr}^{3+}$  em função do pH.<sup>26</sup>

O sensor desenvolvido por Wang e colaboradores<sup>27</sup> também apresenta uma resposta analítica de aumento da fluorescência devido a sua coordenação com  $\text{Zn(II)}$ . Sensores fluorescentes de  $\text{Zn(II)}$ , geralmente, apresentam uma dificuldade em discriminar  $\text{Zn(II)}$  e  $\text{Cd(II)}$ , porém, este sensor se demonstrou capaz de discriminá-los. O sensor **54** foi sintetizado pela reação de condensação entre a 3-acetil-7-(*N,N*-dietilamino)-2*H*-cromen-2-ona (**Cum2**) e a 2-hidrazinilpiridina (**53**) (Esquema 14).



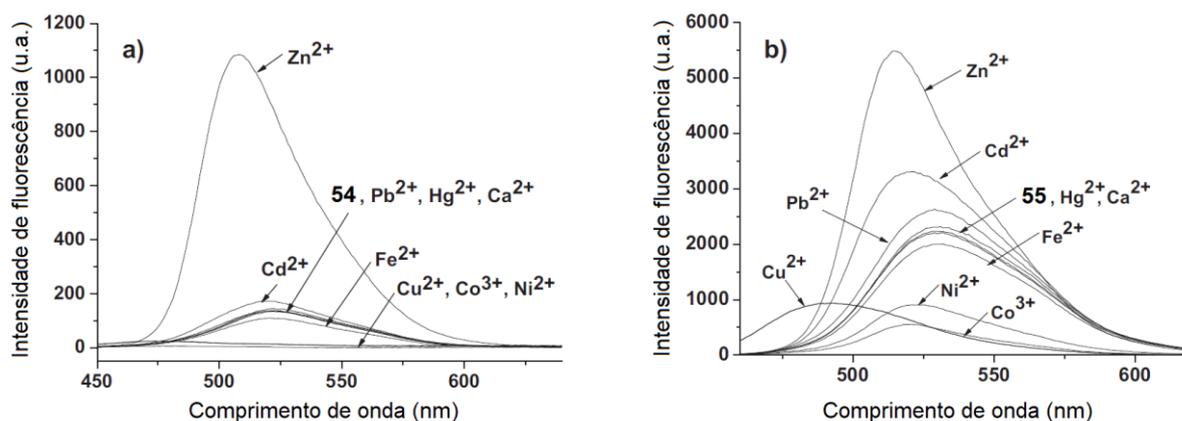
Esquema 14. Síntese da (*E*)-7-(dietilamino)-3-(1-(2-(piridin-2-il)hidrazono)etil)-2*H*-cromen-2-ona (**54**) e da (*E*)-7-(dietilamino)-3-(2-(piridin-2-il)hidrazono)metil)-2*H*-cromen-2-ona (**55**).

A partir do derivado 7-(*N,N*-dietilamino)-2-oxo-2*H*-cromeno-3-carbaldeído (**51**), foi sintetizado o análogo **55** (Esquema 14) e ao submeter os derivados **54** e **55** à avaliação de seletividade para  $\text{Zn(II)}$ , observaram que apenas o primeiro discriminava o  $\text{Zn(II)}$  de  $\text{Cd(II)}$  (Figura 12), indicando que a presença do grupo metila em **54** foi suficiente para sintonizar a afinidade do sensor por  $\text{Zn(II)}$  através de um pequeno controle conformacional. É possível observar através das constantes de ligação (Tabela 1), determinadas computacionalmente, que a diferença de afinidade de **54** por  $\text{Zn}^{2+}$  e  $\text{Cd}^{2+}$  possui uma diferença na ordem de 100, enquanto que **55** não apresenta grande distinção de afinidade.<sup>27</sup>

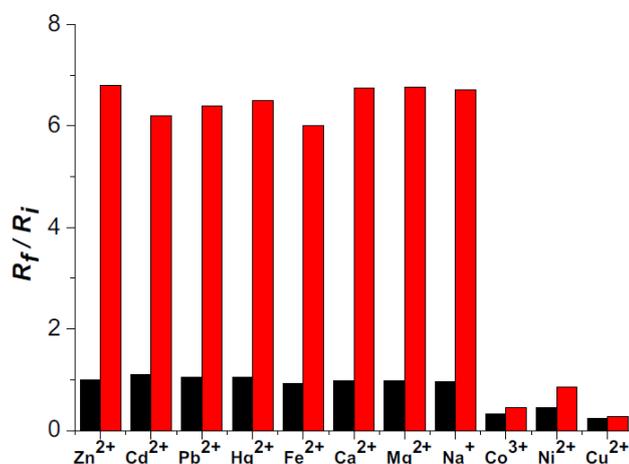
<sup>27</sup> Wu, J.; Sheng, R.; Liu, W.; Wang, P.; Zhang, H.; Ma, J. *Tetrahedron*. **2012**, *68*, 5458.

Tabela 1. Constantes de ligação de **54** e **55**.<sup>27</sup>

Sensor	Íon metálico	Constante de ligação ( $M^{-1}$ )	Sensor	Íon metálico	Constante de ligação ( $M^{-2}$ )
<b>54</b>	$Zn^{2+}$	$3,3 \times 10^6$	<b>55</b>	$Zn^{2+}$	$1,2 \times 10^8$
	$Cd^{2+}$	$5,5 \times 10^4$		$Cd^{2+}$	$7,5 \times 10^7$

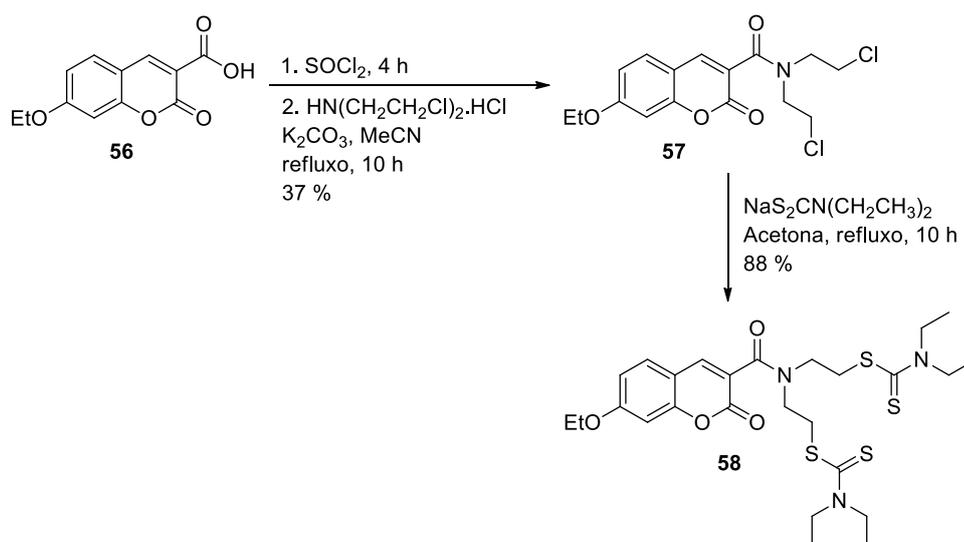
Figura 12. Espectro de emissão a) **54** (10  $\mu M$ ) e b) **55** (10  $\mu M$ ) ambos sob adição de íons metálicos 3 eq.<sup>27</sup>

O aumento da fluorescência do sensor **54** também ocorre pela restrição de rotação da ligação C=N e supressão da sua isomerização.<sup>27</sup> Na presença de  $Zn^{2+}$ , o sensor **54** apresenta um deslocamento da banda de absorção centrada em 418 nm para 466 nm. Já o máximo de emissão do sensor livre em 523 nm é deslocado para 509 nm quando adicionado  $Zn^{2+}$ . Na avaliação da resposta do sensor com outros íons metálicos (Figura 13), foi possível observar a supressão da fluorescência com  $Co^{3+}$ ,  $Cu^{2+}$  e  $Ni^{2+}$ , além disso, a coexistência do  $Zn^{2+}$  com estes íons metálicos não interferiu na fluorescência suprimida. O fenômeno de supressão apresentado pelos íons metálicos foi atribuído ao mecanismo de TCLM com a camada *d* semi-preenchida destes cátions.<sup>27</sup>

Figura 13. Intensidade de fluorescência relativa de **54** (10  $\mu M$ ) para  $Zn^{2+}$  na ausência (primeira barra) e presença (segunda barra) de vários íons competidores (30  $\mu M$ ), sob excitação em 432 nm.<sup>27</sup>

Pelo método de Job, foram determinadas as estequiometrias de **54** e **55** com Zn(II) como 1:1 e 2:1, respectivamente. Por fim, o sensor foi aplicado no imageamento de células HepG2, observando uma leve emissão quando incubada com **54** e 5 eq. de perclorato de zinco (II) por 6 minutos e uma intensidade mais expressiva quando incubada por 15 minutos.<sup>27</sup>

O aumento da intensidade de fluorescência também foi observado no sensor desenvolvido por Chen e colaboradores.<sup>28</sup> O sensor foi preparado a partir do ácido 7-etoxi-2-oxo-2H-cromeno-3-carboxílico (**56**) com a inserção de um grupamento ditiocarbamato que funcionou como receptor seletivo de Ag<sup>+</sup> (Esquema 15).



Esquema 15. Síntese do sensor para Ag<sup>+</sup> **58**.

O sensor **58** apresentou uma baixa fluorescência devido ao fenômeno de transferência de elétrons fotoinduzida (TEF). No fenômeno de TEF, a excitação do sensor provoca a transferência de um elétron do ditiocarbamato para a cumarina, reduzindo sua fluorescência. A coordenação do ditiocarbamato com Ag<sup>+</sup> restringe a transferência de elétron no estado excitado e provoca o aumento da fluorescência, CHEF (*Chelation-Enhanced Fluorescence*) do sensor em 406 nm.<sup>28</sup>

Em análise do sensor **58** com outros íons metálicos, foi possível observar que apenas a Ag<sup>+</sup> gerava uma resposta analítica detectável e que a mistura de outros íons com Ag<sup>+</sup> não interferiram nesta resposta. A resposta do sensor **58** diante de Ag<sup>+</sup> se apresentou estável na faixa de pH de 5 – 8 e a estequiometria atribuída para **58**-Ag<sup>+</sup> foi de 1:1. O sensor demonstrou uma resposta instantânea, alcançando a intensidade máxima de fluorescência à medida que a Ag<sup>+</sup> foi adicionada, mantendo a intensidade estável por 10 min (Figura 14).<sup>28</sup>

<sup>28</sup> Chen, G F.; Liu, L.; Wu, J. L.; Wu, S. J.; Chen, B. H. *Res. Chem. Intermed.* **2018**, *44*, 1381.

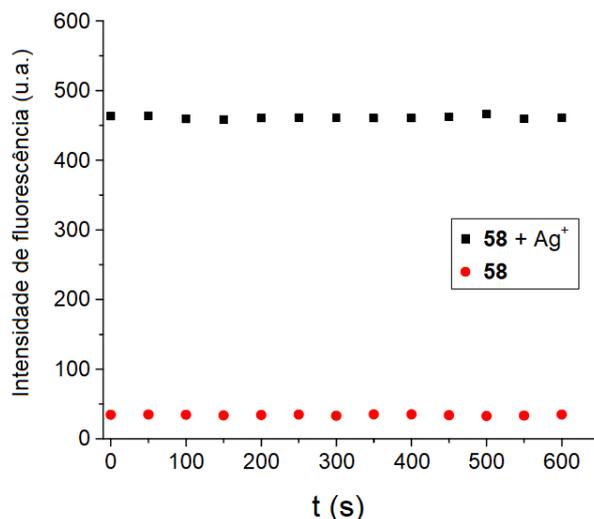
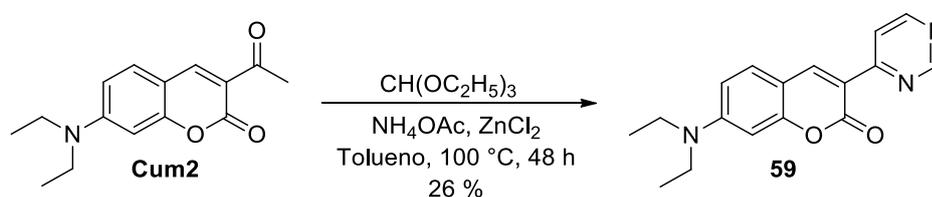


Figura 14. Variação de intensidade de fluorescência de **58** e **58** + Ag<sup>+</sup> em 600 s.<sup>28</sup>

Como exemplo de sensores que apresentam como resposta analítica o deslocamento do comprimento de onda de emissão de fluorescência, tem-se o sensor desenvolvido por Goswami e colaboradores<sup>29</sup>. O sensor foi sintetizado a partir do acoplamento de três componentes catalisado por ZnCl<sub>2</sub> entre a 3-acetil-7-(*N,N*-dietilamino)-2*H*-cromen-2-ona com o ortoformiato de etila e o acetato de amônio (Esquema 16).



Esquema 16. Síntese da 7-(dietilamino)-3-(pirimidin-4-il)-2*H*-cromen-2-ona.

O sensor **59** livre e com os demais íons metálicos analisados, em MeCN/HEPES (7:3, v/v), apresentou uma coloração amarelo devido à sua absorbância em 445 nm, exibindo uma mudança colorimétrica para o laranja devido ao deslocamento de absorção para 525 nm na presença de Hg<sup>2+</sup> (Figura 15a). A resposta fluorimétrica do sensor livre exibiu uma boa intensidade de fluorescência em 509 nm, mantendo a intensidade similar na presença das demais espécies metálicas; com Hg<sup>2+</sup>, a intensidade em 509 nm foi suprimida enquanto uma curva de baixa intensidade em 575 nm surgiu com 11,3 μM de Hg<sup>2+</sup>, mudando a coloração de emissão do amarelo para o laranja (Figura 15b).<sup>29</sup>

<sup>29</sup> Goswami, S.; Das, A. K.; Maity, S. *Dalton Trans.* **2013**, *42*, 16259.

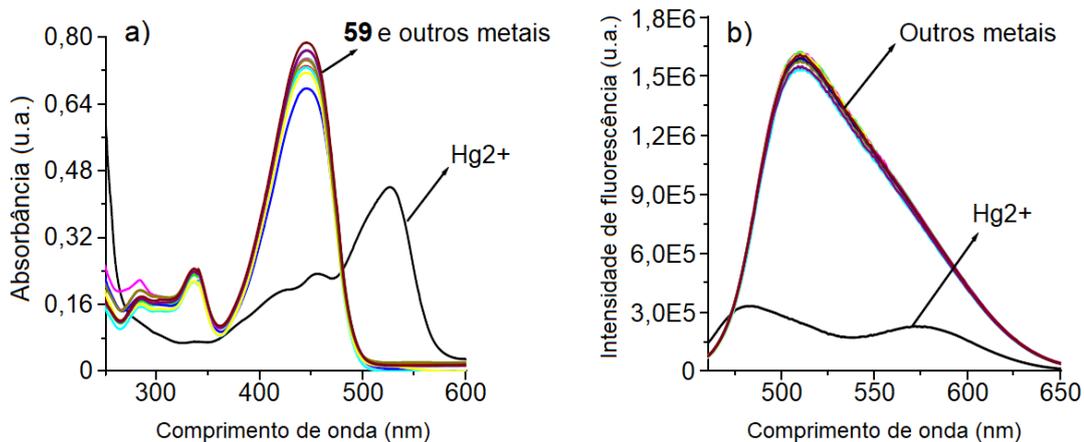
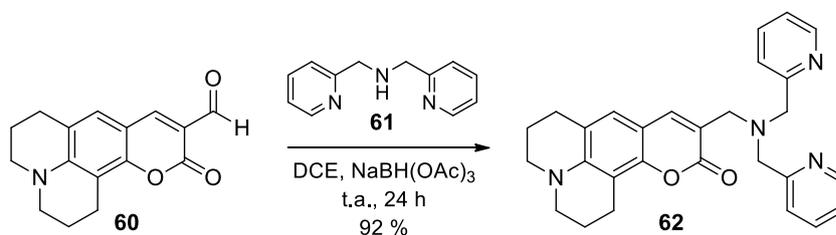


Figura 15. Espectros de **a**) absorção e **b**) emissão (excitação de 445 nm) de **59** na presença de 10 eq. de diferentes íons metálicos ( $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$ ), adaptado de Goswami e colaboradores.<sup>29</sup>

A supressão da emissão em 509 nm foi atribuída ao fenômeno de transferência de elétron fotoinduzida do par de elétrons livres do nitrogênio da porção *N,N*-dietilamino para a porção cumarínica. O surgimento de uma nova banda de emissão foi referido à planaridade do sensor conferida pela coordenação com  $\text{Hg}^{2+}$  e pelo favorecimento do fenômeno de *push-pull* entre o grupo dietilamino na posição-7 para a porção pirimidínica na posição-3 da cumarina.<sup>29</sup>

Não foi observado alteração na resposta analítica com outros íons metálicos coexistindo com  $\text{Hg}^{2+}$ . Foram estipulados dois limites de detecção, 5,9  $\mu\text{M}$  baseado na absorbância e 10  $\mu\text{M}$  baseado na fluorescência. Goswami e colaboradores ainda desenvolveram um kit de teste colorimétrico revestindo papel de filtro com o sensor **59**, que ao ser pulverizado com soluções aquosas de diferentes íons metálicos apresentou mudança colorimétrica seletiva para  $\text{Hg}^{2+}$ .<sup>29</sup>

O mesmo tipo de resposta foi observado no sensor desenvolvido por Brückner e colaboradores,<sup>30</sup> o qual também apresentou um deslocamento do comprimento de onda de absorção máxima. O sensor fluorescente para  $\text{Zn}^{2+}$  foi preparado a partir da condensação entre a cumarina **60** e a di(2-picolil)amina (**61**), seguido de redução da imina formada (Esquema 17).



Esquema 17. Síntese do sensor para  $\text{Zn}^{2+}$  **62**.

<sup>30</sup> Lim, N. C.; Brückner, C. *Chem. Commun.* **2004**, 0, 1094.

O sensor **62** apresentou um deslocamento no perfil de absorção de 31 nm e de 21 nm nas curvas de emissão na presença de  $Zn^{2+}$  (Figura 16). Observaram que o íon  $Ni^{2+}$  interfere na resposta do  $Zn^{2+}$ , suprimindo a fluorescência do sensor, além disso, o íon  $Cd^{2+}$  apresentou uma resposta semelhante à do  $Zn^{2+}$ , porém, como  $Cd(II)$  é uma espécie encontrada em baixa concentração em células saudáveis, na prática, atribuíram que a presença deste íon não interferiria na determinação de  $Zn^{2+}$  em células vivas.<sup>30</sup>

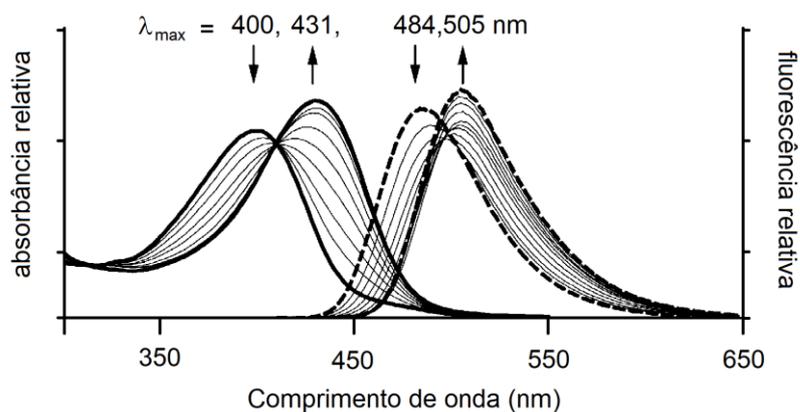


Figura 16. Respostas de UV-vis e fluorescência em titulação de **62** com  $Zn^{2+}$  (0 -1 eq.), sob excitação em 410 nm.<sup>30</sup>

## **2. Objetivos**

### **2.1. Objetivos gerais**

Esta dissertação teve como objetivo geral a síntese e caracterização de derivados biscumarínicos fluorescentes com expectativa de coordenação-resposta analítica de fluorescência seletiva para íons metálicos.

### **2.2. Objetivos específicos**

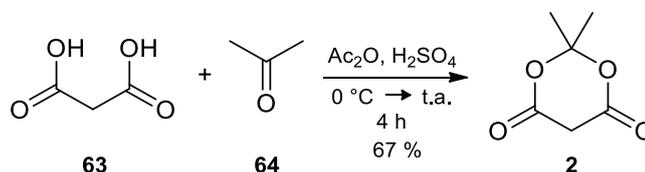
- ⇒ Síntese de derivados carboxílico e cetônico de cumarina 7-(*N,N*-dietilamina) substituída;
- ⇒ Síntese de derivados biscumarínicos através de reações de acoplamento amídico e de condensação de diaminas terminais com dois equivalentes dos derivados de cumarina;
- ⇒ Avaliação do potencial de complexação dos derivados biscumarínicos com íons metálicos acessíveis, esperando-se uma resposta analítica seletiva para alguma espécie metálica.

### 3. Resultados e discussões

#### 3.1. Síntese dos derivados de cumarina

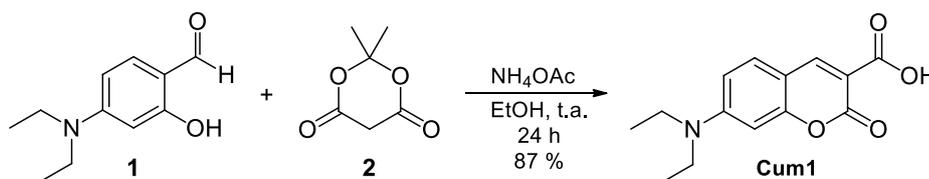
A síntese dos derivados de cumarina foi baseada na condensação de Knoevenagel, utilizando-se o 4-(*N,N*-dietilamino)salicilaldeído (**1**) como reagente comum e variando o composto 1,3-dicarbonílico: o ácido de Meldrum (**2**), para obtenção do derivado carboxílico **Cum1**, e o acetoacetato de etila (**3**), para obtenção do derivado cetônico **Cum2**.

O ácido de Meldrum foi previamente obtido a partir da condensação do ácido malônico (**63**) e da acetona (**64**), sob catálise ácida e adição lenta da acetona (Esquema 18).<sup>31</sup> A solução reacional, após agitação por 4h, foi mantida refrigerada por uma noite e os cristais formados foram filtrados a vácuo e lavados com água gelada, obtendo-se o produto puro em 67 % de rendimento.



Esquema 18. Síntese do ácido de Meldrum.

A síntese do derivado **Cum1** foi adaptada do procedimento descrito por Lam e colaboradores, utilizando-se o acetato de amônio, em vez de acetato de piperidina.<sup>21</sup> Uma solução de 4-(*N,N*-dietilamino)salicilaldeído (**1**) e 1,5 eq. do ácido de Meldrum, em etanol, foi mantida sob agitação e em temperatura ambiente por 24 h, com quantidade catalítica de acetato de amônio (Esquema 19). O produto formado precipita em etanol na forma de sólido laranja amorfo, o qual foi filtrado a vácuo e lavado com etanol gelado, obtendo-se o produto em 87 % de rendimento, sendo utilizado posteriormente sem purificação prévia.

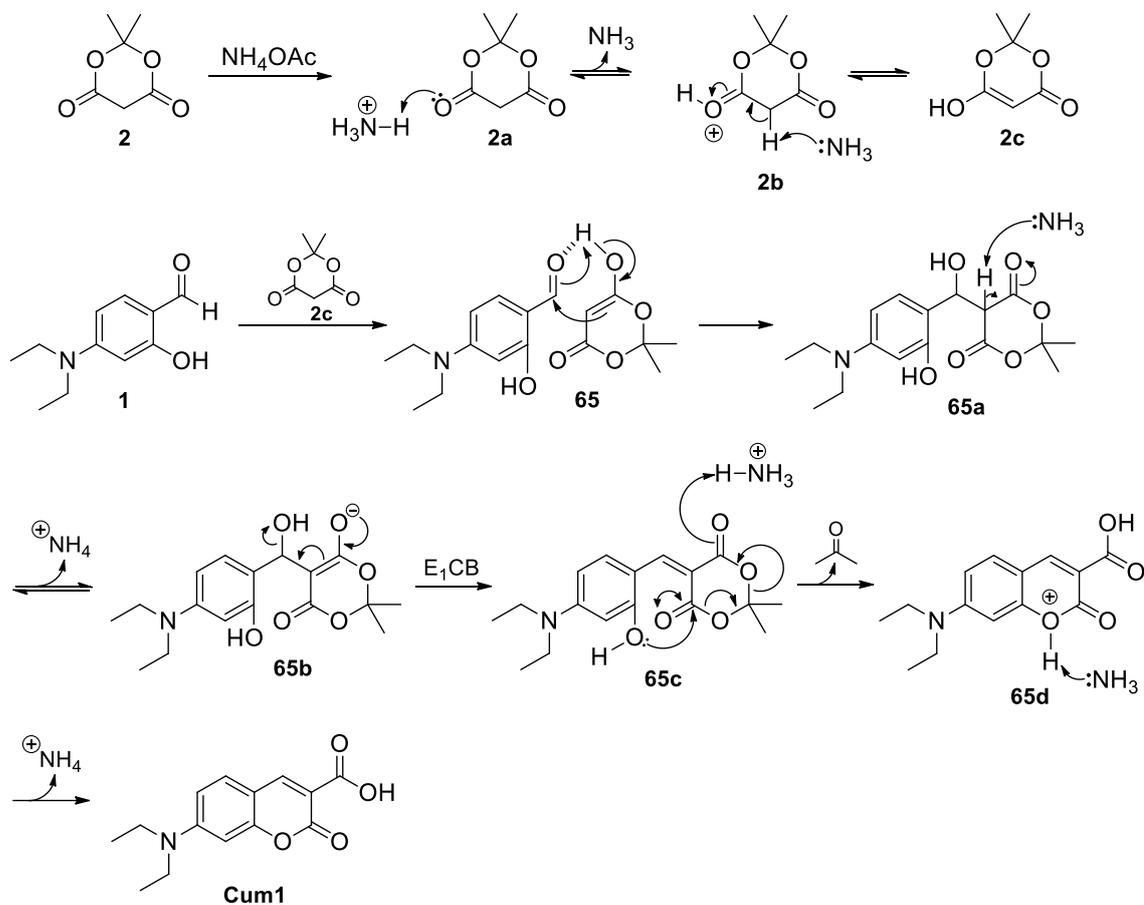


Esquema 19. Síntese do derivado **Cum1**.

A proposta mecanística de formação de **Cum1** (Esquema 20), segundo a reação de Knoevenagel, se inicia pela formação do enol do ácido de Meldrum (**2c**). Em seguida, o enol se adiciona à carbonila do salicilaldeído (**65**) e o intermediário **65a** sofre uma desidratação pelo mecanismo de E<sub>1</sub>CB, formando o intermediário  $\alpha,\beta$ -insaturado **65c**. A formação do núcleo benzopirano é dada pelo ataque nucleofílico do oxigênio da hidroxila ao sítio eletrofílico da carbonila do ácido de Meldrum,

<sup>31</sup> Xiao, J.; Feng, L.; Zhou, L.; Gao, H.; Zhang, Y. Yang, K. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, 59, 150.

sucedido pela eliminação de acetona (**65c**) e reconstituição do catalisador  $\text{NH}_4^+$  e formação do produto após neutralização do oxônio (**65d**).



Esquema 20. Proposta mecanística para formação de **Cum1**.

Cumarinas com grupos substituintes na posição 3 podem ser identificadas por espectro de RMN  $^1\text{H}$  através do simpleto característico na região próxima a 8,50 ppm, correspondente ao hidrogênio (H4) da insaturação  $\alpha,\beta$  do núcleo cumarínico. A metodologia abordada se mostrou eficaz, sendo possível observar a formação do produto no espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **Cum1** (Figura 17), que contém o simpleto característico em 8,63 ppm. A atribuição dos sinais de RMN  $^1\text{H}$  está resumida na Tabela 2.

A fim de exemplificar o comportamento espectroscópico das cumarinas e biscumarinas contidas nesta dissertação, serão discutidas as atribuições dos sinais dos espectros de RMN ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , HSQC e HMBC) para a cumarina **Cum1**.

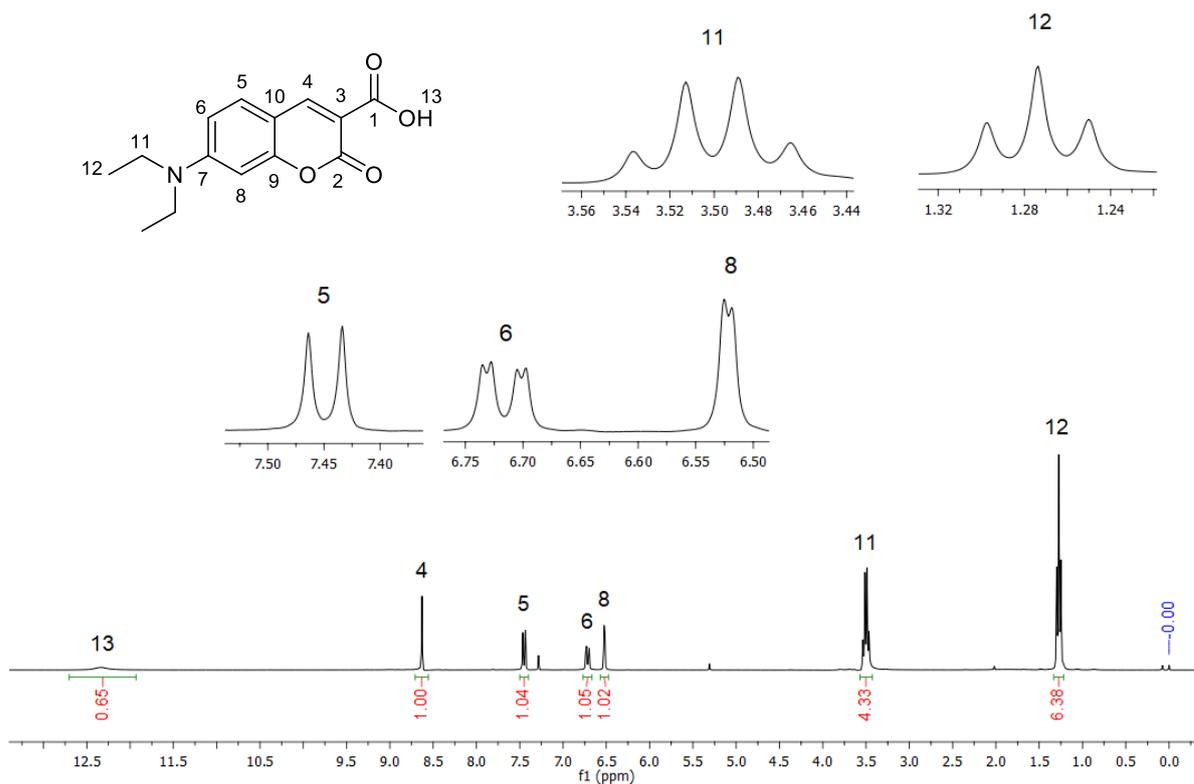


Figura 17. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  300 MHz (em  $\text{CDCl}_3$ ) do composto **Cum1**.

Tabela 2. Atribuição dos sinais do espectro de RMN  $^1\text{H}$  aos H's correspondentes de **Cum1**.

Núcleo correspondente	$\delta$ (ppm)	Multiplicidade	Integração	$J$ (Hz)
13	12,34	s	1	
4	8,63	s	1	
5	7,45	d	1	9,0
6	6,72	dd	1	$J_1 = 9,1$ $J_2 = 2,2$
8	6,53	d	1	2,1
11	3,50	q	4	7,3
12	1,27	t	6	7,0

No espectro de RMN  $^1\text{H}$ , além do simpleto característico em 8,63 ppm (H4), é possível observar um sinal lábil em 12,34 ppm atribuído ao H13 do ácido carboxílico. A atribuição dos hidrogênios aromáticos (H5, H6 e H8) foi baseada na multiplicidade dos sinais. O duplete em 7,45 ppm foi atribuído

ao H5 por conta do seu acoplamento com H6. O duplo-dupletto em 6,72 ppm foi atribuído ao H6 devido ao seu acoplamento com H5 e seu acoplamento a longa distância com H11. Esperar-se-ia um simpleto relativo ao H8, mas devido ao acoplamento a longa distância com H11 é observado um dupletto em 6,53 ppm. Os hidrogênios H11 e H12 foram atribuídos pela multiplicidade e integração de seus sinais. O quarteto em 3,50 ppm, integração 4, é referente ao H11, e o tripleso em 1,27 ppm, integração 6, ao H12.

No espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 18), por sua vez, é possível observar a formação do produto através dos sinais referentes às carbonilas do ácido carboxílico e da lactona, 165,5 (C1) e 164,4 ppm (C2), respectivamente. A atribuição destes dois sinais foi baseada no deslocamento do sinal referente à carboxila na presença de trietilamina, que ao formar o carboxilato deslocou o sinal em 165,5 ppm para 167,0 ppm e o sinal em 164,4 ppm para 163,1 ppm. A atribuição dos demais sinais do RMN  $^{13}\text{C}$  foi obtida por meio de análises bidimensionais, HSQC e HMBC, discutidas adiante.

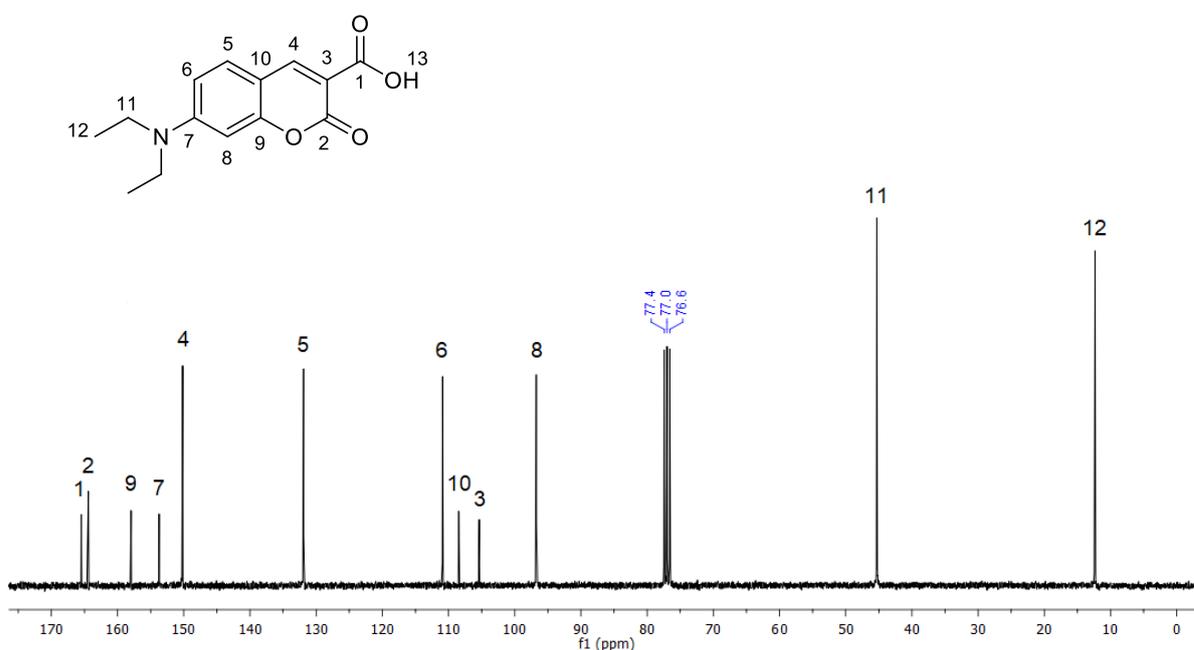


Figura 18. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  75,46 MHz (em  $\text{CDCl}_3$ ) do composto **Cum1**.

Pela análise de RMN bidimensional heteronuclear HSQC (Figura 19) e suas informações de acoplamento a uma ligação,  $^1\text{J H-C}$ , foi possível atribuir os sinais relativos aos carbonos aromáticos C5, C6, C8 e aos carbonos C4, C11 e C12. As correlações extraídas do HSQC estão organizadas na Tabela 3.

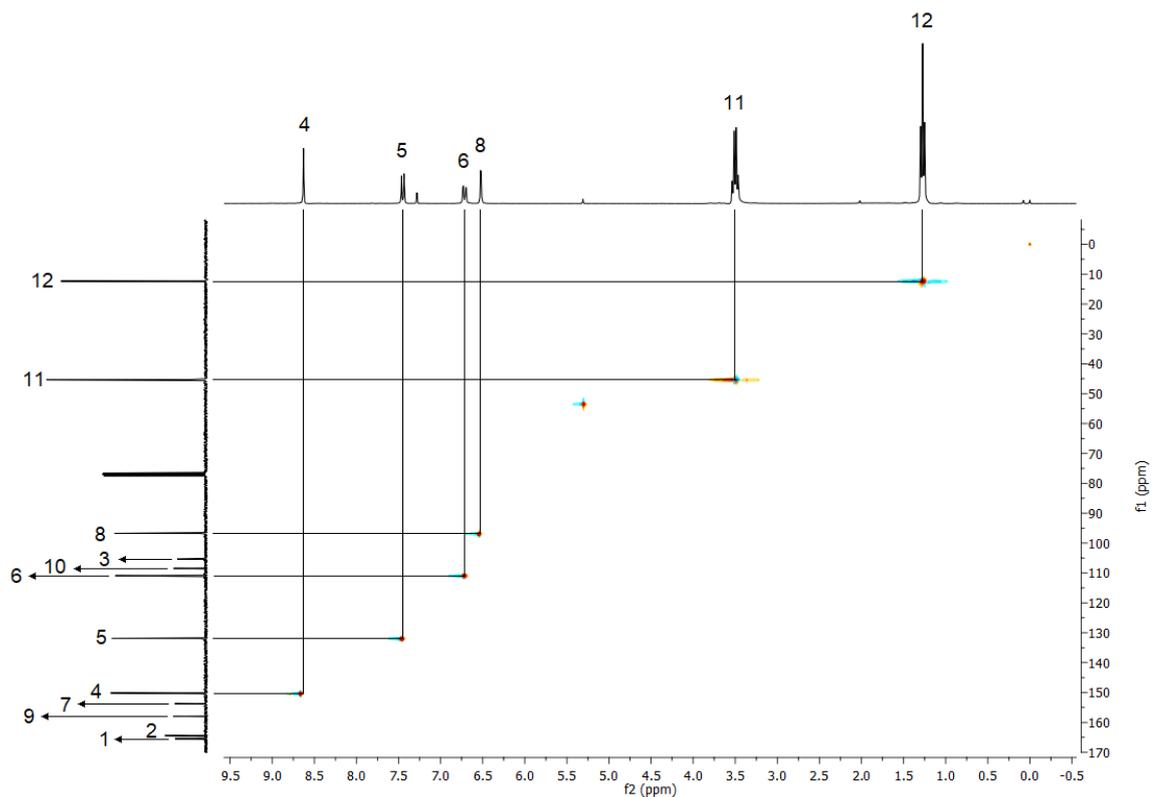
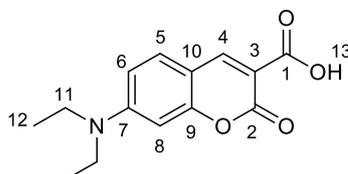


Figura 19. Espectro de RMN-HSQC 600 MHz (em  $\text{CDCl}_3$ ) do composto **Cum1**.

Tabela 3. Correlações heteronucleares  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  observadas no espectro de RMN-HSQC.



$^1\text{H}$	$\delta$ (ppm) $^1\text{H}$ (multi., integração)	$\delta$ (ppm) $^{13}\text{C}$
4	8,63 (s, 1H)	150,2
5	7,45 (d, 1H)	131,9
6	6,72 (dd, 1H)	110,9
8	6,53 (d, 1H)	96,7
11	3,50 (q, 4H)	45,3
12	1,27 (t, 6H)	12,3

Por meio da análise bidimensional heteronuclear HMBC (Figura 20) e avaliação das conectividades através dos acoplamentos  $^2J$ ,  $^3J$  e  $^4J$  entre os núcleos  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , apresentados na Tabela 4, foi possível atribuir os demais sinais dos carbonos: C3, C7, C9 e C10.

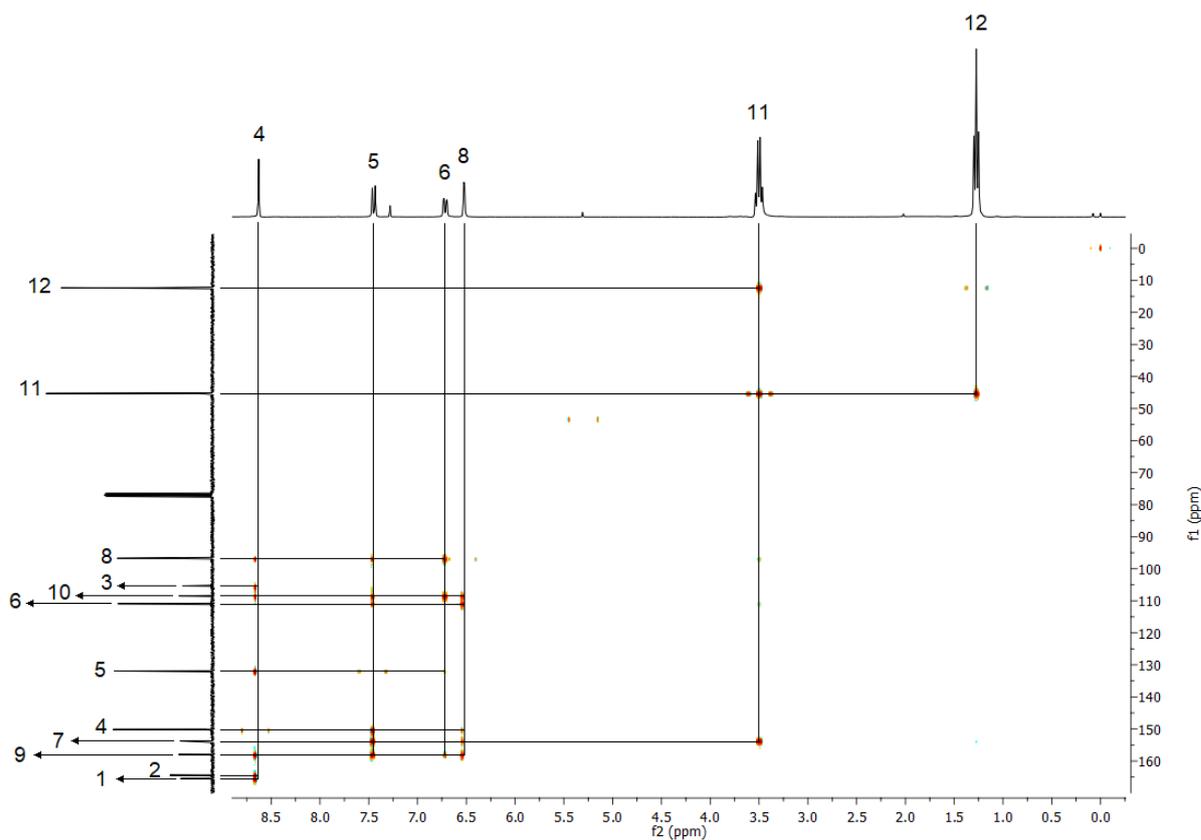
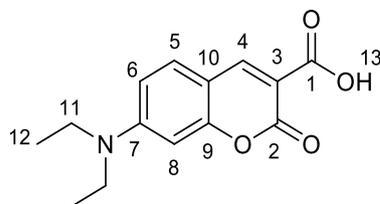


Figura 20. Espectro de RMN-HMBC 600 MHz (em  $\text{CDCl}_3$ ) do composto **Cum1**.

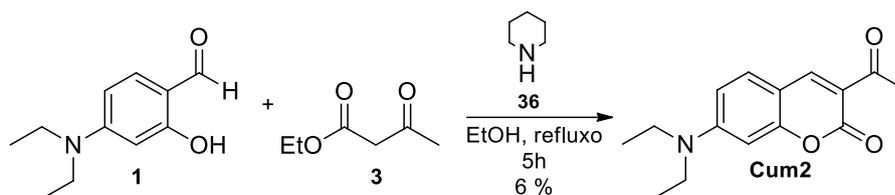
Tabela 4. Correlações heteronucleares  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  observadas no espectro de RMN-HMBC.



$^1\text{H}$ ( $\delta$ )	Carbono a $^2\text{J}$ ( $\delta$ )	Carbono a $^3\text{J}$ ( $\delta$ )	Carbono a $^4\text{J}$ ( $\delta$ )
4 (8,63 ppm)	C3 (105,4) e C10 (108,5)	C1 (165,5), C2 (164,4), C5 (131,9), C9 (158,0)	C8 (96,7)
5 (7,45 ppm)	C6 (110,9) e C10	C4 (150,2), C7 (153,7), C9	C8
6 (6,72 ppm)	C5 e C7*	C8 e C10	C9
8 (6,53 ppm)	C7 e C9	C6 e C10	C4
11 (3,50 ppm)	C12 (12,3)	C7	
12 (1,27 ppm)	C11 (45,3)		

Considerando as atribuições obtidas para a cumarina **Cum1**, por analogia, foram feitas as atribuições das demais cumarinas e biscumarinas.

A síntese do derivado **Cum2** foi baseada no procedimento descrito por Wang e colaboradores,<sup>27</sup> em que uma solução etanólica contendo o salicilaldeído substituído (**1**), 1,5 eq. de acetoacetato de etila (**3**) e uma quantidade catalítica de piperidina é mantida sob agitação e refluxo por 5 h (Esquema 21). Na primeira tentativa, optou-se por utilizar um método de purificação diferente do descrito pelos autores devido à pouca massa obtida para realizar uma recristalização, assim, o produto foi obtido em 6 % de rendimento após purificado via coluna cromatográfica (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> → 2% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), diferenciando-se do rendimento relatado pelos autores de 82 %.



Avaliou-se, então, a influência do tempo reacional sobre o rendimento, deixando a reação sob refluxo por 16 h. Observou-se um incremento na formação do produto, obtendo-o em 21 % de rendimento após purificado por coluna cromatográfica (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> → 2% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), porém, não foi o suficiente para alcançar o alto rendimento descrito pelos autores.

Em uma análise mais crítica do procedimento, observou-se que o solvente utilizado era etanol absoluto. Com isso, considerou-se que a concentração de água no etanol utilizado estaria comprometendo a formação do produto da reação. Com o intuito de avaliar a influência da água na formação do derivado **Cum2**, decidiu-se realizar a reação em metanol, considerando a sua menor concentração de água quando não anidro em relação ao etanol.<sup>32</sup> Em um tempo reacional de 16 h, o produto foi obtido em 51 % de rendimento, após recristalização em MeOH, e em outra reprodução com tempo reacional de 24 h, foi possível obter o produto em 67 %. A reação ainda foi realizada em etanol seco, em refluxo por 16 h, obtendo o produto puro, após recristalização em EtOH, em 86 % de rendimento. Os resultados obtidos estão resumidos na Tabela 5.

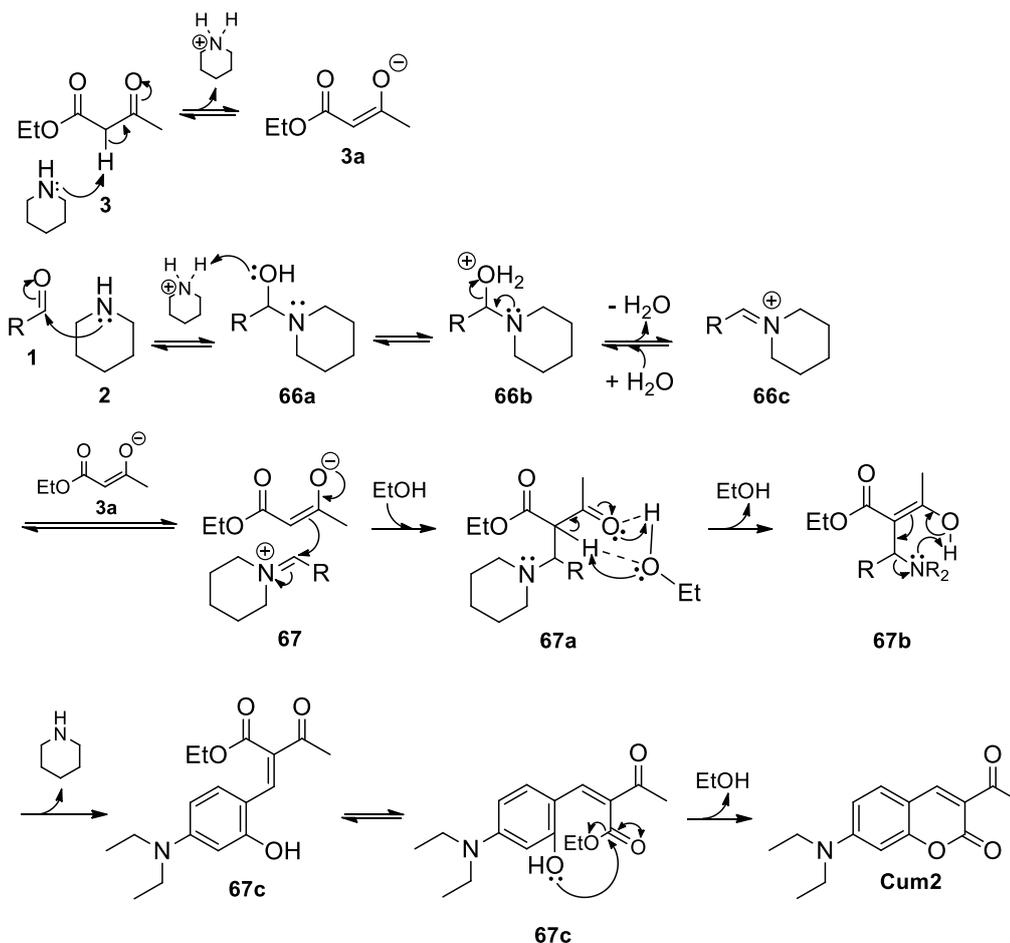
Tabela 5. Avaliação metodológica na síntese de **Cum2**.

Entrada	Condição experimental	Purificação	Rendimento (%)
1	EtOH, 5 h	Coluna cromatográfica	6
2	EtOH, 16 h	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> → 2% MeOH/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	21
3	MeOH, 16 h	Recristalização em MeOH	51
4	MeOH, 24 h	Recristalização em MeOH	67
5	EtOH seco, 16 h	Recristalização em EtOH	86

<sup>32</sup> Williams, D. B. G.; Lawton, M. J. *Org. Chem.* **2010**, *75*, 8351.

A formação do derivado **Cum2** foi identificada pelo espectro de RMN  $^1\text{H}$  pelo simpleto em 8,44 ppm, integração 1H, e do simpleto intenso em 2,68 ppm, integração 3H, que indicam a formação da cumarina e a metila  $\alpha$  à carbonila da cetona. Além disso, pelo espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  foi possível corroborar a presença da cetona pelo seu sinal característico em 195,8 ppm.

A influência da água na formação deste derivado de cumarina fica evidente ao considerar o mecanismo proposto no Esquema 22 abaixo, no qual se nota que a presença de água desloca o equilíbrio no sentido do consumo do íon imínio (**66c**), sendo este um intermediário essencial para o progresso da reação.

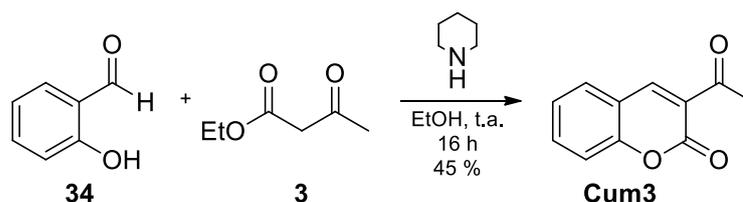


Esquema 22. Proposta mecanística de formação do composto **Cum2**.

A reação é iniciada pela formação do íon imínio (**66c**) pela adição nucleofílica do nitrogênio da piperidina ao sítio eletrofílico da carbonila do salicilaldeído, com subsequente perda de água. A piperidina, agindo como base, retira o hidrogênio ácido do composto 1,3-dicarbônico (**3**) formando seu enolato, que, ao reconstituir a carbonila, ataca o intermediário imínio e reestabelece sua neutralidade em **67a**. A piperidina é reconstituída a partir da troca de hidrogênio entre o intermediário **67a** com o solvente, seguido de prototropismo proposto em **67b**, formando o intermediário  $\alpha,\beta$ -insaturado **67c**. A lactonização é dada similarmente à do derivado **Cum1**, formando neste caso o derivado cetônico **Cum2**.

Além dos derivados fluorescentes apresentados, foi considerada a síntese de um derivado simplificado da cumarina cetônica para avaliar a metodologia de preparação dos derivados biscumarínicos de imina, devido às dificuldades iniciais apresentadas na tentativa de preparar a imina com **Cum2**, as quais serão apresentadas posteriormente.

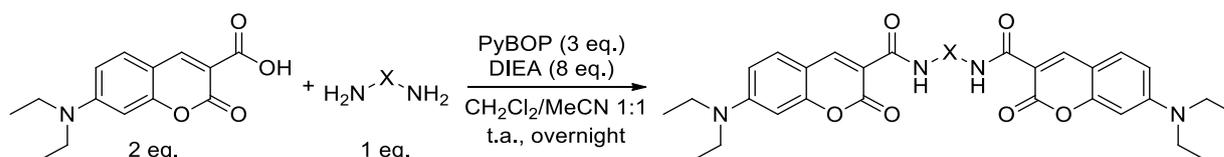
Deste modo, o derivado **Cum3** foi preparado pela metodologia descrita por Koorbanally e colaboradores (Esquema 23),<sup>33</sup> a partir de uma solução etanólica contendo o salicilaldeído (**34**), não destilado, com 1,1 eq. do acetoacetato de etila, catalisado por piperidina. A solução foi mantida sob agitação e temperatura ambiente por 16 h. O precipitado branco-amarelado foi filtrado e lavado com água e etanol gelados, obtendo o produto puro em 45 % de rendimento.



### 3.2. Síntese dos derivados biscumarínicos

#### 3.2.1. Síntese dos derivados amídicos

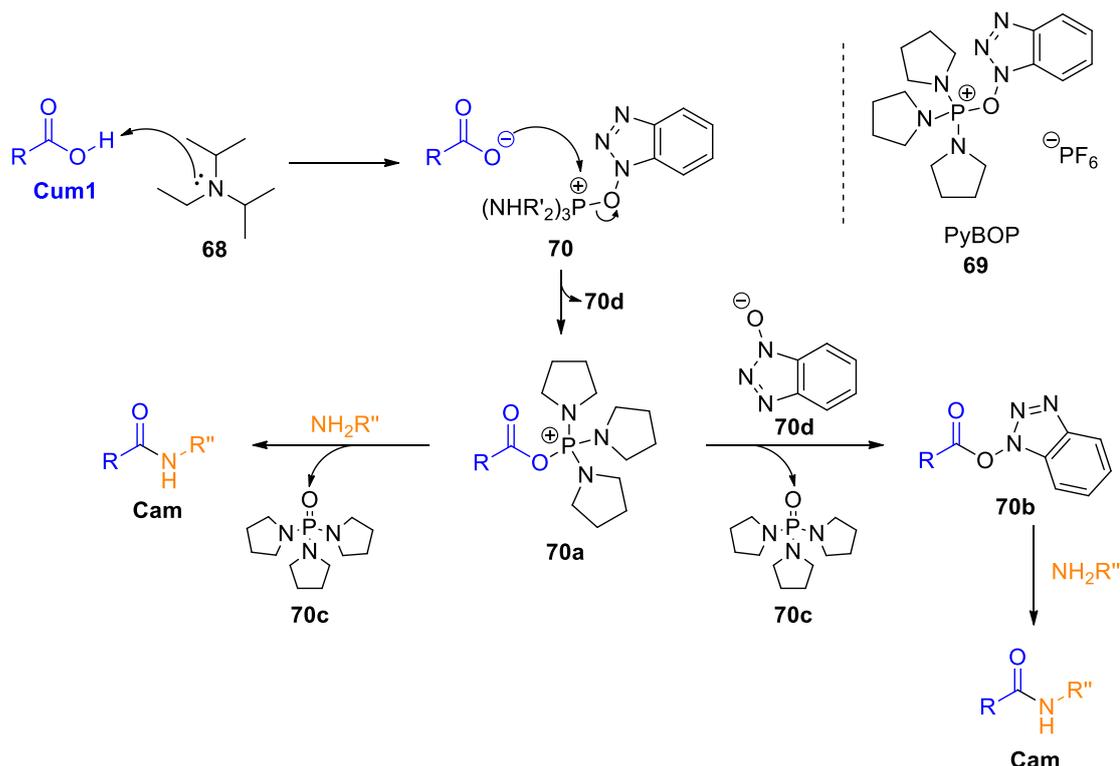
O desenvolvimento dos potenciais sensores fluorescentes foi iniciado pela síntese dos derivados biscumarínicos de amida, denominados de **Cam**. A primeira metodologia testada foi a descrita por Heping e colaboradores,<sup>34</sup> na qual sintetizaram biscumarinas através do acoplamento amídico entre o derivado de cumarina **Cum1** e diaminas com o auxílio do agente de acoplamento pyBOP (hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxitripirrolidino-fosfônio), representada no Esquema 24.



<sup>33</sup> Moodley, T.; Momin, M.; Mocktar, C.; Kannigadu, C.; Koorbanally, N. A. *Magn. Reson. Chem.* **2016**, *54*, 610.

<sup>34</sup> Chunfeng, Y.; Meixiang, L.; Wenyan, H.; Heping, Z. *Chinese J. Org. Chem.* **2011**, *31*, 2088.

A proposta mecanística de Hoeg-Jensen e colaboradores<sup>35</sup> para o acoplamento amídico por pyBOP (**69**) (Esquema 25) é iniciada pela abstração do hidrogênio do ácido carboxílico por uma base (DIEA **68**), formando seu carboxilato. O carboxilato, por sua vez, ataca o sítio de fosfônio do pyBOP, eliminando o benzotriazolato (**70d**). O éster ativado **70a** pode, então, sofrer um ataque nucleofílico da amina e do benzotriazolato, formando a amida de interesse e o carboxilato de benzotriazola (**70b**), respectivamente. O carboxilato de benzotriazola, como um éster ativado, também pode sofrer adição nucleofílica da amina para formação de amida. Como subproduto da adição nucleofílica é eliminado o óxido de tri(pirrolidin-1-il)fosfina (**70c**).



Esquema 25. Proposta mecanística para acoplamento via pyBOP.

Primeiramente, a metodologia de Heping e colaboradores foi reproduzida utilizando a etilenodiamina **4** para obtenção do derivado denominado **Cam1**, o qual foi obtido pelos autores em 80% de rendimento. O progresso da reação foi acompanhado via CCD, observando que, após 16 h de reação, o material de partida **Cum1** havia sido consumido, formando poucos subprodutos.

A etapa de work-up descrita por Heping e colaboradores consiste em simples evaporação do solvente e a purificação é dada por recristalização ou cromatografia em coluna, a depender das características dos produtos por eles obtidos. Foi incorporada uma etapa de extração no work-up da reação com o intuito de remover prováveis resíduos de pyBOP. A extração foi adaptada da descrita por Hawker e colaboradores,<sup>36</sup> em que o sólido obtido é solubilizado em AcOEt e lavado com água.

<sup>35</sup> Hoeg-Jensen, T.; Jakobsen, M. H.; Olsen, C. E.; Holm, A. *Tetrahedron Lett.* **1991**, 32, 7617.

<sup>36</sup> Robb, M. J.; Connal, L. A.; Lee, B. F.; Lynd, N. A.; Hawker, C. J. *Polym. Chem.* **2012**, 3, 1618.

Na etapa de extração, o produto obtido apresentou baixíssima solubilidade em AcOEt, utilizando-se, assim, solvente em grande quantidade, e mesmo assim sendo ineficaz na solubilização completa do produto. A fração orgânica com parte do produto solubilizado foi lavada com água, seca com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida e o sólido obtido foi purificado por cromatografia em coluna (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> → 2% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), obtendo-se o produto em 19 % de rendimento.

Por meio do espectro de RMN <sup>1</sup>H (Figura 21) do sólido obtido foi possível observar a presença dos picos relativos aos hidrogênios do produto desejado, corroborado pelo multiplete em 3,68 ppm referente ao hidrogênio α-amida (H14), evidenciando a eficiência de conversão da metodologia aplicada. Porém, observou-se a presença dos picos referentes ao fragmento pirrolidínico do pyBOP, revelando que a extração com AcOEt não foi eficaz.

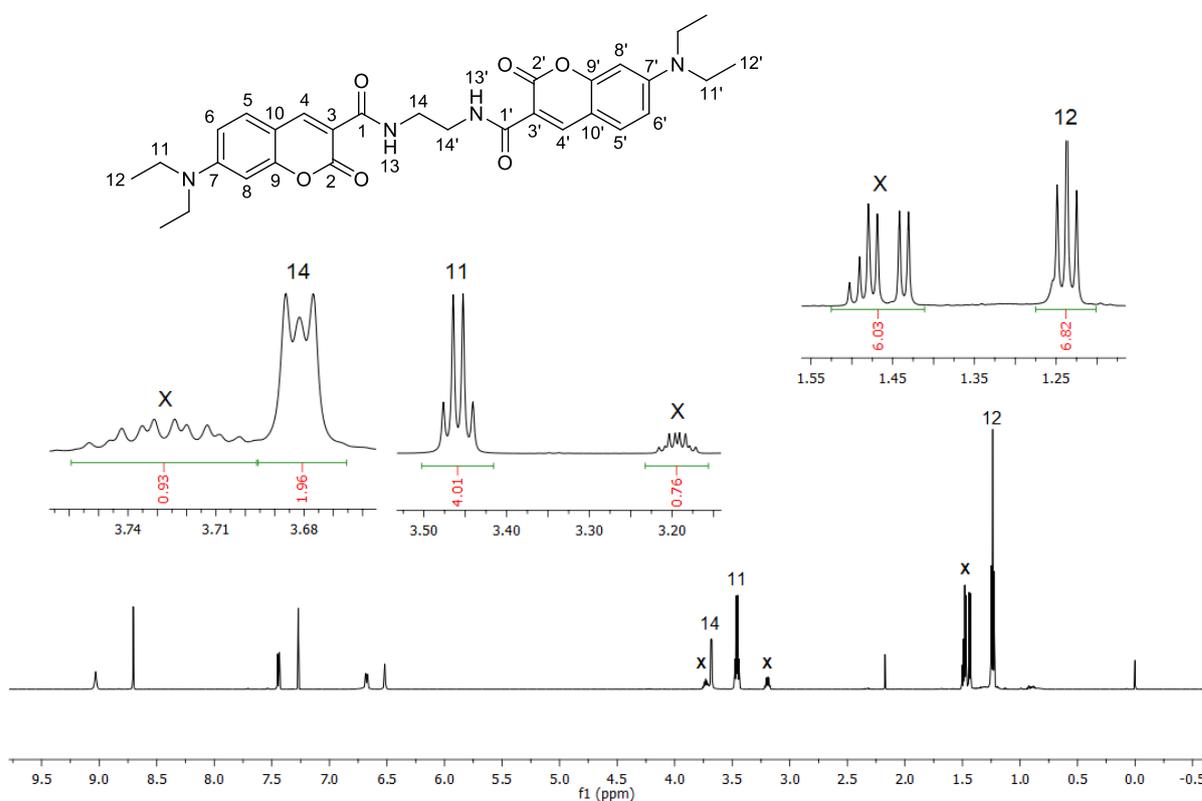


Figura 21. Espectro de RMN <sup>1</sup>H 600MHz (em CDCl<sub>3</sub>) do composto **Cam1** com sinais de resíduos de pyBOP.

Diante da adversidade em solubilizar o produto em AcOEt, em uma nova tentativa da reação, avaliou-se a solubilidade do produto em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> para prosseguir com a extração. O produto obtido foi purificado por cromatografia em coluna (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> → 2% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), porém, ainda se observou resquícios de pyBOP no espectro de RMN <sup>1</sup>H.

A partir deste resíduo sólido obtido, modificou-se a etapa de extração para uma descrita por Hawker e colaboradores,<sup>37</sup> em que se utiliza CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> como fase orgânica e esta é lavada com salmoura, H<sub>2</sub>O, sol. saturada de NaHCO<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>O e novamente salmoura. A fração orgânica foi seca com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

<sup>37</sup> Fors. B. P.; Poelma, J. E.; Menyo, M. S.; Robb, M. J.; Spokoyny, D. M.; Kramer, J. W.; Waite, J. H.; Hawker, C. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 14106.

anidro, filtrado e concentrado sob pressão reduzida. O produto foi purificado por cromatografia em coluna ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2 \rightarrow 2\% \text{ MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ). Através do espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 22) foi possível observar a formação do produto pelo multiplete característico em 3,68 ppm (14) e notou-se a ausência dos picos referentes ao resíduo de pyBOP, obtendo-se assim o produto desejado com 27% de rendimento após duas etapas extrações e duas purificações por cromatografia em coluna.

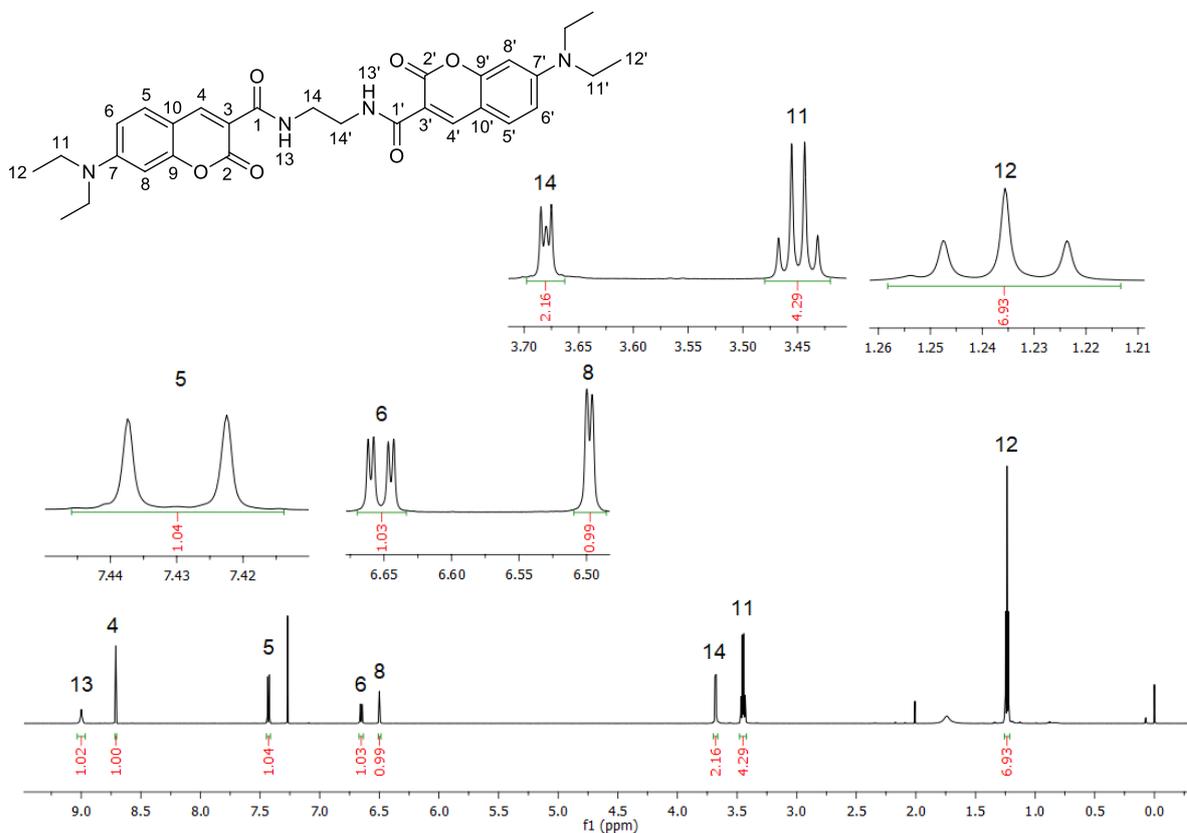


Figura 22. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  600MHz (em  $\text{CDCl}_3$ ) do composto **Cam1**.

Dispondo-se de uma extração eficaz, a reação foi reproduzida mais uma vez. Após 24 h de agitação a temperatura ambiente, a reação foi finalizada sendo lavada com salmoura,  $\text{H}_2\text{O}$ , sol. saturada de  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  e salmoura. O sólido obtido foi purificado por cromatografia em coluna ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2 \rightarrow 2\% \text{ MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ), obtendo o produto puro em 71 % de rendimento como um sólido amarelo amorfo. A formação do produto foi confirmada por RMN  $^1\text{H}$ , RMN  $^{13}\text{C}$  e por ESI-MS  $[\text{Cam1} + \text{H}]^+ = 547,2558 \text{ m/z}$  ( $[\text{Cam1} + \text{H}]^+_{\text{Calculado}} = 547,2512$ ; erro relativo: 0,0008 %).

Tabela 6. Estudo metodológico para finalização da síntese de **Cam1**.

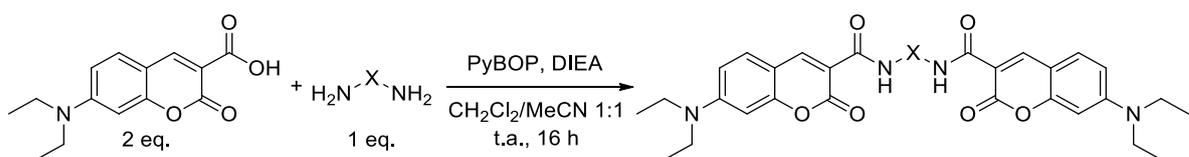
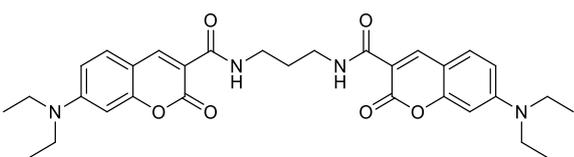
Entrada	Finalização	Rendimento (%)
1	Solvente evaporado e extração em AcOEt com H <sub>2</sub> O.	19*
2	Solvente evaporado e extração em CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> e água, extração em CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> com salmoura, H <sub>2</sub> O, NaHCO <sub>3</sub> , H <sub>2</sub> O e salmoura novamente.	27**
3	Finalização com salmoura e extração em CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> com H <sub>2</sub> O, NaHCO <sub>3</sub> , H <sub>2</sub> O e salmoura.	71

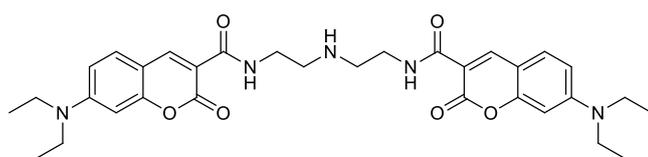
\* Produto com sinais residuais de pyBOP; \*\* Produto obtido após duas etapas de purificação.

A metodologia desenvolvida para **Cam1** foi então aplicada no acoplamento amídico de **Cum1** com a propilenodiamina (**5**), obtendo-se o derivado denominado de **Cam2**. O produto foi obtido em 64 % de rendimento como um sólido cristalino amarelo, sendo confirmado pelos espectros de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C e por ESI-MS [**Cam2** + H]<sup>+</sup> = 561,2727 m/z ([**Cam2** + H]<sup>+</sup>Calculado = 561,2668; erro relativo: 0,001 %).

Não foi observada a formação do produto derivado da dietilenotriamina (**6**), denominado **Cam3**. Considerando o derivado **Cam3** o de maior potencial de coordenação dentre os derivados pretendidos, buscou-se uma metodologia que garantisse a formação do produto desejado.

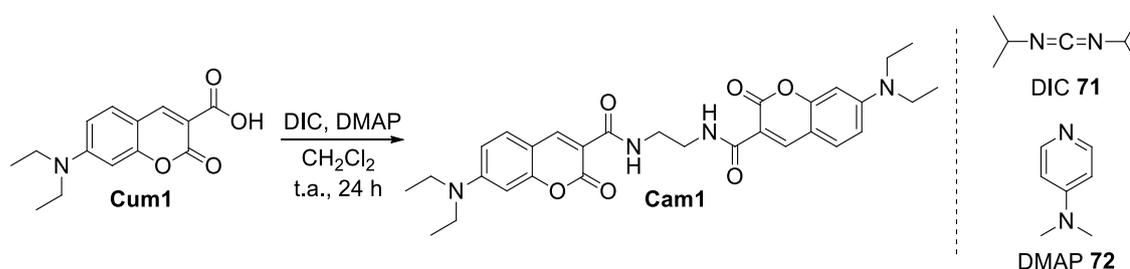
Tabela 7. Metodologia aplicada e rendimentos obtidos.

Produto	Rendimento	Rendimento na literatura <sup>34</sup>
 <p style="text-align: center;"><b>Cam1</b> (C<sub>30</sub>H<sub>34</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>)</p>	71 %	80 %
 <p style="text-align: center;"><b>Cam2</b> (C<sub>31</sub>H<sub>36</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>)</p>	64 %	64 %



**Cam3**  
(C<sub>32</sub>H<sub>39</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>)

Tendo em vista a dificuldade de formação do composto **Cam3** utilizando o pyBOP, buscou-se avaliar a eficiência de conversão com outro agente de acoplamento, o DIC (**71**), utilizando DMAP (**72**) como base. O procedimento foi adaptado do trabalho de Sebestik e colaboradores<sup>38</sup>, sendo reproduzido para a síntese de **Cam1** (Esquema 26), devido a sua simplicidade molecular comparada a **Cam3**. A uma solução de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> contendo 2 eq. do ácido de cumarina, 1 eq. de etilenodiamina foi adicionado 2 eq. de DIC e uma quantidade catalítica de DMAP.



Esquema 26. Síntese de **Cam1** via DIC/DMAP.

Após 24 h de agitação a temperatura ambiente foi observada a formação de um precipitado amarelo. Este sólido amarelo foi filtrado e analisado por CCD, observando a presença de uma mancha comparável à do padrão de **Cum1**. Analisou-se, então, a solução reacional em busca da formação de algum produto, sendo observado duas manchas, uma comparável a **Cum1** e outra sendo assumida como um produto. A solução reacional foi concentrada e purificada por cromatografia em coluna (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> → 2% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), obtendo-se um novo sólido amarelo em um rendimento de 5,5 %. Ambos os sólidos obtidos, o filtrado e o concentrado da solução reacional, foram analisados por espectroscopia de RMN <sup>1</sup>H (Figura 23).

<sup>38</sup> Sebestik, J.; Zawada, Z.; Safarik, M.; Hlavacek, J. *Amino Acids*, **2012**, *43*, 1297.

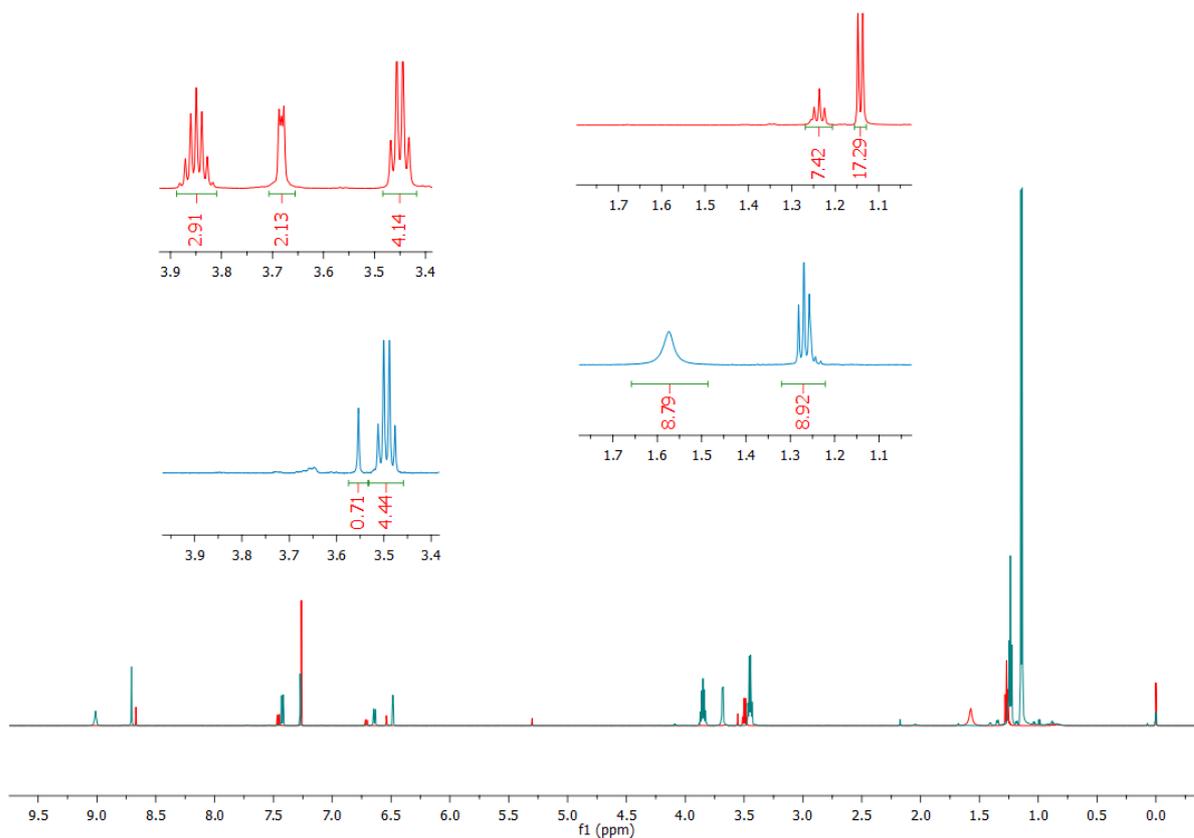


Figura 23. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  600MHz (em  $\text{CDCl}_3$ ) do composto **Cam1** obtido via acoplamento por DIC/DMAP (em azul, espectro do sólido obtido por filtração e em vermelho, espectro do sólido obtido da solução reacional).

Nota-se que o espectro referente ao sólido filtrado (em azul) não apresenta o multiplete na região de 3,70 ppm referente à formação da carboxiamida. O espectro do sólido purificado obtido da solução reacional (em vermelho) apresenta o multiplete característico da carboxiamida, porém, contém sinais excedentes que correspondem ao subproduto de DIC, a diisopropilureia. Conforme a baixa taxa de conversão apresentada após purificação do produto, optou-se por não prosseguir com a remoção do derivado de ureia por extração, prevendo um baixo rendimento.

Em um segundo momento, em uma reanálise dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  de **Cam1** e **Cam2** foram observados sinais com integrais consideráveis em 1,74 ppm (integrando 2H para **Cam1**) e em 1,48 ppm (integrando 2H para **Cam2**) (Figura 24).

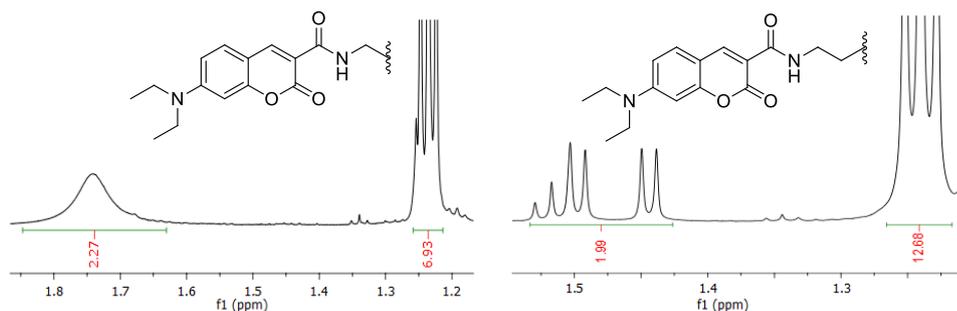


Figura 24. Sinais referentes a impurezas prováveis do pyBOP nos espectros de RMN  $^1\text{H}$  de **Cam1** e **Cam2**.

Considerando estes sinais como impurezas, foram realizadas análises de espectrometria de massas para avaliá-las. Pelos espectros de ESI-MS (exemplificado por **Cam1** na Figura 25), foi observado um pico de baixa intensidade em 415 m/z, porém o mesmo se mostrou comum para os dois compostos. Com base nos reagentes em comum utilizados na obtenção de tais derivados, o pico em 415 m/z foi atribuído a algum resquício do agente de acoplamento pyBOP e provocou uma busca por um novo agente de acoplamento para síntese-teste de **Cam1** para confirmação da origem da impureza.

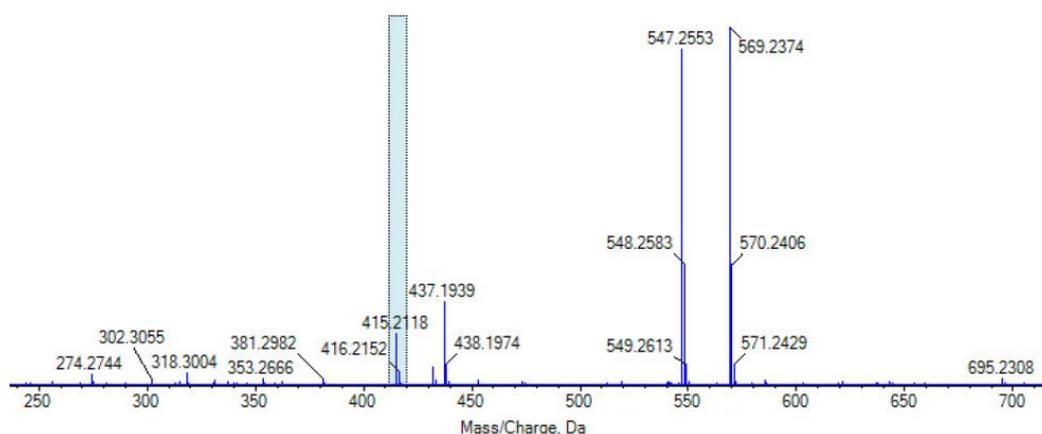
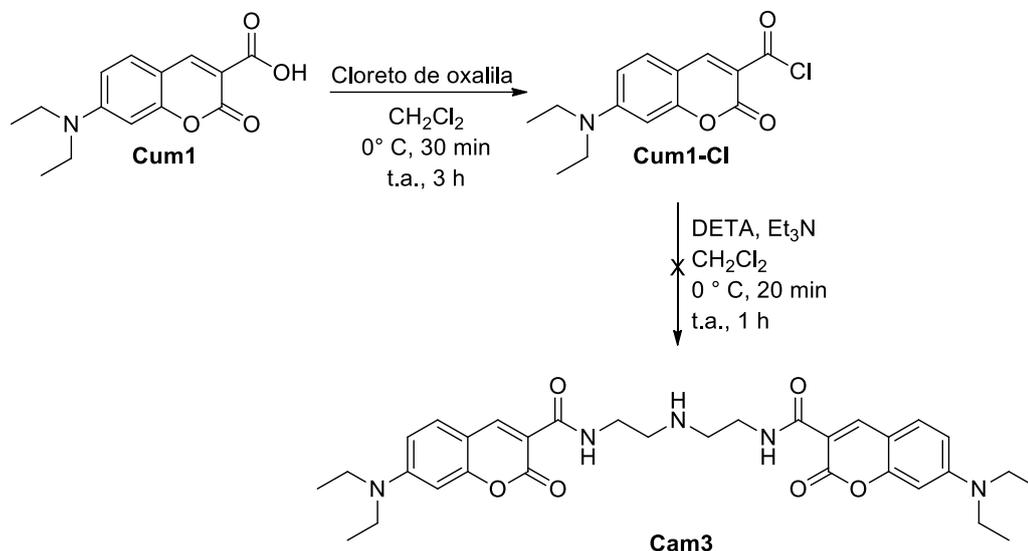


Figura 25. Espectro de massas de **Cam1**.

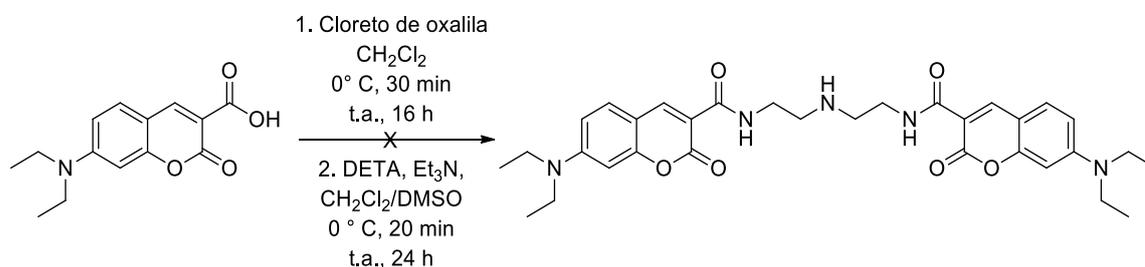
Como apresentado anteriormente, a utilização de DIC/DMAP não se mostrou eficaz na síntese de **Cam1**, optou-se, então, por utilizar o DCC devido à precipitação do seu subproduto de ureia em solvente frio. Uma solução de clorofórmio contendo **Cum1**, etilenodiamina, DCC e DMAP foi mantida sob agitação e temperatura ambiente por 16 h,<sup>24</sup> obtendo-se um precipitado amarelo claro após concentração sob pressão reduzida. O sólido obtido foi lavado com acetato de etila gelado e o precipitado branco, referente ao subproduto de ureia, foi filtrado. Após duas lavagens, observou que o rendimento utilizando DCC foi muito baixo, tornando o acoplamento via DCC menos eficiente do que via pyBOP. A reação também foi testada utilizando HOBt e DIEA, porém não foi observado, via CCD, um consumo significativo do reagente de partida.

Devido às dificuldades apresentadas, buscou-se uma nova metodologia para formação de amidas baseada na formação do cloreto de ácido de **Cum1**. Inicialmente, foi avaliada a formação do cloreto de ácido (**Cum1-Cl**) utilizando cloreto de oxalila para seguinte utilização da dietilenotriamina (Esquema 27)<sup>39</sup>.



Primeiramente, quando a reação de formação do cloreto de ácido foi finalizada por concentração sob pressão reduzida, foi possível observar o produto sendo hidrolisado em alguns pontos do balão através da mudança de coloração do sólido amarelo, atribuído ao cloreto de ácido, para laranja, coloração conhecida do derivado **Cum1**. Além disso, a baixa solubilidade do cloreto de ácido formado em  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  comprometeu a etapa de reação seguinte. Ao final da sequência de reações foi observado apenas a restauração do derivado de cumarina ácida.

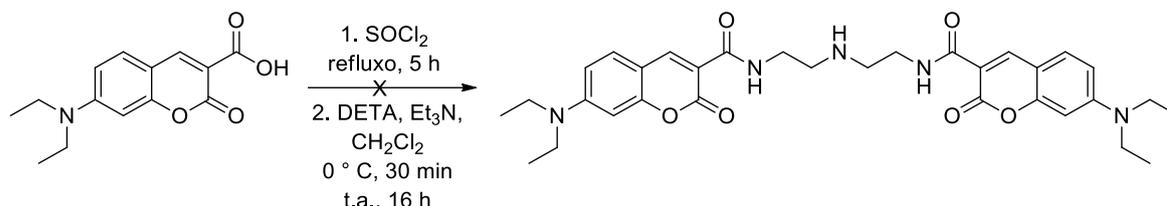
Considerando que parte da hidrólise do cloreto de ácido foi consequência da água presente no  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  utilizado, secou-se o solvente utilizando peneira molecular.<sup>32</sup> A reação foi reproduzida em  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  seco e o tempo reacional aumentado nas duas etapas de reação (Esquema 28).



<sup>39</sup> Silva, W. A. *Estudos da Redução Assimétrica de Iminas e Chalconas. Síntese de Compostos com Potencial Ação Farmacológica/Tecnológica*. 2009. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade de Brasília, Brasília.

Ainda foi possível observar a hidrólise de **Cum1-Cl** na finalização da primeira etapa de reação, mas em menor proporção. Foi necessário a utilização de DMSO como co-solvente para a completa solubilização do cloreto de ácido formado. Ao final da sequência de reações, obteve-se o material de partida.

Com base na ineficácia de formação do cloreto de ácido com o cloreto de oxalila, analisou-se a eficiência de formação com uma nova fonte de cloreto, o cloreto de tionila (Esquema 29)<sup>40</sup>.



Esquema 29. Rota sintética de **Cam3** via cloreto de ácido formado por cloreto de tionila.

O derivado **Cum1** foi mantido sob agitação e refluxo em SOCl<sub>2</sub> por 5 h. Após este tempo, o cloreto de tionila foi retirado por destilação com hexano, obtendo-se um óleo castanho ao final. Este óleo foi solubilizado em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> e a esta solução, em banho de gelo, adicionou-se a dietilenotriamina e a trietilamina, mantendo a reação sob agitação e temperatura ambiente por 16 h. Ao final da reação obteve-se um sólido castanho, cujo espectro de RMN <sup>1</sup>H não apresentou o multiplete característico da formação da carboxiamida.

Considerando os obstáculos encontrados na síntese do derivado **Cam3** foi analisada uma alíquota da dietilenotriamina, recém destilada, por ESI-MS, afim de avaliar a composição da amina que estava sendo utilizada. Pelo espectro de massas (Figura 26) observou o pico da amina protonado em 104 m/z, porém, observou-se a presença de picos com razão m/z maiores que a da amina, possivelmente produtos de polimerização, indicando que o reagente utilizado estava com sua composição comprometida. Com o resultado desta análise foi decidido interromper o estudo sintético de **Cam3** até a obtenção de um reagente de composição mais confiável.

<sup>40</sup> Ghanei-Nasab, S.; Khoobi, M.; Hadizadeh, F.; Marjani, A.; Moradi, A.; Nadri, H.; Emami, S. Foroumadi, A.; Shafiee, A. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *121*, 40.

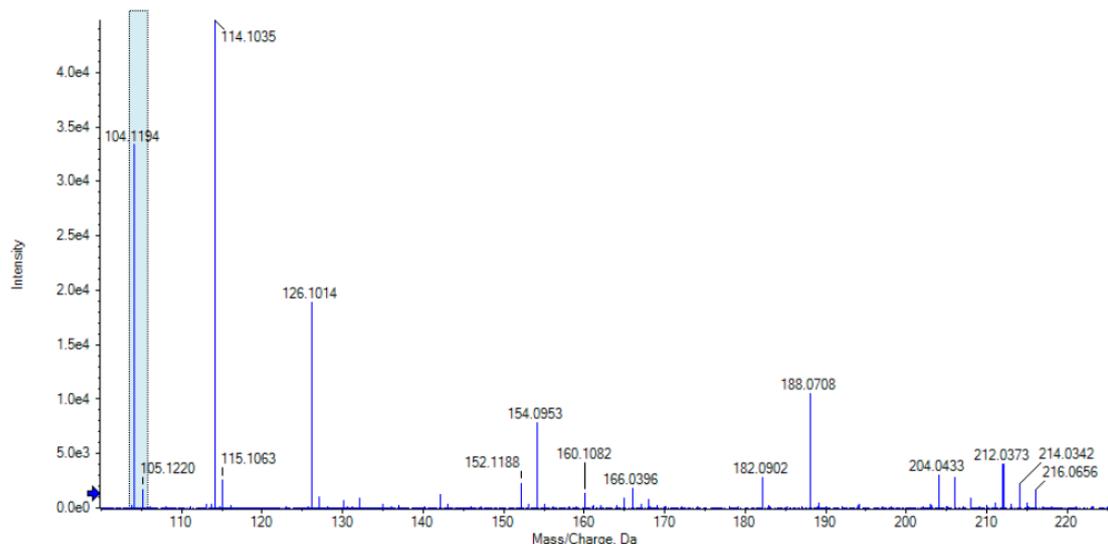


Figura 26. Espectro de massas da dietilenotriamina recém destilada.

Considerando que a reação de acoplamento via cloreto de ácido foi comprometida pela composição questionável da dietilenodiamina disponível em nosso laboratório no momento, decidiu-se reproduzir a reação utilizando a etilenodiamina (**4**). Inicialmente, foi utilizada a metodologia proposta por Shafiee e colaboradores (Tabela 8),<sup>40</sup> como apresentada anteriormente. O progresso da reação foi acompanhado via CCD e após 16 h foi possível observar o consumo da de **Cum1**, porém não se observou a formação do composto **Cam1**.

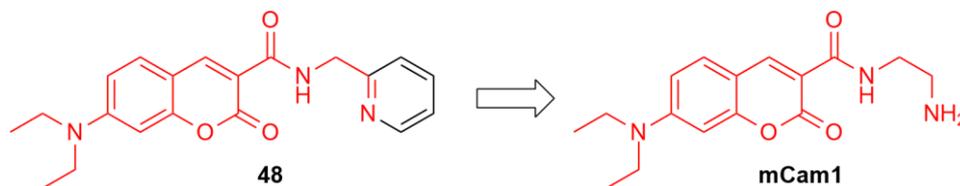
Uma nova metodologia foi testada,<sup>41</sup> na qual a formação do cloreto de ácido não ocorre sob refluxo. Seguindo a metodologia, o cloreto de ácido foi filtrado e lavado com éter etílico, porém, no momento da filtração já foi possível observar parte do produto sendo hidrolisado, comprometendo a etapa de acoplamento seguinte. A etapa de formação do cloreto de ácido foi tentada novamente e o excesso de cloreto de tionila foi removido com o auxílio do Kugelrohr, montando em sequência a segunda etapa de reação, adicionando a trietilamina em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco em banho de gelo e em seguida a etilenodiamina. Via CCD, foi possível observar uma baixa taxa de conversão do reagente de partida e não se observou a formação do produto desejado.

Tabela 8. Testes metodológicos para síntese de **Cam1** via cloreto de ácido.

Entrada	Formação do Cum1-Cl	Etapa de acoplamento	Rendimento
1	SOCl <sub>2</sub> , refluxo, 5h	<b>4</b> , Et <sub>3</sub> N, CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , refluxo, 16h	-
2	SOCl <sub>2</sub> , t.a., 3h	<b>4</b> , Et <sub>3</sub> N, CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , 0° - t.a., 16h	-

<sup>41</sup> Long, L.; Wu, Y.; Wang, L.; Gong, A.; Hu, F.; Zhang, C. *Chem. Commun.*, **2015**, 51, 10435.

Em outro momento do estudo, com base no sensor de cobre(II) de Kim e colaboradores<sup>24</sup> e com a possibilidade de obter um sítio de coordenação similar pelo acoplamento amídico da etilenodiamina com **Cum1**, desenvolveu-se a síntese do derivado monomérico **mCam1** (Esquema 30), com a finalidade de avaliar a seletividade deste derivado com íons metálicos.



Esquema 30. Sensor de Kim e colaboradores e seu análogo.

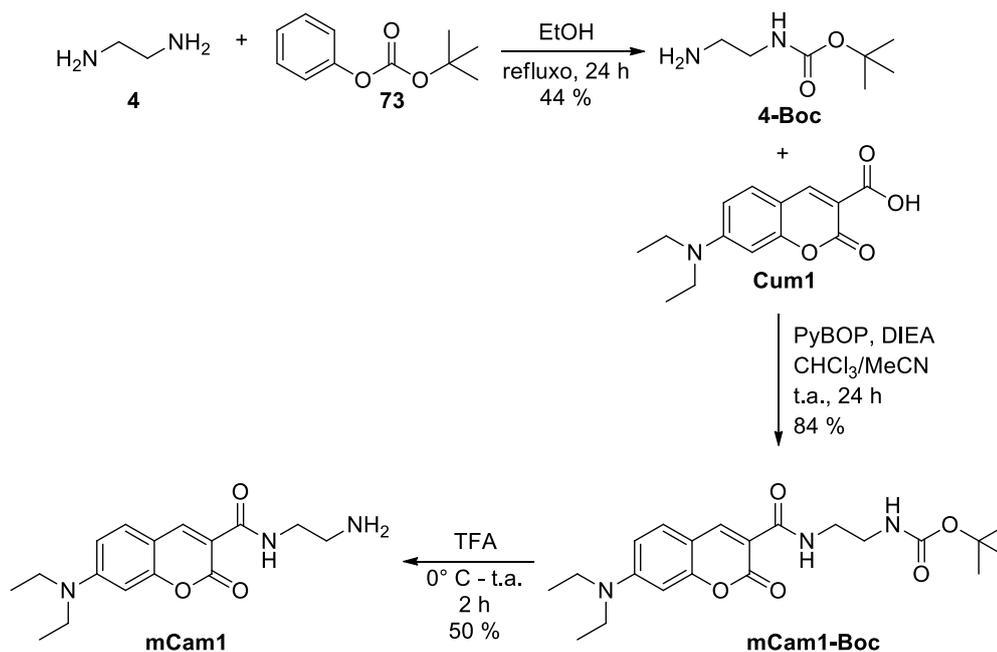
O desenvolvimento do derivado **mCam1** (Esquema 31) foi realizado de acordo com o procedimento descrito por Hawker e colaboradores.<sup>37</sup> Inicialmente foi realizada a mono-proteção da etilenodiamina (**4**) com o grupo protetor Boc (*t*-Butiloxicarbonil) utilizando o *t*-butilfenilcarbonato (**73**), em etanol seco, refluxando a solução reacional por 24 h e concentrando-a sob vácuo.<sup>42</sup> O resíduo sólido foi diluído em H<sub>2</sub>O e acidificado a pH 3, extraíndo-o com CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. A fase aquosa foi basicada e extraída com CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> e esta fase orgânica foi concentrada, obtendo-se o produto em 44 % de rendimento na forma de um óleo levemente amarelado.

O acoplamento amídico foi feito a partir da adição de DIEA a uma solução de **Cum1** e pyBOP em MeCN sob agitação. A esta solução, adicionou-se uma solução de **4-Boc** em CHCl<sub>3</sub>, mantendo a solução resultante sob agitação por 24 h em temperatura ambiente. A reação foi finalizada adicionando salmoura e extraíndo-a com AcOEt. A fase orgânica foi lavada com NaHSO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O, NaHCO<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>O e salmoura, seca, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O sólido resultante de **mCam1-Boc** foi purificado por coluna cromatográfica (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> → 2% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), obtendo o produto puro em 84 % de rendimento.

Na etapa de desproteção, adicionou-se o TFA em um balão contendo **mCam1-Boc** imerso em banho de gelo, mantendo a reação sob agitação por 2 h. O excesso de TFA foi removido sob pressão reduzida e a base livre isolada ao neutralizar o resíduo da reação. A solução aquosa neutra foi extraída com CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> e a fase orgânica lavada com sol. saturada de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> e salmoura. O sólido obtido após a concentração da fase orgânica apresentou uma baixa solubilidade nos solventes deuterados (CDCl<sub>3</sub> e MeOH-d<sub>4</sub>) destinados à realização do espectro de RMN <sup>1</sup>H para confirmação da formação do produto. Após uma filtração do sólido não solubilizado em MeOH-d<sub>4</sub>, foi realizado uma análise por RMN <sup>1</sup>H, observando a não formação do produto.

Atribuindo o insucesso da reação ao TFA utilizado, repetiu-se a rota sintética de **mCam1** e utilizou-se o TFA de um frasco mais novo. Com um TFA mais confiável, foi possível obter o produto desprotegido em 50 % de rendimento.

<sup>42</sup> Vercillo, O. E. *Reações Ugi na construção de ciclopeptídeos: Síntese de um provável inibidor do complexo Tat/TAR do vírus HIV-1*. 2007. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade de Brasília, Brasília.

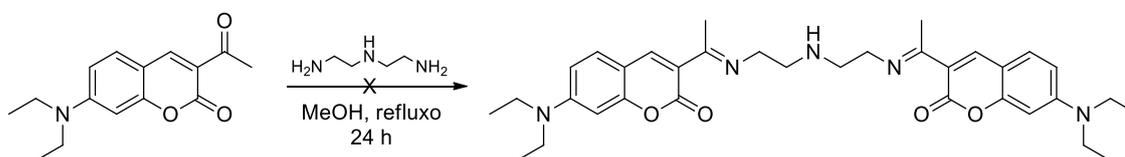


Esquema 31. Rota sintética de mCam1.

### 3.2.2. Síntese dos derivados imínicos

O desenvolvimento da síntese dos derivados biscumarínicos de imina, denominados de **Cim**, foi iniciada pela metodologia de condensação descrita por Linert e Abou-Hussein,<sup>43</sup> na qual eles utilizaram o derivado de cumarina simplificado, **Cum3**, e a dietilenotriamina em etanol, mantendo-os sob agitação e refluxo por 3 h.

A metodologia foi reproduzida para o derivado de cumarina fluorescente **Cum2** e com a dietilenotriamina (que ainda não havia sido analisada por ESI-MS), utilizando metanol devido à sua menor concentração de água comparada à do etanol disposto em nosso laboratório no momento da síntese. Considerando que o grupo *N,N*-dietilamino diminui a reatividade da carbonila, a reação foi mantida sob agitação e refluxo por 24 h (Esquema 32).



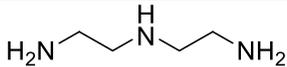
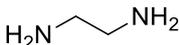
Esquema 32. Rota sintética teste de Cim3.

Após o tempo reacional estipulado e acompanhando o progresso da reação por CCD, observou que a cumarina não tinha sido consumida, optando-se por deixar a reação sob agitação e refluxo por

<sup>43</sup> Abou-Hussein, A. A.; Linert, W. *Spectrochim. Acta A.* **2015**, *141*, 223.

mais 24 h. Após este tempo, observou que a taxa de consumo do reagente de partida se manteve ineficaz. A reação também foi reproduzida utilizando a etilenodiamina e após 24 h de reação foi observado que os reagentes não haviam sido consumidos.

Tabela 9. Condições experimentais testadas para síntese de **Cim3**.

Entrada	Amina	Tempo reacional (h)	Rendimento (%)
1		48	-*
2		24	-*

\* Apenas o reagente de partida **Cum2** foi recuperado.

A ineficácia apresentada nas reações de condensação utilizando **Cum2** foram atribuídas a dois principais motivos: a presença de água no solvente utilizado, que desloca o equilíbrio favorecendo o consumo dos produtos à medida que formados, e ao grupo doador de elétrons *N,N*-dietilamino na posição-7 da cumarina, que diminui a reatividade do sítio eletrofílico da carbonila ao aumentar sua densidade de carga negativa por efeito de ressonância.

Com base no que foi especulado, verificou-se o efeito do grupo substituinte na formação da imina utilizando uma cumarina sem o grupo *N,N*-dietilamino, **Cum3**, na preparação do derivado **Cim3**-simplificado. O procedimento descrito por Linert e Abou-Hussein foi, então, reproduzido com os mesmos reagentes, deixando-os sob agitação e refluxo, em etanol, por 3 h. Observou-se que o efeito da ausência do grupo substituinte, neste caso, não havia sido um fator preponderante para o não sucesso da reação.

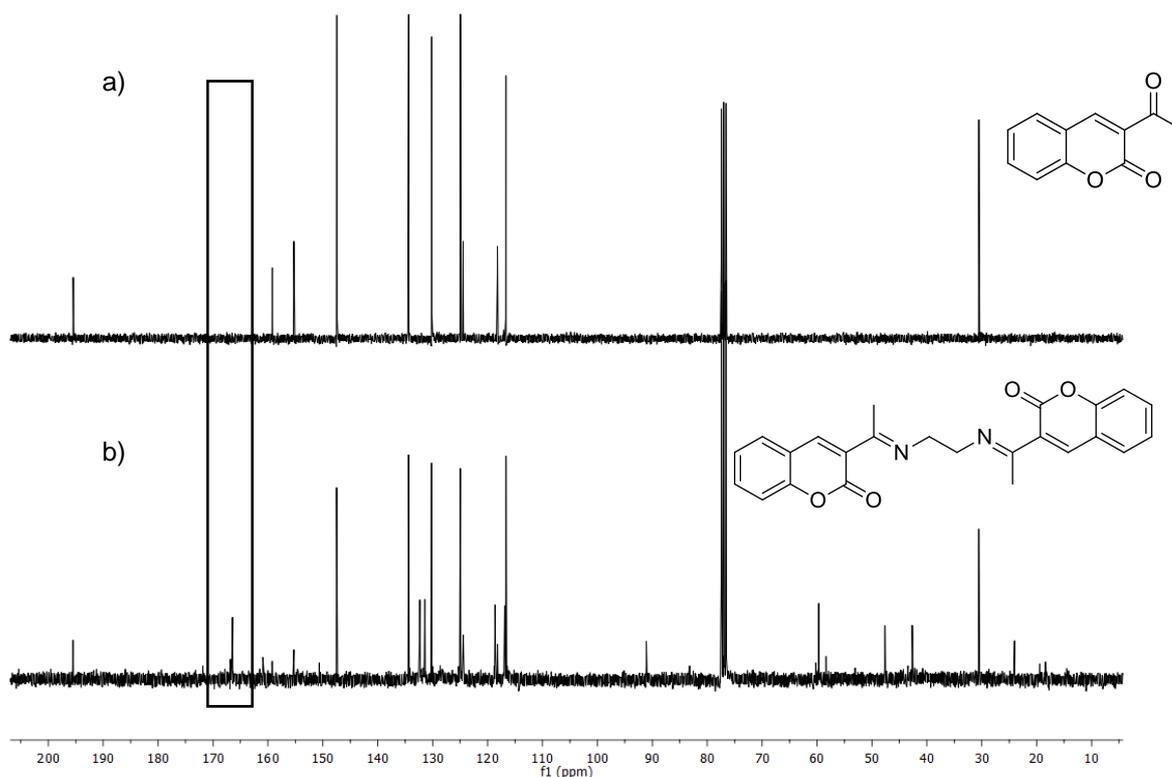
Verificou-se, então, o efeito da água presente no solvente utilizado ao adicionar peneira molecular no meio reacional, mantendo as condições experimentais da literatura. Ao final do tempo reacional, foi observado que a peneira molecular utilizada estava parcialmente desintegrada, formando um precipitado que foi removido por filtração simples e lavado com etanol. A solução reacional apresentou um pequeno consumo do reagente ao ser analisada por CCD. Após a solução reacional ser concentrada sob pressão reduzida, obteve-se um óleo âmbar, sendo este purificado por coluna cromatográfica ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2 \rightarrow 2\% \text{ MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ), obtendo um sólido amarelo em pequena quantidade. O sólido obtido foi analisado por RMN  $^1\text{H}$  e não apresentou os sinais referentes aos metilenos do fragmento oriundo da dietilenotriamina.

Tabela 10. Novas condições experimentais testadas para síntese de **Cim3**-simplificado.

Entrada	Condição experimental	Aditivo	Rendimento (%)
1	EtOH, refluxo, 3 h	-	-
2	EtOH, refluxo, 3 h	MS 3Å	-

Neste momento da pesquisa, em paralelo à tentativa de síntese de **Cim3** e **Cim3**-simplificado, foi realizada a análise da dietilenotriamina utilizada por ESI-MS apresentada anteriormente e com base no resultado, entendeu-se que o estudo metodológico de **Cim3** estava comprometido. A partir deste ponto, o estudo da formação de derivados de imina foi realizado utilizando a etilenodiamina, tendo em vista a formação de **Cim1**-simplificado.

O estudo metodológico de **Cim1**-simplificado foi iniciado utilizando a mesma condição experimental da literatura, refluxo em etanol seco por 3 h. Por CCD, foi possível observar que **Cum3** havia sido consumido de maneira discreta. Ao concentrar a solução reacional se obteve um sólido amarelo, cujo espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  apresentou um sinal em 166,5 ppm, o qual foi atribuído ao carbono da imina (Figura 27). O sólido obtido não foi purificado considerando que o consumo da cumarina inicial foi baixo. Almejando o incremento do consumo da cumarina, a reação foi refeita com um tempo reacional de 24 h, porém, não foi possível observar a formação do produto pelo espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ .

Figura 27. Espectros de a) **Cum3** e b) **Cim1**-simplificado com resquício de **Cum3**.

Em uma terceira reprodução, o volume de etanol seco utilizado foi reduzido e a reação montada em um tubo de Schlenk, deixando a reação sob agitação e refluxo por 16 h. Ao final do tempo reacional, por CCD, foi possível observar a mancha referente à cumarina, mas também a mancha atribuída ao derivado de imina formado. A mistura reacional foi concentrada e purificada por placa cromatográfica preparativa, utilizando apenas  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  como eluente. A purificação não foi completamente eficaz, obtendo-se o produto em 6 % de rendimento. Como o produto foi obtido em pequena quantidade, o RMN  $^{13}\text{C}$  ficou comprometido, não apresentando os sinais do produto em sua totalidade, mas foi possível observar um sinal pouco expressivo em 166,5 ppm.

Baseado na baixa taxa de formação do produto esperado, analisou-se a influência de aditivos na reação. Foi utilizado sulfato de sódio anidro para a desidratação do meio reacional devido à água formada na reação de condensação e o ácido *p*-toluenossulfônico foi utilizado (em 1 e 0,15 eq.) com o intuito de ativar o sítio eletrofílico da carbonila ao protoná-la.

Inicialmente, utilizando apenas o sulfato de sódio e acompanhando a reação por CCD, foi observado que a taxa de consumo da cumarina de partida não teve um incremento significativo. Utilizando 1 eq. de *p*TsOH, observou-se que o consumo da cumarina foi irrelevante, enquanto que ao utilizar 0,15 eq. de *p*TsOH foi possível notar um consumo mais significativo da cumarina, elegendo esta condição para teste com **Cum2** (Tabela 11). No primeiro caso, o excesso do ácido utilizado pode ter comprometido a reação ao protonar parte da amina, além da carbonila da cumarina, diminuindo as espécies de caráter nucleofílico no meio reacional.

Este estudo metodológico também abrangeu a reação assistida por micro-ondas. A reação foi realizada a uma temperatura de 80 °C, utilizando o sulfato de sódio anidro como agente desidratante. O progresso da reação em micro-ondas foi verificado por CCD de 1 em 1 minuto até completar 5 minutos de reação, observando que a maior parte da cumarina não havia sido consumida.

A reação de condensação também foi avaliada na ausência de solvente. A cumarina **Cum3** junto com a etilenodiamina foram maceradas em um almofariz, observando a formação de um sólido amarelo. A purificação do sólido foi feita por placa cromatográfica preparativa ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ), porém, a purificação não foi tão eficaz devido à proximidade das manchas do reagente e produto. O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do produto bruto obtido apresentou o pico característico da imina em 166,5 ppm.

Tabela 11. Estudo metodológico da síntese de **Cim1**-simplificado.

Entrada	Condição experimental	Aditivo	Rendimento (%)
1	EtOH <sup>a</sup> , refluxo, 3 h	-	nd
2	EtOH <sup>a</sup> , refluxo, 24 h	-	nd
3	EtOH <sup>b</sup> , refluxo, 16 h	-	6*
4	EtOH <sup>b</sup> , refluxo, 3 h	$\text{Na}_2\text{SO}_4$	nd
5	EtOH <sup>b</sup> , refluxo, 16 h	<i>p</i> TsOH (1 eq.) e $\text{Na}_2\text{SO}_4$	nd

6	EtOH <sup>b</sup> , refluxo, 16 h	<i>p</i> TsOH (0,15 eq.) e Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	nd
7	EtOH <sup>b</sup> , μO, 80 °C, 5 min	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	nd
8	sem solvente	-	13*

<sup>a</sup> Volume utilizado de EtOH foi de 10~20 mL; <sup>b</sup> 1~3 mL de EtOH.

\* Purificação não foi totalmente eficaz, apresentando picos referente à **Cum3**.

nd: rendimento não determinado.

Com base nos resultados apresentados na reação sem solvente e utilizando 0,15 eq. de *p*TsOH na formação de **Cim1**-simplificado, testou-se estas condições experimentais na síntese de **Cim1**, além de testar uma metodologia utilizando o Dean-Stark (Tabela 12). Nenhuma das condições testadas para **Cum2** apresentaram progresso de reação.

Tabela 12. Estudo metodológico da síntese de **Cim1**.

Entrada	Condição experimental	Rendimento (%)
1	Sem solvente	nr
2	EtOH, <i>p</i> TsOH (0,10 eq.) Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , refluxo, 3 h	nr
3	Tolueno, Dean-Stark, 80 °C	nr

nr: não reagiu.

### 3.3. Estudo fotofísico

As propriedades fotofísicas dos derivados **Cams** foram avaliadas através dos dados obtidos das técnicas de espectrofotometria de absorção molecular UV-Vis e de espectrofluorimetria de emissão molecular. Foram utilizados nove solventes com polaridades diferentes para investigação dos efeitos solvatocrômicos, sendo estes: acetato de etila, acetona, acetonitrila, água, diclorometano, dioxano, etanol, metanol e tetraidrofurano (Tabela 13).

Tabela 13. Parâmetros de polaridade de Reichardt.<sup>44</sup>

Solvente	Dioxano	THF	AcOEt	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Acetona	MeCN	EtOH	MeOH	H <sub>2</sub> O
<b>Polaridade de Reichardt</b>	0,164	0,207	0,228	0,309	0,355	0,460	0,654	0,762	1,000

<sup>44</sup> Reichardt, C. *Chem. Rev.* **1994**, *94*, 2319.

Para a realização das análises, foram preparadas soluções estoques de 10 mM de cada derivado **Cam** em diclorometano e em DMSO, devido à imiscibilidade do diclorometano em água. As medidas de absorção e emissão moleculares foram realizadas em soluções de 10  $\mu$ M, preparadas a partir da diluição da solução estoque de cada derivado.

As curvas de absorção (tracejadas) e emissão (sólidas) de **Cam1** estão apresentadas na Figura 28 e os dados obtidos a partir de seus máximos estão organizados na Tabela 14.

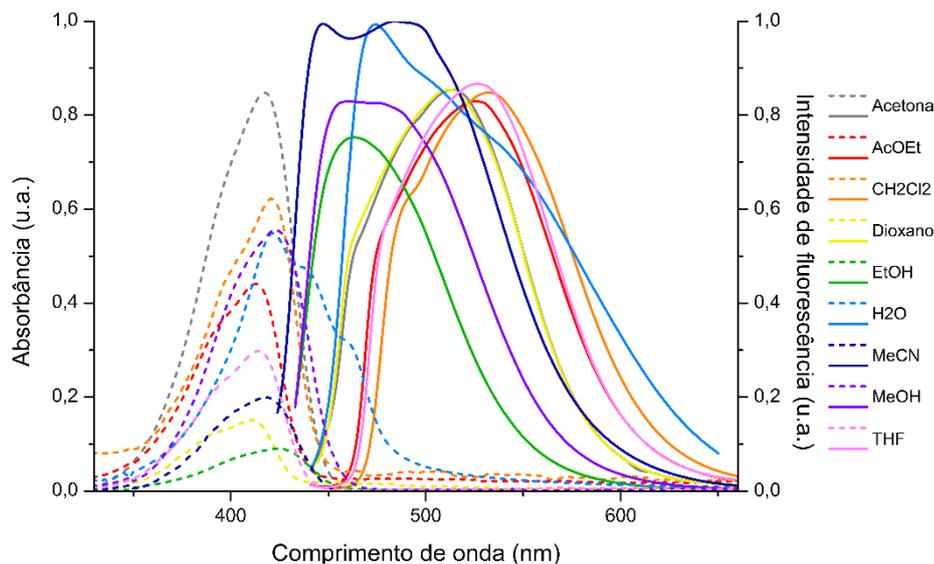


Figura 28. Solvatograma de **Cam1**.

Tabela 14. Dados de absorção e emissão do solvatograma de **Cam1**.

Composto	Solvente	Absorção		Emissão	Deslocamento de Stokes (nm)
		$\lambda_{\max}$ (nm)	$\log \epsilon$	$\lambda_{\max}$ (nm)	
<b>Cam1</b> ( $\phi = 0,71$ )	Dioxano	411	4,18	512	101
	Tetraidrofurano	414	4,47	526	112
	Acetato de etila	413	4,64	525	112
	Diclorometano	421	4,79	531	110
	Acetona	417	4,93	513	96
	Acetonitrila	418	4,30	484	66
	Etanol	424	3,95	463	39
	Metanol	423	4,74	460	37
	Água	422	4,74	474	52

O efeito solvatocrômico é compreendido a partir do valor de deslocamento de Stokes, seguindo o princípio de que quanto maior o deslocamento de Stokes, maior a estabilização de um fluoróforo no estado excitado, devido, principalmente, às interações entre os momentos dipolares da molécula analito

com as moléculas de solvente. Diante dos dados obtidos das curvas de **Cam1**, foi possível observar que o deslocamento de Stokes é mais pronunciado em solventes de baixo parâmetro de polaridade, como AcOEt e THF, e menos pronunciado nos solventes com maior tendência a formar ligações de hidrogênio, como EtOH, MeOH e H<sub>2</sub>O. Nota-se que, mesmo possuindo um baixo parâmetro de polaridade, estes solventes possuem momentos dipolos que podem contribuir para a estabilização de **Cam1** via interações dipolo-dipolo.

As curvas de absorção (tracejadas) e emissão (sólidas) de **Cam2** estão apresentadas na Figura 29 e os dados obtidos a partir de seus máximos estão organizados na Tabela 15.

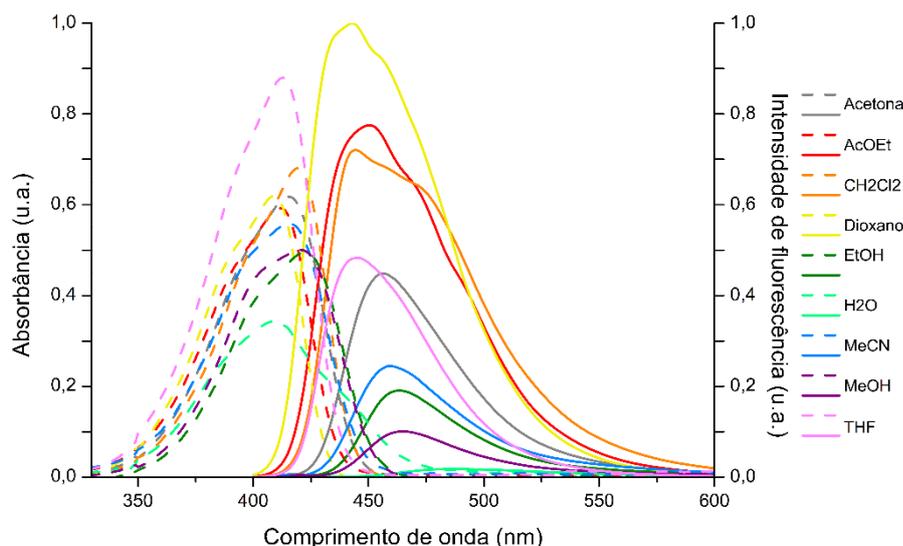


Figura 29. Solvatograma de **Cam2**.

Tabela 15. Dados de absorção e emissão do solvatograma de **Cam2**.

Composto	Solvente	Absorção		Emissão	Deslocamento de Stokes (nm)
		$\lambda_{\max}$ (nm)	$\log \epsilon$	$\lambda_{\max}$ (nm)	
<b>Cam2</b> ( $\phi = 0,13$ )	Dioxano	409	4,79	443	34
	Tetraidrofurano	412	4,94	445	33
	Acetato de etila	411	4,77	450	39
	Diclorometano	419	4,83	444	25
	Acetona	415	4,79	456	41
	Acetonitrila	415	4,75	459	44
	Etanol	422	4,69	464	42
	Metanol	420	4,70	465	45
	Água	409	4,53	488	79

Pelos dados obtidos das curvas de **Cam2**, foi possível observar que o deslocamento de Stokes é mais pronunciado em solventes polares com H<sub>2</sub>O, EtOH e MeOH, em que a maior contribuição para

a estabilização do estado excitado deve ser proveniente de ligações de hidrogênio, sendo mais eficiente com as interações com a H<sub>2</sub>O.

Ao comparar os valores de deslocamento de Stokes entre os dois derivados biscumarínicos, observa-se que a faixa de variação de **Cam1** (37 – 112 nm) é maior que a de **Cam2** (26 – 79 nm), que possui uma faixa ainda menor ao desconsiderar o deslocamento em água (26 – 45 nm). Com base nestes valores, é de se considerar que o momento dipolar de **Cam2** no estado excitado é similar ao do estado fundamental, provavelmente devido a um fenômeno de estabilização intramolecular.

As propriedades fotofísicas do derivado monomérico **mCam1** também foram analisadas e suas curvas de absorção e emissão estão expostas na Figura 30 e os dados obtidos a partir de seus máximos dispostos na Tabela 16.

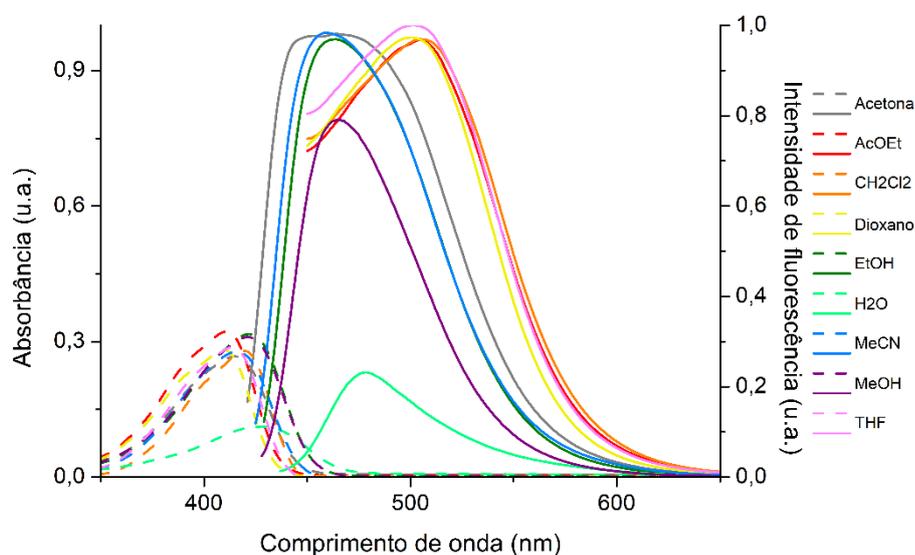


Figura 30. Solvatograma de **mCam1**.

Tabela 16. Dados de absorção e emissão do solvatograma de **mCam1**.

Composto	Solvente	Absorção		Emissão	Deslocamento de Stokes (nm)
		$\lambda_{\max}$ (nm)	$\log \epsilon$	$\lambda_{\max}$ (nm)	
<b>mCam1</b> ( $\phi = 0,45$ )	Dioxano	410	4,45	500	90
	Tetraidrofurano	413	4,46	501	88
	Acetato de etila	411	4,51	505	94
	Diclorometano	419	4,44	508	89
	Acetona	415	4,43	464	49
	Acetonitrila	416	4,44	460	44
	Etanol	422	4,50	464	42
	Metanol	421	4,49	466	45
	Água	428	4,05	478	50

Baseado nos dados apresentados, é possível observar que o derivado monomérico **mCam1** exibiu um comportamento similar ao derivado biscumarínico **Cam1**, apresentando maior deslocamento de Stokes em solventes mais apolares, como dioxano e THF, podendo ter sua estabilização atribuída às interações dipolo-dipolo com as moléculas de solvente.

Um dos processos de estabilização que pode ser considerado para os derivados fluorescentes de cumarina analisados é a transferência de carga interna (TCI), o qual pode ser avaliado pela curva de Lippert-Mataga (Figura 31), que relaciona o deslocamento de Stokes, em número de onda, com o parâmetro de polaridade específico de cada solvente na escala de Reichardt (Tabela 13).

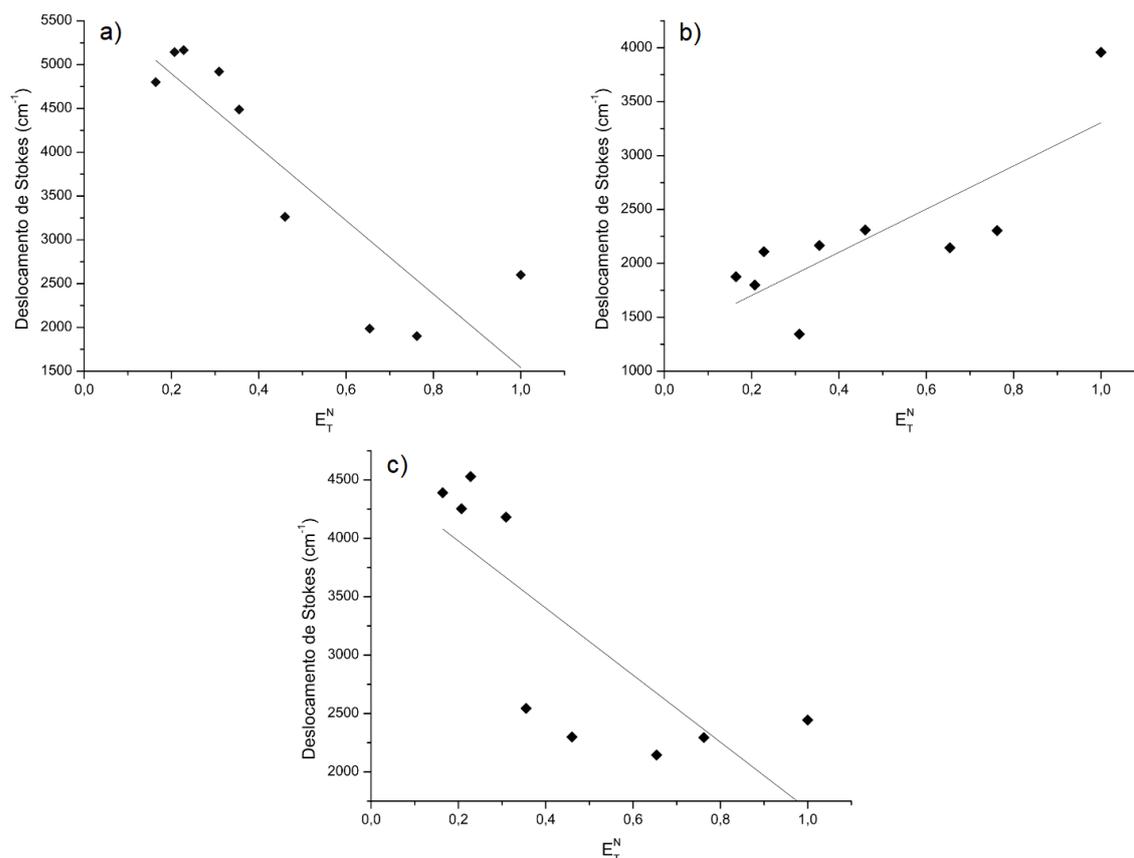


Figura 31. Curvas de Lippert-Mataga de a) **Cam1**, b) **Cam2** e c) **mCam1**.

O fator de correlação linear da curva de Lippert-Mataga (Tabela 17) indica, proporcionalmente, a influência do processo de TCI na estabilização da molécula. Assim, percebe-se que dentre os compostos apresentados, o processo de TCI tem maior contribuição na estabilização do estado excitado de **Cam1**. Os compostos **Cam2** e **mCam1** também são estabilizados por TCI e devem receber contribuição de outro processo de estabilização.

Tabela 17. Correlações lineares dos compostos.

Composto	Cam1	Cam2	mCam1
R <sup>2</sup>	0,7404	0,5912	0,5475

Outra propriedade fotofísica que foi determinada foi o rendimento quântico, utilizando o sulfato de quinina como fluoróforo de referência, tendo como rendimento quântico de comparação o do derivado **Cum1** como 0,04 (Tabela 18). Observa-se que o composto **Cam2** possui a menor eficiência quântica em relação aos outros compostos, mas ainda apresenta um bom incremento em relação ao derivado de partida **Cum1**, considerando que possui dois sistemas fluorogênicos em sua estrutura e uma transferência de carga mais efetiva através dos orbitais do fragmento etilênico. O composto **Cam1** se destaca pelo seu alto rendimento quântico em relação a **Cam2**, provavelmente devido à maior contribuição orbitalar das ligações C-N do fragmento etilênico na distribuição de carga interna do primeiro composto; em relação a **mCam1**, seu rendimento quântico maior pode ser explicado pela distribuição de densidade de carga negativa até a ligação C-N da amina primária.

Tabela 18. Rendimentos quânticos obtidos para os compostos.

Composto	Rendimento quântico ( $\phi$ )
<b>Cum1</b>	0,04
<b>Cam1</b>	0,71
<b>Cam2</b>	0,13
<b>mCam1</b>	0,45

As intensidades de fluorescência dos derivados **Cam1** e **mCam1** foram avaliadas em uma faixa de pH de 2 – 12 em soluções aquosas, a fim de observar a estabilidade de fluorescência dos compostos.

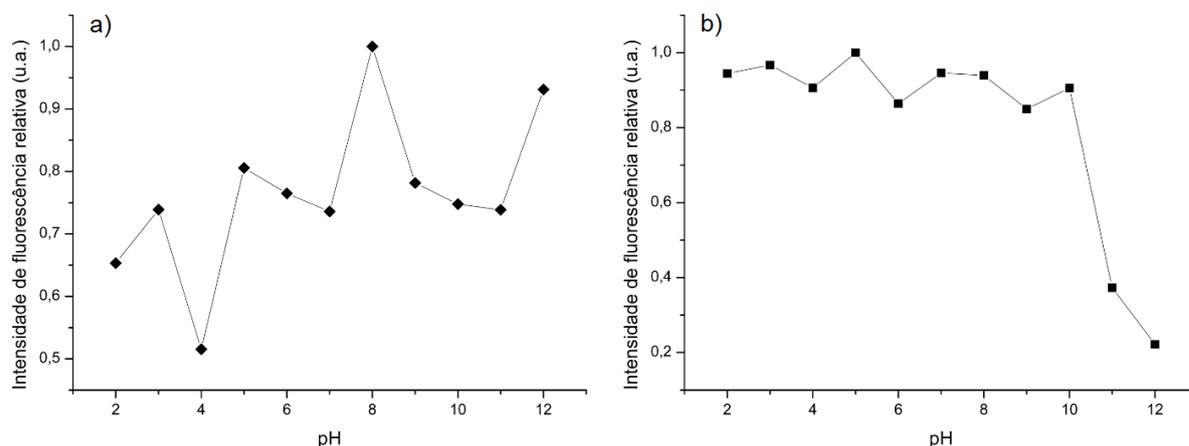


Figura 32. Variação na intensidade de fluorescência em função do pH de a) **Cam1** e b) **mCam1**.

A partir dos gráficos da Figura 32, é possível observar que **Cam1** apresentou as maiores intensidades de fluorescência em pH 8 e 12 e que a fluorescência do composto apresentou uma relativa estabilidade na faixa de 5 – 11. Já o composto **mCam1** apresentou uma relativa estabilidade na faixa

de 2 – 10, mantendo a intensidade de fluorescência quase constante. A avaliação de seletividade dos compostos foi realizada em água deionizada com pH 8.

### 3.4. Avaliação de seletividade

Com base nos efeitos solvatocrômicos observados, foi iniciada a avaliação de seletividade dos derivados diante de íons metálicos. Inicialmente, as análises foram feitas para **Cam1**, em diclorometano, com 13 íons metálicos na forma de cloretos:  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$ .

Foram preparadas soluções estoques de  $10^{-1}$  M de cada cloreto metálico em etanol ou metanol, considerando a miscibilidade destes em diclorometano, que foram, em seguida, diluídas para uma concentração de 1 mM. As medidas de absorção (tracejadas) e emissão (sólidas) de fluorescência foram realizadas em soluções de  $10\ \mu\text{M}$  do derivado fluorescente **Cam1** com 1 eq. de íon metálico (Figura 33).

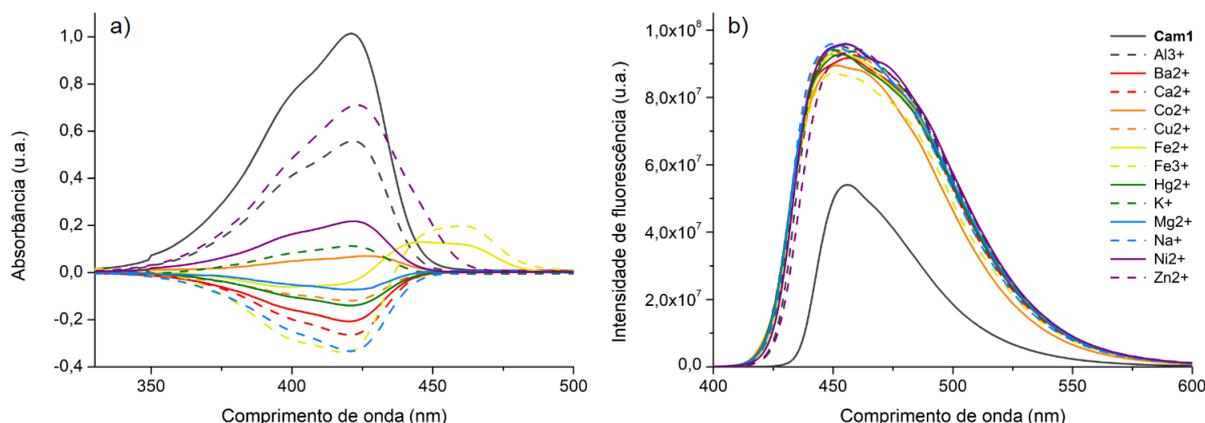


Figura 33. Curvas de a) absorção e b) emissão de **Cam1** com 1 eq. de íons metálicos em  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , excitação em 421 nm.

A partir das curvas de absorção foi possível observar que a absorção de **Cam1** em 421 nm apresentou uma diminuição na absorbância com todos os íons metálicos, dos quais apenas a absorbância com  $\text{Al}^{3+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$  foram as mais pronunciadas. Com  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{3+}$  houve um deslocamento batocrômico, porém, não foi possível observar uma mudança colorimétrica das soluções. Pelas curvas de emissão, observou um efeito hipercrômico na emissão centrada em 456 nm para todos os íons metálicos, inviabilizando a utilização do derivado como sensor em diclorometano.

Considerando a falta de seletividade em diclorometano, optou-se por realizar as análises em etanol, além de incluir os íons metálicos  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Ce}^{3+}$ ,  $\text{Cr}^{3+}$ ,  $\text{In}^{3+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  e  $\text{Sn}^{2+}$  para avaliar a seletividade (Figura 34).

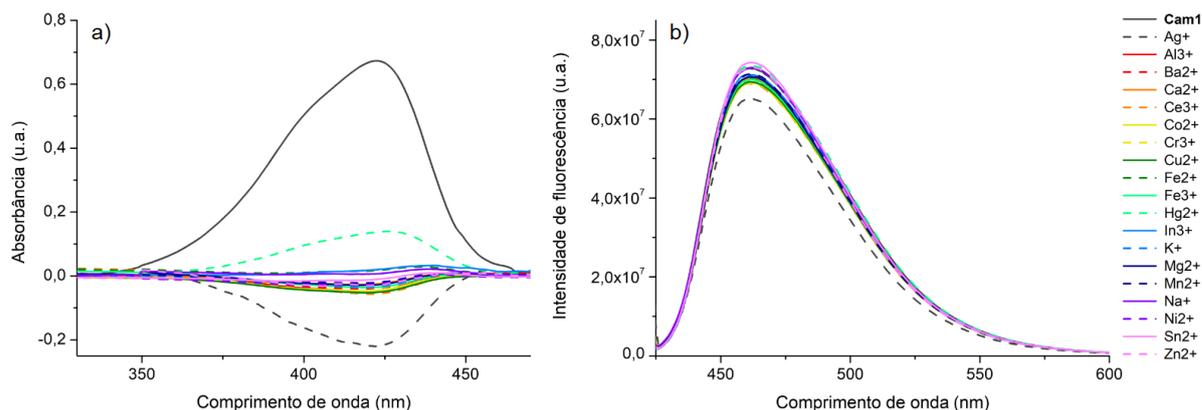


Figura 34. Curvas de a) absorção e b) emissão de **Cam1** com 1 eq. de íons metálicos em EtOH, excitação em 420 nm.

Em etanol, foi possível observar que a absorbância em 420 nm com  $\text{Hg}^{2+}$  sofreu um efeito hipocrômico, enquanto que com os demais íons metálicos a absorbância foi quase nula. O perfil de emissão do derivado **Cam1** em 461 nm não apresentou alteração quando diante de qualquer íon metálico. O derivado **Cam2** apresentou uma resposta analítica semelhante à **Cam1**, não observando absorção do derivado com as espécies metálicas em 421 nm e nem alteração no perfil de emissão em 460 nm (Figura 35).

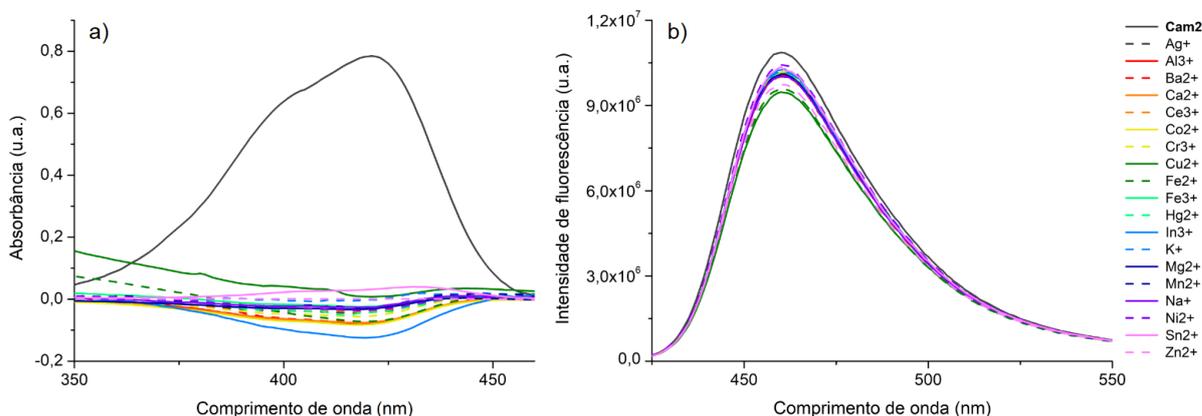


Figura 35. Curvas de a) absorção e b) emissão de **Cam2** com 1 eq. de íons metálicos em EtOH, excitação em 421 nm.

Com base nas respostas apresentadas em etanol e considerando a potencial aplicação dos derivados fluorescentes em sistemas biológicos, foram realizadas análises em água deionizada. Houve também a exclusão do íon de  $\text{Ce}^{3+}$  e a inclusão do íon  $\text{Cd}^{2+}$  devido à disponibilidade em laboratório.

Em água, foi possível observar que, na presença dos íons metálicos analisados, a absorbância em 422 nm do derivado **Cam1** sofreu um efeito hipocrômico, sendo que com nenhum metal foi observado uma curva de absorção positiva (Figura 36a). Pelas curvas de emissão, observou-se que não houve uma alteração seletiva referente à intensidade de fluorescência, mas foi notado que o pico de emissão em 473 nm sofreu um deslocamento batocrômico de 15 nm com  $\text{Cu}^{2+}$  e de 8 nm com  $\text{Ag}^{+}$

(Figura 36b). Com o intuito de avaliar a confiabilidade da resposta analítica para  $\text{Cu}^{2+}$ , foram preparadas novas soluções de **Cam1** e **Cam1**+ $\text{Cu}(\text{II})$  e foi notado que a curva de emissão da nova solução de **Cam1** foi deslocada para 471 nm e que **Cam1**+ $\text{Cu}(\text{II})$  não exibiu o deslocamento batocrômico apresentado na primeira replicata (Figura 36d). Com isso, a aplicação do derivado **Cam1** como sensor para  $\text{Cu}^{2+}$  foi descartado por não apresentar uma boa reprodutibilidade.

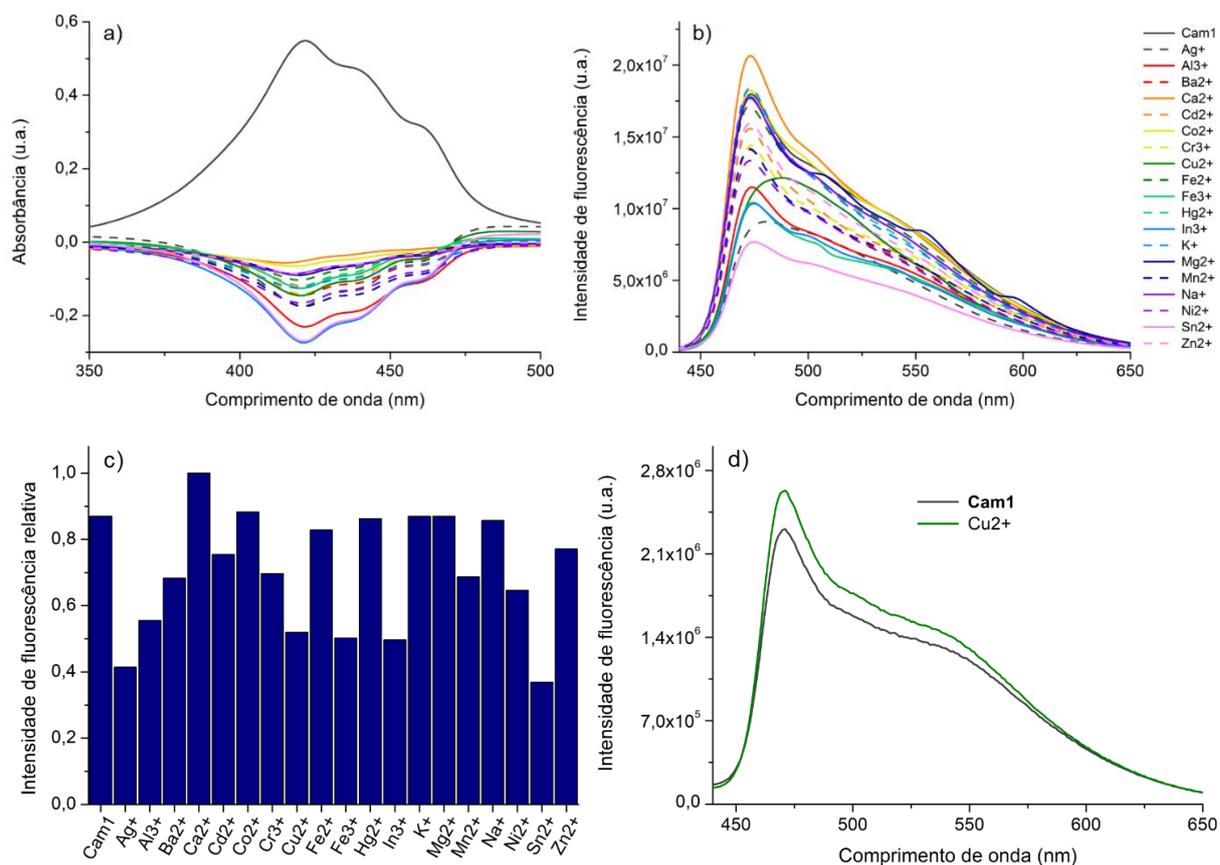


Figura 36. Curvas de a) absorção e b) emissão de **Cam1** com 1 eq. de íons metálicos em água deionizada, excitação em 422 nm. c) Intensidades de fluorescência relativas de **Cam1** com 1 eq. de íons metálicos em 473 nm. d) Intensidade de fluorescência em replicata para **Cam1** e **Cam1**+ $\text{Cu}^{2+}$

O derivado **Cam1** foi submetido a 10 eq. de íons metálicos para avaliar se a uma concentração maior de analito implicaria em uma variação da resposta analítica (Figura 37). Foi observado que as intensidades de fluorescência variaram com o aumento da concentração dos íons metálicos, mas que esta variação não foi suficiente para tornar o derivado um sensor.

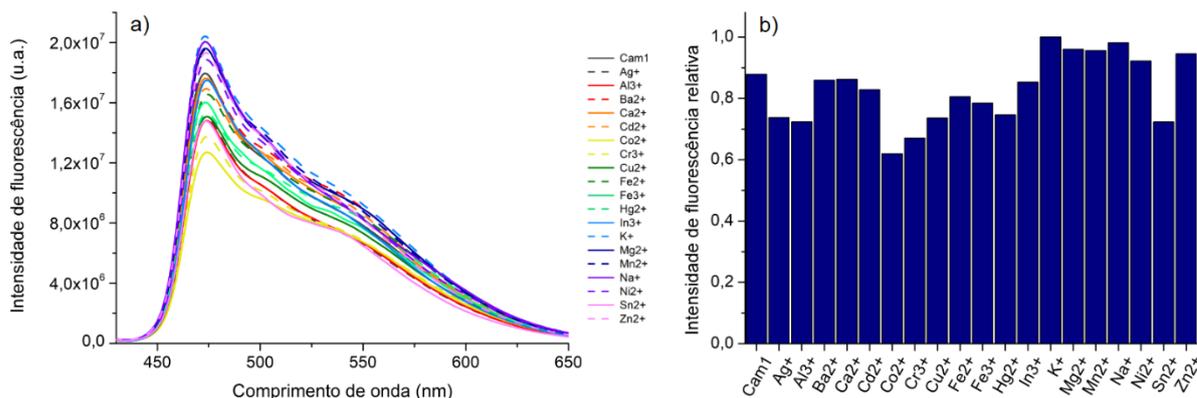


Figura 37. a) Curvas de emissão de **Cam1** com 10 eq. de íons metálicos em água deionizada, excitação em 422 nm. b) Intensidades de fluorescência relativas de **Cam1** com 10 eq. de íons metálicos em 473 nm.

O derivado **Cam2**, em água, apresentou uma curva de absorção em 409 nm quando livre e apenas com Na<sup>+</sup> foi possível observar uma leve absorção comparada aos outros íons. Os íons de Cu<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup> e Na<sup>+</sup> exibiram um aumento na intensidade de fluorescência em 488 nm, porém, a proximidade entre seus valores inviabilizam a aplicação do derivado como sensor para algum destes íons metálicos (Figura 38).

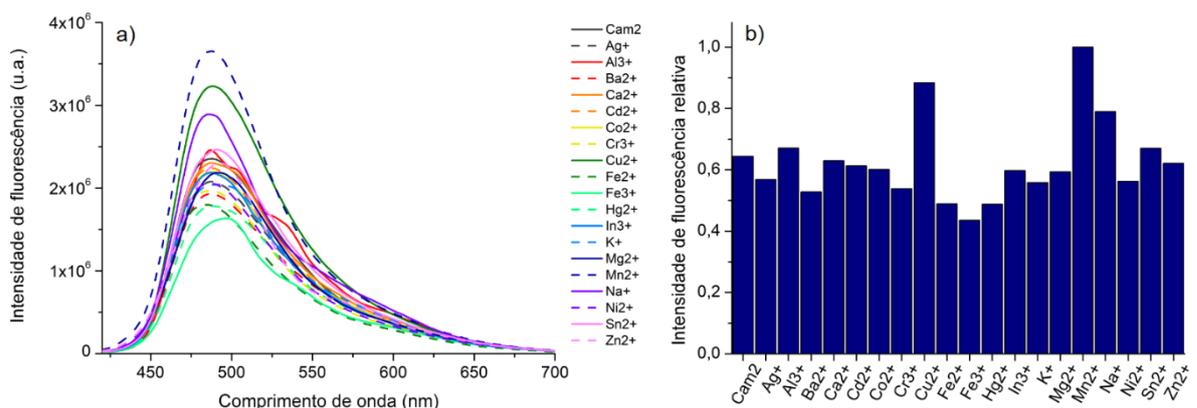


Figura 38. a) Curvas de emissão de **Cam2** com 1 eq. de íons metálicos em água deionizada, excitação em 409 nm. b) Intensidades de fluorescência relativas de **Cam2** com 1 eq. de íons metálicos em 488 nm.

Além dos derivados biscumarínicos, o derivado **mCam1** foi analisado em água e apresentou uma baixa absorbância em 430 nm, enquanto que a intensidade de fluorescência, em 479 nm, se manteve similar diante dos íons metálicos analisados (Figura 39).

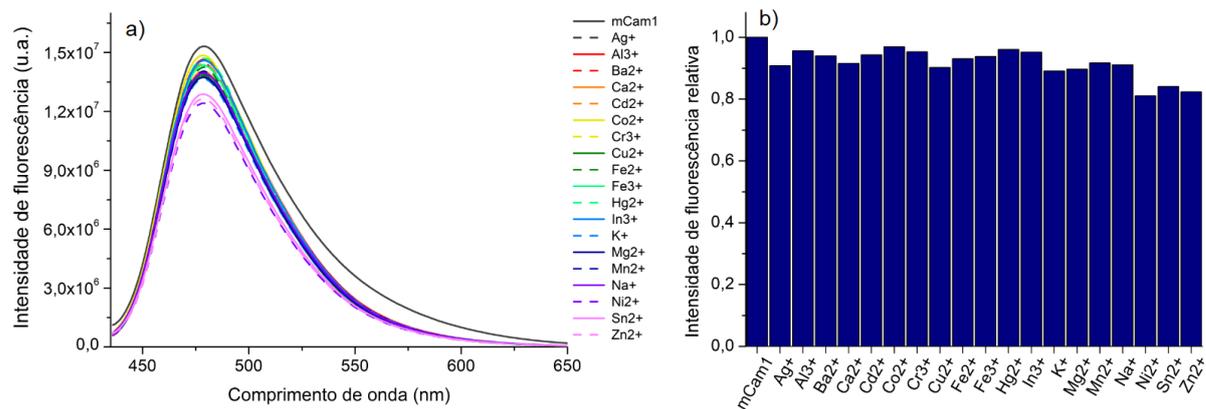


Figura 39. a) Curvas de emissão de **mCam1** com 1 eq. de íons metálicos em água deionizada, excitação em 430 nm. b) Intensidades de fluorescência relativas de **mCam1** com 1 eq. de íons metálicos em 479 nm.

## 4. Conclusões e perspectivas

Na primeira etapa deste projeto, a síntese de três potenciais quimiossensores fluorescentes (**Cam1**, **Cam2** e **mCam1**) foi realizada utilizando a metodologia proposta com o agente de acoplamento pyBOP, obtendo-se bons rendimentos (50 – 71 %), após superadas as dificuldades apresentadas na etapa de finalização da reação. Não se obteve o derivado **Cam3** devido a dietilenotriamina disponível em nosso laboratório não apresentar as características adequadas para estudo. Além disso, provável resquício de pyBOP foi identificado por ESI-MS nos produtos purificados **Cam1** e **Cam2**, provocando a busca por uma nova metodologia sintética. As metodologias testadas com DIC/DMAP, DCC e HOBT não apresentaram boa conversão para a substituição do pyBOP. Os derivados obtidos tiveram suas características fotofísicas determinadas (deslocamento de Stokes e rendimento quântico) e suas seletividades por íons metálicos avaliadas utilizando 19 cátions. Não foi possível observar seletividade, em água, para alguma espécie metálica por parte dos derivados obtidos.

Um breve estudo metodológico da síntese de **Cum2** viabilizou a otimização da sua obtenção de 6 % de rendimento, quando utilizado etanol não-anidro, para 86 %, utilizando-se etanol seco como solvente.

Diante das dificuldades na síntese dos derivados de imina **Cims**, foi estabelecido a síntese de **Cum3** para realizar um estudo metodológico utilizando um derivado de cumarina simplificado e mais reativo. A síntese de **Cim**-simplificado foi investigada em condições experimentais que variaram tempo reacional, volume e ausência de solvente e influência de aditivos como sulfato de sódio anidro e ácido *p*-toluenossulfônico. Foi observado que a formação da imina ocorreu na maior parte das condições testadas, porém, a taxa de conversão da cumarina de partida em produto se manteve sempre baixa. As reações utilizando 0,15 eq. de *p*TsOH com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e sem solvente foram purificadas por placa cromatográfica preparativa em diclorometano, contudo, a purificação não foi eficaz devido à proximidade das manchas referentes ao reagente de partida e ao produto, obtendo-se o produto com certo grau de impureza.

A síntese de **Cim1** utilizando o derivado fluorescente **Cum2** foi testada utilizando 0,10 eq. de *p*TsOH com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, sem solvente e o aparato de Dean-Stark, no entanto não foi observado progresso de reação em alguma das condições citadas, inviabilizando a obtenção dos derivados de imina como potenciais sensores fluorescentes.

Os derivados obtidos **Cam1**, **Cam2** e **mCam1** não apresentaram seletividade para os íons metálicos testados, impossibilitando a aplicação desses como sensores fluorescentes, assim como a síntese dos derivados **Cims** não foi sucedida como o esperado, não tornando viável a investigação destes derivados como potenciais sensores fluorescentes para íons metálicos.

Como perspectivas, temos a avaliação de um estudo metodológico na síntese dos derivados **Cims** sob radiação micro-ondas; para os derivados amídicos obtidos, **Cam1**, **Cam2** e **mCam1**, temos que avaliar a aplicabilidade deles em alguma atividade biológica ou em bioimageamento.

## 5. Referências bibliográficas

1. Domaille, D. W.; Que, E. L.; Chang, C. J. *Nat. Chem. Biol.*, **2008**, *4*, 168.
2. Mergu, N.; Kim, M.; Son, Y. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectroc.*, **2018**, *188*, 571.
3. Lee, J. D. Grupo 11: o grupo do cobre. In: *Química Inorgânica Não Tão Concisa*. São Paulo, Brasil: Edgard Blucher, **1999**, 423.
4. He, G.; Liu, X.; Xu, J.; Ji, L.; Yang, L.; Fan, A.; Wang, S. Wang. Q. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectroc.*, **2018**, *190*, 116.
5. Valeur, B. Fluorescent molecular sensor of ions and molecules. In: *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH, **2001**. 273.
6. Lakowicz, J. R. Introduction to Fluorescence. In: *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. USA: Springer, **2006**. 1.
7. Skoog, D. A.; West, D. M.; Holler, F. J.; Crouch, S. R. Espectroscopia de Fluorescência Molecular. In: *Fundamentos de Química Analítica*. São Paulo: Cengage Learning, **2013**. 782.
8. Santos, W. H.; Siqueira, M. S.; Silva-Filho, L. C. *Quim. Nova*. **2013**, *36*, 1303.
9. Croteau, R.; Kutchan, T. M.; Lewis, N. G. Natural Products (Secondary Metabolites). In: Buchanan, B.; Gruissem, W.; Jones, R. *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. USA: Wiley Blackwell, **2015**. 1308.
10. Dewick, P. M. The Shikimate Pathway: Aromatic amino acids and phenylpropanoids. In: *Medicinal Natural Products - A Biosynthetic Approach*. England: John Wiley & Sons, **2002**. 142.
11. Cunha, S.; Iunes, C. E. M.; Oliveira, C. C.; Santana, L. L. B. *Quim. Nova*. **2015**, *38*, 1125.
12. Ghouili, A.; Dusek, M.; Petricek, V.; Ben Ayed, T.; Ben Hassen, R. *J. Phy. Chem. Solids*. **2014**, *75*, 188.
13. Setsukinai, K.; Urano, Y.; Kikuchi, K.; Higuchi, T.; Nagano, T. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*. **2000**, 2453.
14. Pang, B.; Li, Q.; Li, C.; Yang, Z. *J. Lumin.* **2019**, *205*, 446.
15. Long, L.; Zhou, L.; Wang, L.; Meng, S.; Gong, A.; Du, F.; Zhang, C. *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 8214.
16. Daru, J.; Stirling, A. *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 8749.
17. Ahmad, Z. S.; Desai, R. D. *Heterocycl. Compd.* **1937**, *3*, 6.
18. Topkaya, D.; Alp, S. *J. Fluoresc.* **2017**, *27*, 1413.
19. Kürti, L.; Czakó, B. Knoevenagel Condensation. In: *Strategic Applications of Named Reactions in Organic Synthesis*. USA: Elsevier, **2005**, 242
20. Bednarz, S.; Bogdal, D. *Int. J. Chem. Kinet.* **2009**, *41*, 589.
21. Song, A.; Wang, X.; Lam, K. S. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 1755.
22. García-Beltrán, O.; Mena, N.; Yañez, O.; Caballero, J.; Vargas, V.; Nuñez, M. T.; Cassels, B. K. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *67*, 60.

23. Warriar, S.; Kharkar, P. S. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2018**, *188*, 659.
24. Jung, H. S.; Lee, J. Y.; Joo, T.; Kim, J. S.; et al. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 2008.
25. Fraceto, L. F.; Gonçalves, M. M.; Moraes, C. M.; Araújo, D. R.; Zanella, L. Paula., E.; Pertinhez, T. A. *Quim. Nova*, **2007**, *30*, 1203.
26. Jia, H.; Feng, C.; Tian, C. *Anal. Sci.* **2018**, *34*, 1079.
27. Wu, J.; Sheng, R.; Liu, W.; Wang, P.; Zhang, H.; Ma, J. *Tetrahedron*. **2012**, *68*, 5458.
28. Chen, G F.; Liu, L.; Wu, J. L.; Wu, S. J.; Chen, B. H. *Res. Chem. Intermed.* **2018**, *44*, 1381.
29. Goswami, S.; Das, A. K.; Maity, S. *Dalton Trans.* **2013**, *42*, 16259.
30. Lim, N. C.; Brückner, C. *Chem. Commun.* **2004**, *0*, 1094.
31. Xiao, J.; Feng, L.; Zhou, L.; Gao, H.; Zhang, Y. Yang, K. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *59*, 150.
32. Williams, D. B. G.; Lawton, M. *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 8351.
33. Moodley, T.; Momin, M.; Mocktar, C.; Kannigadu, C.; Koorbanally, N. A. *Magn. Reson. Chem.* **2016**, *54*, 610.
34. Chunfeng, Y.; Meixiang, L.; Wenyan, H.; Heping, Z. *Chinese J. Org. Chem.* **2011**, *31*, 2088.
35. Hoeg-Jensen, T.; Jakobsen, M. H.; Olsen, C. E.; Holm, A. *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 7617.
36. Robb, M. J.; Connal, L. A.; Lee, B. F.; Lynd, N. A.; Hawker, C. J. *Polym. Chem.* **2012**, *3*, 1618.
37. Fors. B. P.; Poelma, J. E.; Menyó, M. S.; Robb, M. J.; Spokoyny, D. M.; Kramer, J. W.; Waite, J. H.; Hawker, C. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 14106.
38. Sebestik, J.; Zawada, Z.; Safarik, M.; Hlavacek, J. *Amino Acids*, **2012**, *43*, 1297.
39. Silva, W. A. *Estudos da Redução Assimétrica de Iminas e Chalconas. Síntese de Compostos com Potencial Ação Farmacológica/Tecnológica.* **2009**. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade de Brasília, Brasília.
40. Ghanei-Nasab, S.; Khoobi, M.; Hadizadeh, F.; Marjani, A.; Moradi, A.; Nadri, H.; Emami, S. Foroumadi, A.; Shafiee, A. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *121*, 40.
41. Long, L.; Wu, Y.; Wang, L.; Gong, A.; Hu, F.; Zhang, C. *Chem. Commun.*, **2015**, *51*, 10435.
42. Vercillo, O. E. *Reações Ugi na construção de ciclopeptídeos: Síntese de um provável inibidor do complexo Tat/TAR do vírus HIV-1.* **2007**. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade de Brasília, Brasília.
43. Abou-Hussein, A. A.; Linert, W. *Spectrochim. Acta A.* **2015**, *141*, 223.
44. Reichardt, C. *Chem. Rev.* **1994**, *94*, 2319.
45. Melhuish, W. H. *J. Phys. Chem.* **1961**, *65*, 229.

## 6. Materiais e métodos

**RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ :** os espectros de ressonância magnética nuclear foram obtidos em espectrômetro *Bruker Ascend Avance III HD* (600 MHz para  $^1\text{H}$  e 150 MHz para  $^{13}\text{C}$ ) e *Varian Oxford YH Mercury Plus* (300 MHz para  $^1\text{H}$  e 75 MHz para  $^{13}\text{C}$ ). Todos os produtos foram solubilizados em  $\text{CDCl}_3$ , utilizando-se TMS (trimetilsilano) como referência interna e os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) expressados em partes por milhão (ppm). As abreviações das multiplicidades dos sinais nos espectros de RMN  $^1\text{H}$  foram utilizadas segundo a convenção: s (simpleto), d (duplete), t (triplete), q (quadruplete), qt (quintuplete), m (multiplete) e dd (duplo duplete).

**Espectrofotômetro de absorção:** os espectros de absorção foram obtidos em um espectrofotômetro *Varian Cary 5000* com leitura de branco.

**Espectrofotômetro de fluorescência:** os espectros de emissão foram obtidos em um espectrofluorímetro *Horiba Fluorolog*. As medidas foram realizadas com slits de excitação e emissão 2 e 5 nm, variados de acordo com o experimento.

**Solventes:** apenas o diclorometano e o acetato de etila foram destilados previamente. Quando necessário, o diclorometano foi seco com peneira molecular 3 Å por tempo maior ou igual a 24 horas ou por refluxo utilizando  $\text{CaH}_2$ . O etanol foi seco utilizando magnésio em raspas e iodo como indicador.

**Reagentes líquidos:** as aminas utilizadas, o acetoacetato de etila, o cloreto de oxalila e de tionila foram previamente destilados.

**Sais metálicos:** foram utilizados os seguintes sais:  $\text{AgNO}_3$ ,  $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CdCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{FeCl}_3$ ,  $\text{HgCl}_2$ ,  $\text{InCl}_3$ ,  $\text{KCl}$ ,  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{ZnCl}_2$ .

**Métodos cromatográficos:** o acompanhamento das reações por cromatografia em camada delgada foi realizado em folhas de alumínio revestidas com sílica gel 60 *Fluka Analytical*. Quando necessário, a purificação dos compostos por cromatografia em coluna foi feita em fase estacionária de sílica gel 60 e fase móvel composta por diclorometano e proporção variável de 0 a 3% de metanol. O método de purificação por placa preparativa (20x20 cm) também foi utilizado, tendo eluição com  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ .

**Estudo fotofísico:** as medidas de absorção e intensidade de fluorescência foram realizadas em soluções de 1  $\mu\text{M}$ , preparadas a partir de uma solução estoque de 1 mM de cada composto em diclorometano ou DMSO (devido à imiscibilidade de diclorometano em água). As soluções de 1  $\mu\text{M}$  foram preparadas a partir de alíquotas de 40  $\mu\text{L}$  da solução estoque, com volume total de 4 mL.

completado com o solvente desejado. O estudo do efeito do solvente foi efetuado com oito solventes: acetona, acetonitrila, acetato de etila, diclorometano, dioxano, etanol, metanol e tetraidrofurano.

**Rendimento quântico:** a determinação do rendimento quântico das amostras foi baseada no rendimento quântico de referência do sulfato de quinina. A solução de 1  $\mu\text{M}$  foi preparada a partir do cloridrato de quinina e solubilizado em solução de ácido sulfúrico 0,05 M. As soluções da cumarina e dos derivados foram preparadas como descrito anteriormente, utilizando-se acetonitrila como solvente, devido à sua equivalência ao índice de refração da solução de ácido sulfúrico ( $n^2 = n_{\text{ref}}^2$ ). As análises de emissão foram realizadas com fonte de excitação em 366 nm e slit de 3 nm. Calculou-se as áreas absolutas (I) das curvas obtidas para determinar o rendimento quântico através da relação matemática:

$$\phi = \phi_{\text{ref}} \frac{I}{I_{\text{ref}}} \frac{n_{\text{ref}}^2}{n^2} \quad (\text{Equação 2})$$

na qual o termo  $\phi_{\text{ref}}$  é o rendimento quântico de referência do sulfato de quinina e equivale a 0,53,<sup>45</sup> o termo I se refere a área integrada da curva de emissão e  $n$ , ao índice de refração do solvente.

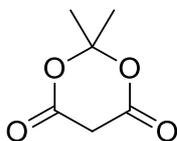
**Avaliação de seletividade:** foram preparadas soluções estoques de 1 mM dos íons metálicos a partir dos sais previamente citados inicialmente em etanol e metanol, para avaliação em diclorometano e em etanol, e em água deionizada para avaliação em água. As soluções de 1  $\mu\text{M}$  dos derivados de biscumarinas foram preparadas como apresentadas no estudo fotofísico, adicionando-se 40  $\mu\text{L}$  das soluções estoques dos íons metálicos (totalizando 1 eq.), prosseguindo-se com as medidas de absorção e emissão de cada solução, excitando-as com comprimento de onda referente ao máximo de absorção dos derivados livres.

---

<sup>45</sup> Melhuish, W. H. *J. Phys. Chem.* **1961**, *65*, 229.

## 7. Parte experimental

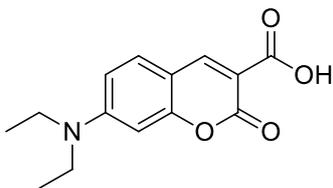
### 2,2-dimetil-1,3-dioxano-4,6-diona (Ácido de Meldrum)



Em um balão de 100 mL, a uma solução contendo ácido malônico **63** (8,4207 g; 80 mmol) e anidrido acético (9,9 mL; 105 mmol), sob agitação e 0°C, foi adicionado 0,3 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado. A temperatura ambiente e agitação, a acetona **64** (8,3 mL; 113 mmol) foi adicionada com o auxílio de um funil de adição à solução inicial. A solução reacional foi mantida sob agitação por 4 h e após este tempo foi mantida em repouso refrigerada por 16 h. Os cristais de ácido de Meldrum foram filtrados a vácuo e lavados com água gelada. O filtrado foi refrigerado por mais 24 h, repetindo-se o procedimento de filtração. O ácido de Meldrum (7,7028 g; 53 mmol) foi obtido em 67 % de rendimento. (E.1.1) RMN <sup>1</sup>H (600 MHz; CDCl<sub>3</sub>): δ 3,62 (s, 2H); 1,79 (s, 6H).

(E.1.2.) RMN <sup>13</sup>C (150 MHz; CDCl<sub>3</sub>): δ 163,1; 106,3; 36,2; 27,5.

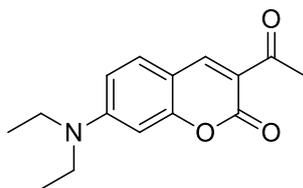
### Ácido 7-(*N,N*-dietilamino)-2-oxo-2*H*-cromeno-3-carboxílico (Cum1)



Em um balão de 50 mL, uma solução de 4-(*N,N*-dietilamino)-2-hidroxibenzaldeído **1** (1,5013 g; 7,76 mmol), ácido de Meldrum **2** (1,4438 g; 10,00 mmol) e acetato de amônio (0,1443 g; 1,87 mmol) em etanol P.A. (20 mL) foi agitada por 16 h sob temperatura ambiente. O precipitado laranja foi filtrado a vácuo e o sólido lavado com H<sub>2</sub>O destilada e etanol, ambos gelados, obtendo-se a cumarina **Cum1** (1,6029 g; 6,13 mmol) em 79 % de rendimento, sendo utilizada em outras etapas sem prévia purificação.

(E.2.1) RMN <sup>1</sup>H (300 MHz; CDCl<sub>3</sub>): δ 12,34 (sl, 1H); 8,63 (s, 1H); 7,45 (d, *J* = 9,0 Hz, 1H); 6,72 (dd, *J* = 9,1 e 2,2 Hz, 1H); 6,53 (d, *J* = 2,1 Hz, 1H); 3,50 (q, *J* = 7,3 Hz, 4H); 1,27 (t, *J* = 7,0 Hz, 6H).

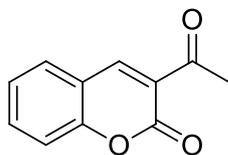
(E.2.2) RMN <sup>13</sup>C (75,46 MHz; CDCl<sub>3</sub>): δ 165,5; 164,4; 158,0; 153,7; 150,2; 131,9; 110,9; 108,5; 105,4; 96,7; 45,3; 12,3.

**3-Acetil-7-(N,N-dietilamino)-2H-cromen-2-ona (Cum2)**

Em um balão de 50 mL, uma solução de 4-(N,N-dietilamino)-2-hidroxibenzaldeído **1** (0,2830 g; 1,50 mmol), de acetoacetato de etila **3** (287  $\mu$ L; 2,25 mmol) e piperidina **36** (15  $\mu$ L; 0,15 mmol) em etanol seco (20 mL) foi refluxada por 16 h. A solução foi resfriada à temperatura ambiente, apresentando a formação de um precipitado amarelo. O precipitado foi filtrado por gravidade e o sólido resultante recristalizado em etanol P.A., obtendo-se **Cum2** (0,3253 g; 1,26 mmol) em 86 % de rendimento.

**(E.3.1)** RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  8,44 (s, 1H); 7,40 (d,  $J = 8,9$  Hz, 1H); 6,62 (dd,  $J = 9,0$  e 2,4 Hz, 1H); 6,47 (d,  $J = 2,3$  Hz, 1H); 3,47 (q,  $J = 7,1$  Hz, 4H); 2,68 (s, 3H); 1,25 (t,  $J = 7,1$  Hz, 6H).

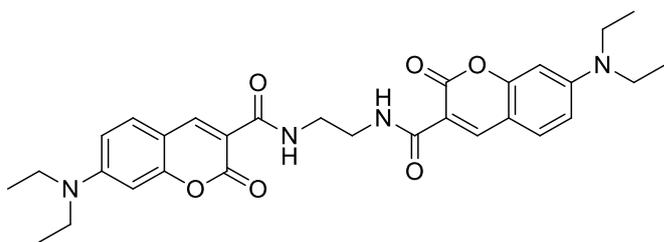
**(E.3.2)** RMN  $^{13}\text{C}$  (75,46 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  195,8; 160,9; 158,7; 153,0; 147,9; 131,9; 116,1; 109,8; 108,2; 96,6; 45,1; 30,6; 12,4.

**3-Acetil-2H-cromen-2-ona (Cum3)**

Em um balão de 50 mL, uma solução contendo 2-hidroxibenzaldeído **34** (1 mL; 10 mmol), não destilado previamente, acetoacetato de etila **3** (1,4 mL; 11 mmol) e piperidina (0,1 mL; 1,00 mmol) em etanol (20 mL) foi mantida sob agitação e temperatura ambiente por 20 h. O precipitado branco-amarelado foi filtrado por filtração normal, obtendo-se **Cum3** (0,8558 g; 4,55 mmol) em 45 % de rendimento, sendo utilizada em outras etapas sem prévia purificação.

**(E.4.1)** RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  8,51 (s, 1H); 7,66 (m, 2H); 7,36 (m, 2H); 2,73 (s, 3H).

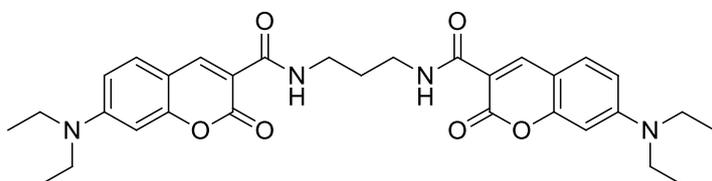
**(E.4.2)** RMN  $^{13}\text{C}$  (75,46 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  195,5; 159,2; 155,3; 147,4; 134,4; 130,2; 124,9; 124,5; 118,2; 116,6; 30,5.

***N,N'*-(etano-1,2-diil)bis(7-(*N,N*-dietilamino)-2-oxo-2*H*-cromeno-3-carboxamida) (Cam1)**

Em um balão de 50 mL, uma solução de **Cum1** (0,1303 g; 0,50 mmol), etilenodiamina **4** (17  $\mu$ L; 0,25 mmol), pyBOP **69** (0,2599 g; 0,50 mmol) e DIEA **68** (0,3 mL; 1,55 mmol), em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeCN (1:1, 20 mL), permaneceu sob agitação e temperatura ambiente por aproximadamente 20 h. À solução reacional foi lavada com salmoura e a fase orgânica lavada com H<sub>2</sub>O, sol. conc. de NaHCO<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>O e salmoura, seca com NaSO<sub>4</sub> anidro, filtrada e concentrada a vácuo. O derivado **Cam1** (0,09 g; 0,17 mmol) foi obtido em 71 % de rendimento após purificação em coluna cromatográfica (0  $\rightarrow$  2% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), como um sólido amarelo.

**(E.5.1)** RMN <sup>1</sup>H (600 MHz; CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  9,00 (s, 2H); 8,71 (s, 2H); 7,43 (d,  $J$  = 8,9 Hz, 2H); 6,65 (dd,  $J$  = 8,9 e 2,6 Hz, 2H); 6,50 (d,  $J$  = 2,5 Hz, 2H); 3,68 (m, 4H); 3,45 (q,  $J$  = 7,1 Hz, 8H); 1,24 (t,  $J$  = 7,1 Hz, 12H).

**(E.5.2)** RMN <sup>13</sup>C (150 MHz; CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  163,5; 162,6; 157,6; 152,3; 148,1; 131,1; 110,5; 110,0; 108,6; 96,7; 45,2; 39,3; 12,3.

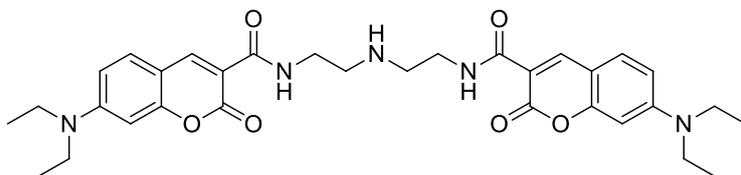
***N,N'*-(propano-1,3-diil)bis(7-(*N,N*-dietilamino)-2-oxo-2*H*-cromeno-3-carboxamida) (Cam2)**

Em um balão de 50 mL, uma solução de **Cum1** (0,1306 g; 0,50 mmol), propanodiamina **5** (21  $\mu$ L; 0,25 mmol), pyBOP **69** (0,2602 g; 0,50 mmol) e DIEA (0,3 mL; 1,55 mmol), em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeCN (1:1, 20 mL), permaneceu sob agitação e temperatura ambiente por aproximadamente 20 h. À solução reacional foi lavada com salmoura e a fase orgânica lavada com H<sub>2</sub>O, sol. conc. de NaHCO<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>O e salmoura, seca com NaSO<sub>4</sub> anidro, filtrada e concentrada a vácuo. O derivado **Cam2** (0,0892 g; 0,16 mmol) foi obtido em 64 % de rendimento após purificação em coluna cromatográfica (0  $\rightarrow$  2% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), como um sólido amarelo.

**(E.6.1)** RMN <sup>1</sup>H (600 MHz; CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  8,96 (m, 2H); 8,72 (s, 2H); 7,44 (d,  $J$  = 8,9 Hz, 2H); 6,69 (dd,  $J$  = 9,0 e 2,2 Hz, 2H); 6,54 (d,  $J$  = 1,9 Hz, 2H); 3,54 (q,  $J$  = 6,3 Hz, 2H); 3,46 (q,  $J$  = 7,1 Hz, 8H); 1,94 (p,  $J$  = 6,8 Hz, 2H); 1,24 (t,  $J$  = 7,2 Hz, 12H).

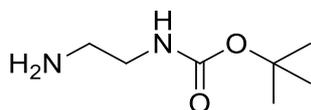
**(E.6.2)** RMN <sup>13</sup>C (150 MHz; CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  163,3; 162,5; 157,5; 152,0; 148,0; 131,1; 110,7; 110,2; 108,8; 97,2; 45,4; 37,2; 29,9; 12,3.

***N,N'*-(azanodiilbis(etano-2,1-diil))bis(7-(*N,N*-dietilamino)-2-oxo-2*H*-cormeno-3-carboxamida)  
(Cam3)**



Em um balão de 50 mL, uma solução de **Cum1** (0,0784 g; 0,30 mmol), dietilenotriamina **6** (16  $\mu$ L; 0,15 mmol), pyBOP **69** (0,1561 g; 0,30 mmol) e DIEA (0,2 mL; 1,00 mmol), em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeCN (1:1, 20 mL), permaneceu sob agitação e temperatura ambiente por aproximadamente 20 h. À solução reacional foi lavada com salmoura e a fase orgânica lavada com H<sub>2</sub>O, sol. conc. de NaHCO<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>O e salmoura, seca com NaSO<sub>4</sub> anidro, filtrada e concentrada a vácuo. O derivado **Cam3** não foi obtido.

***tert*-butil(2-aminoetil)carbamato (4-Boc)**

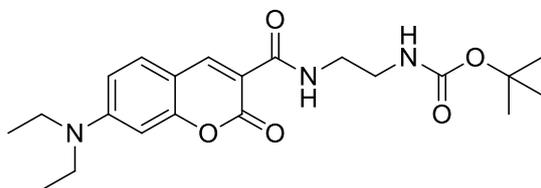


Em um balão de 50 mL, refluxou-se uma solução contendo etilenodiamina **4** (1,5 mL; 22,50 mmol) e carbonato de *tert*-butiloxifenila **73** (4,1 mL; 22,50 mmol) em etanol seco (20 mL) por 24 h. A solução foi concentrada a vácuo e o resíduo diluído em água, sendo em seguida acidificado a pH 3 com solução 2 M de HCl e extraído com CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. A fase orgânica foi seca com NaSO<sub>4</sub> anidro, filtrada e concentrada a vácuo, obtendo-se **4-Boc** (1,6031 g, 10,00 mmol) em 44 % de rendimento.

(E.7.1) RMN <sup>1</sup>H (300 MHz; CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  4,95 (sl, 1H); 3,17 (q, *J* = 5,9 Hz, 2H); 2,80 (t, *J* = 5,9 Hz, 2H); 1,45 (s, 9H); 1,27 (s, 2H).

(E.7.2) RMN <sup>13</sup>C (75,46 MHz; CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  156,2; 79,1; 53,4; 43,4; 41,8; 28,4.

***t*-butil(2-(7-(*N,N*-dietilamino)-2-oxo-2*H*-cromeno-3-carboxiamida)etil)carbamato (mCam1-Boc)**



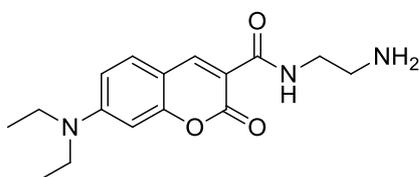
Em um balão de 10 mL, a uma solução de **Cum1** (0,0262 g; 0,10 mmol) e pyBOP (0,0530 g; 0,10 mmol) em 1 mL de MeCN, sob agitação, adicionou-se DIEA (50  $\mu$ L; 0,27 mmol) via septo e uma solução de *tert*-butil(2-aminoetil)carbamato **4-Boc** (16  $\mu$ L; 0,10 mmol) em 0,3 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, deixando a solução sob agitação e temperatura ambiente por 24 h. À solução reacional foi lavada com salmoura e a fase orgânica lavada com H<sub>2</sub>O, sol. conc. de NaHCO<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>O e salmoura, seca com NaSO<sub>4</sub> anidro, filtrada e concentrada a vácuo. O composto **mCam1-Boc** (0,0344

g; 0,08 mmol) foi obtido em 84 % de rendimento após ser purificado em coluna cromatográfica (0 → 2% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), como um sólido amarelo.

**(E.8.1)** RMN <sup>1</sup>H (300 MHz; CDCl<sub>3</sub>): δ 8,97 (s, 1H); 8,70 (s, 1H); 7,43 (d, *J* = 8,9 Hz, 1H); 6,65 (dd, *J* = 9,1 e 2,5 Hz, 1H); 6,50 (d, *J* = 2,4 Hz, 1H); 5,07 (sl, 1H); 3,56 (q, *J* = 5,8 Hz, 2H); 3,46 (q, *J* = 7,1 Hz, 4H); 3,36 (q, *J* = 5,1 Hz, 2H); 1,44 (s, 9H), 1,24 (t, *J* = 7,1 Hz, 6H).

**(E.8.2)** RMN <sup>13</sup>C (75,46 MHz; CDCl<sub>3</sub>): δ 163,9; 162,6; 157,5; 156,0; 152,1; 148,1; 131,2; 110,4; 108,8; 97,2; 79,4; 45,5; 41,0; 39,7; 28,4; 12,3.

### ***N*-(2-aminoetil)-7-(*N,N*-dietilamino)-2-oxo-2*H*-cromeno-3-carboxiamida (mCam1)**



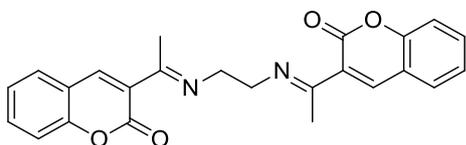
Em um balão de 10 mL, adicionou-se 1 mL de TFA a **mCam1-Boc** (0,0242 g; 0,06 mmol) a 0 °C, agitando a solução por 2 h. O excesso de TFA foi removido sob vácuo e o resíduo neutralizado com solução 2 M de NaOH, sendo extraído com CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. A fase orgânica foi lavada com sol. conc. de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> e salmoura, seca com NaSO<sub>4</sub> anidro, filtrada e concentrada a vácuo, obtendo-se **mCam1** (0,0092 g; 0,03 mmol) em 50 % de rendimento.

**(E.9.1)** RMN <sup>1</sup>H (300 MHz; CDCl<sub>3</sub>): δ 8,98 (s, 1H); 8,71 (s, 1H); 7,43 (d, *J* = 9,0 Hz, 1H); 6,65 (dd, *J* = 8,9 e 2,5 Hz, 1H); 6,51 (d, *J* = 2,4 Hz, 1H); 3,51 (q, *J* = 6,1 Hz, 2H); 3,46 (q, *J* = 7,2 Hz, 4H); 2,93 (t, *J* = 6,1 Hz, 4H); 1,24 (t, *J* = 7,1 Hz, 6H)

**(E.9.2)** RMN <sup>13</sup>C (75,46 MHz; CDCl<sub>3</sub>): δ 163,5; 162,7; 157,6; 152,5; 148,1; 131,1; 110,2; 109,9; 108,3; 96,5; 45,0; 42,8; 41,8; 12,4.

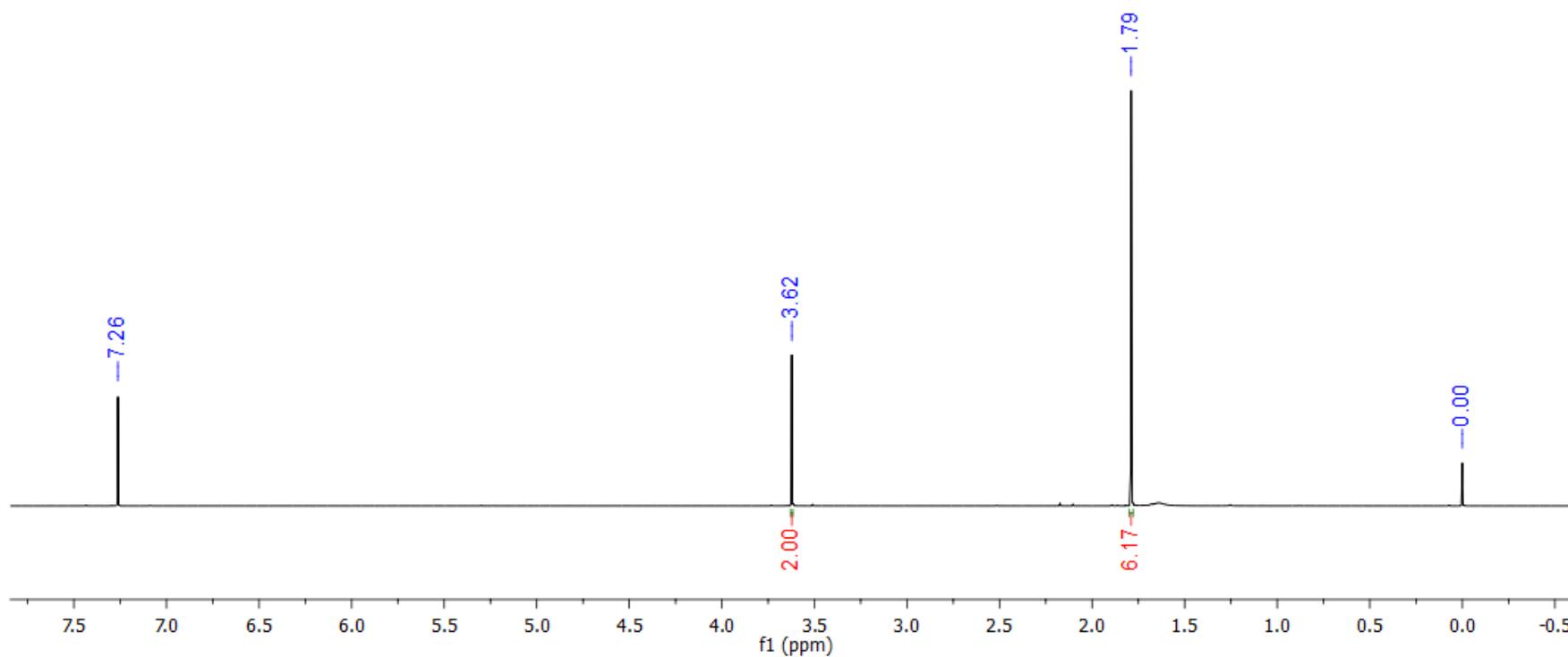
### **3,3'-(etano-1,2-diilbis(azanilideno))bis(etano-1-il-1-ilideno)bis(2*H*-cromeno-2-ona)**

**(Cim1-simplificado)**

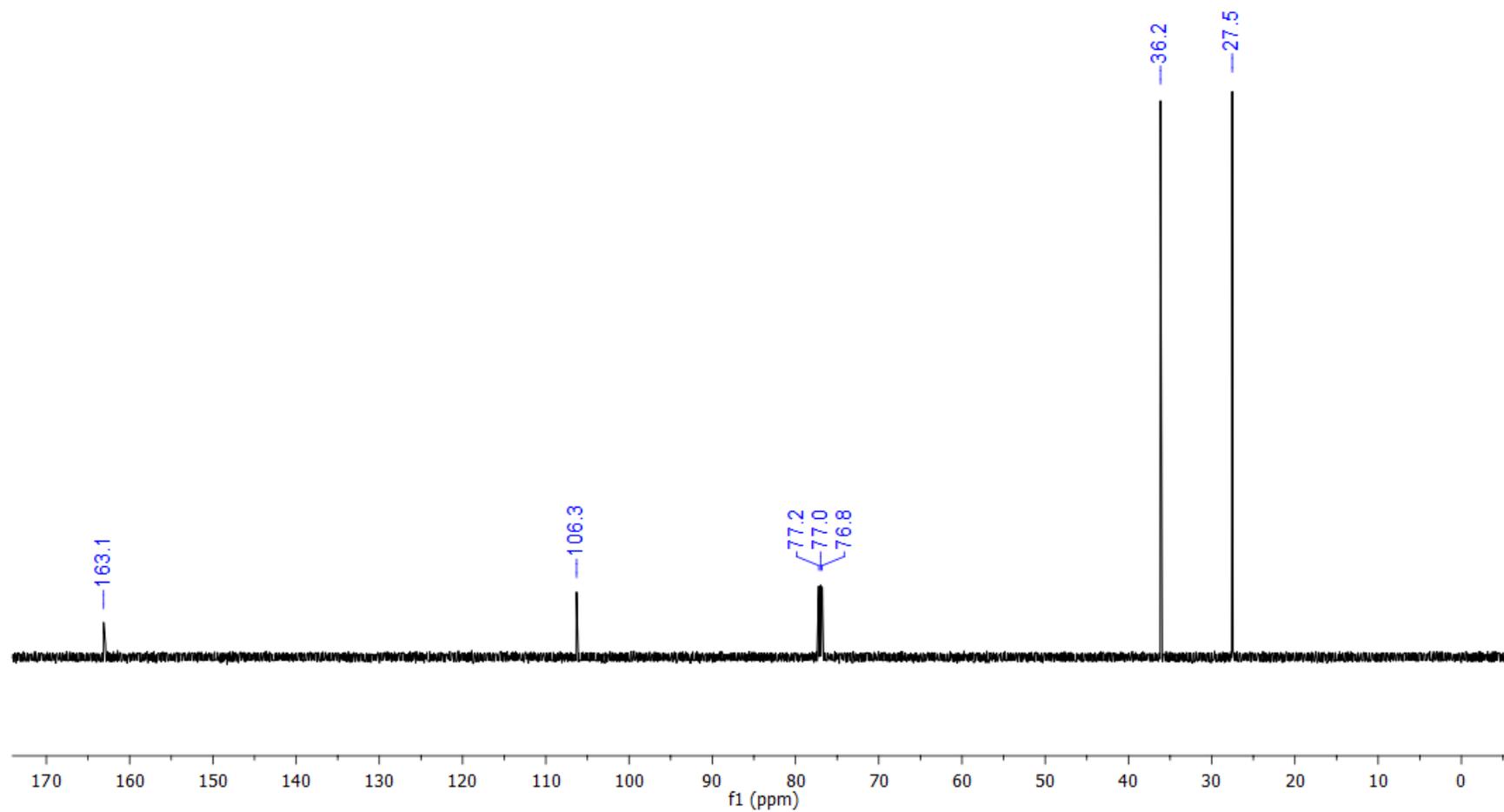


Em um almofariz foram adicionados a cumarina **Cum3** (0,0754 g; 0,4 mmol) e a etilenodiamina **4** (13 μL; 0,2 mmol), que com o auxílio de um pistilo foram maceradas por alguns minutos, observando a formação de um sólido amarelo. A purificação do **Cim1-simplificado** foi realizada por cromatografia em placa (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), porém a purificação não foi completamente eficaz, apresentando resquício do reagente de partida **Cum3**. O produto **Cim1-simplificado** (0,0080 g; 0,03 mmol) foi obtido em 13 % de rendimento..

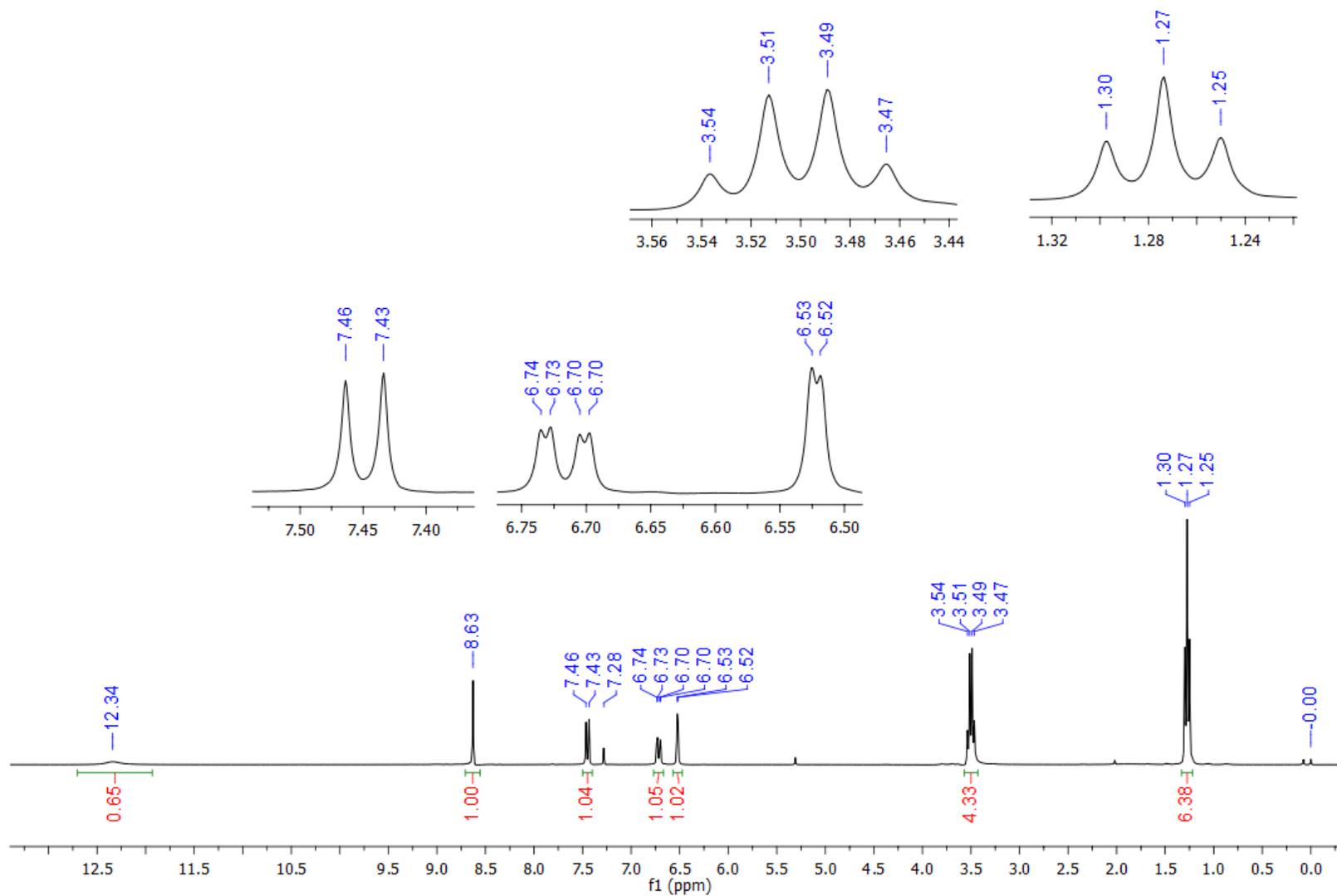
## 8. Anexos



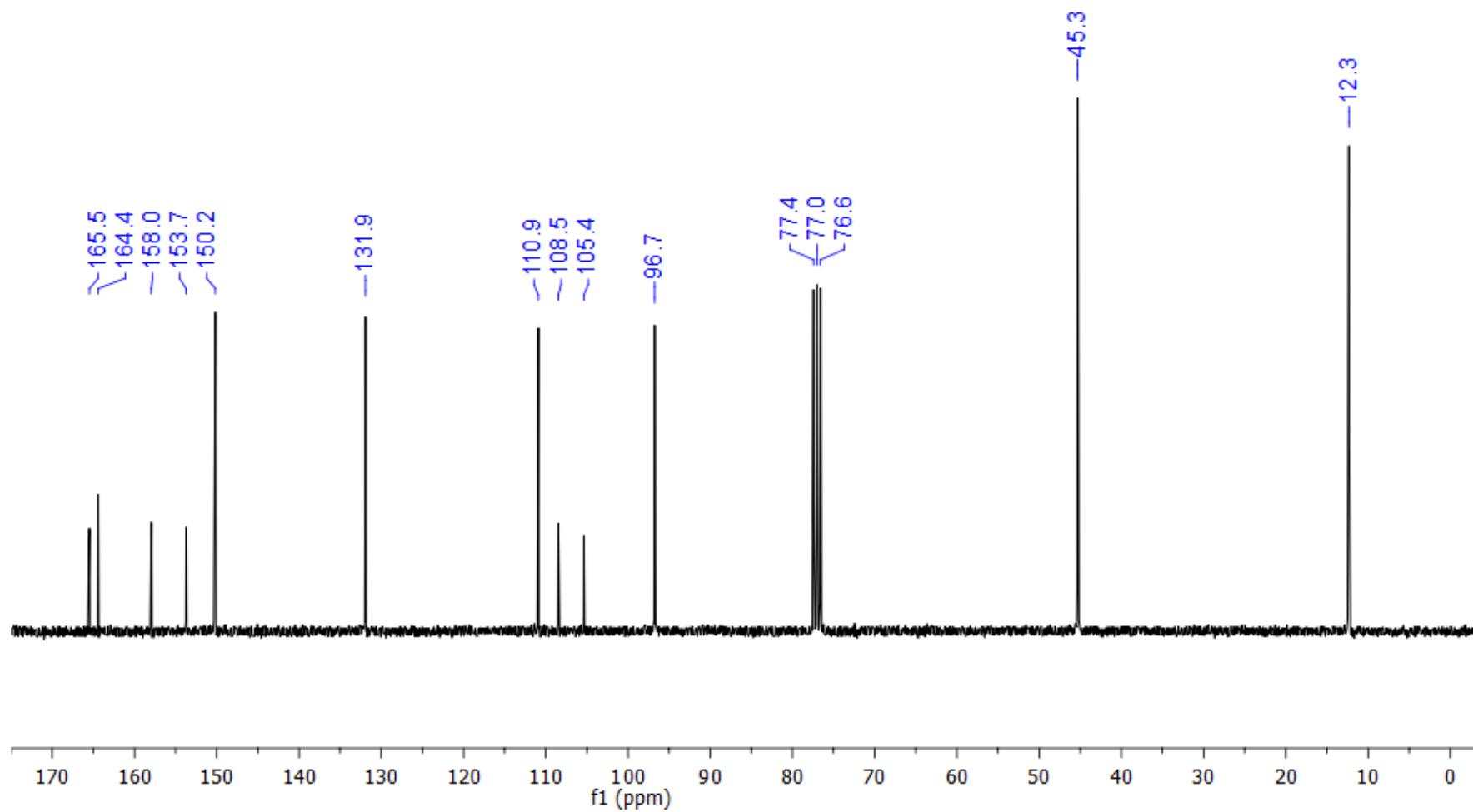
**Espectro 1.1.** Espectro de RMN <sup>1</sup>H (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do ácido de Meldrum **2**.



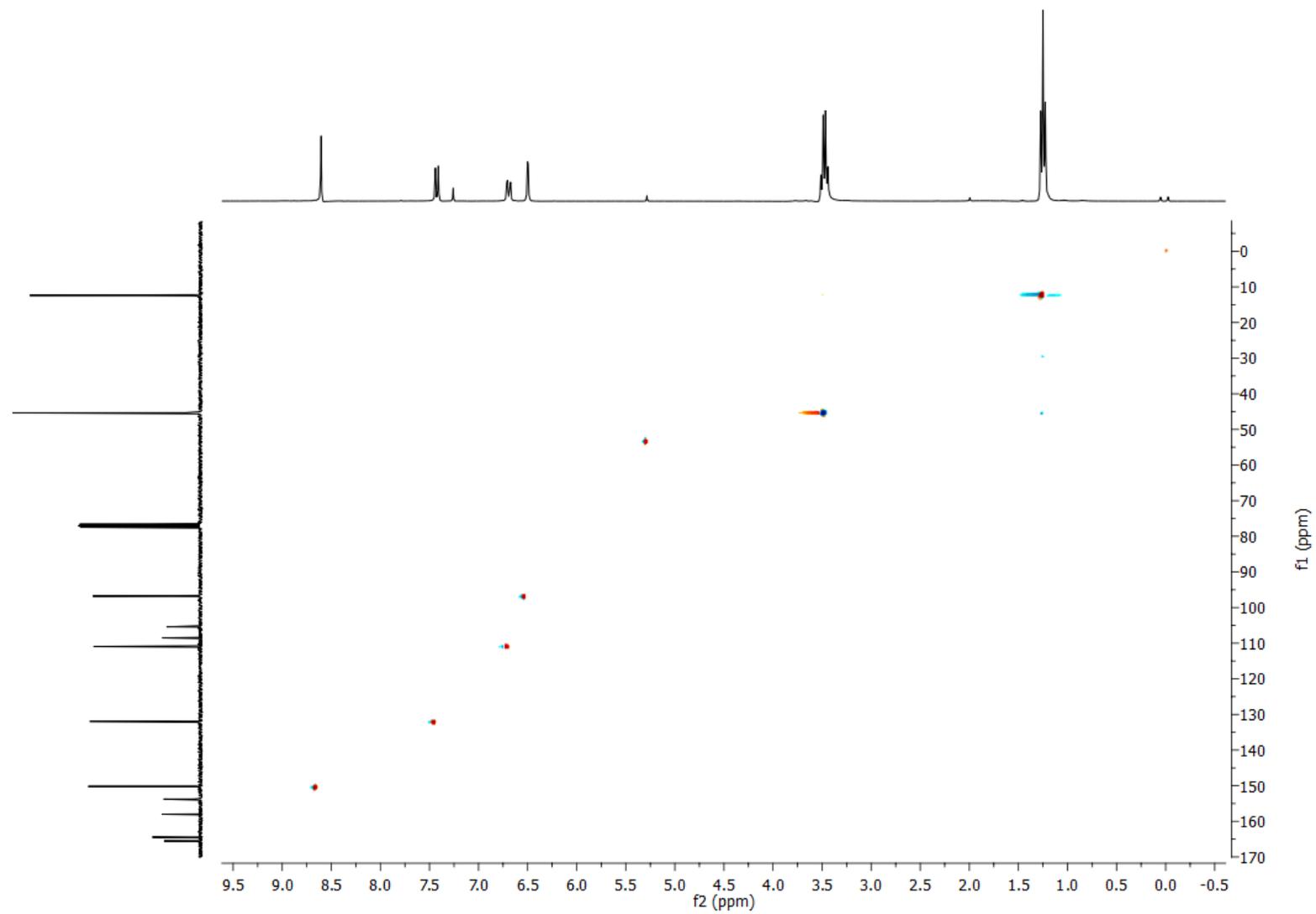
**Espectro 1.2.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do ácido de Meldrum **2**.



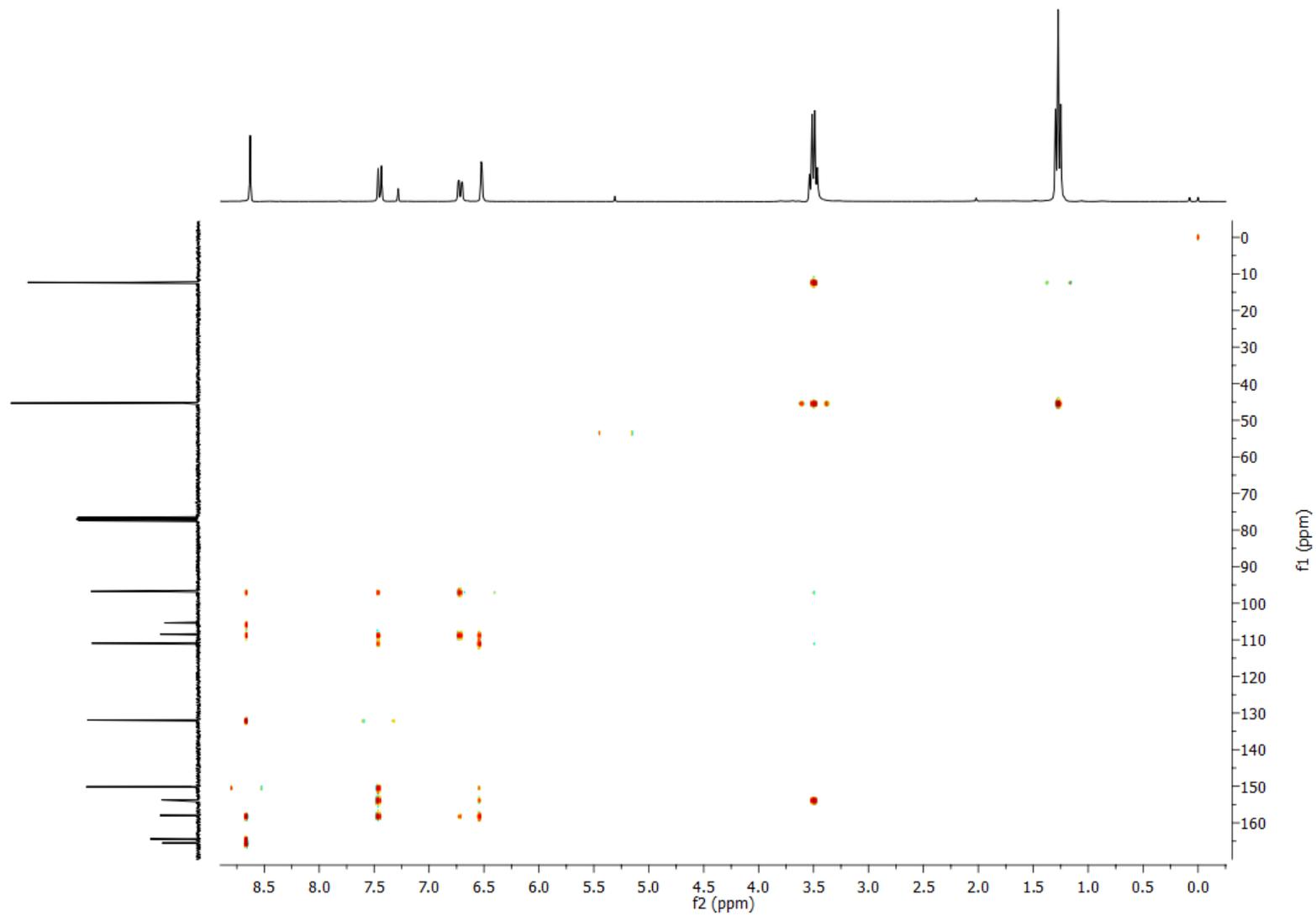
**Espectro 2.1.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de **Cum1**.



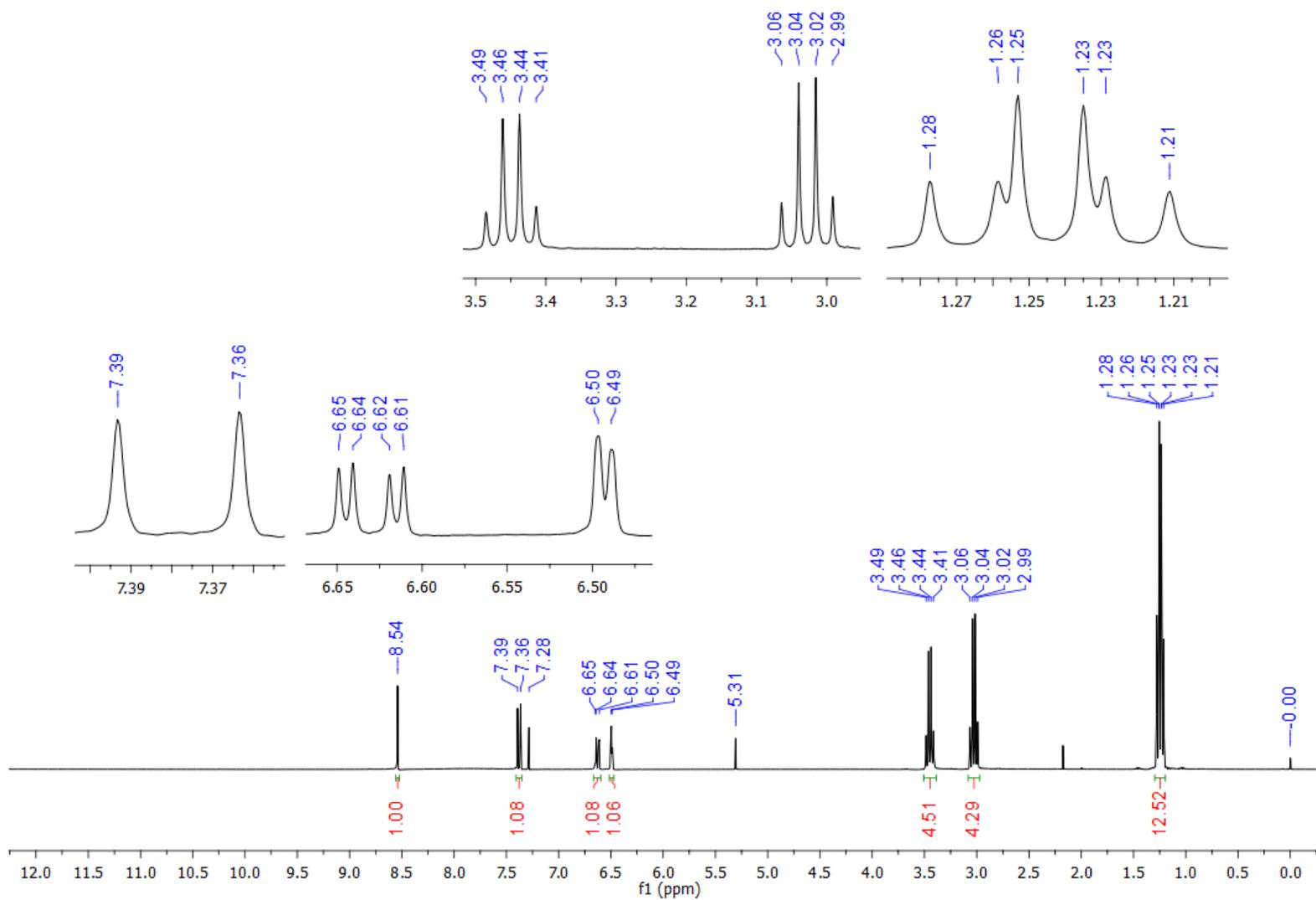
**Espectro 2.2.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (75,46 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de **Cum1**.



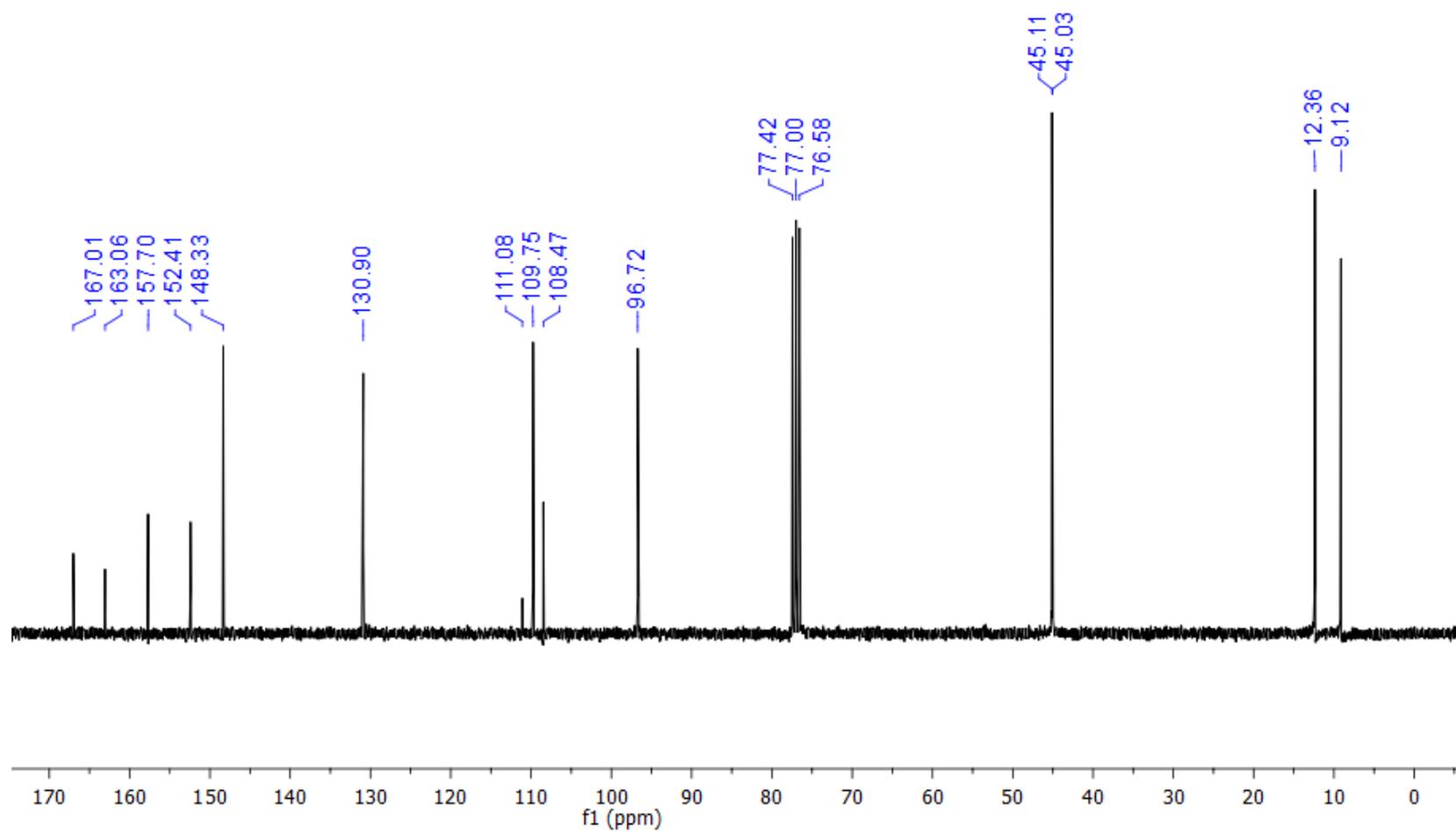
**Espectro 2.3.** Espectro de RMN HSQC (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de **Cum1**.



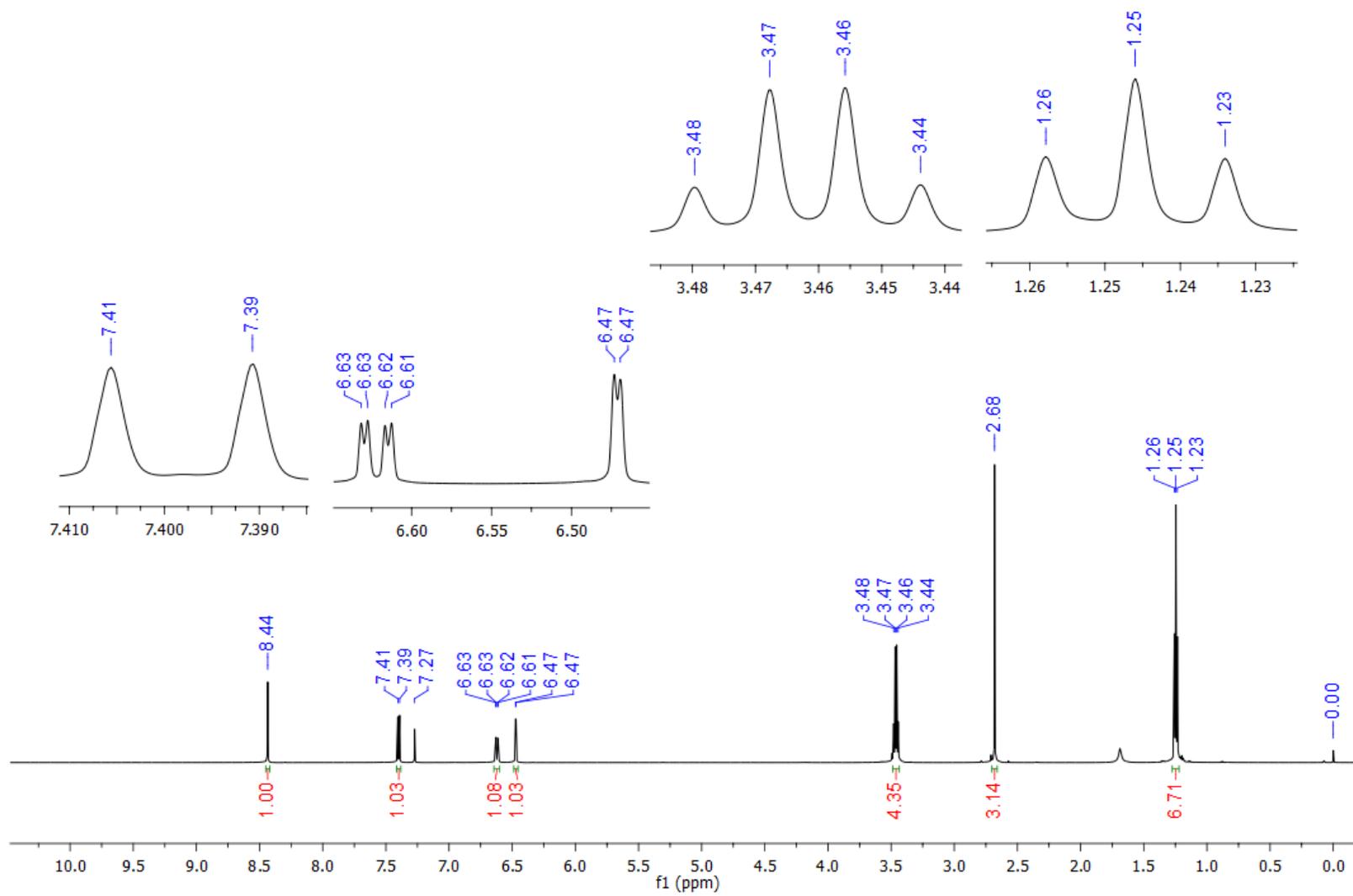
**Espectro 2.4.** Espectro de RMN HMBC (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de **Cum1**.



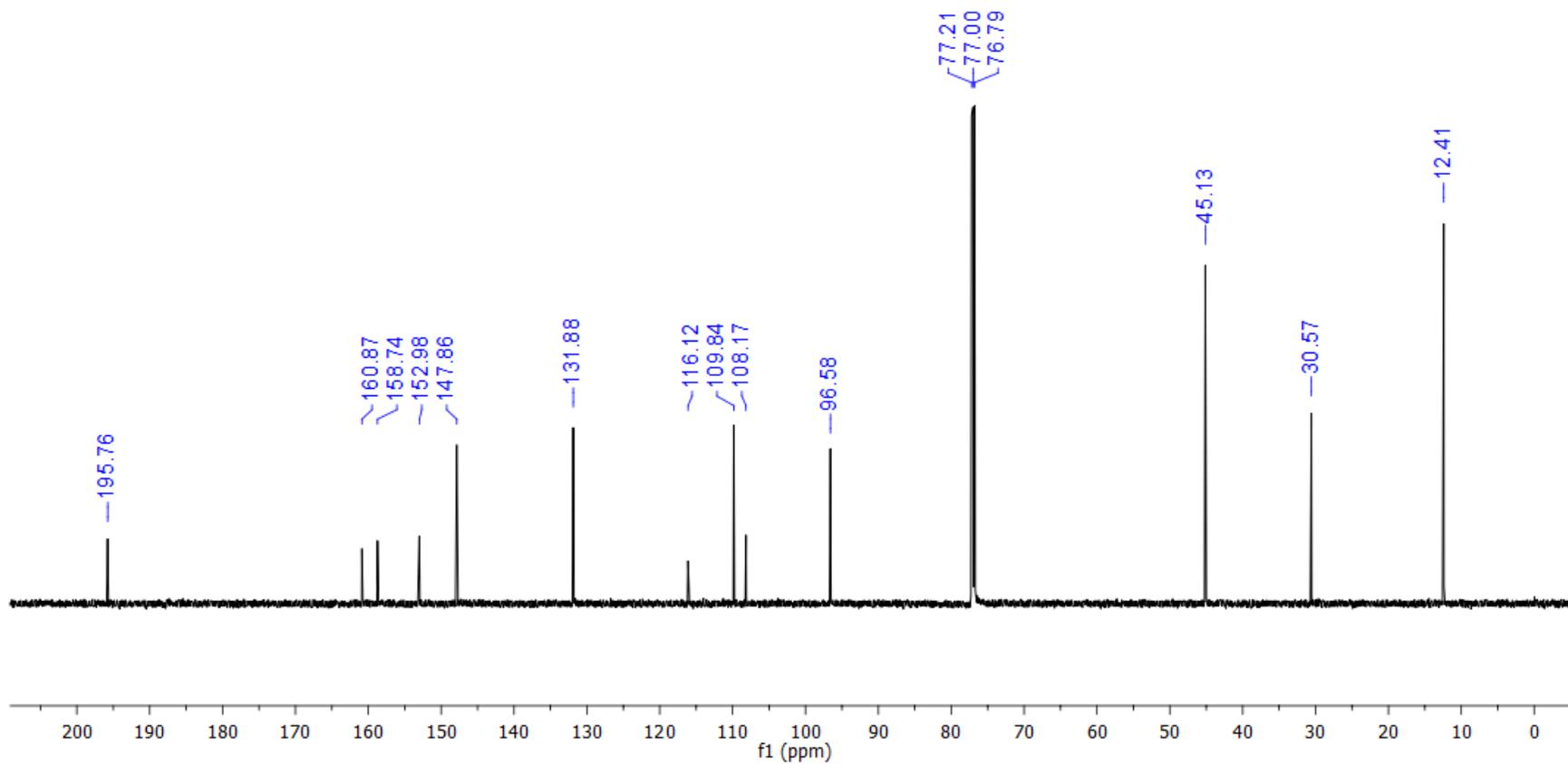
**Espectro 2.5.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de **Cum1**-carboxilato.



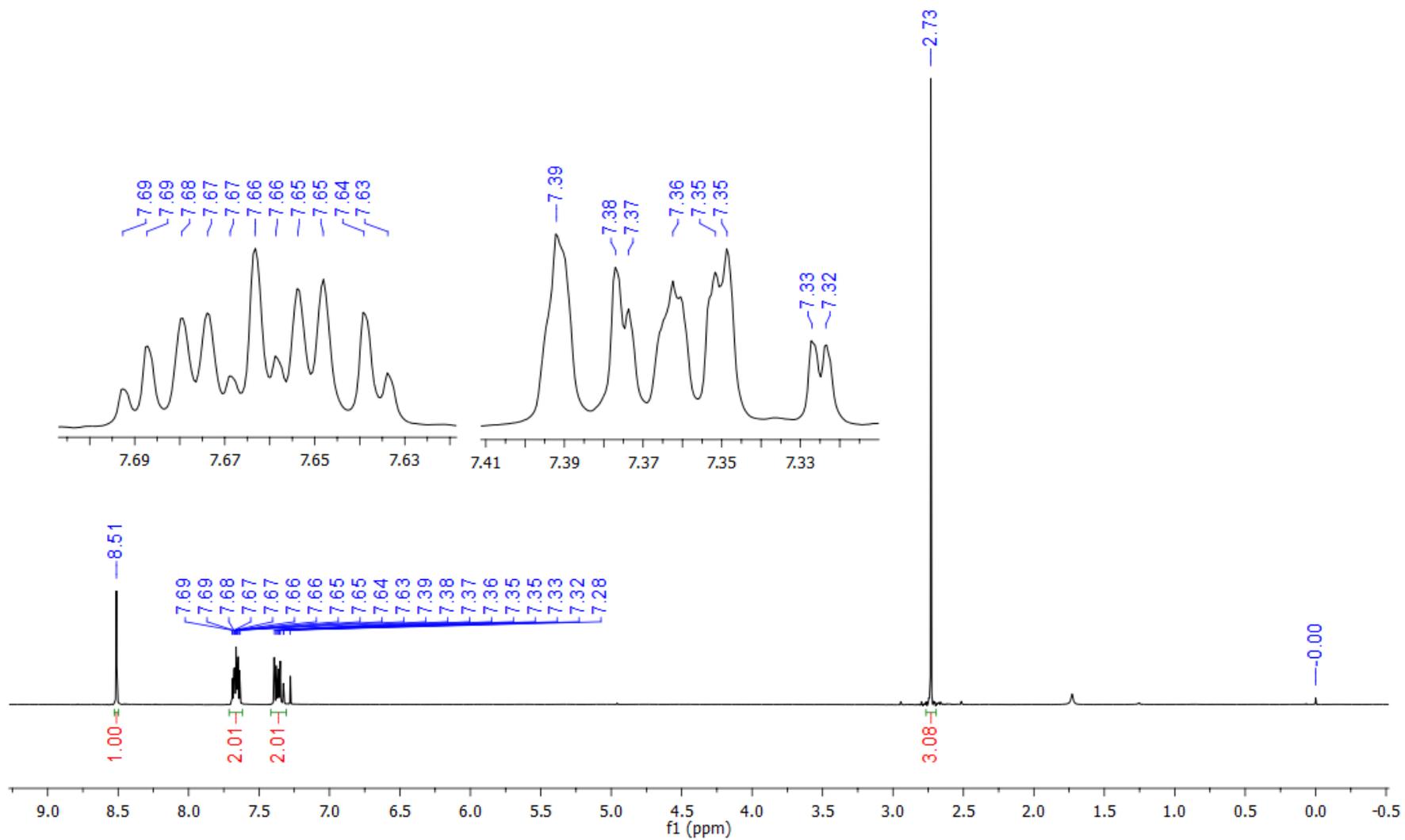
**Espectro 2.6.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (75,46 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de **Cum1**-carboxilato.



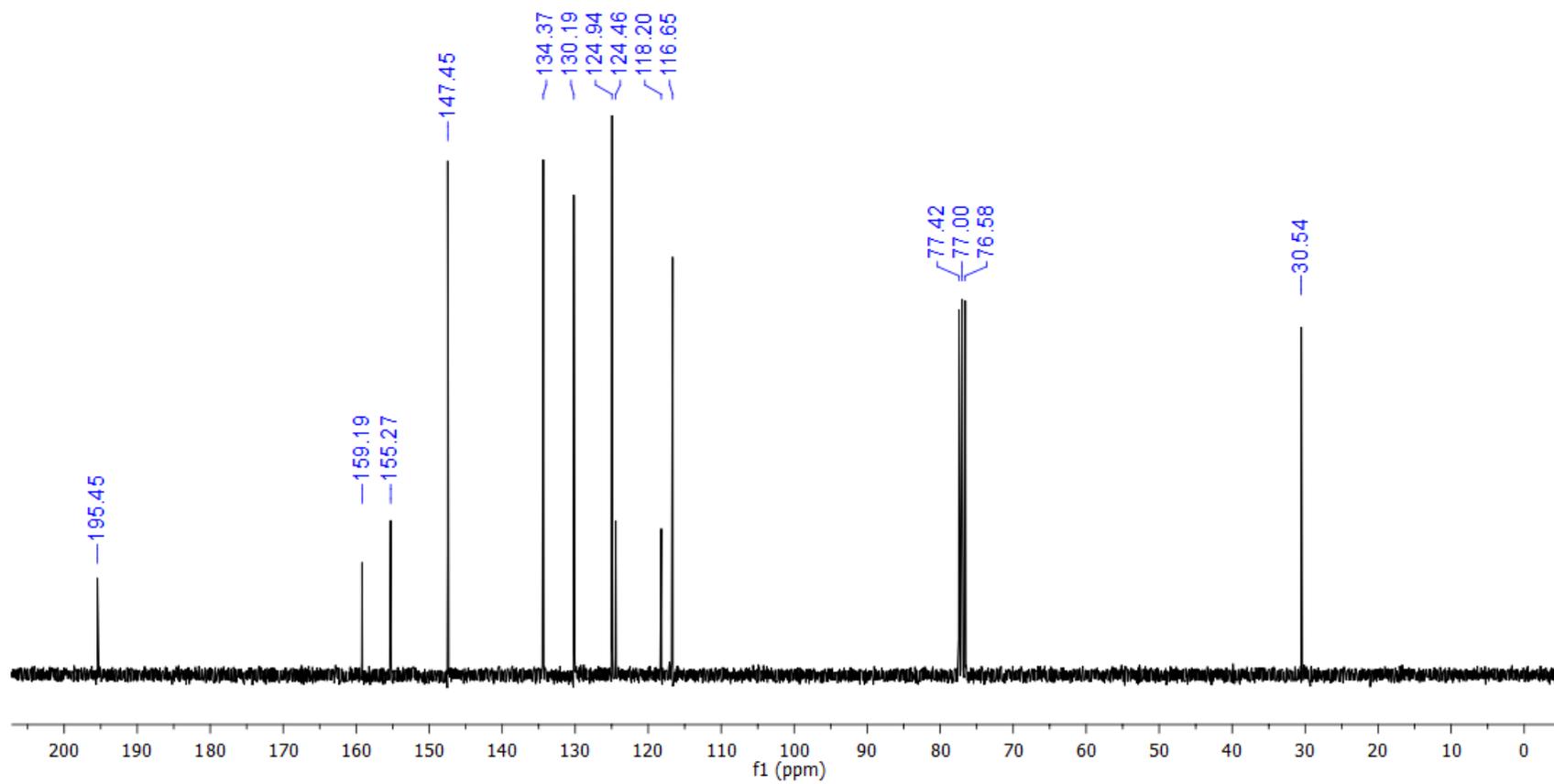
**Espectro 3.1.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de **Cum2**.



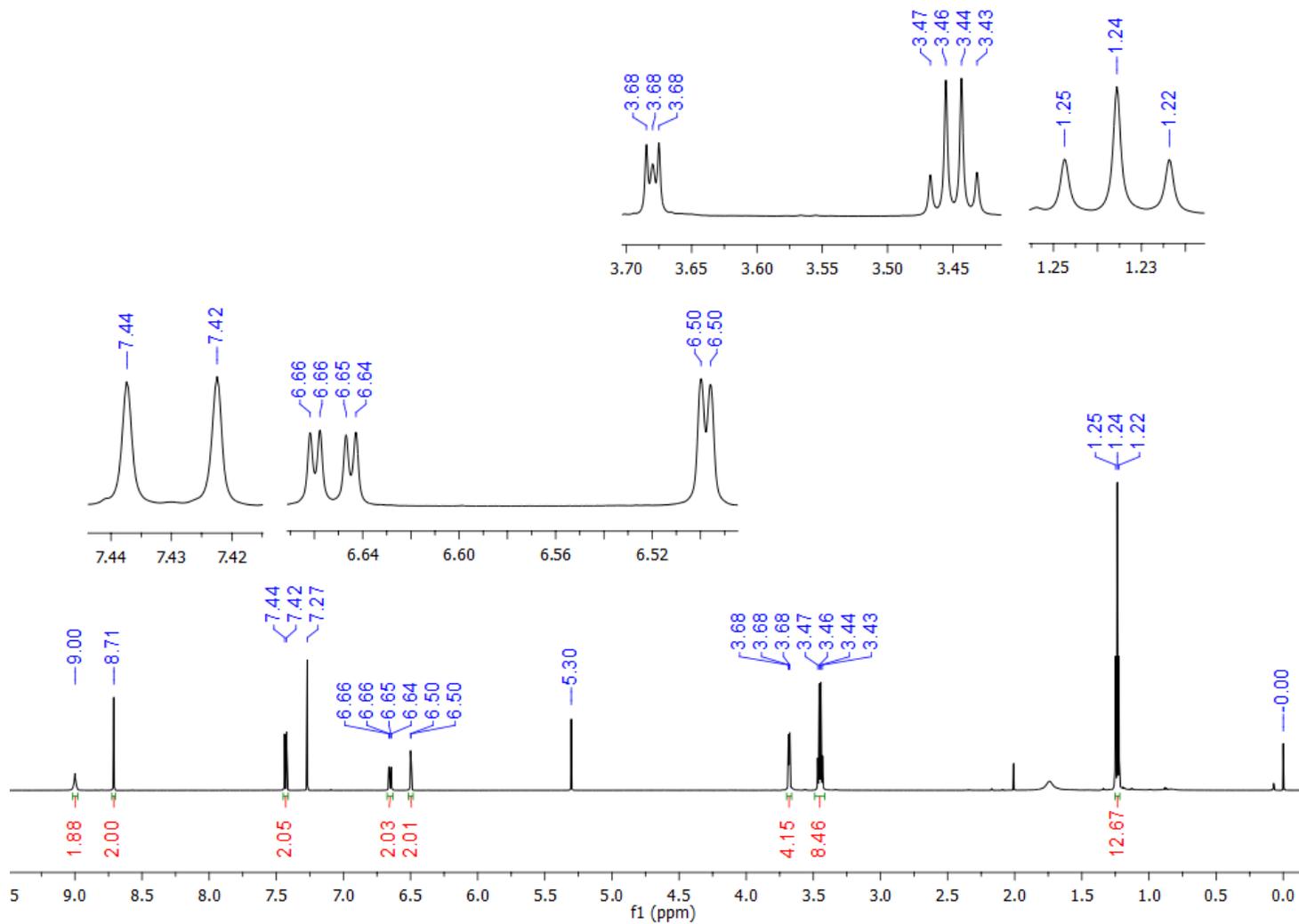
**Espectro 3.2.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (75,64 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de **Cum2**.



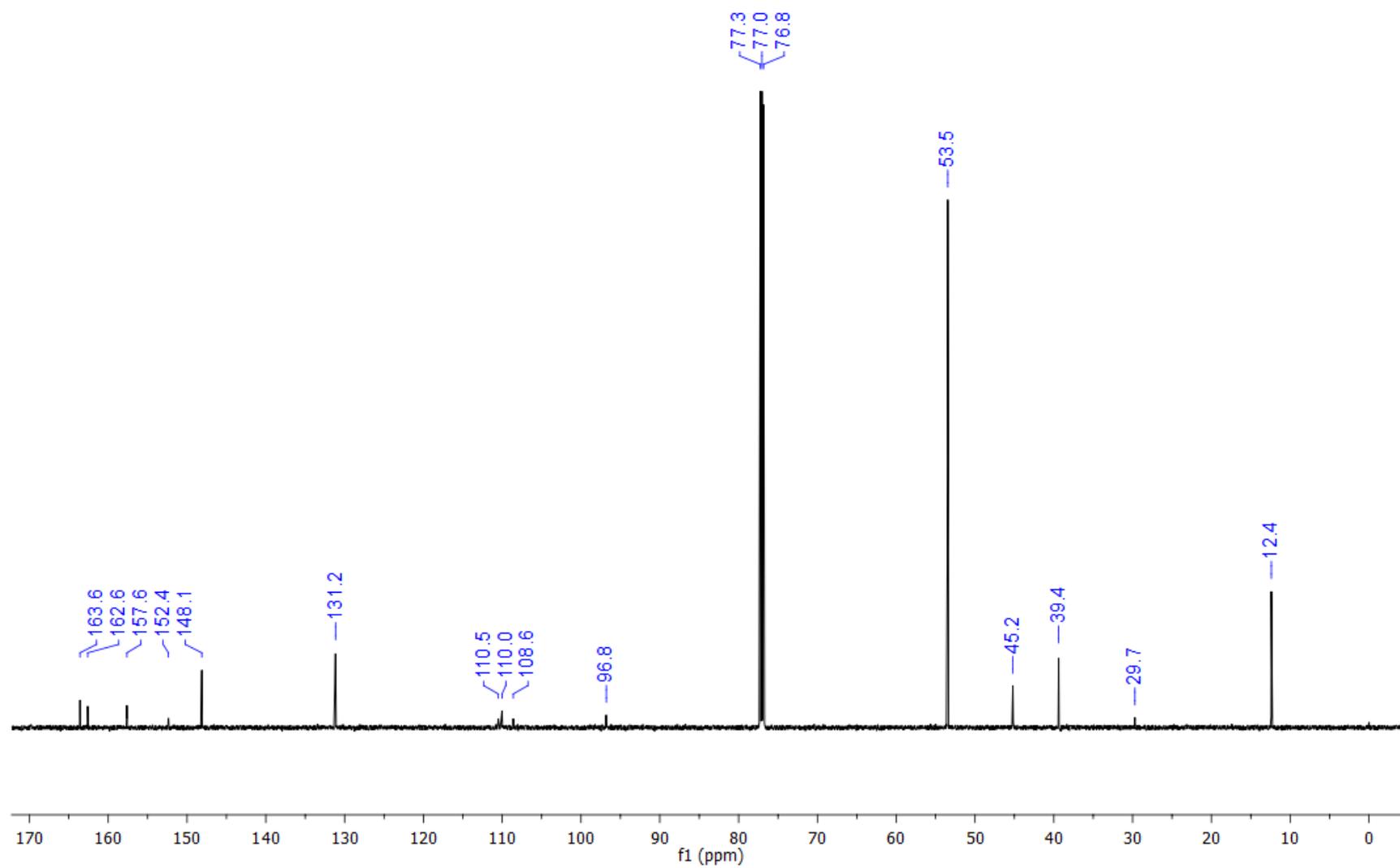
**Espectro 4.1.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de **Cum3**.



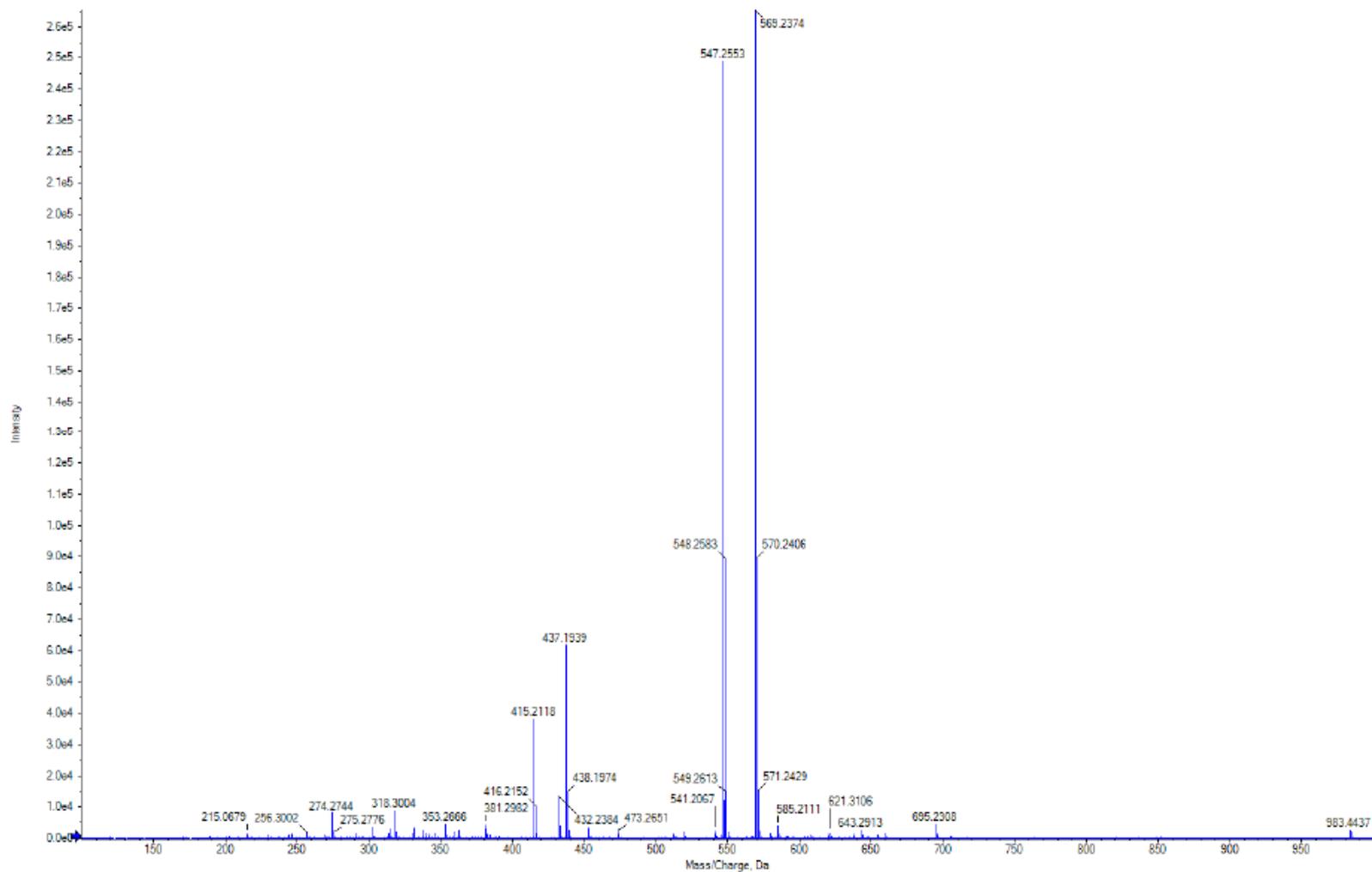
**Espectro 4.2.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (75,64 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de **Cum3**.



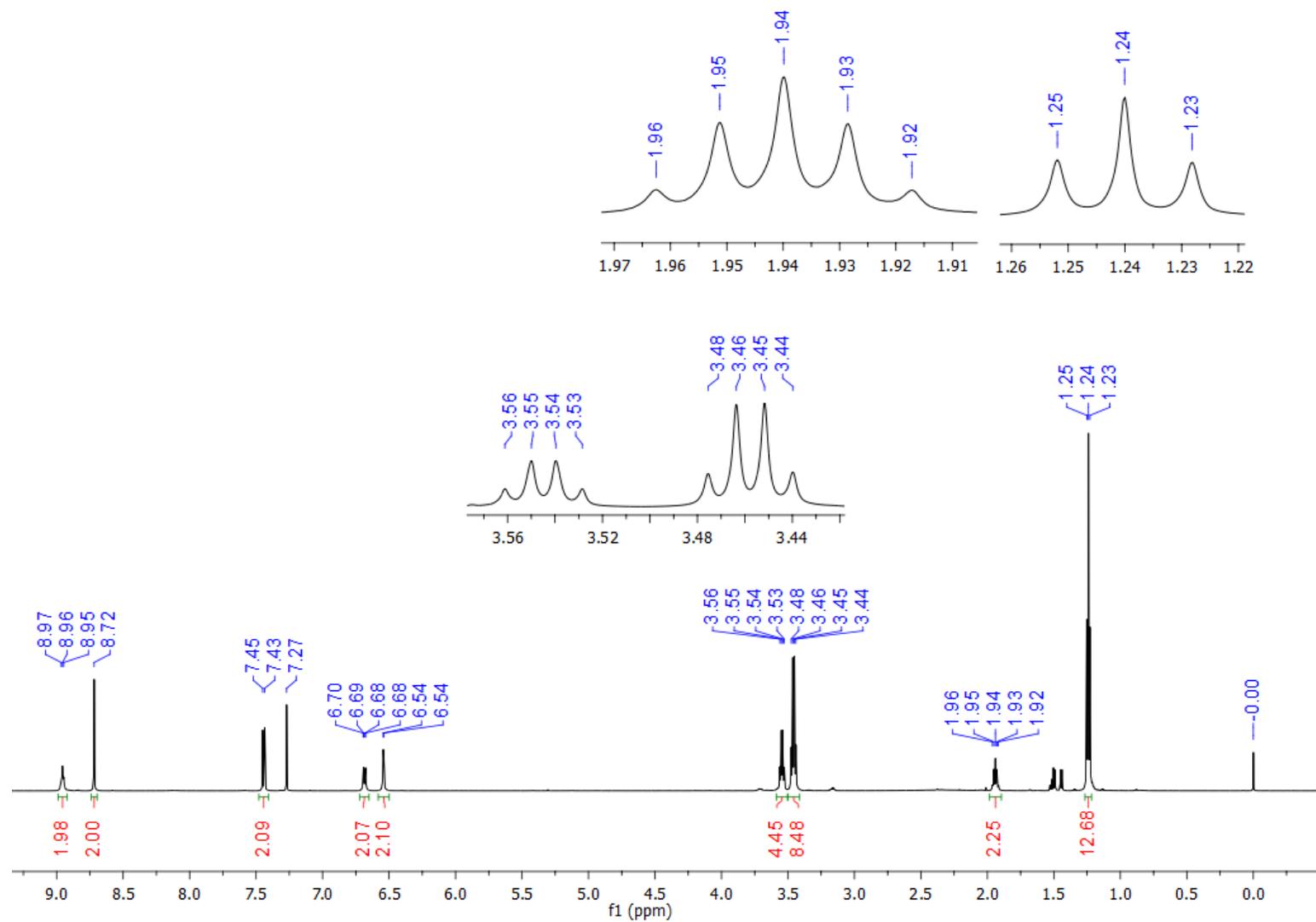
**Espectro 5.1.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de **Cam1**.



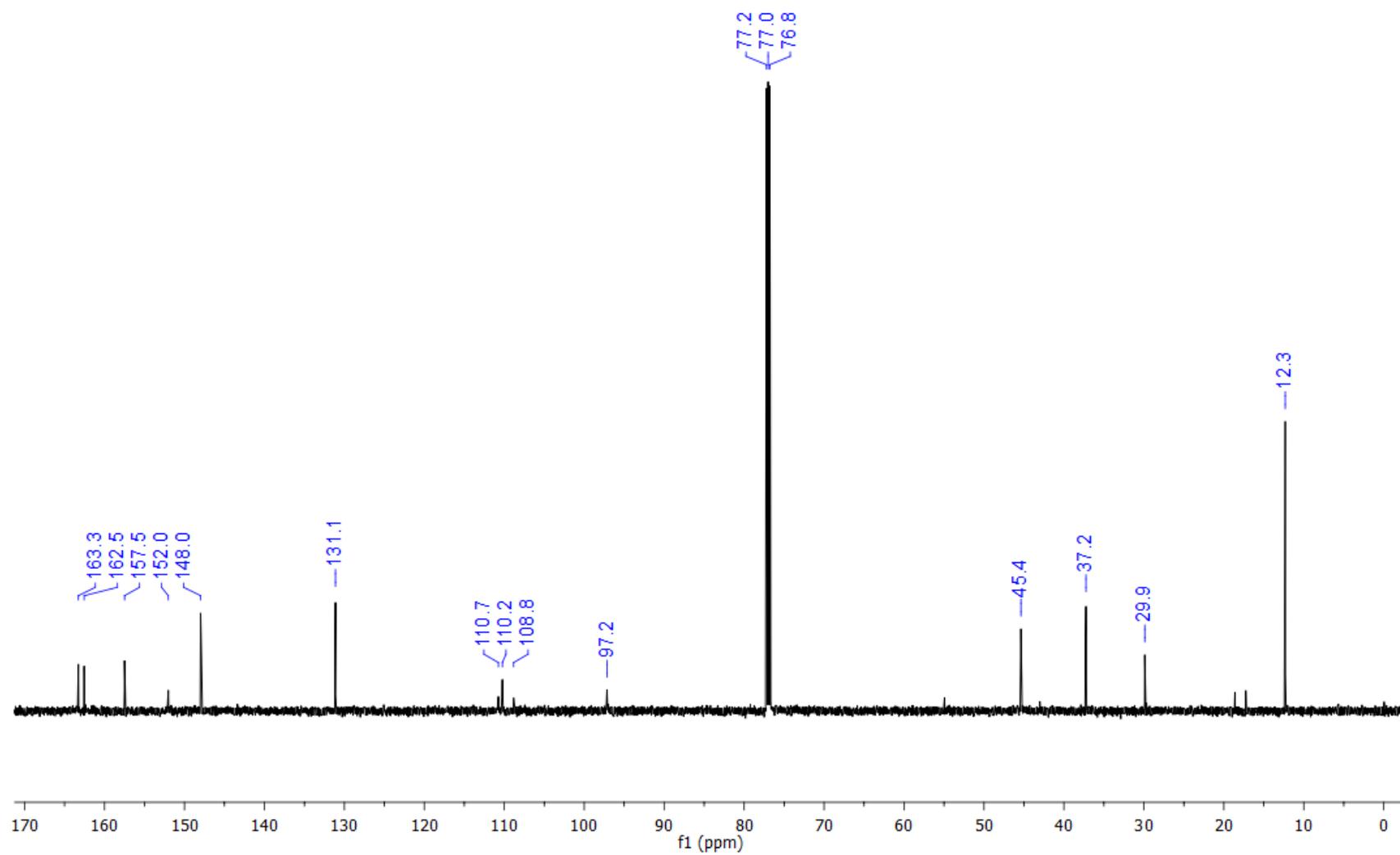
**Espectro 5.2.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (75,64 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de **Cam1**.



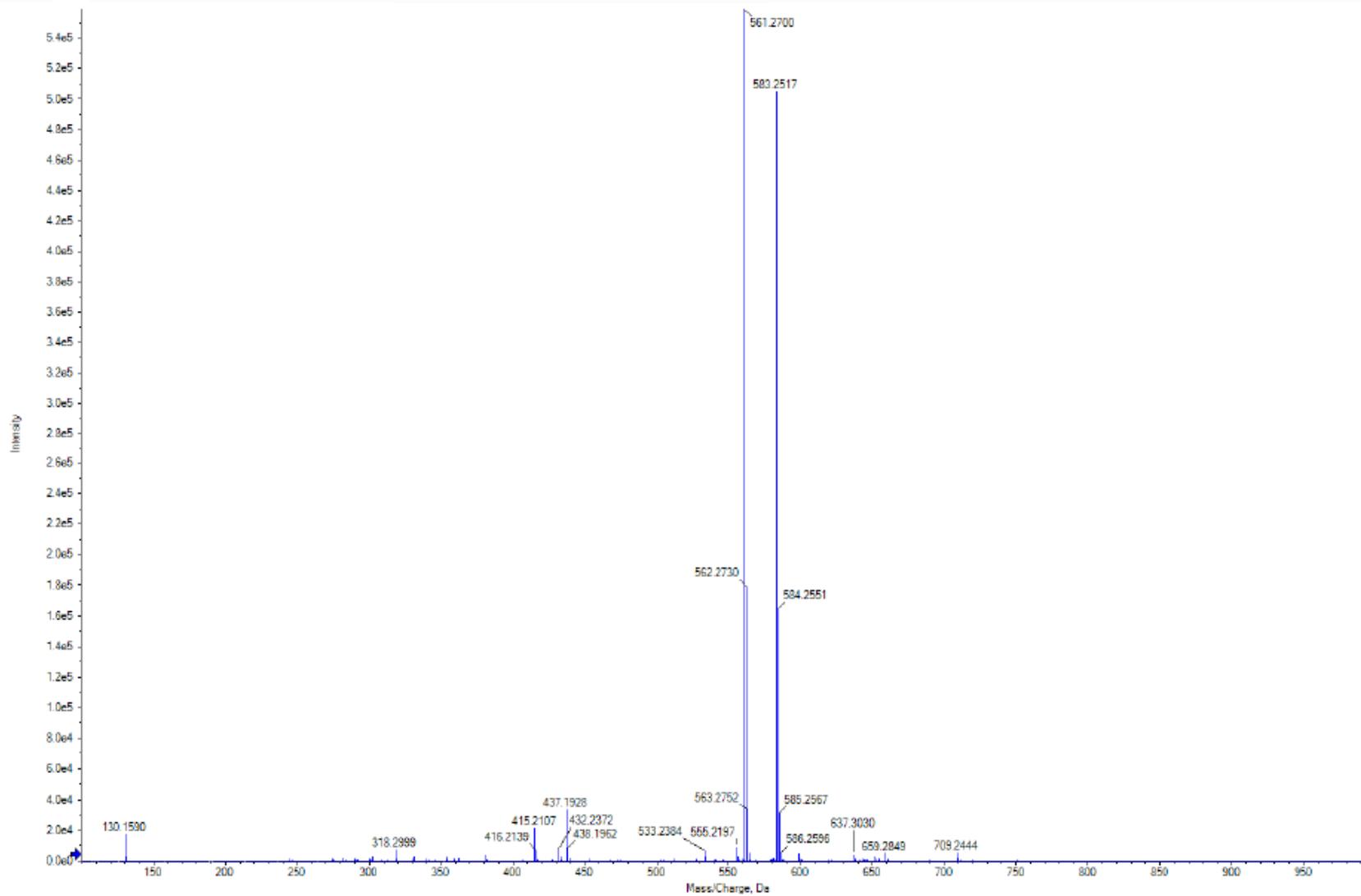
**Espectro 5.3.** Espectro de massas de alta resolução (ESI-MS) de **Cam1**.



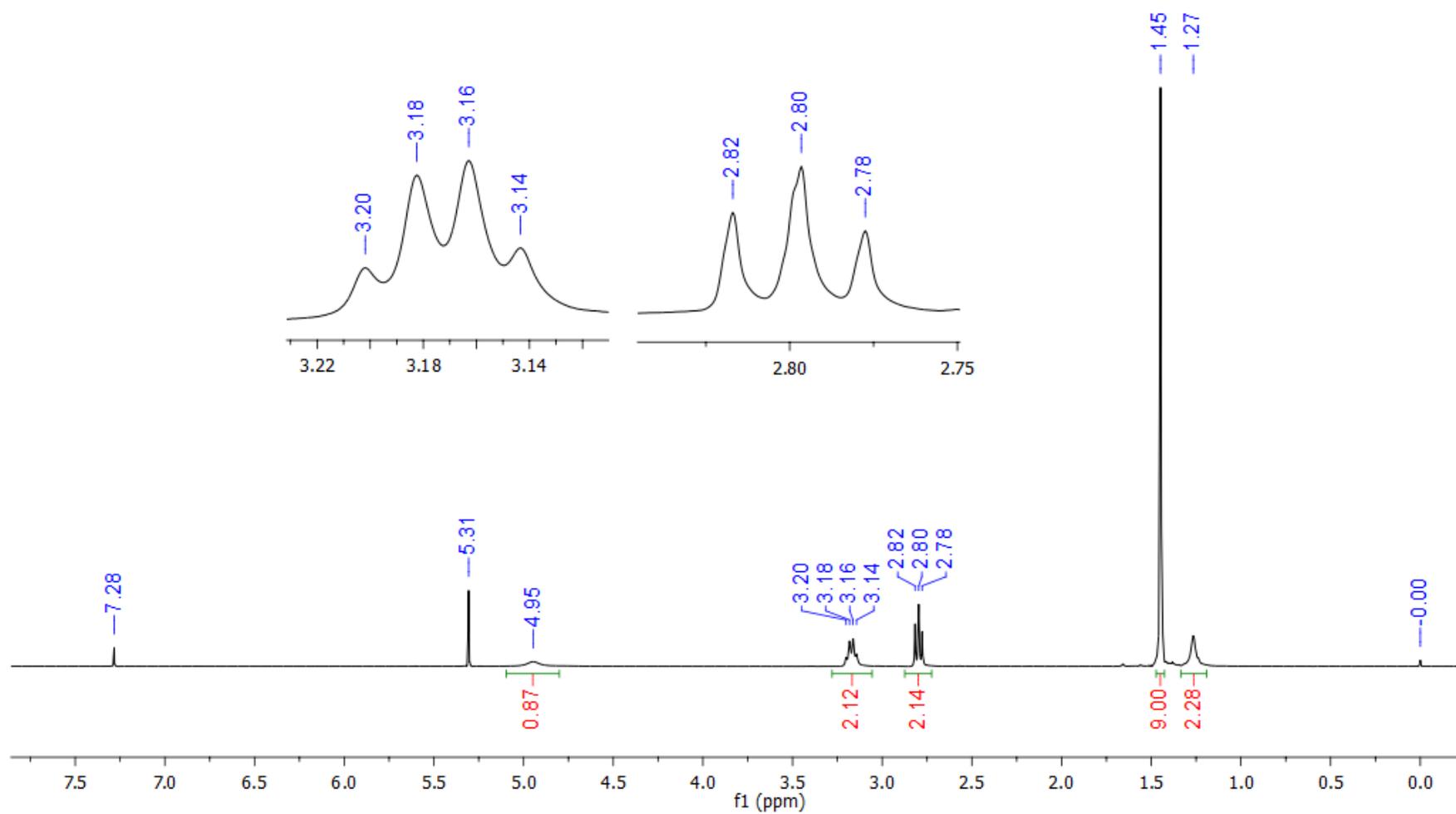
**Espectro 6.1.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de **Cam2**.



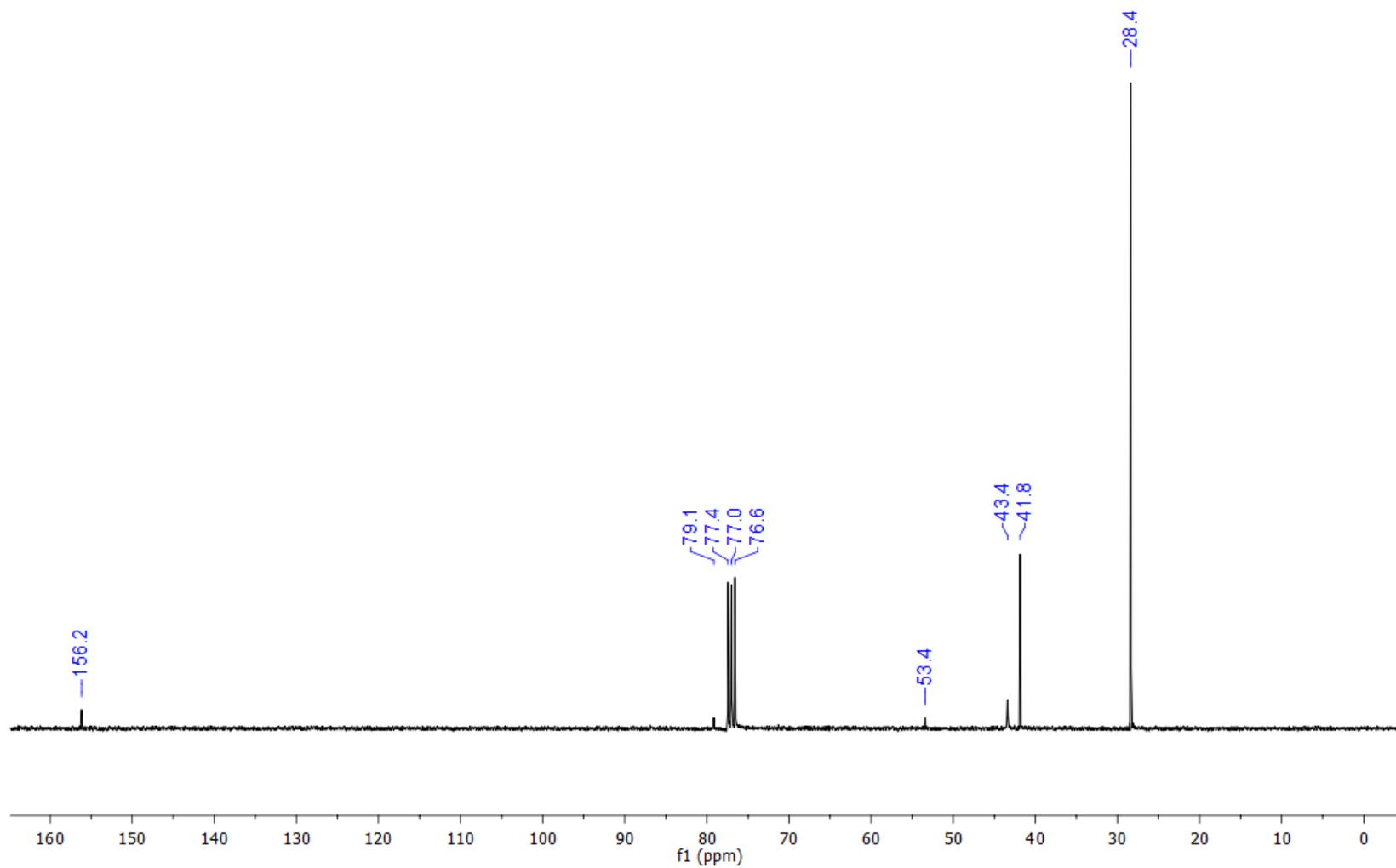
**Espectro 6.2.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (75,64 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de **Cam2**.



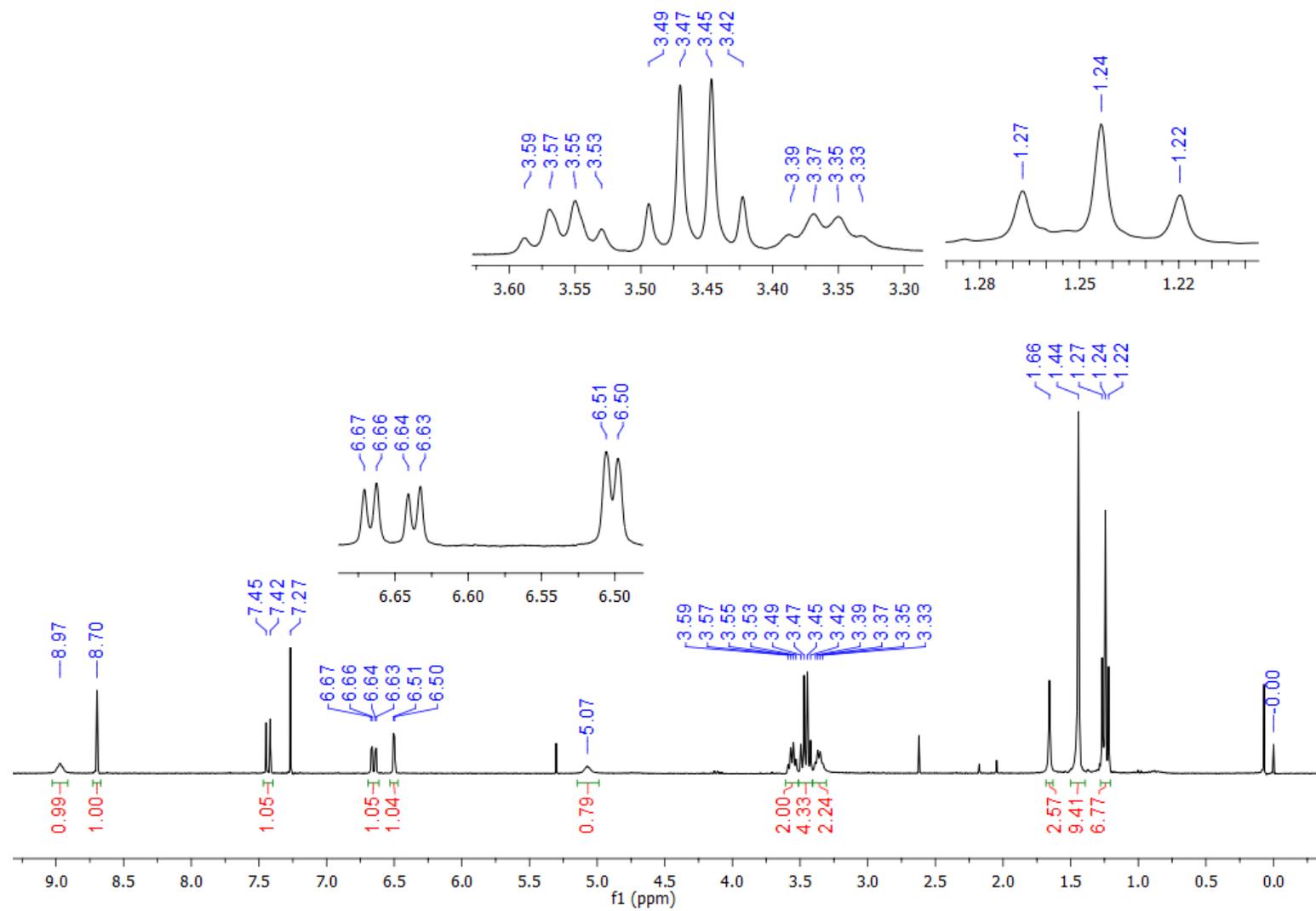
**Espectro 6.3.** Espectro de massas de alta resolução (ESI-MS) de **Cam2**.



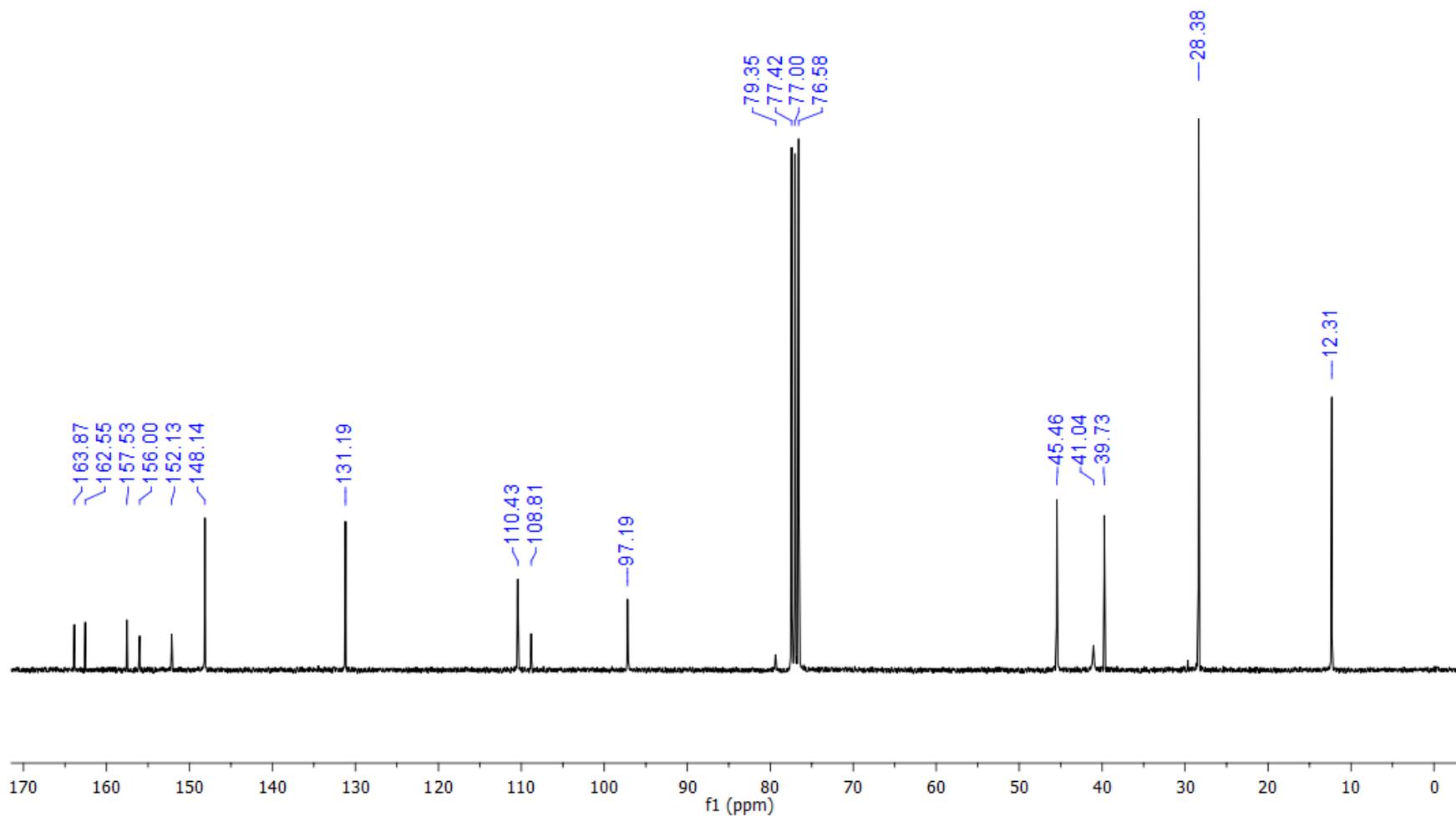
**Espectro 7.1.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de 4-Boc.



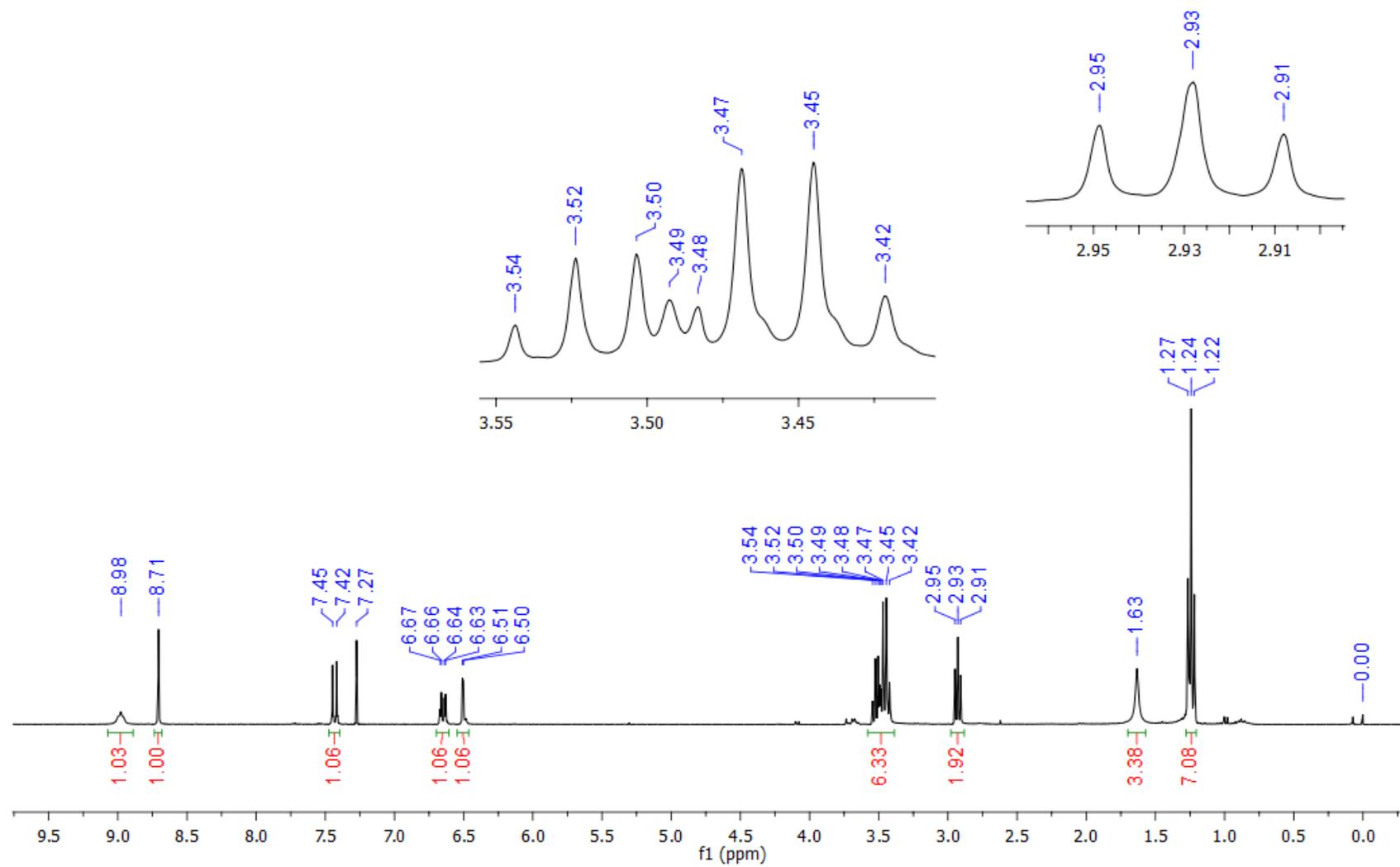
**Espectro 7.2.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (75,64 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de 4-Boc.



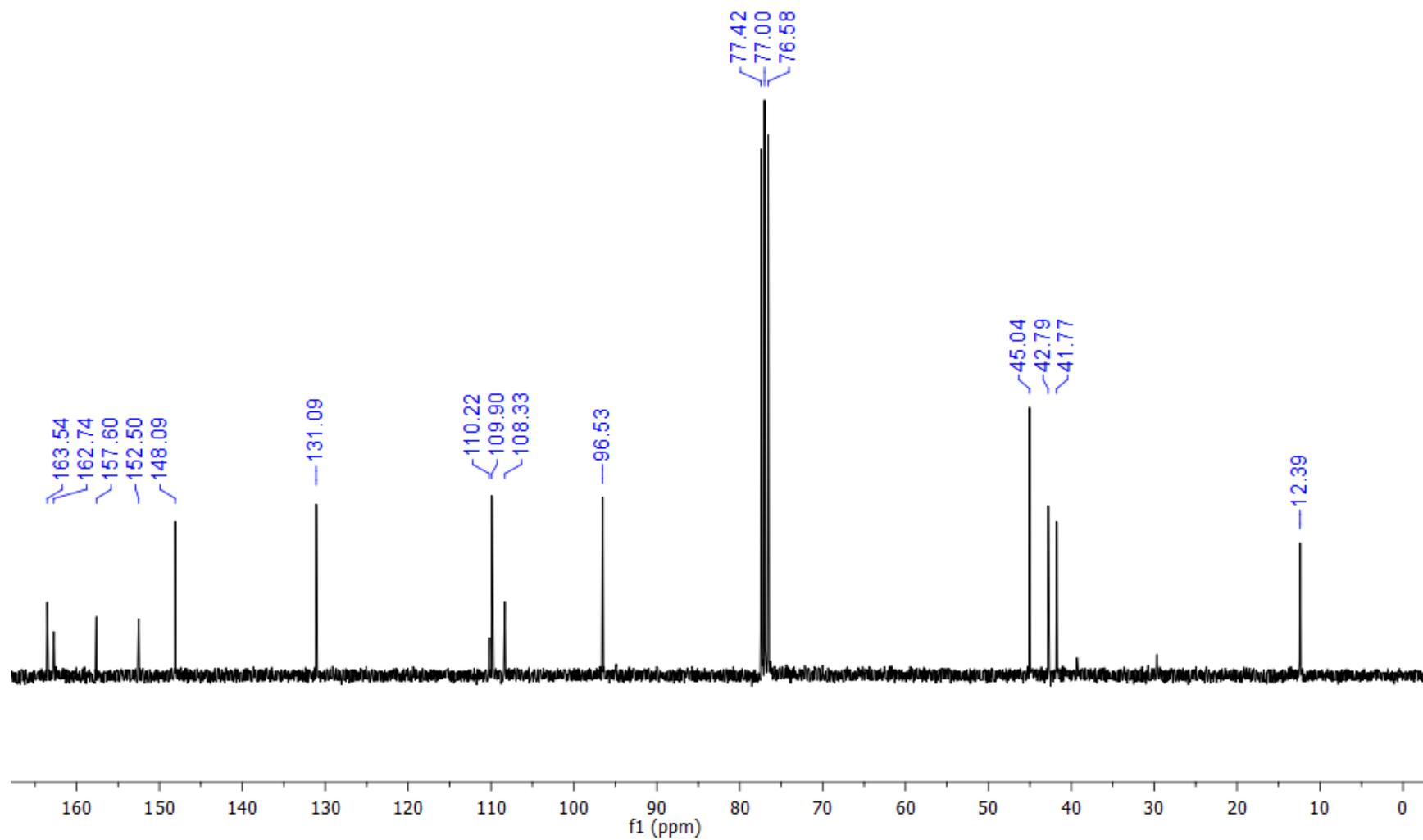
**Espectro 8.1.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de *mCam1*-Boc.



**Espectro 8.2.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (75,46 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de **mCam1-Boc**.



**Espectro 9.1.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de mCam1.



**Espectro 9.2.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (75,46 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de **mCam1**.