



Universidade de Brasília

Instituto de Química

**Arquitetura molecular de derivados
Benzotiadiazolas para a marcação de mitocôndrias**

Aluno: Pedro Henrique Pimenta Rocha Carvalho

Orientador: Prof. Dr. Brenno Amaro da Silveira Neto

Coorientador: Prof. Dr. José Raimundo Corrêa

Brasília – DF

2014

Universidade de Brasília
Programa de pós-graduação em Química
Laboratório de Química Medicinal e Tecnológica

Arquitetura molecular de derivados
Benzotiadiazolas para a marcação de mitocôndrias

Aluno: Pedro Henrique Pimenta Rocha Carvalho
Orientador: Prof. Dr. Brenno Amaro da Silveira Neto
Coorientador: Prof. Dr. José Raimundo Corrêa

Brasília

2014

*“Sonho que se sonha só
É só um sonho que se sonha só
Mas sonho que se sonha junto é realidade”*

Raul Seixas

Agradecimentos

Agradeço a minha família. Minha avó Zenaide, minha mãe Jandira, meu pai Moisés e minha irmã Izadora, por me amarem e por todo o esforço que fizeram por mim durante toda minha vida.

Agradeço aos meus colegas da época de colégio, Thiago, Filipe, Arthur, Eduardo, Bruno, Luca, Guiga, Fusca, Danilo, Victor, Paulo, Gui, Léo, Caio, Tayná, Greice, Carol, Karine, Catherine, Luana, Lorena, Baby, Rebeca, Nathy, Renata.

Agradeço aos amigos do Mad Fussy. Maciel, Viturugo, Léo, Thiago, Junim, Black Caio, Joãozinho, Requeijão, Jack, Piauí, Xucrute, Igor, Barbrão, Letícia.

Aos amigos do colégio Dínatos. Coxinha, Vinicius, André Fleury, Thiago, Gazella, Cadinho, Geolodoido, Bruno Cirilo, Gomão, Molina

Agradeço à Sociedade dos Cabritos Secretos. Daniel, Elias, Bahia, Cuia, Nareba, Ítalo, Dudu, Anão, Alemão, D2, Pedro, Ieri, Vitor Honorato, Harry, Billy.

Agradeço aos funcionários do IQ-UnB, pela ajuda para a realização deste trabalho.

Ao amigo Allan Ribeiro por ser sempre tão solícito e acessível.

A Sofia Chilena pela ajuda na criação das imagens.

A minha tia Marlene pela ajuda na formatação deste trabalho.

Aos colegas de laboratório Taynara, Júlia, Gisele, Haline, Raquel, Marina, Dani, Jéssica, Bia, Rômulo, Betinho, Gabriel mendigo, Alberto, Thyago, Felipe, Diego, Pedrinho I, Pedrinho II e Marcelão.

Aos amigos Eduardo Cruz e ao Professor Eufrânio (UFMG) pelas colaborações e discussões químicas.

Ao Professor Peter Bakuzis pelo auxílio com inglês.

Ao Professor Jez Willians Braga pelo auxílio nas análises de fluorescência.

À Professora Thereza Soares (UFPE), pelos cálculos de *Docking Molecular*.

À Professora Cláudia Gatto pelas análises de raios X.

Ao Professor Heibbe pelos cálculos realizados e pelo bom humor de todo dia.

A Bruna Guido pela realização dos experimentos de imageamento celular.

Aos Professores Wender, Marcelo e Paterno pelos cafés e *boas piadas* de cada dia.

Aos meus orientadores, Professor José Raimundo Corrêa e Professor Brenno Neto pela paciência, dedicação e carinho.

Resumo

O uso de sondas fluorescentes em citologia é fundamental para o acompanhamento e monitoramento de moléculas, biomoléculas e organelas durante os processos metabólicos relacionados a vida e a morte celular. Existem diversos marcadores comerciais voltados para essa finalidade, no entanto esses marcadores apresentam uma série de desvantagens específicas que dificultam o seu uso. Em busca de soluções para esses problemas, novos compostos são sintetizados e testados como potenciais marcadores celulares. O núcleo 2,1,3-benzotiadiazola (BTD) apresenta uma série de características desejáveis para a síntese de compostos fluorescentes com potencial atividade biológica. Neste trabalho, uma série de moléculas derivadas do núcleo BTD foram sintetizadas e testadas em experimentos de imageamento celular. As estruturas dessas moléculas foram planejadas de forma que a relação da arquitetura molecular de um composto e sua seletividade dentro da célula pudesse ser melhor compreendida. Os resultados obtidos com as primeiras moléculas testadas levou a conclusões que proporcionaram a formulação de uma última estrutura, (4-(4-metoxifenil)-7-(etil-2-piridina)-2,1,3-benzotiadiazola), que apresentou elevada seletividade por mitocôndrias. Os compostos foram devidamente caracterizados e tiveram suas estruturas determinadas por difração de raios-X. Suas propriedades fotofísicas e comportamentos solvatocrômicos foram investigados. Cálculos teóricos foram realizados para que a distribuição de seus orbitais e densidade de carga fossem determinados. Cálculos de *docking* molecular foram realizados para a investigação do sítio de interação dessas moléculas com as biomoléculas presentes nas mitocôndrias.

Abstract

Fluorescent probes possess a pivotal role in cytology as they are essential for tracking molecules, biomolecules and organelles during the cell-cycle. There are several commercial probes used for these tasks. However, these probes presents several drawbacks that makes their effectiveness laborious. A series of novel compounds has been synthesized and tested as potential probes to overcome these problems. The 2, 1, 3-benzothiadiazole core shows a plethora of desirable characteristics for the synthesis of fluorescent compounds that could be used as potential cell probes. In this work, a series of new BTD derivatives has been synthesized and tested in cell imaging experiments. The structure of these new compounds were planned to elucidate the relationship between the molecular architecture and the selectivity inside the cells. The first compounds tested brought interesting results that were used in order to rationalize a new structure, 4-(4-methoxyphenyl)-7-(pyridin-2-ylethynyl)-2,1,3-benzothiadiazole, that presented high selectivity for mitochondria. These new compounds were fully characterized and three of the four novel molecules had their structures determined by X-ray diffraction. Their photophysics properties and solvatochromic effects were also investigated. Theoretical calculations were performed to elucidate the orbital diagrams and maps of electron density. Molecular docking was also performed to localize the binding spots of these new compounds.

Sumário

Agradecimentos	iv
Resumo.....	vi
<i>Abstract</i>	vii
Lista de Abreviaturas	ix
Lista de Tabelas.....	x
Lista de Esquemas	xi
Lista de Figuras	xii
Capítulo 1 Introdução.....	xv
1.1-O Estudo da Célula	2
1.2-Microscopia de Fluorescência	3
1.3-Sensores Fluorescentes	4
1.4-Aplicações dos Fluoróforos	6
1.5-Sondas Celulares	8
1.6-Mitocôndrias e Sensores Mitocondriais.....	10
1.7-Sensores derivados do núcleo 2,1,3-benzotiadiazola	15
Objetivos	19
Capítulo 2 Síntese.....	20
Capítulo 3 Estruturas de raios-X.....	26
Capítulo 4 Propriedades Fotofísicas.....	33
Capítulo 5 Cálculos teóricos	41
Capítulo 6 Imageamento celular	50
Capítulo 7 <i>Docking</i> Molecular	50
Capítulo 8 Conclusões e perspectivas	57
Capítulo 9 Parte experimental.....	62
Referências Bibliográficas	74

Lista de Abreviaturas

GFPs - *Green Fluorescent Proteins*

BODIPY - *Boron difluoride dipyrromethene*

ATP - *Adenosine Triphosphate*

dsDNA – *double-stranded Desoxyribonucleic acid*

mtDNA - *Mitochondrial DNA*

RNA - *Ribonucleic acid*

BTD - 2,1,3-benzotriazol

HOMO - *Highest Occupied Molecular Orbital*

LUMO - *Lowest Occupied Molecular Orbital*

TMSA - Trimetilsililacetileno

ESIPT - *Excited State Intramolecular Proton Transfer*

ICT – *Intra Charge Transfer*

DFT – *Density Functional Theory*

ANT – *Adenine Nucleotide Translocase*

PDB – *Protein Data Base*

Lista de Tabelas

Tabela 1. Dados obtidos por difração de raios-X e parâmetros refinados para BTDOMe , BTDAP , BTD2 , BTD3 , BTD4 e Splendor	28
Tabela 2. Dados fotofísicos para os compostos BTDs em soluções 10 µM.	35
Tabela 3. Valores de E_N^T dos solventes utilizados. ^a	40
Tabela 4. Equação da reta dos gráficos de Lippert-Mattaga das BTD1 , BTD2 , BTD3 , BTD4 e Splendor	40
Tabela 5. Valores de R ² encontrados para as BTD1 , BTD2 , BTD3 , BTD4 e Splendor ...40	40
Tabela 6. Dados Teóricos calculados para as BTD1 , BTD2 , BTD3 , BTD4 e Splendor , nos estados fundamental e excitado obtidos com diferentes correlações funcionais de troca (CAM-B3LYP, M062X, PBE1PBE, wB97XD) usando 6-311+g(2d,p) Pople's split-valence basis set. Todos os resultados foram obtidos utilizando geometrias otimizadas com nível CAM-B3LYP/6-31+g(d).....	46
Tabela 7. Dados teóricos de TD-DFT das estruturas BTD1 , BTD2 , BTD3 , BTD4 e Splendor obtidos por diferentes correlações funcionais de troca (CAM-B3LYP, M062X, PBE1PBE, wB97XD) utilizando 6-311+g(2d,p) <i>Pople's split-valence basis set</i> . Todos os resultados foram obtidos com estruturas otimizadas com nível de cálculo CAM-B3LYP/6-31+g(d).....	47
Tabela 8. Energias de interação estimadas e predição das constantes de inibição entre a proteína ANT e as BTDs estudadas.....	58

Lista de Esquemas

Esquema 1. Representação esquemática da arquitetura molecular básica de um Quimiossensor fluorescente. (Adaptado da referência 14).....	5
Esquema 2. Diagrama simplificado de Jablonski. (Adaptado da referência 15).....	6
Esquema 3. Estrutura de núcleos orgânicos com potencial para fluorescência e seus derivados que são utilizados como marcadores celulares comerciais de diferentes organelas e componentes.	9
Esquema 4. Compostos utilizados para o estudo da arquitetura molecular de novos marcadores derivados do núcleo BTD. (Adaptado da referência 50).....	17
Esquema 5. Rota sintética para a obtenção dos derivados lapachol luminescentes com etiqueta fluorescente do derivado de BTD. (Adaptado da referência ⁵²).....	18
Esquema 6. Rota sintética utilizada para obtenção da BTD 2	25
Esquema 7. Rota sintética utilizada para a obtenção da BTD1	26
Esquema 8. Rota sintética utilizada para preparação das BTD3 e BTD4	26
Esquema 9. Rota sintética seguida para obtenção do composto Splendor	27
Esquema 10. Representação esquemática dos processos ICT e ESIPT.....	38
Esquema 11. Redução do composto BTTD-NO₂ (não fluorescente) para BTTD-NH₂ (fluorescente), o qual foi utilizado em imageamento celular. Note que a nomenclatura deste esquema é a mesma usada pelos autores do trabalho original. (Adaptado da referência 72).	63

Lista de Figuras

Figura 1. Representação esquemática de uma célula e suas organelas básicas.(Adaptado da referência 5)	3
Figura 2. (A) Exemplos de estruturas que apresentam as características desejáveis para dissipação via mecanismos radioativos. (B) Composto que apresenta arquitetura empregada em quimiossensores fluorescentes.	6
Figura 3. (A) Exemplos de variações espectroscópicas de fluoróforos em diferentes meios. Fluoróforo sensível à presença de íons fluoretos. (B)Fluoróforo apresenta deslocamento em seu comprimento de onda de emissão dependendo da polaridade do solvente. (C) Fluoróforo sensível ao pH. (Adaptado das referências 17, 18 e 19)	7
Figura 4. Imagem de uma célula durante o processo de divisão celular na etapa de metáfase. Em azul estão os cromossomos, em vermelho os microtúbulos e em verde as proteínas cinetócoros (Adaptado das referências 25 e 26).	8
Figura 5. Representação esquemática de uma mitocôndria combinada com imagem obtida por microscopia eletrônica de transmissão. (Adaptado da referência 34)	11
Figura 6. Estruturas de marcadores comerciais seletivos para mitocôndrias.	12
Figura 7. Marcadores comerciais brometo de etídio (seletivo para dsDNA) e MitoSOX (seletivo para mitocôndrias).	13
Figura 8. Estrutura de novas moléculas fluorescentes testadas para a marcação seletivas de mitocôndrias. (Estruturas extraídas das referências 42 43, 44 e 45 respectivamente).	14
Figura 9. Núcleo 2,1,3-benzotiadiazola que também é conhecido como BTD.	15
Figura 10. Estrutura do primeiro derivado BTD eficientemente aplicado para detecção e quantificação de dsDNA. (Estrutura extraída da referência 48).	16
Figura 11. Estrutura dos derivados BTDs utilizados como marcadores de dsDNA em experimentos de imageamento celular. (Estruturas extraídas da referência 47).	16
Figura 12. Derivados fluorescentes monossubstituídos de BTDs aplicados como marcadores seletivos de mitocôndrias. (Estruturas extraídas da referência 48)	17
Figura 13. Derivados BTDs. Compostos BTDBrBr , BTDPh , BTDAP e BTDOMe (intermediários). Compostos BTD1 , BTD2 , BTD3 , BTD4 e Splendor (produtos finais).	24
Figura 14. Projeções cristalográficas dos intermediários BTDOMe (esquerda) e BTDAP (direita). (Estrutura do BTDAP adaptada da referência 48)	27
Figura 15. Representação da estrutura molecular da BTD2 com as respectivas marcações cristalográficas.	29
Figura 16. Projeção cristalográfica, com as respectivas marcações para a BTD3	29
Figura 17. Projeções das estruturas moleculares da BTD4 (cima) e Splendor (abaixo) com as respectivas marcações cristalográficas.	30

Figura 18. Vista perspectiva ao longo do eixo cristalográfico b das interações intermoleculares entre S...N e das ligações de hidrogênio intramoleculares da BTD2	31
Figura 19. (A) Projeção do empacotamento cristalino da BTD3 , vista ao longo do eixo b. (B) Vista perspectiva da cadeia em ziguezague formada por ligações de hidrogênio na BTD4 ao longo do eixo cristalográfico b. (C) Parte do diagrama de empacotamento da estrutura cristalina do Splendor	32
Figura 20. Formação de ligações de hidrogênio entre moléculas do etanol e o grupo 2-aminopiridina dos compostos BTD1 , BTD2 , BTD3 e BTD4	36
Figura 21. Gráficos dos espectros de absorção e emissão dos compostos BTD1 , BTD2 , BTD3 , BTD4 e Splendor . Note que para a BTD4 a emissão em tolueno é menos intensa, pois a fenda de emissão e excitação utilizada em sua medição foi menor que as dos demais solventes.	37
Figura 22. Deslocamento de Stokes (cm^{-1}) vs <i>ENT</i> nos solventes testados (tolueno, acetato de etila, diclorometano, acetonitrila e etanol).	39
Figura 23. Mapa de distribuição de densidade eletrônica para as BTD1 , BTD2 , BTD3 , BTD4 e Splendor calculado com o método CAM-B3LYP/6-31+g(d). Amarelo representa a distribuição eletrônica antes do processo de ICT, e azul representa a distribuição após o processo de ICT....	45
Figura 24. Estruturas otimizadas com os orbitais HOMO e LUMO na fase Gasosa das BTD1 , BTD2 , BTD3 , BTD4 e Splendor . Cálculos com nível PBE1PBE/6-311+G(2d,p)//CAM-B3LYP/6-31+g(d). As estruturas calculadas em água apresentaram localizações dos orbitais similares. Os orbitais obtidos utilizando PBE1PBE como funcional de correlação de troca forneceram resultados similares aos obtidos utilizando CAM-B3LYP.	48
Figura 25. Diagrama de energia dos orbitais HOMO e LUMO em fase gasosa (A) e em água (B).	49
Figura 26. Células de câncer de mama (MCF-7) marcadas com (1) BTD1 , (2) BTD2 , (3) BTD3 , (4) BTD4 . (Esquerda) Emissão no canal do azul. (Direita) Emissão no canal do verde.	51
Figura 27. Célula de câncer de mama (MCF-7) marcada seletivamente com Splendor . (Esquerda) Emissão no canal do azul. (Direita) Emissão no canal do verde. A expansão à direita mostra uma figura expandida com a escala em 10 μM	52
Figura 28. Experimentos de marcação com células de câncer de mama (MCF-7). (1) Mitocôndrias marcadas com o marcador comercial MitoTracker red. (2) Mitocôndrias marcadas com MitoTracker red (vermelho) e os núcleos marcados com BTDBT (azul). (3), (6) e (9) fase de contraste das imagens das células. (4) Mitocôndrias marcadas com Splendor . (5) Mitocôndrias marcadas com Splendor (verde) e núcleos marcados com BTDBT (azul). (7) Sobreposição de (1) e (4). Note que a emissão em laranja é devido às emissões em verde e vermelho dos marcadores. (8) Sobreposição de (2) e (5) onde, novamente, é possível observar a emissão laranja.	53
Figura 29. Células cancerígenas de mama (MCF-7) monitoradas durante o processo de divisão celular (fase de anáfase). (1) Núcleo marcado com marcador comercial DAPI (azul). (2) Mitocôndrias marcadas com Splendor (verde) e núcleo marcado com DAPI (azul). (3) Mitocôndrias marcadas com MitoTracker red (vermelho) e núcleo marcado com DAPI (azul). (4) Fase de contraste das imagens das células. Note que com o Splendor é possível ver que há uma distribuição mitocondrial homogênea entre os cromossomos, o que, com o MitoTracker red, não foi possível.	54

Figura 30. Células de câncer de mama (MCF-7) em experimentos de imageamento durante o ciclo de divisão celular, na etapa anáfase (1-4), visando a marcação e monitoramento das mitocôndrias até a etapa de citocinese (5). (1) Núcleo marcado com o marcador comercial DAPI (azul). (2) Imagem da fase de contraste das células. (3) Mitocôndria marcada com **Splendor** (verde) durante a anáfase. (4) Sobreposição dos painéis (1), (2) e (3). Note que usando **Splendor** é possível observar claramente a distribuição mitocondrial entre os dois núcleos na fase de anáfase até a etapa de citocinese..... 55

Por meio do *docking molecular*, observou-se que o **Splendor** interage com a ANT de maneira análoga ao atractilosídeo (Figura 31). Os compostos testados formaram menos ligações de hidrogênio com a proteína, devido ao seu caráter mais hidrofóbico, quando comparado com a atractilosídeo. Pode ser observado na Figura 34 que a conformação e posição de interação do **Splendor** na proteína ocupa a mesma região que a parte mais hidrofóbica da atractilosídeo. 58

Figura 31. Conformações de menores energias para os compostos testados (A-B) **BTD1** (laranja), **BTD2** (verde), **BTD3** (vermelho), **BTD4** (amarelo) e **Splendor** (C-D). O potencial eletrostático da superfície da ANT é apresentado em azul, vermelho e branco para positivo, negativo e neutro, respectivamente. A escala para a carga da superfície é dado em $k_B T$ e vai de -25 a 25 $k_B T$ 59

Figura 32. Estrutura da atractilosídeo. 60

Figura 33. (A) Detalhes da interação da atractilosídeo (A) e a conformação de interação de menor energia para **Splendor** (B)..... 60

Figura 34. Derivado BTD com um grupo glicoligante. (Estrutura extraída da referência 72). 63

Capítulo 1

Introdução

1.1- O Estudo da Célula

A célula é a unidade estrutural dos seres vivos que apresenta funções específicas dependendo do seu tipo celular. A maioria absoluta das formas de vida identificadas é constituída por células.¹ Sendo, a maioria, seres unicelulares. Seres pluricelulares, por sua vez, apresentam vastas combinações multicelulares, diferenciadas e organizadas em grupos (tecidos) que executam funções específicas. Essas células estão conectadas e/ou integradas por uma complexa rede de comunicação que trabalha de forma sincronizada com as demandas dos diferentes organismos. Essa rede é responsável por uma infinidade de atividades que conjuntamente geram as condições necessárias para a manutenção da vida. A complexidade inerente aos sistemas vivos e suas interações já justifica plenamente a necessidade da compreensão detalhada dos processos celulares bem como demonstra a sua fundamental importância para a existência dos seres vivos. Por mais diferentes que sejam os seres vivos, de forma geral, suas células apresentam determinados aspectos estruturais e funcionais incrivelmente semelhantes e conservados.²

Muitos esforços têm sido feitos por grupos de pesquisa no mundo inteiro para que o processo de divisão e diferenciação celular seja compreendido de uma forma mais detalhada e profunda. O conhecimento adquirido nessas investigações podem vir a ser aplicados no tratamento de doenças degenerativas, na medicina regenerativa e no câncer, que geralmente estão associadas aos processos de proliferação, diferenciação e morte celular.^{1,3,4}

Compreender a célula, seus processos metabólicos e especificamente a divisão celular não é uma tarefa simples. A célula e suas organelas constituintes (Figura 1)⁵ possuem dimensões muito reduzidas para que possam ser estudadas diretamente a olho nu. Para que seja possível a investigação de suas estruturas e processos é necessário fazer uso de técnicas microscópicas e espectroscópicas.¹

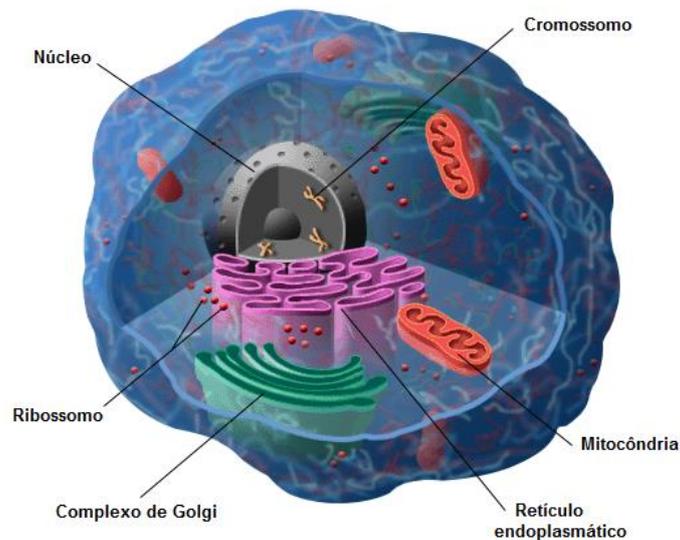


Figura 1. Representação esquemática de uma célula e suas organelas básicas.(Adaptado da referência 5)

1.2- Microscopia de Fluorescência

A ciência da investigação de pequenos objetos é chamada de microscopia. Microscópios óticos são instrumentos que utilizam luz visível para produzir imagens ampliadas de objetos que possuem dimensões muito pequenas para serem observados a olho nu. Existem diversos tipos de microscópios e de técnicas de microscopia, a mais antiga e de mais emprego, principalmente para amostras biológicas, é a microscopia de luz.⁶

Os microscópios de luz permitem aumentos de até 1000 vezes que podem ainda ser incrementados por ampliações digitais dadas por programas de computador especializados no tratamento de imagens.^{6,7} A ampliação produzida por microscópios de luz é eficaz o bastante para o estudo da célula.

No entanto, uma célula é composta por cerca de 70% de água, isto é, são translúcidas e, portanto, praticamente invisíveis em um microscópio de luz. Há pouco conteúdo em seu interior que ofereça contraste o suficiente para que possa ser observado com nitidez. Para que as células pudessem ser melhor visualizadas em um microscópio de luz, técnicas de aumento de contraste foram desenvolvidas. Uma dessas técnicas é a microscopia de fluorescência.^{2,6}

A microscopia de fluorescência é um ramo da microscopia de luz que faz uso de compostos fluorescentes como fonte de contraste. A fonte luminosa emite um feixe de luz no visível (acima de 400 nm) com o objetivo de se excitar o fluoróforo que foi previamente inserido no interior da célula, ou acoplado a uma biomolécula específica com a finalidade de marcar um alvo em particular.⁶

Uma das vantagens extraordinárias da microscopia de fluorescência é a possibilidade de observação de estruturas que se situam abaixo do limite de resolução imposto pela luz que é de cerca de 0,2 μm . Ao vermos, por exemplo, a emissão fluorescente de um fluoróforo associado a um anticorpo, indiretamente estamos vendo a molécula a qual este anticorpo está associado, mesmo esta molécula estando fora do limite de resolução da microscopia de luz.⁸

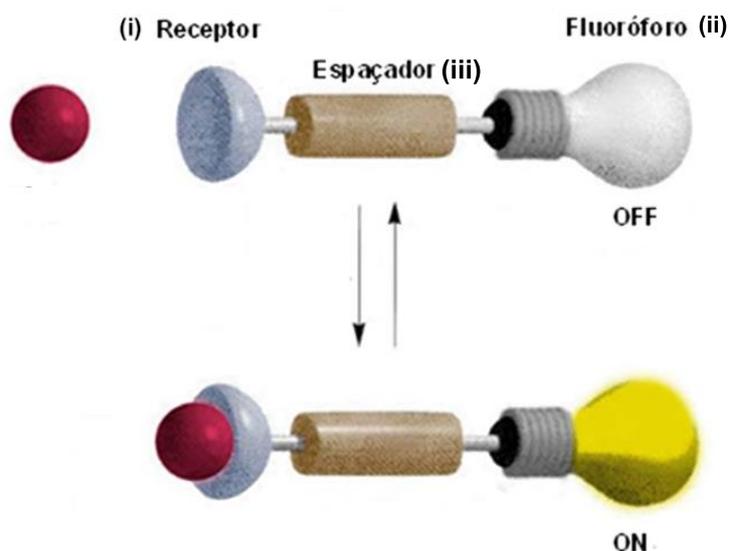
Existem três técnicas principais para que um marcador fluorescente seja inserido no interior de uma célula.⁹ A primeira delas é a imunofluorescência. Essa técnica consiste em se ligar quimicamente uma substância fluorescente a um anticorpo, ou seja, é uma etiqueta fluorescente que permitirá o acompanhamento do anticorpo marcado por técnicas fluorescentes.¹⁰ A segunda técnica envolve métodos de clonagem gênica. Por exemplo, a inserção de partes da família de proteínas GFPs (*Green Fluorescent Proteins*) em outras proteínas de interesse por meio de construções gênicas *in vitro*.¹¹ A terceira técnica, por sua vez, consiste em inserir moléculas naturalmente fluorescentes com alvos de marcação específico, como os sensores fluorescentes, no interior da célula.¹² A terceira técnica é o alvo deste trabalho e será discutida em maiores detalhes.

1.3- Sensores Fluorescentes

Um sensor é por definição um dispositivo capaz de gerar um sinal como resposta ao interagir com a matéria ou energia.¹³ Um sensor fluorescente é, portanto, um dispositivo que emite um sinal fluorescente como resposta. Esses podem ser classificados em dois tipos principais: os quimiossensores e os biossensores.

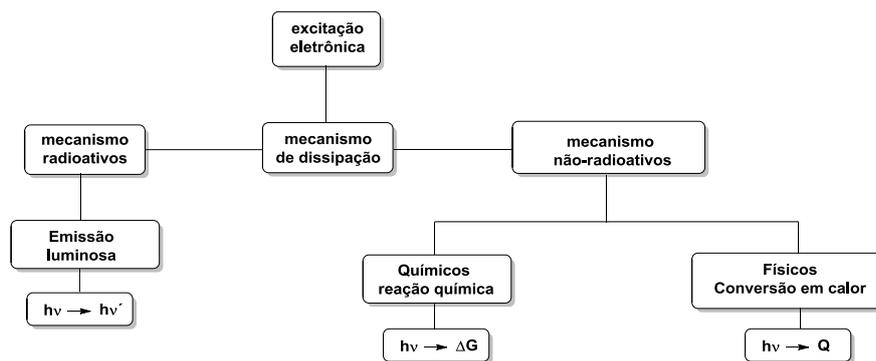
Quimiossensor é uma molécula de origem abiótica capaz de gerar um sinal ao interagir com um analito ou com energia. Um Quimiossensor fluorescente é, portanto, uma molécula capaz de emitir um sinal fluorescente presença de matéria ou energia.¹³

A arquitetura de um Quimiossensor fluorescente geralmente apresenta três componentes: (i) receptor, que é parte da molécula que interage com o analito; (ii) fluoróforo, que é o responsável pela emissão do sinal luminoso; e (iii) espaçador, que conecta os componentes (i) e (ii) da estrutura. Um exemplo¹⁴ deste modelo com esta arquitetura molecular básica pode ser vista no Esquema 1.



Esquema 1. Representação esquemática da arquitetura molecular básica de um Quimiossensor fluorescente. (Adaptado da referência 14)

Quimiossensores fluorescente são, portanto, capazes de emitir luz após sofrerem excitação por uma fonte luminosa ou qualquer outra fonte de energia. Um composto após sofrer excitação pode dissipar a energia absorvida por duas vias principais: (i) por vias não radioativas, em que a energia absorvida pode ser convertida em uma reação química ou dissipada na forma de calor; ou (ii) por vias radioativas, em que a energia absorvida é emitida na forma de luz. O Esquema 2 apresenta o diagrama simplificado de Jablonski, o qual exemplifica os processos de dissipação de energia descritos.^{15,16}



Esquema 2. Diagrama simplificado de Jablonski. (Adaptado da referência 15)

Para que um composto fluorescente possa dissipar a energia absorvida na forma de luz, ele deve apresentar certas características em sua estrutura que facilitem os processos radioativos. Entre estas características se destacam:¹⁷ (i) rigidez estrutural, (ii) planaridade, (iii) ligações π -conjugadas (normalmente), (iv) grupos funcionais aromáticos (normalmente), (v) anéis condensados (normalmente). A Figura 2 apresenta estruturas de alguns compostos orgânicos que possuem as características desejáveis para a dissipação de energia via mecanismos radioativos e de compostos que possuem a arquitetura empregada em Quimiossensores apresentada no Esquema 1.

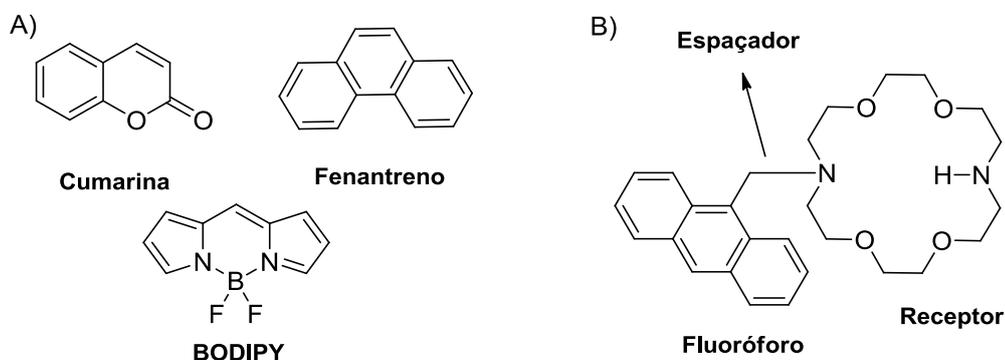


Figura 2. (A) Exemplos de estruturas que apresentam as características desejáveis para dissipação via mecanismos radioativos. (B) Composto que apresenta arquitetura empregada em quimiossensores fluorescentes.

1.4- Aplicações dos Fluoróforos

O meio em que o fluoróforo se encontra tem grande influência sobre suas propriedades espectroscópicas. A intensidade e o comprimento de onda da radiação emitida dependem da estrutura e conformação do fluoróforo, que costumam sofrer grandes variações com uma dependência direta do tipo de

solvente,¹⁷ do pH do meio,¹⁸ da sua concentração e da concentração do analito de interesse. Esses fatores podem suprimir (efeito “*light off*”) ou aumentar (efeito “*light up*”) a intensidade do sinal de fluorescência ou deslocar o comprimento de onda de emissão (efeito batocrômico ou hipsocrômico). A Figura 3 apresenta alguns exemplos da variação das propriedades espectroscópicas de compostos fluorescentes em diferentes meios^{17,19} e na presença de diferentes analitos.²⁰

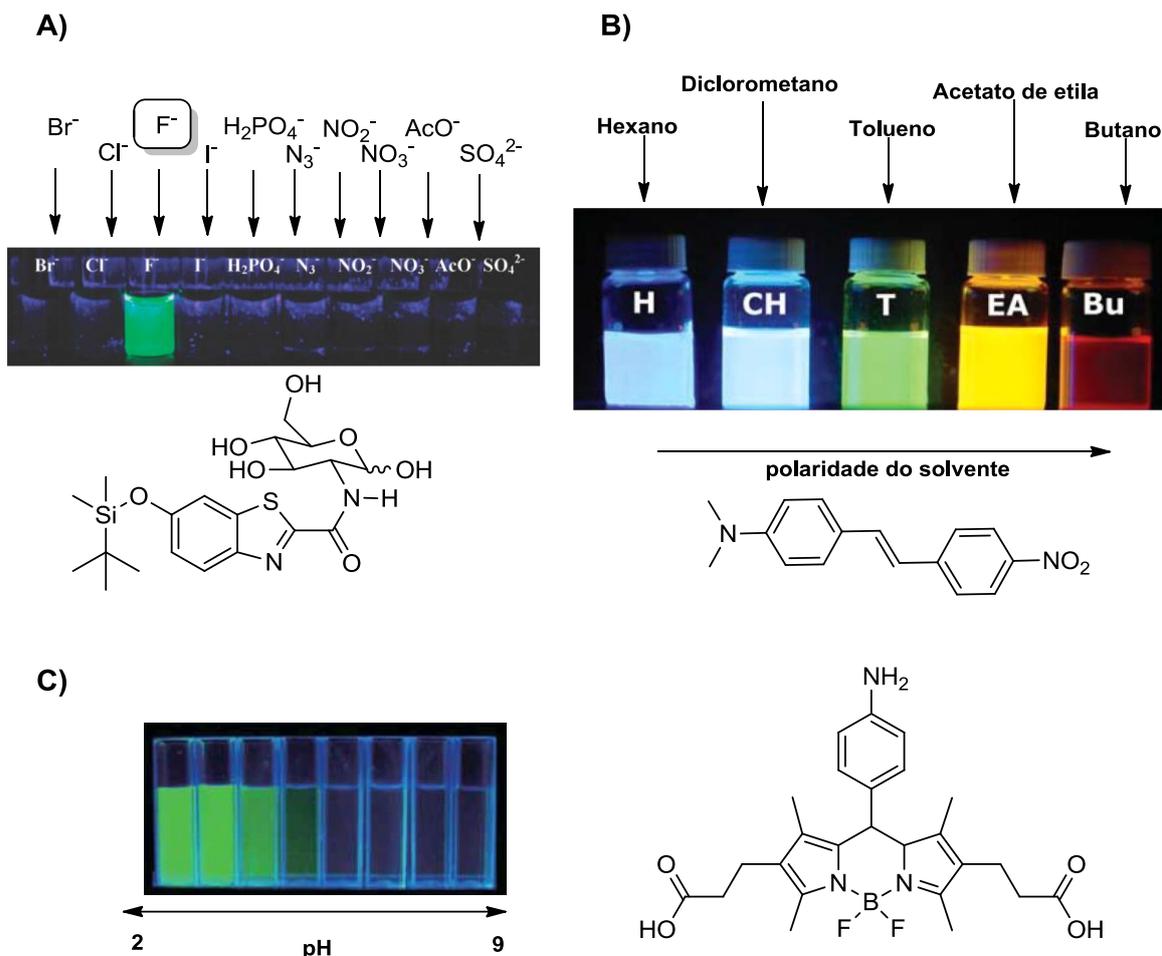


Figura 3. (A) Exemplos de variações espectroscópicas de fluoróforos em diferentes meios. Fluoróforo sensível à presença de íons fluoretos. (B) Fluoróforo apresenta deslocamento em seu comprimento de onda de emissão dependendo da polaridade do solvente. (C) Fluoróforo sensível ao pH. (Adaptado das referências 17, 18 e 19)

Em consequência dessas variações espectroscópicas, muitos fluoróforos podem ser utilizados para diversos tipos de medições e detecções de variados analitos. Medidas de viscosidade,²¹ de pH,¹⁸ de concentração de íons,²² detecção de biomoléculas, análises da conformação de proteínas²³ e o monitoramento de organelas se tornam possíveis com a utilização de compostos fluoróforos.

1.5- Sondas Celulares

Sondas celulares se tornaram uma ferramenta indispensável no desenvolvimento da citologia, devido à sua elevada sensibilidade, seletividade e versatilidade.²⁴ Tais sondas podem ser usadas para diversos tipos de marcações e podem ser aplicadas em conjunto para o monitoramento simultâneo de diferentes estruturas dentro de uma mesma célula em experimentos multiparamétricos (com marcações multicoloridas). Como exemplo, tem-se a imagem de uma célula epitelial, em processo de divisão celular, na etapa de metáfase, e ao lado uma representação esquemática desse mesmo processo (Figura 4).^{25,26}

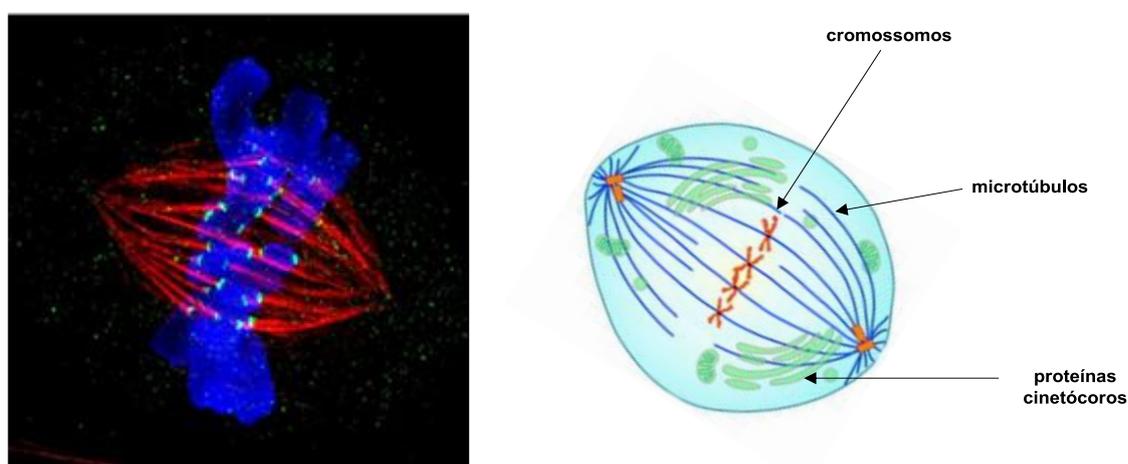
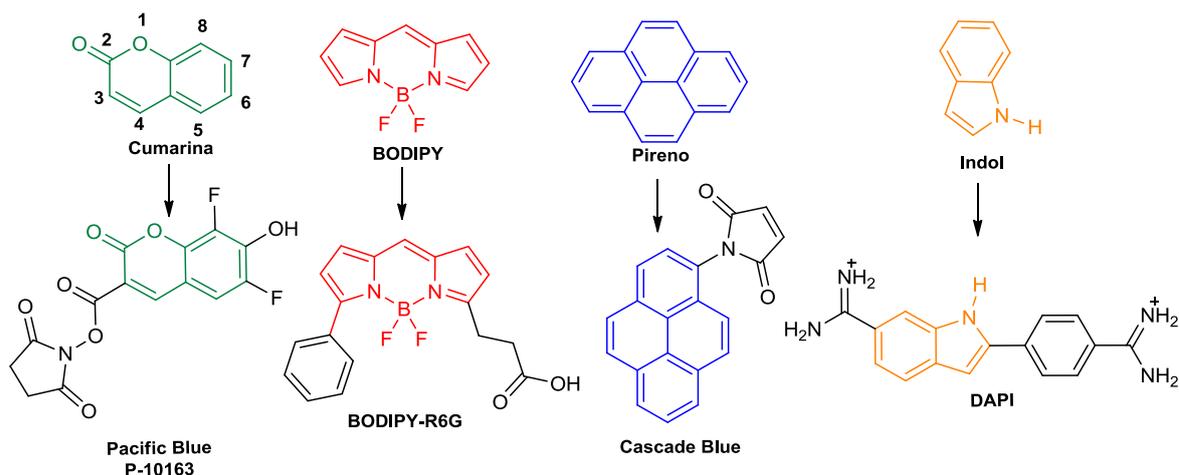


Figura 4. Imagem de uma célula durante o processo de divisão celular na etapa de metáfase. Em azul estão os cromossomos, em vermelho os microtúbulos e em verde as proteínas cinetócoros (Adaptado das referências 25 e 26).

O uso de sonda celulares fluorescentes na citologia é consolidado a ponto de existirem diversas empresas, como por exemplo, a *Lifetechnologies* e a *Invitrogen*, voltadas para a síntese e comercialização desses produtos. O número de compostos fluorescentes com potencial para o monitoramento de processos celulares é enorme.²⁷ Grande parte dos marcadores comerciais existentes são derivados de núcleos orgânicos básicos que já têm suas propriedades espectroscópicas bem determinadas e que apresentam as características desejáveis para um marcador celular. O Esquema 3 apresenta a estrutura de alguns núcleos fluorescentes que são comumente utilizados em estruturas de marcadores comerciais.²⁸



Esquema 3. Estrutura de núcleos orgânicos com potencial para fluorescência e seus derivados que são utilizados como marcadores celulares comerciais de diferentes organelas e componentes.

Derivados cumarínicos são moléculas com excitação na região UV-Vis do espectro luminoso e, usualmente, emitem um sinal luminoso na região do azul (410-470 nm).²⁹ Suas propriedades podem ser ajustadas levando a derivados hidrofóbicos ou hidrofílicos, dependendo das funcionalizações em sua estrutura base. Compostos que possuem o núcleo cumarina com heteroátomos substituintes na posição 7 costumam ser fluoróforos com propriedades espectroscópicas atraentes para marcação celular.¹² Um exemplo é o derivado do núcleo cumarina conhecido como Pacific Blue (Esquema 3), que no caso apresenta uma hidroxila na posição 7.

Fluoróforos derivados do núcleo BODIPY (do inglês, *boron difluoride dipyrromethene*) apresentam usualmente caráter lipofílico.³⁰ Suas propriedades espectroscópicas costumam não variar de maneira significativa, independente do meio em que se encontram. Seus rendimentos quânticos de fluorescência normalmente são elevados mesmo em meio aquoso.³¹ Um exemplo de marcador com estas características é o composto comercial BODIPY-R6G (Esquema 3).

Compostos policíclicos aromáticos, apesar de menos comuns, também são utilizados como marcadores celulares. Por exemplo o derivado do núcleo pireno³² conhecido como *Cascade Blue* (Esquema 3).²⁷

Derivados indólicos são bastante utilizados como marcadores celulares. Um exemplo amplamente conhecido e muito utilizado é o marcador comercial DAPI

(Esquema 3), o qual é comumente aplicado para marcação de DNA nuclear em experimentos de imageamento celular.

Para aplicação mais eficiente em processos de marcação celular, deseja-se que os fluoróforos apresentem determinadas características como:⁷ (i) elevado rendimento quântico (ou efeito “*light up*”); (ii) comprimento de onda de excitação apropriado, sendo desejado boa absorvitividade na região do visível (acima de 400 nm); (iii) boa estabilidade fotoquímica, em especial no estado excitado; (iv) baixa citotoxicidade; (v) espectro de emissão bem definido; (vi) elevada seletividade; e (vii) preferencialmente, com amplos deslocamento de Stokes.

1.6- Mitocôndrias e Sensores Mitocondriais

Mitocôndrias são organelas cujo tamanho pode variar de 1 a 4 μm e ocupam de 15 a 20% do volume total de uma célula.³³ São dinâmicas, podendo ainda mudar suas morfologias de maneira drástica, dependendo do tipo de célula, e do estágio metabólico celular em que se encontram. São envolvidas por uma dupla camada de membranas, nomeadas de membrana interna e membrana externa. Essas duas membranas têm diferentes propriedades e funções e dividem a organela em dois compartimentos: (i) um espaço interno da mitocôndria denominado matriz; (ii) um espaço entre as duas membranas, chamado de espaço intermembranas. A membrana externa envolve a mitocôndria, mantendo-a separada do meio externo e a membrana interna envolve a matriz da organela. A matriz das mitocôndrias apresenta consistência gelatinosa, devido à grande concentração de proteínas solubilizadas. Além de proteínas e enzimas, na matriz mitocondrial podem ser encontrados ribossomos e moléculas de DNA^{1,2} (Figura 5).³⁴

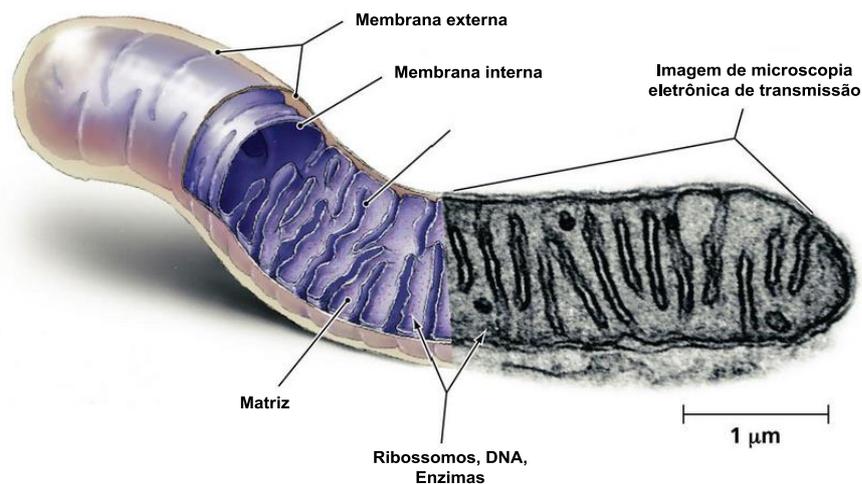


Figura 5. Representação esquemática de uma mitocôndria combinada com imagem obtida por microscopia eletrônica de transmissão. (Adaptado da referência 34)

Mitocôndrias possuem seu próprio genoma e maquinário próprio para os eventos de transcrição e tradução, sequencialmente de RNA e proteínas. O DNA mitocondrial (mtDNA) é inerentemente materno. Essas organelas desempenham um importante papel no metabolismo celular. São as responsáveis pela produção de energia metabólica na forma de adenosina trifosfato (ATP), que é utilizada pelas células como fonte de energia primária.² As mitocôndrias têm um importante papel em processos como diferenciação celular e na morte celular programada, conhecida como apoptose, processo essencial para o desenvolvimento embrionário dos organismos de seres humanos. As mitocôndrias participam ainda do processo de oxidação de lipídeos e da homeostase térmica. Estas organelas também estão relacionadas a uma grande diversidade de processos neurais, como a neurotransmissão, principalmente na manutenção do equilíbrio energético das células nervosas.

A compreensão e monitoramento das mitocôndrias em diferentes contextos biológicos é de grande importância para um maior entendimento do funcionamento da célula. Uma vez que o desequilíbrio de seu funcionamento está relacionado com uma série de problemas como câncer,³⁵ diabetes,³⁶ neurodegeneração³⁷ e também com o processo de envelhecimento.³⁸

Sondas celulares específicas para mitocôndrias permitem aos pesquisadores determinarem a abundância, localização, atividade e efeitos

farmacológicos que drogas possam causar nessa organela. Existem diversas sondas comerciais voltadas para a sua marcação. A Figura 6 apresenta as estruturas de algumas destas sondas comerciais.³⁹

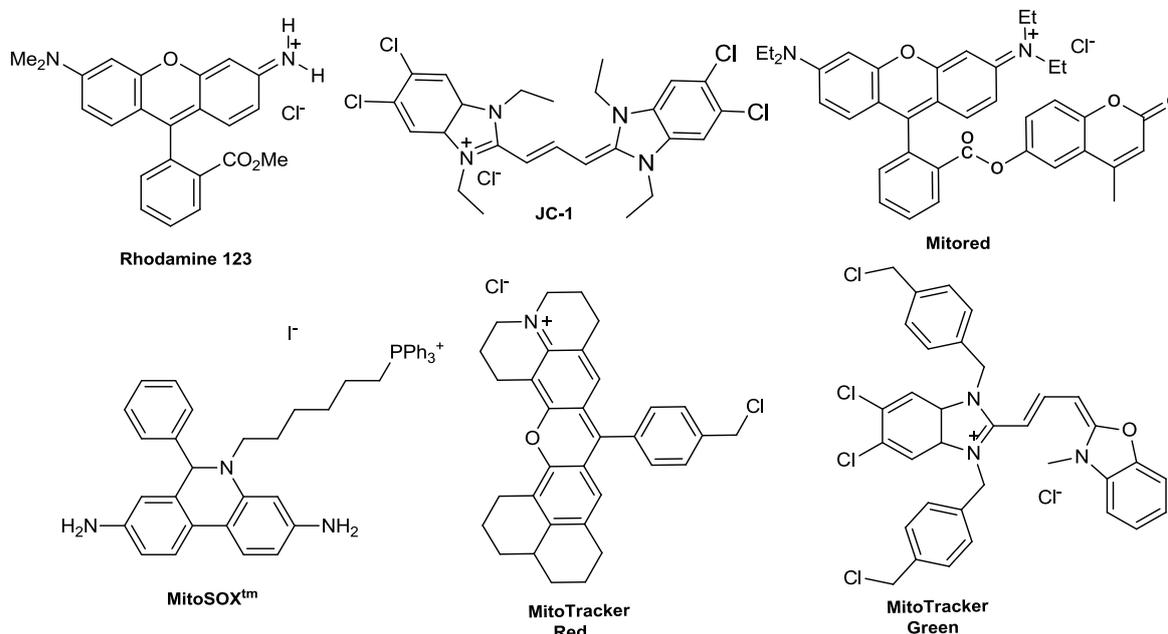


Figura 6. Estruturas de marcadores comerciais seletivos para mitocôndrias.

Apesar do grande número de sensores voltados para a marcação das mitocôndrias ainda não foi determinado um padrão estrutural definitivo para marcadores com essa finalidade. No entanto, existem determinadas características desta organela que ajudam na formulação de novas sondas, como por exemplo, o seu potencial de membrana negativo. As membranas externas das mitocôndrias são carregadas negativamente com um potencial de -180 mV,⁴⁰ que é um valor significativamente maior quando comparado ao das demais organelas presentes no citoplasma. Essa característica pode ser usada em prol do design de marcadores catiônicos fluorescentes.

Considerando a carga negativa da membrana mitocondrial, a síntese de marcadores carregados positivamente se torna uma estratégia interessante. Uma maneira de se sintetizar compostos catiônicos é introduzir o grupo trifetilfosfônio em suas estruturas. Esse grupo, além de conferir caráter positivo às estruturas, também já demonstrou afinidade pelas mitocôndrias, apresentando geometria,

espaçamento, rigidez favoráveis à marcação e caráter lipofílico que ajuda na transposição de membranas.⁴¹

Corrobora essa afirmação e a funcionalidade do grupo a comparação das estruturas dos marcadores comerciais brometo de etídio, utilizado para a marcação de dsDNA, e a do MitoSox®, marcador comercial de mitocôndrias. Ambos apresentam o mesmo núcleo fluoróforo e se diferenciam essencialmente pelo grupo que confere carga positiva à estrutura (Figura 7).

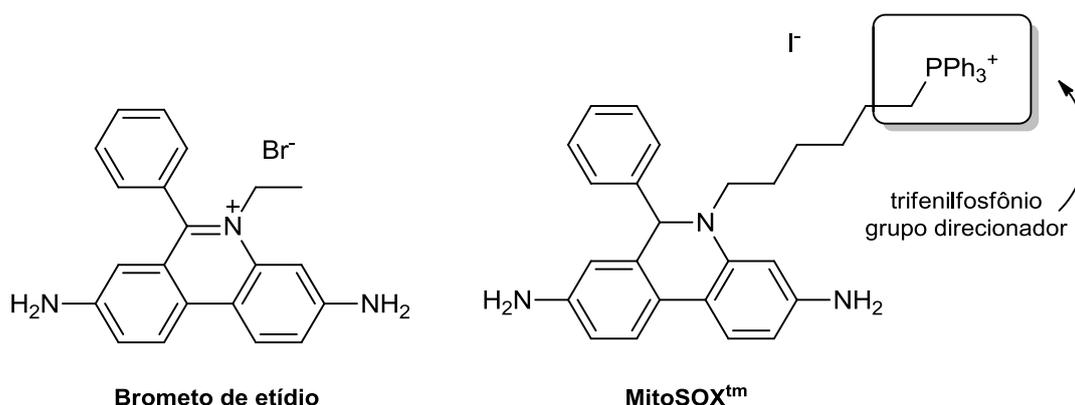


Figura 7. Marcadores comerciais brometo de etídio (seletivo para dsDNA) e MitoSOX (seletivo para mitocôndrias).

Todos os marcadores seletivos de mitocôndrias comerciais citados, apesar de serem amplamente utilizados, apresentam uma série de aspectos negativos tais como a dificuldade para estocagem (usualmente requerem estocagem a -18 °C), elevada instabilidade química e fotoquímica, elevada citotoxicidade, baixa seletividade (costumam não ser totalmente específicos-seletivos), um teor de impurezas significativo e um elevado custo. Além disso, em geral, são sensíveis a variações de temperatura, pH, presença de oxigênio e luz. Tais características são descritas pelos seus fabricantes.

Nesse contexto, e devido à grande importância de se compreender melhor os processos nos quais as mitocôndrias estão envolvidas, novas moléculas fluorescente, seletivas para marcação mitocondrial, vêm sendo sintetizadas e testadas por inúmeros grupos de pesquisa ao redor do mundo.

Um trabalho recentemente publicado⁴² descreveu a construção de uma biblioteca de compostos fluorescentes derivados do núcleo cumarina. Essas

moléculas transpõem a membrana celular e se acumulam preferencialmente nas mitocôndrias. O grupo de Trapani e colaboradores (em 2011) sintetizou dois derivados de imidazopiridinas (**IPD1**) que também se mostraram seletivos para mitocôndrias.⁴³ Jiang e seu grupo de pesquisa (em 2012) sintetizaram compostos capazes de detectar e quantificar íons de zinco (II) no interior das mitocôndrias (**DQZn2**).⁴⁴ Miyata e colaboradores (em 2011) descreveram o **NBDNO**, composto que marca mitocôndrias e é capaz de liberar óxido nítrico no interior da célula.⁴⁵ As estruturas de todos esses compostos são apresentadas na Figura 8.

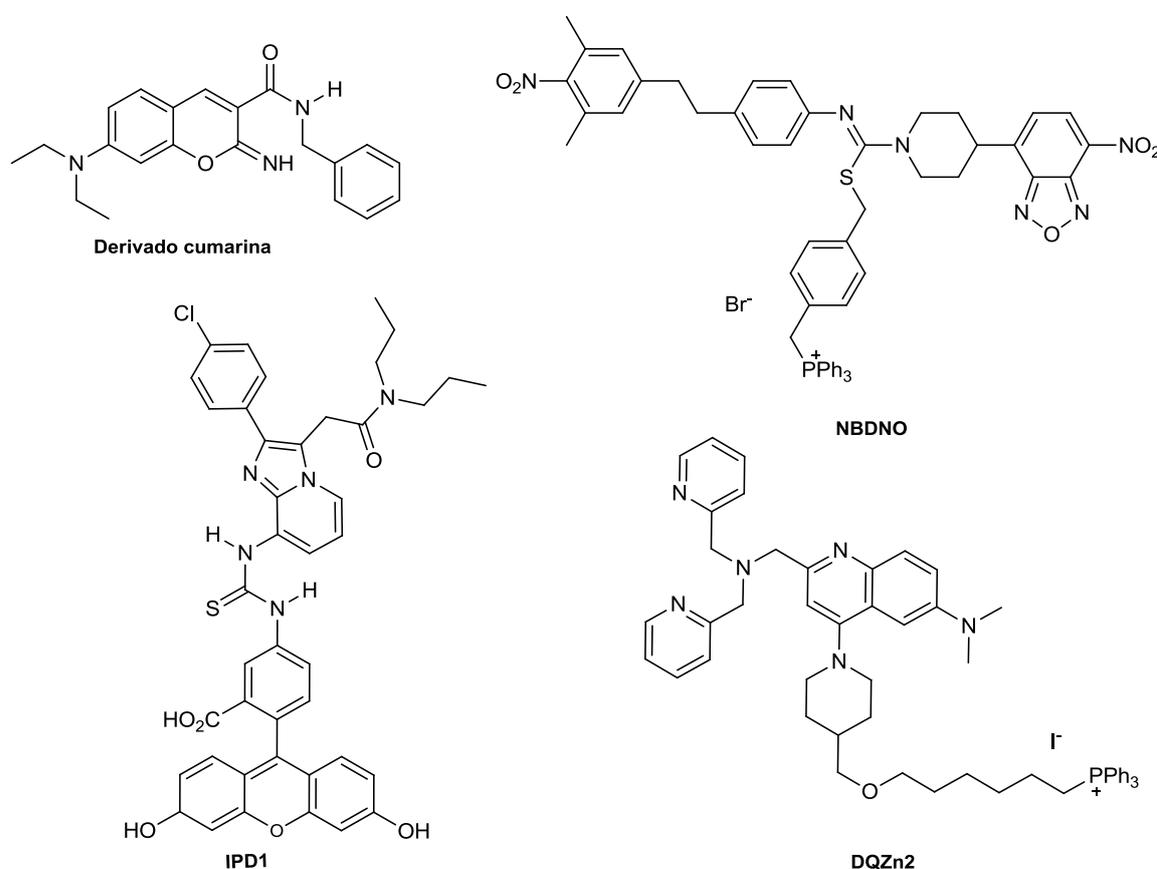


Figura 8. Estrutura de novas moléculas fluorescentes testadas para a marcação seletivas de mitocôndrias. (Estruturas extraídas das referências 42 43, 44 e 45 respectivamente).

Além desses novos compostos relatados com núcleos clássicos para marcadores celulares, um novo e promissor heterociclo passou recentemente a ser explorado para a síntese de novos marcadores, e já vem apresentando resultados promissores – o núcleo 2,1,3-benzotiadiazola.

1.7- Sensores derivados do núcleo 2,1,3-benzotiadiazola

Derivados fluorescentes do núcleo 2,1,3-benzotiadiazola (conhecido como BTB, Figura 9) normalmente apresentam características desejáveis para novos marcadores celulares. Dentre estas características destacam-se: (i) grupos funcionais aromáticos funcionalizáveis, o que permite obtenção de diversidade estrutural; (ii) planaridade e rigidez estrutural; (iii) conjugação π eficiente; e (iv) forte caráter aceptor de elétrons, característica essa importante para compostos luminescentes, pois desta maneira o orbital LUMO de seus derivados sofre uma diminuição em energia, e conseqüentemente o valor de *band gap* também diminui, levando à emissão de luz em comprimentos de onda maiores.⁴⁶ Além disto, com o forte caráter aceptor, estruturas moleculares do tipo “*donor-acceptor*” com processos eficientes e estabilizantes de transferência de carga intramolecular são favorecidos.

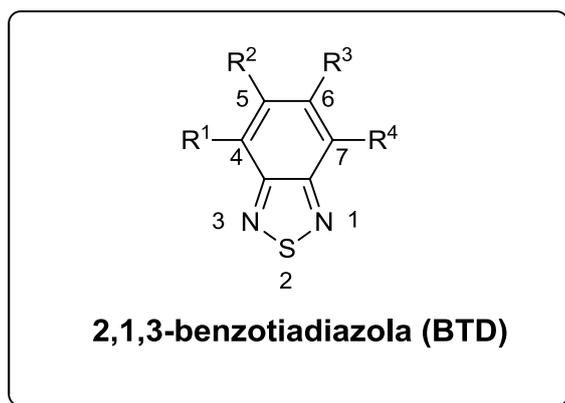


Figura 9. Núcleo 2,1,3-benzotiadiazola que também é conhecido como BTB.

Derivados do núcleo BTB normalmente sofrem extensões das conjugações π nas posições 4 e 7, e são usualmente sintetizados a partir do derivado 4,7-dibromo-2,1,3-benzotiadiazola por meio de reações de acoplamentos.^{47,48}

O primeiro relato⁴⁹ científico de pequenas moléculas fluorescentes derivadas do núcleo BTB com aplicação biológica data de 2007.ⁱ As propriedades espectroscópicas dos compostos sintetizados foram estudadas com titulações de dsDNA, e os resultados dos experimentos mostraram que um dos compostos

ⁱ A referência 48 foi uma publicação pioneira do uso de BTBs fluorescentes como intercaladores de DNA e foi o início das pesquisas na área de Química Biológica e Medicinal coordenadas pelo Prof. Dr. Brenno A. D. Neto.

sintetizados (Figura 10) apresentava variações nas intensidades e no comprimento de onda do sinal luminoso emitido à medida que se adicionava dsDNA à solução, mostrando que havia afinidade entre as moléculas testadas e o analito.

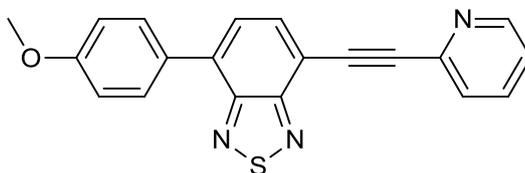


Figura 10. Estrutura do primeiro derivado BTD eficientemente aplicado para detecção e quantificação de dsDNA. (Estrutura extraída da referência 48).

Em 2010, dois novos derivados do núcleo BTB, denominados **BTDBI** e **BTDBT** (Figura 11),⁴⁷ foram sintetizados e testados em titulações espectrofluorimétricas com dsDNA. Os resultados mostraram a afinidade dos compostos pela biomolécula. Em seguida as moléculas foram testadas em experimentos de imageamento celular com células vivas do tipo células-tronco humana, mostrando-se altamente seletivas para DNA nuclear.ⁱⁱ

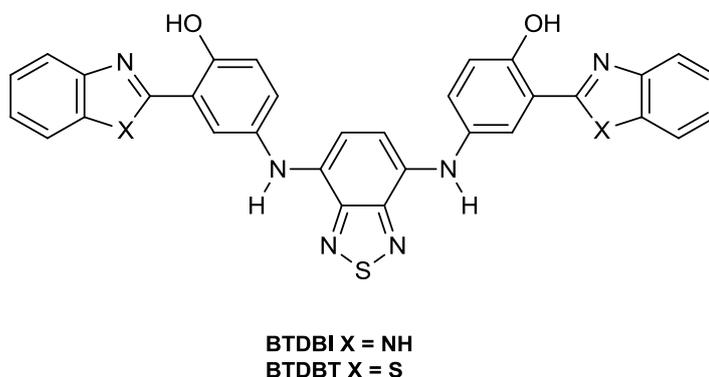
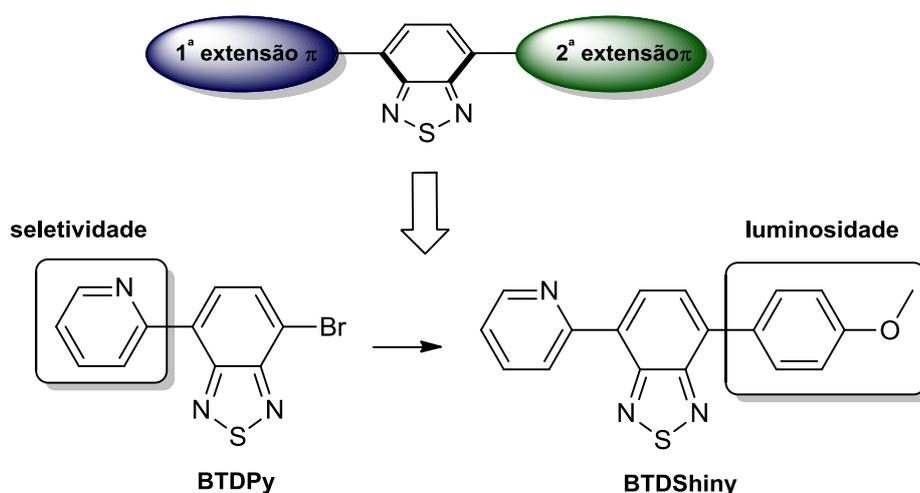


Figura 11. Estrutura dos derivados BTBs utilizados como marcadores de dsDNA em experimentos de imageamento celular. (Estruturas extraídas da referência 47).

Novos derivados BTBs continuaram a ser sintetizados e testados em nosso grupo de pesquisa como marcadores celulares seletivos. Com o objetivo de se estudar o efeito que as substituições nas posições 4 e 7 teriam sobre sua seletividade e luminosidade, foi relatado em um trabalho realizado em 2012 (Esquema 4),⁵⁰ que uma das substituições seria responsável pela seletividade

ⁱⁱ O relato da referência 46 é considerado a primeira aplicação de BTBs fluorescentes (tipo *small molecule*) como marcadores celulares. Este trabalho foi uma Dissertação de Mestrado orientada pelo Prof. Dr. Brenno A. D. Neto e defendida pelo discente Felipe. F. de Oliveira em 2010.

dentro da célula e que a segunda substituição seria responsável pela luminosidade (por meio do efeito “*light up*”) do composto. Foi testado o composto monossustituído **BTDPy**,⁵¹ (que já era conhecido) que se mostrou seletivo para mitocôndrias, contudo com sinal luminoso pouco intenso. Em busca de um sinal luminoso mais intenso, foi sintetizado o composto chamado **BTDShiny**, que possui um grupo elétron doador em sua estrutura (Esquema 4). Esse novo composto fluorescente continuou apresentando seletividade para mitocôndrias, porém com sinal luminoso muito mais intenso.



Esquema 4. Compostos utilizados para o estudo da arquitetura molecular de novos marcadores derivados do núcleo BTD. (Adaptado da referência 50).

Outros derivados BTDs monossustituídos fluorescentes (Figura 12)⁴⁸ também foram testados em experimentos de imageamento celular. Os novos derivados apresentaram excelentes resultados com elevada seletividade por mitocôndrias e uma ótima emissão de luz por fluorescência.

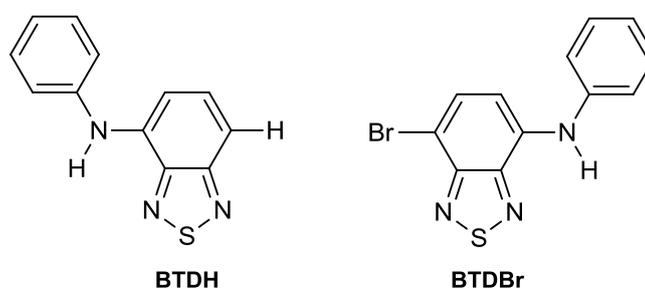
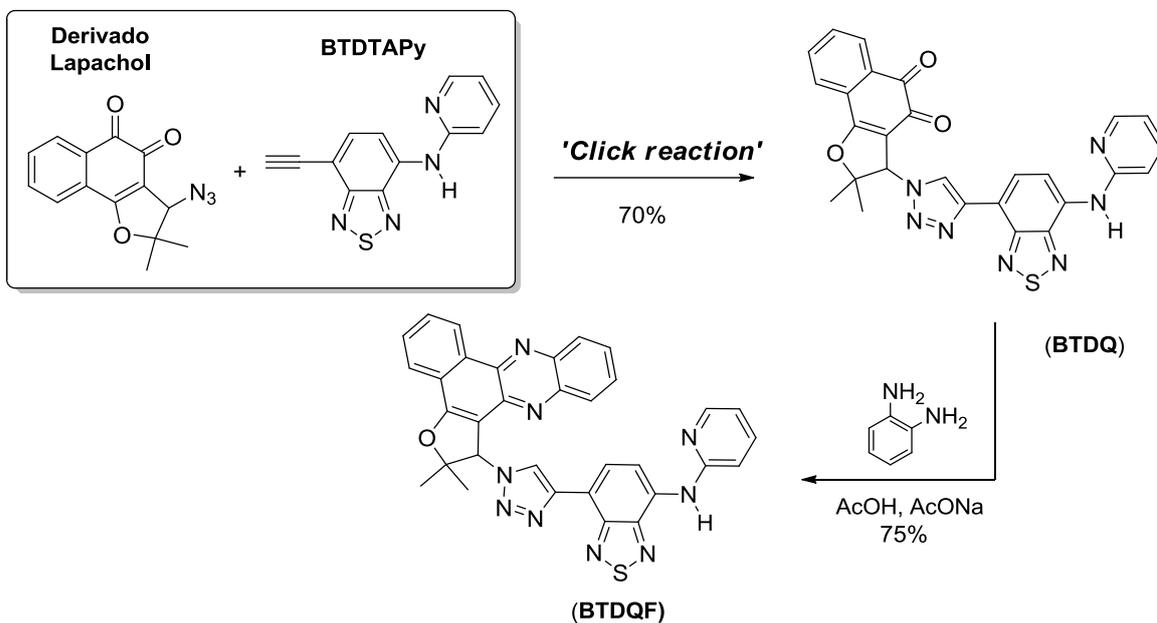


Figura 12. Derivados fluorescentes monossustituídos de BTDs aplicados como marcadores seletivos de mitocôndrias. (Estruturas extraídas da referência 48)

Além de poderem ser utilizados como marcadores celulares, os derivados BTDs também podem ser utilizados como etiquetas fluorescentes para compostos antitumorais. Por exemplo, recentemente o nosso grupo descreveu que derivados do lapachol, que apresentam conhecida atividade antitumoral, mas não são fluorescentes, puderam ser monitorados dentro de células tumorais (MCF-7) marcados com uma etiqueta fluorescente derivada do núcleo BTD.⁵² O composto **BTDAPy** (Esquema 5.) foi utilizado para a marcação fluorescente dos derivados lapachol.



Esquema 5. Rota sintética para a obtenção dos derivados lapachol luminescentes com etiqueta fluorescente do derivado de BTD. (Adaptado da referência 52).

Objetivos

Este trabalho teve como objetivo a síntese e caracterização de novas moléculas fluorescentes não simétricas com conjugação π -estendida derivadas do núcleo BTD com potencial para aplicação biológica em experimentos de imageamento celular.

As estruturas sintetizadas neste trabalho foram planejadas de modo a se aprimorar as características de derivados BTDs testados anteriormente. E também visando o estudo da arquitetura molecular e definição de um padrão de características estruturais de moléculas que pudessem levar a marcação seletiva de mitocôndrias no interior da célula.

Capítulo 2

Síntese

2- Síntese dos derivados benzotiadiazolas fluorescentes

A Figura 13 apresenta a estrutura das moléculas utilizadas na execução deste trabalho.

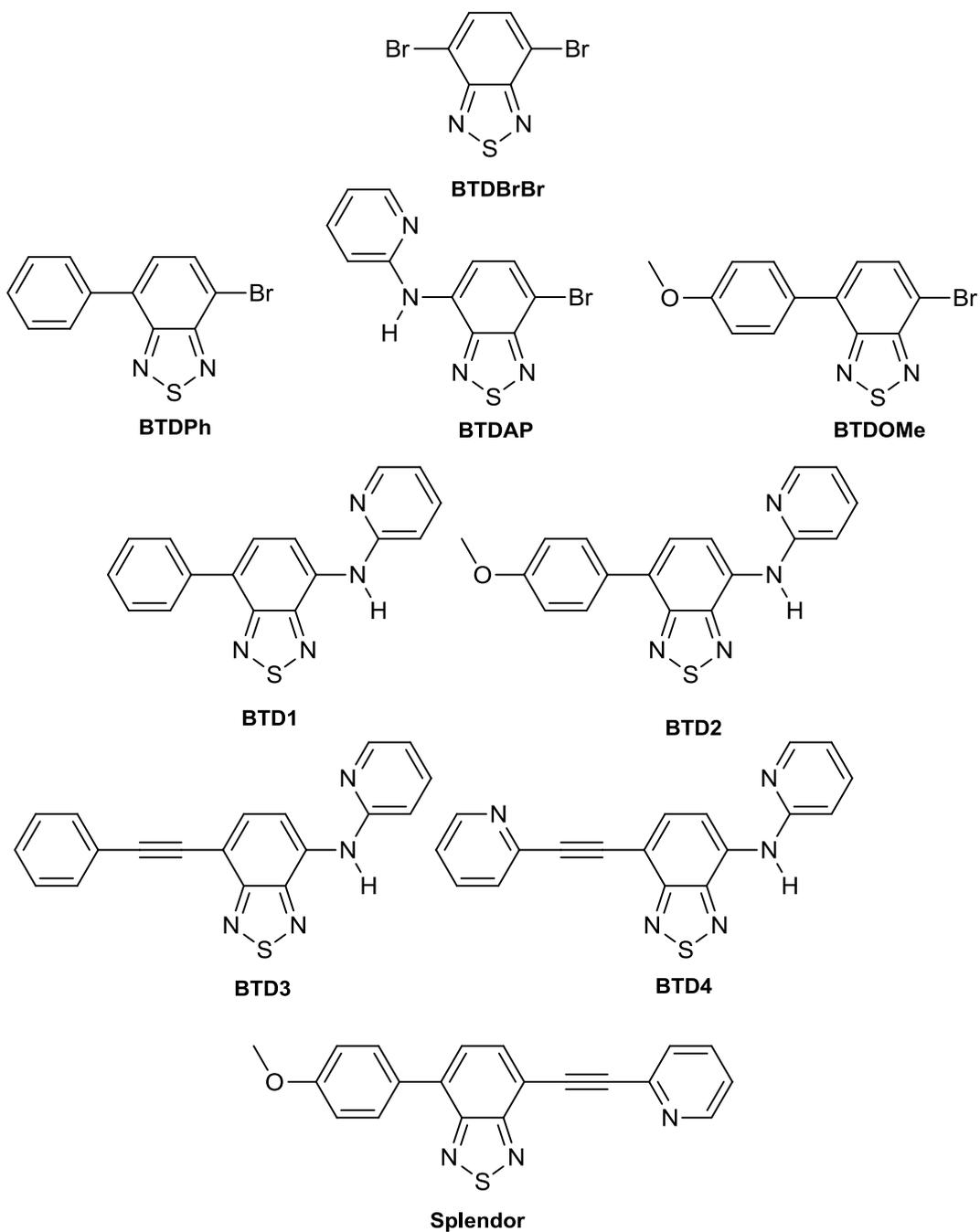
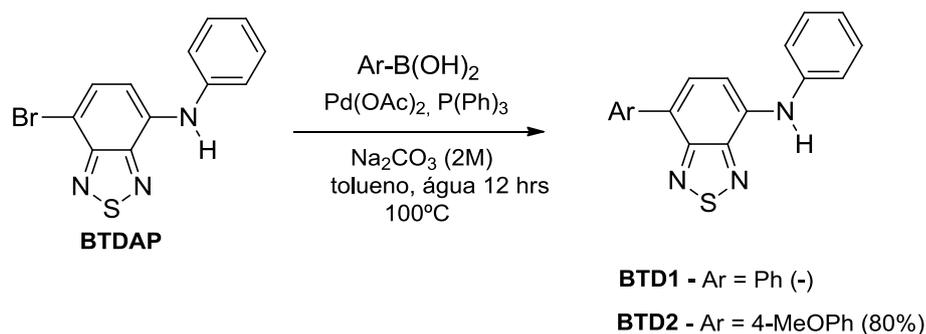


Figura 13. Derivados BTDs. Compostos **BTDBrBr**, **BTDPPh**, **BTDAp** e **BTDOMe** (intermediários). Compostos **BTd1**, **BTd2**, **BTd3**, **BTd4** e **Splendor** (produtos finais).

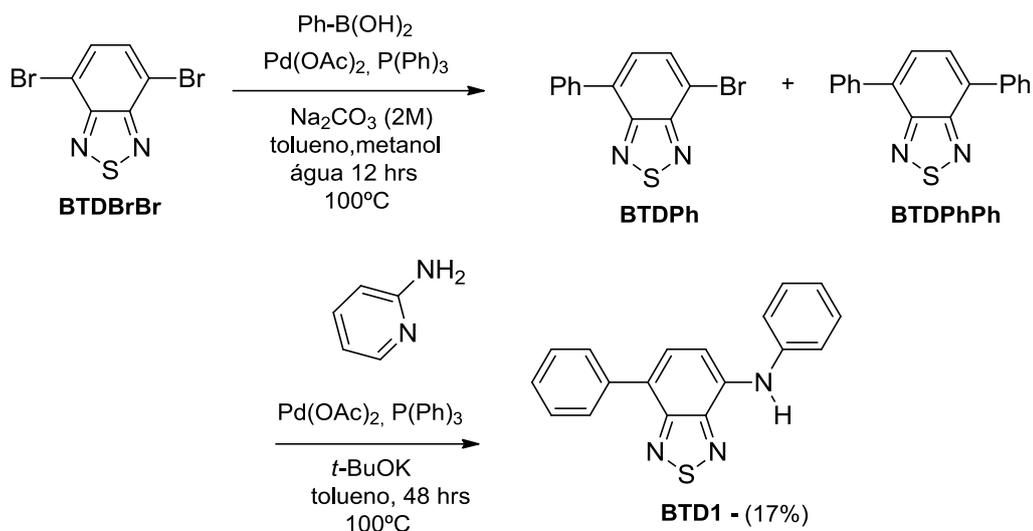
Os grupos substituintes foram escolhidos de modo que se pudesse aprimorar as características do composto **BTDAP**. Para a **BTD1** foi escolhido o substituinte fenil, em busca de um maior rendimento quântico. O grupo 4-metoxifenil, utilizado na **BTD2**, foi adicionado de modo a se aumentar a eficiência do efeito *light up*⁵⁰. As **BTD3** e **BTD4** foram planejadas de forma que possuísem um grupo espaçador, tripla ligação, e um heteroátomo com par de elétrons disponível para a formação de ligações de hidrogênio (**BTD4**).

Para obtenção dos compostos utilizados, primeiro foi preparado o intermediário **BTDAP**.⁴⁸ Este foi submetido a reações de Acoplamento cruzado de Suzuki com o ácido fenilborônico visando a formação da **BTD1** e com o ácido 4-metoxifenilborônico visando a **BTD2**. O acoplamento não funcionou para a obtenção do composto **BTD1**, em que o substrato utilizado foi o ácido fenilborônico (Esquema 6).



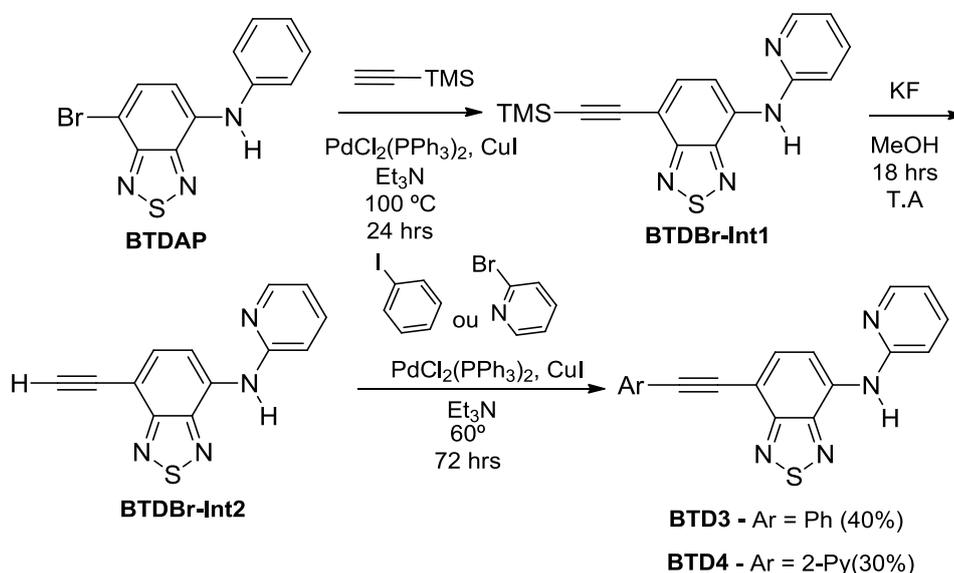
Esquema 6. Rota sintética utilizada para obtenção da **BTD 2**.

Para a obtenção da **BTD1**, realizou-se então o acoplamento de Suzuki do intermediário **BTDBrBr** e o ácido-fenilborônico, levando a formação de uma mistura de produtos inseparáveis (**BTDPPh** e **BTDPPhPh**).^{53,54} Em seguida, essa mistura foi submetida a uma Aminoação de Buchwald-Hartwig⁵⁵ com a 2-aminopiridina, levando a formação da **BTD1** com 17% de rendimento (Esquema 7).



Esquema 7. Rota sintética utilizada para a obtenção da **BTD1**.

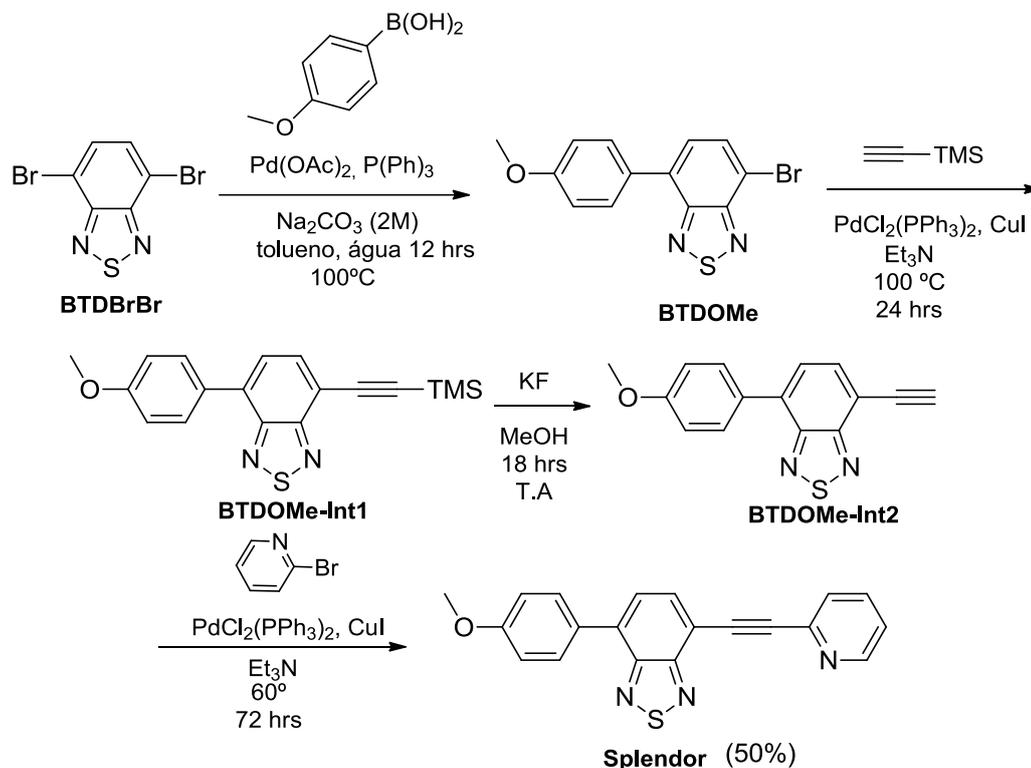
Para as sínteses das **BTD3** e **BTD4**, **BTDAP** foi submetido a um Acoplamento cruzado de Sonogashira⁵⁶ com trimetilsililacetileno (TMSA), seguida de desproteção com KF em metanol, para depois realizar-se um segundo Acoplamento de Sonogashira, levando a obtenção dos produtos desejados (Esquema 8).



Esquema 8. Rota sintética utilizada para preparação das **BTD3** e **BTD4**.

A rota utilizada para a preparação do composto **Splendor** foi a mesma do que a utilizada para as **BTD3** e **BTD4**. O intermediário **BTDBrBr** foi submetido a um Acoplamento cruzado de Suzuki com 4-metoxifenilborônico, formando o composto **BTDOMe**. Este foi submetido a uma reação de Sonogashira com TMSA, formando

o intermediário **BTDOMe-Int1**, que em seguida foi desprotegido com KF em metanol, levando a formação do **BTDOMe-Int2**, que foi submetido a um segundo acoplamento de Sonogashira com 2-bromopiridina, levando a formação do produto desejado (Esquema 9).



Esquema 9. Rota sintética seguida para obtenção do composto **Splendor**.

De forma geral, conforme visto na Sessão Experimental, os derivados foram obtidos em rendimentos que variaram de bons a excelentes. Os acoplamentos promovidos por paládio utilizados foram todos padrões e são amplamente utilizados na literatura em geral.

Capítulo 3

Estruturas de raios-X

3- Estruturas de raios-X

Característica interessante dos compostos que possuem o núcleo BTM em suas estruturas é sua tendência em formar estruturas cristalinas bem ordenadas.⁵⁷ Isso ocorre devido à polarização proporcionada pelo anel 2,1,3-tiadiazola. A Tabela 1 apresenta os dados da coleta e refinamento da análise por difração de raios-X de monocristal para as **BTDOMe**, **BTDAp**,⁴⁸ **BTM2**, **BTM3**, **BTM4**, e **Splendor**.⁵⁸ Dos compostos aplicadas como marcadores celulares apenas a **BTM1** não formou monocristal apropriado para análise de raios-X.ⁱⁱⁱ

A Figura 14 apresenta as projeções cristalográficas das estruturas dos intermediários **BTDOMe** e **BTDAp**. A análise por difração de raios-X de monocristal revela que a estrutura do intermediário **BTDOMe** é constituída por duas moléculas independentes. A representação de uma dessas moléculas pode ser observada na Figura 14. Nota-se um ângulo entre o grupo 4-metoxifenil e o anel BTM de 53,5°. O intermediário **BTDAp** (Figura 14) apresenta uma estrutura rígida e planar devido à existência de interações de hidrogênio intramoleculares entre os átomos N(10)–H(10)···N(3) (2.38(2) Å) e C(5)–H(5)···N(16) (2.34(2) Å). Essas interações continuam presentes nas **BTM1**, **BTM2**, **BTM3** e **BTM4**, no entanto com pequenas variações em seu comprimento, devido aos efeitos de empacotamento causado pelos demais substituintes.⁴⁸

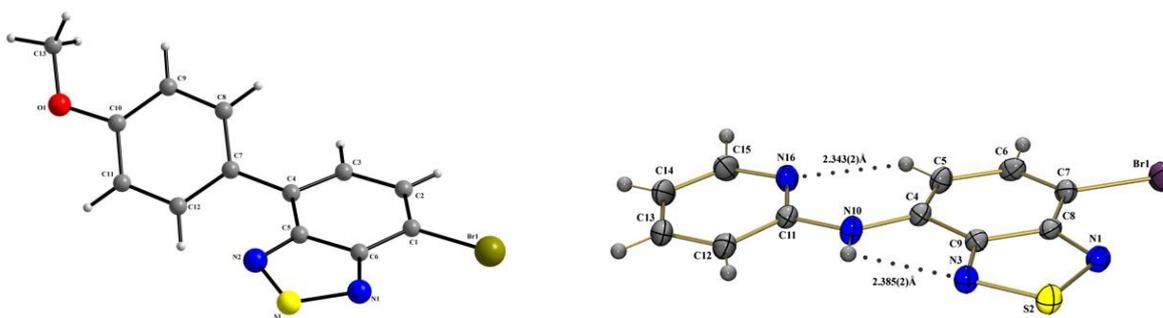


Figura 14. Projeções cristalográficas dos intermediários **BTDOMe** (esquerda) e **BTDAp** (direita). (Estrutura do **BTDAp** adaptada da referência 48)

ⁱⁱⁱ As análises de raios-X de monocristal foram realizadas pelo grupo da Prof. Dr. Claudia Cristina Gatto, do Instituto de Química, da Universidade de Brasília. Apenas uma das estruturas aqui descritas ainda não foi depositada no CCDC e esta estrutura, que também será discutida ao longo do texto, irá ser depositada juntamente com uma futura publicação do grupo.

Tabela 1. Dados obtidos por difração de raios-X e parâmetros refinados para **BTDOMe**, **BTDAP**, **BTD2**, **BTD3**, **BTD4** e **Splendor**.

	BTDOMe	BTDAP⁴⁸	BTD2	BTD3	BTD4	Splendor⁵⁸
Fórmula Química	C ₂₆ H ₁₈ N ₄ O ₂ S ₂ Br	C ₁₁ H ₇ N ₄ SBr	C ₃₆ H ₂₈ N ₈ O ₂ S ₂	C ₁₉ H ₁₂ N ₄ S	C ₁₈ H ₁₁ N ₅ S	C ₂₀ H ₁₃ N ₃ OS
M (g mol ⁻¹)	642,38	307,18	668,78	328,39	329,38	343,39
Sistema Cristalino	Ortorrômbico	Monoclínico	Monoclínico	Monoclínico	Ortorrômbico	Triclínico
Grupo Espacial	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ /c	P2 ₁ /n	Cc	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P ⁻ ; 1
Cela Unitária a (Å)	7,211(2)	4,385(3)	18,952(2)	13,335(3)	11,642(7)	8,963(1)
b (Å)	12,036(2)	23,419(2)	7,177(6)	13,880(3)	14,699(8)	9,048(1)
c (Å)	28,591(5)	11,243(1)	22,919(2)	25,802(5)	6,942(4)	10,465(1)
α	90	90	90	90	90	111,391(2)
β	90	100,743(6)	94,574(4)	94,380(10)	90	90,220(2)
γ	90	90	90	90	90	91,569(2)
V (Å ³)	2478,91(9)	1134,30(2)	3107,6(4)	4761,93(17)	1558,32(10)	789,76(2)
Z	4	4	4	12	4	2
D _c /g cm ⁻³	1,429	1,799	1,429	1,374	1,404	1,625
Índice de varredura	-9 ≤ h ≤ 9 -15 ≤ k ≤ 14 -37 ≤ l ≤ 36	-5 ≤ h ≤ 5 -27 ≤ k ≤ 30 -14 ≤ l ≤ 10	-23 ≤ h ≤ 23 -8 ≤ k ≤ 8 -27 ≤ l ≤ 27	-15 ≤ h ≤ 15 -16 ≤ k ≤ 16 -30 ≤ l ≤ 30	-10 ≤ h ≤ 10 -12 ≤ k ≤ 11 -25 ≤ l ≤ 21	-11 ≤ h ≤ 11 -12 ≤ k ≤ 12 -13 ≤ l ≤ 13
Coefficiente de absorção /mm ⁻¹	3,472	3,789	0,221	0,211	0,217	0,218
Correção de absorção	multi-scan	Semi-empirical	multi-scan	multi-scan	multi-scan	multi-scan
Max/min transmissão	0,55/0,26	0,60/0,72	0,98/0,90	0,96/0,98	0,9612/0,89	0,92/0,95
Reflexões medidas	16529	10203	25826	41306	9279	8197
Refleções independentes / R _{int}	5817/0,0433	2607/0,0595	5901/0,0960	8400/0,0500	3272/0,0387	3875/0,0193
Parâmetros refinados	328	183	519	625	261	227
R1 (F) / wR2 (F ²) (I > 2σ(I))	0,0456/0,0999	0,0399/0,0644	0,0541/0,0999	0,0684/0,1624	0,0437/0,0752	0,0418/0,106
Goof	0,993	0,998	0,987	1,034	1,016	1,050
Densidade eletrônica residual (eÅ ⁻³)	0,655/-0,384	0,0399/0,0644	0,225/-0,265	0,595/-0,350	0,125/-0,261	0,34/-0,26
Número de depósito CCDC	-	-	987428	1003806	987429	728473

A análise dos cristais da **BTD2** mostrou que na cela unitária desse composto existem duas moléculas independentes, com pequenas diferenças nos ângulos diedrais entre os grupos 4-metoxifenil (24,6° e 25,1°) e 2-piridina (10,7° e 16,9°) em relação ao plano do anel **BTD**. Ligações de hidrogênio intermoleculares são encontradas na resolução dessa estrutura, entre os átomos N3-H3...N2 [d(N...N)

= 2,796(4) Å, $\angle(\text{N3H3}\cdots\text{N2}) = 111(3)^\circ$. Também são observadas interações entre os átomos C10-H \cdots N4 (átomo de nitrogênio do anel da piridina). As interações C10-H \cdots N4 e N3-H3 \cdots N2 levam à formação de um plano (Figura 15).

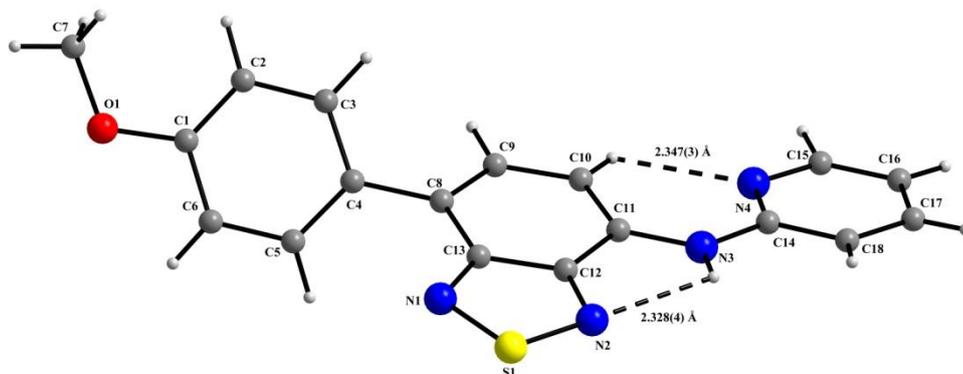


Figura 15. Representação da estrutura molecular da **BTD2** com as respectivas marcações cristalográficas.

Para a **BTD3** as análises de raios-X revelaram a existência de três moléculas independentes na sua rede cristalina. Uma dessas moléculas é apresentada na Figura 16. Nessa molécula, o grupo fenil está distorcido em 49° em relação ao plano do anel BTD.

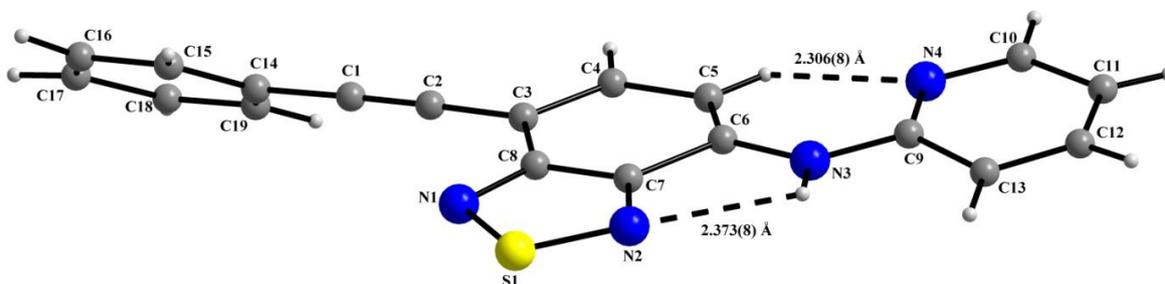


Figura 16. Projeção cristalográfica, com as respectivas marcações para a **BTD3**.

As análises por difração de raios-X das estruturas dos compostos **BTD4** e **Splendor** (Figura 17) mostraram que essas moléculas assumem conformações não planares e arranjo cristalino torcido. Observa-se na estrutura cristalina da **BTD4**, ligações de hidrogênio intramoleculares que são formadas entre N4-H4A \cdots N3 [$d(\text{N}\cdots\text{N}) = 2,820(3)$ Å, $\angle(\text{N4H4A}\cdots\text{N3}) = 107,86(2)^\circ$], assim como as observadas nas **BTD2** e **BTD3**. **Splendor** e **BTD4** possuem um substituinte em comum, o grupo 2-Py(C \equiv C)BTD, e diferem em apenas um dos lados do núcleo BTD. Esses diferentes grupos substituintes provocam mudanças no

empacotamento cristalino e nas conformações assumidas por essas estruturas. Os diferentes substituintes terão influência direta nas propriedades fotofísicas, como será discutido mais adiante.

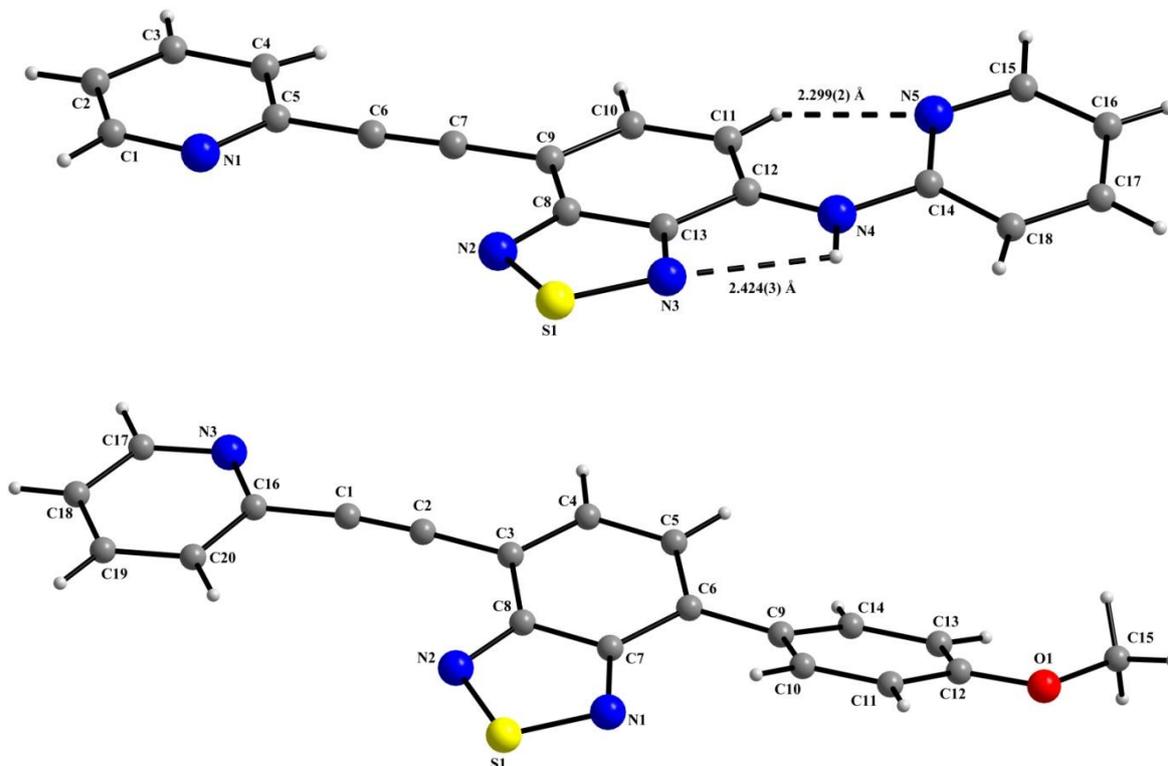


Figura 17. Projeções das estruturas moleculares da **BTD4** (cima) e **Splendor** (abaixo) com as respectivas marcações cristalográficas.

Para a **BTD2**, a análise por difração de raios-X revela interações intermoleculares na sua rede cristalina do tipo S...N entre os átomos de enxofre e nitrogênio do anel 2,1,3-tiadiazola, com distâncias de S2...N1 de 3,213(3) Å e S1...N6 3,276(3) Å (Figura 18).

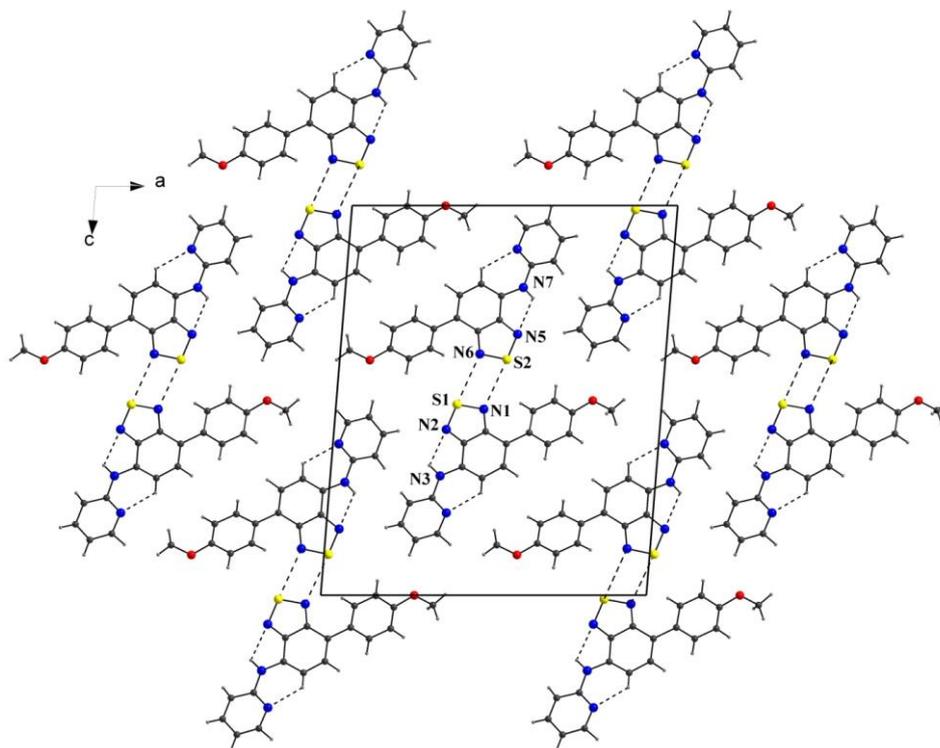


Figura 18. Vista perspectiva ao longo do eixo cristalográfico *b* das interações intermoleculares entre S...N e das ligações de hidrogênio intramoleculares da **BTD2**

Interações intermoleculares do tipo S...N não são observadas na rede cristalina das **BTD3** e **BTD4**. Na **BTD3** são observadas interações do tipo C-H...N (H5...N4 2,306(8) Å, C...N 2,922(12) Å) e ligações de hidrogênio intermoleculares entre os átomos N3-H3A...N2 [$d(\text{N}\cdots\text{N}) = 2,800(1)$ Å, $\angle(\text{N3H3A}\cdots\text{N2}) = 111,11(4)^\circ$]. Na **BTD4** existem ligações de hidrogênio intermoleculares entre N4-H4A...N1ⁱ [$d(\text{N}\cdots\text{N}) = 3,209(3)$ Å, $\angle(\text{N4H4A}\cdots\text{N1}^i) = 165(2)^\circ$]. Estas ligações de hidrogênio se estendem por toda a rede cristalina e ajudam a estabilizar as conformações moleculares. Um grande número de interações C-H...N (H...N 2,299(2) Å, C...N 2,859(4) Å) também é observado.

Na estrutura cristalina do **Splendor** as interações eletrostáticas S...N também não são observadas. Levando-se em consideração a soma dos raios de van der Waals do S e N, conclui-se que o empacotamento cristalino nesse composto ocorra devido às interações intermoleculares do tipo $\pi\cdots\pi$, que são importantes no processo de cristalização de moléculas que possuem uma extensa conjugação π com distância entre planos de 3,536 Å. A Figura 19 apresenta o empacotamento cristalino das estruturas das **BTD3**, **BTD4** e **Splendor**.

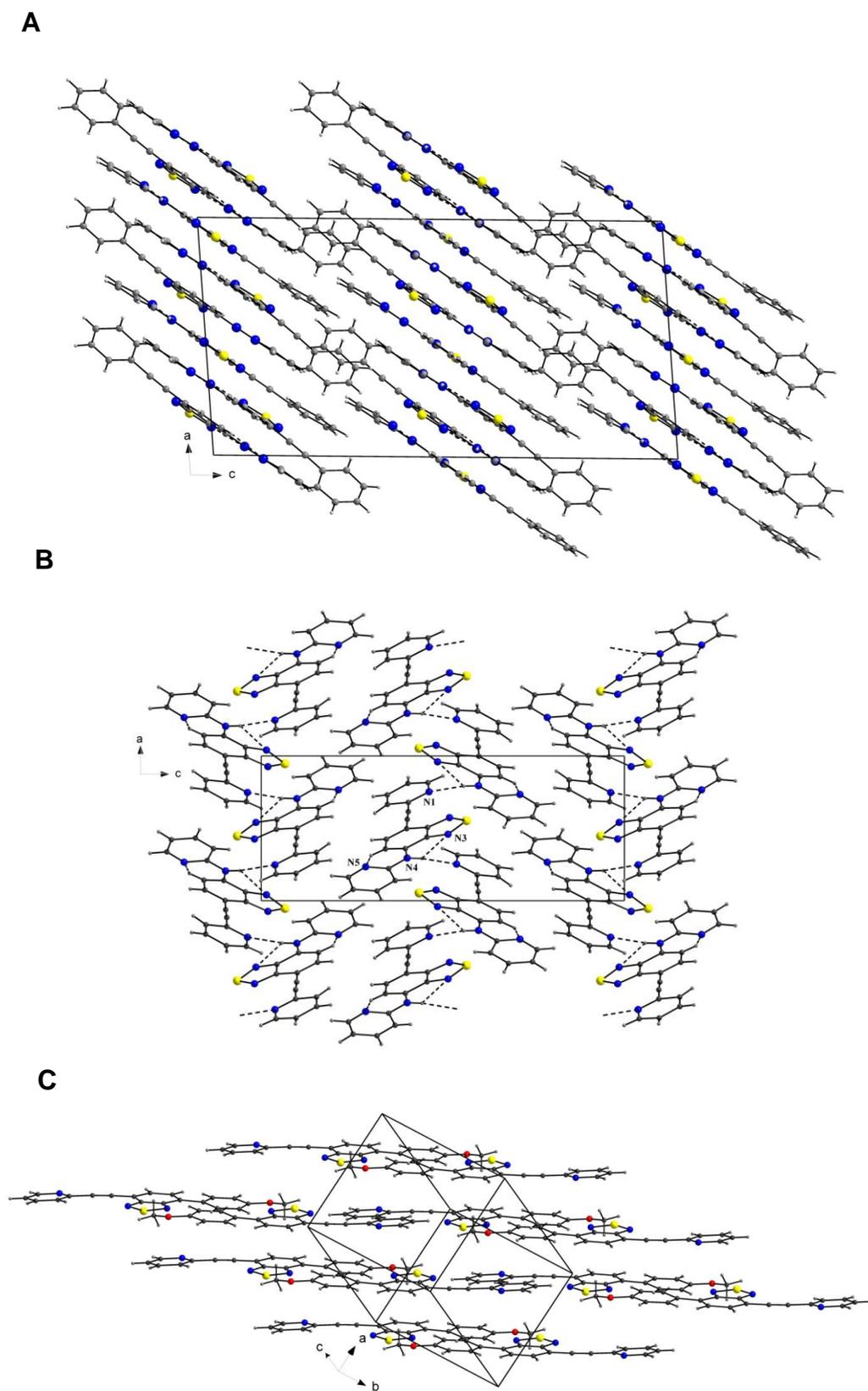


Figura 19. (A) Projeção do empacotamento cristalino da **BTD3**, vista ao longo do eixo *b*. (B) Vista perspectiva da cadeia em ziguezague formada por ligações de hidrogênio na **BTD4** ao longo do eixo cristalográfico *b*. (C) Parte do diagrama de empacotamento da estrutura cristalina do **Splendor**.

Capítulo 4

Propiedades Fotofísicas

4- Propriedades Fotofísicas

Os cinco derivados BTDs fluorescentes tiveram suas propriedades fotofísicas investigadas por meio de análises de espectrofotometria e espectrofluorimetria em diferentes solventes para se verificar os efeitos solvatocrômicos. Os dados obtidos podem ser vistos na Tabela 2.

Tabela 2. Dados fotofísicos para os compostos BTDs em soluções 10 μ M.

BTD	Solvente	Log ϵ (ϵ)	$\lambda_{\text{max(abs)}}$ (nm)	$\lambda_{\text{max(em)}}$ (nm)	Deslocamento de Stokes
^a BTD1	PhMe	4.13 (13343)	449	568	119
	AcOEt	4.28 (19155)	448	578	130
	CH ₂ Cl ₂	4.36 (22789)	447	588	141
	MeCN	4.15 (14169)	442	588	146
	EtOH	4.21 (16234)	448	606	158
^b BTD2	PhMe	3.93 (8438)	457	592	135
	AcOEt	3.74 (5483)	455	598	143
	CH ₂ Cl ₂	4.06 (11470)	455	610	155
	MeCN	3.77 (5905)	447	614	167
	EtOH	3.81 (6426)	453	620	167
^c BTD3	PhMe	4.17 (14853)	459	570	111
	AcOEt	4.22 (16416)	459	580	121
	CH ₂ Cl ₂	4.21 (16191)	459	592	133
	MeCN	4.33 (21524)	454	600	146
	EtOH	4.22 (16424)	460	616	156
^d BTD4	PhMe	4.19 (15562)	456	560	104
	AcOEt	4.26 (18039)	455	572	117
	CH ₂ Cl ₂	4.18 (15027)	456	582	126
	MeCN	4.16 (14471)	451	590	139
	EtOH	4.22 (16435)	457	602	145
^e Splendor	PhMe	4.11 (12853)	410	510	100
	AcOEt	4.16 (14397)	406	518	112
	CH ₂ Cl ₂	4.09 (12441)	409	530	121
	MeCN	4.19 (15539)	406	544	138
	EtOH	4.06 (12452)	404	550	146

^a $\phi_f = 0,13$ ^b $\phi_f = 0,04$ ^c $\phi_f = 0,063$ ^d $\phi_f = 0,17$ ^e $\phi_f = 0,38$

Pode-se observar que, para todos os compostos, independente do solvente em que se encontram solubilizados, os valores de comprimentos de onda de absorção não sofrem grandes variações. **BTD1** (442-448nm), **BTD2** (447-457 nm), **BTD3** (454-460 nm), **BTD4** (451-457nm), **Splendor** (404-410 nm). As variações observadas nos comprimentos de onda de emissão são maiores para as BTDs:

BTD1 (568-606nm), **BTD2** (592-620 nm), **BTD3** (570-616 nm), **BTD4** (560-602nm) e **Splendor** (510-550 nm).

No estado excitado, fluoróforos apresentam maior momento de dipolo do que no estado fundamental. E esta polarização é estabilizada também pelos momentos de dipolo das moléculas do solvente que estão ao redor do fluoróforo. Esse efeito de estabilização será maior em solventes de maior polaridade, como pode ser visto nas Tabela 2, em que os maiores valores de deslocamentos de Stokes são encontrados no solvente de maior polaridade, no caso, o etanol.^{17,59}

O efeito do solvente pode levar a maiores deslocamentos de Stokes, e pode também levar a menores intensidades de emissão. Isso pode ser observado para as BTDs que contém o grupo 2-aminopiridina, ou seja, **BTD1**, **BTD2**, **BTD3** e **BTD4**. Quando solubilizadas em etanol a intensidade de emissão desses compostos é muito menor se comparada àquelas em solventes de menor polaridade, como por exemplo o tolueno. Esse fato pode ser explicado pela formação de interações de hidrogênio entre as moléculas dos compostos e as do solvente. Essas interações distorcem o plano da molécula, desfavorecendo a emissão de energia por vias radioativas. Esse efeito é menos pronunciado na molécula **Splendor**, uma vez que ela possui menos sítios que possam realizar ligações de hidrogênio intramoleculares (Figura 20) adicionais como no caso das **BTD1**, **BTD2**, **BTD3** e **BTD4**. Os gráficos dos espectros de absorção e emissão das moléculas BTDs podem ser vistos na Figura 21.

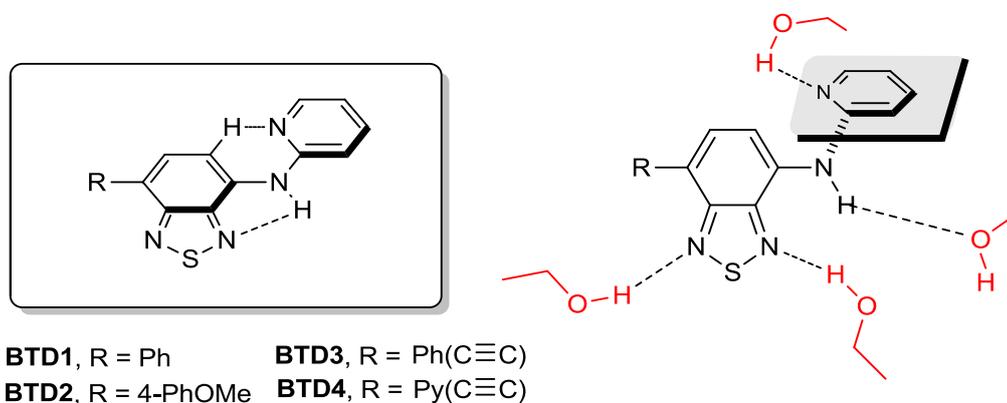


Figura 20. Formação de ligações de hidrogênio entre moléculas do etanol e o grupo 2-aminopiridina dos compostos **BTD1**, **BTD2**, **BTD3** e **BTD4**.

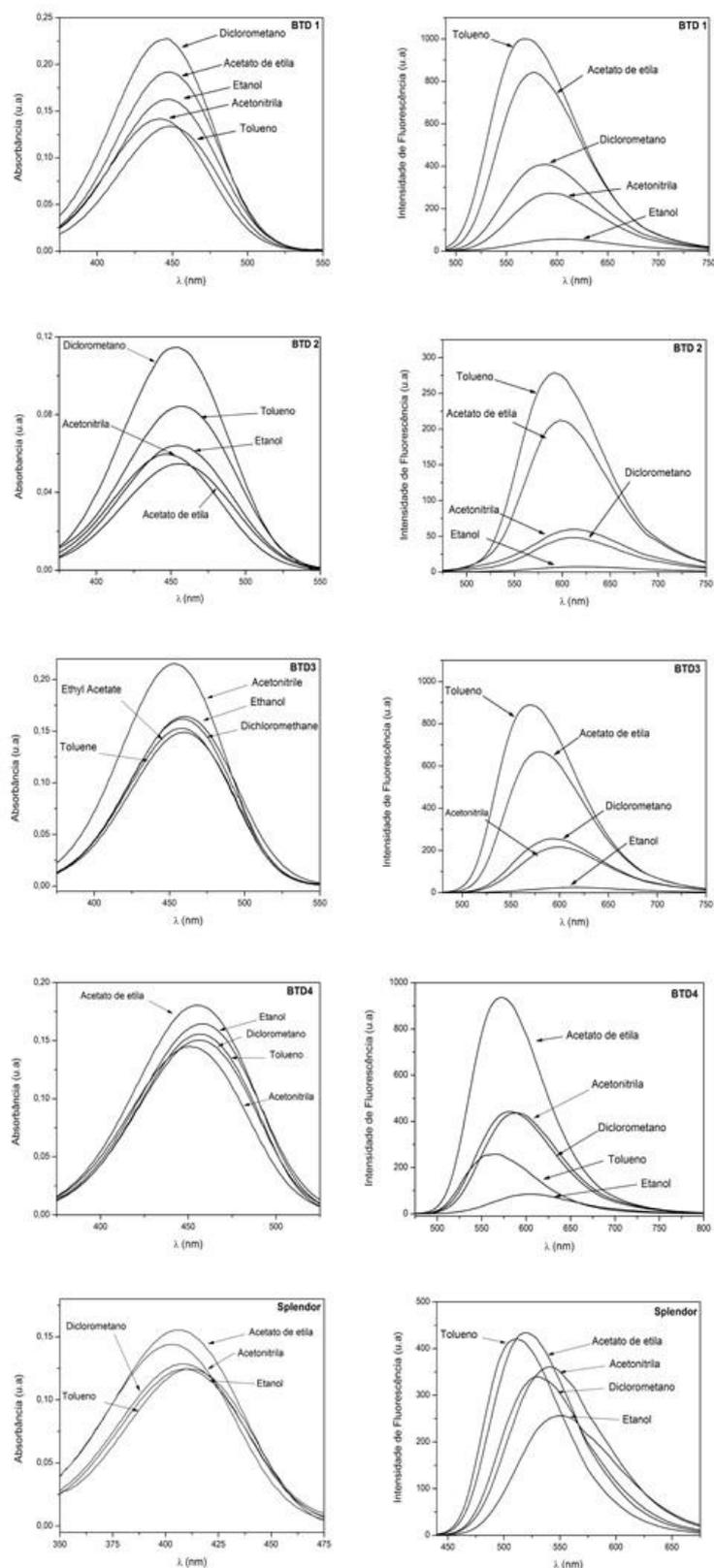
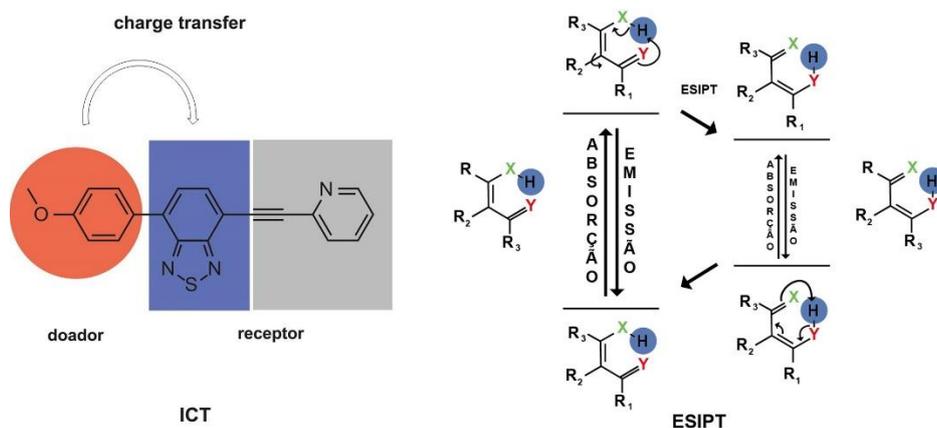


Figura 21. Gráficos dos espectros de absorção e emissão dos compostos **BTD1**, **BTD2**, **BTD3**, **BTD4** e **Splendor**. Note que para a **BTD4** a emissão em tolueno é menos intensa, pois a fenda de emissão e excitação utilizada em sua medição foi menor que as dos demais solventes.

Todos os compostos apresentaram amplos deslocamentos de Stokes ($\lambda_{emi} - \lambda_{abs}$), igual ou maiores que 100 nm, independente do solvente em que se encontravam solubilizados, e por esta razão, conclui-se que a sua estabilidade possa ser consequência da ação de processos intramoleculares. Por exemplo, os processos ICT (*intramolecular charge transfer*) e ESIPT (*excited state intramolecular proton transfer*).¹⁵

Os processos ESIPT e ICT são mecanismos de estabilização interna que ocorrem muito rapidamente e alteram a distribuição de carga na estrutura da molécula. O processo ESIPT consiste em uma transferência protônica intramolecular e o processo ICT em uma redistribuição de carga entre as partes elétron doadoras e elétron aceptoras de uma molécula (Esquema 10).



Esquema 10. Representação esquemática dos processos ICT e ESIPT.

Acreditava-se que os compostos que contém o grupo 2-aminopiridina como substituinte (**BTDAP**, **BTD1**, **BTD2**, **BTD3** e **BTD4**) eram estabilizados pelo processo ESIPT.⁴⁸ Várias características apontavam para esta possibilidade: (i) geometria planar nos estados fundamental e excitado, (ii) longos deslocamentos de Stokes, (iii) transições eletrônicas com caráter ICT, (iv) grandes variações nas transições eletrônicas sob diferentes condições de pH, (v) cálculos teóricos indicando a possibilidade de ESIPT.^{48,60}

No entanto, recentemente, um estudo teórico evidenciou que tais derivados de BTDs prefeririam ICT como mecanismo de dissipação de energia ao ESIPT.⁶⁰

Para avaliar a influência do ICT no estado excitado, foram traçados os gráficos (Figura 22) do deslocamento de Stokes vs E_T^N , sendo E_T^N o parâmetro de polaridade de solvente descritos por Reichard^{59,61} (Tabela 3).

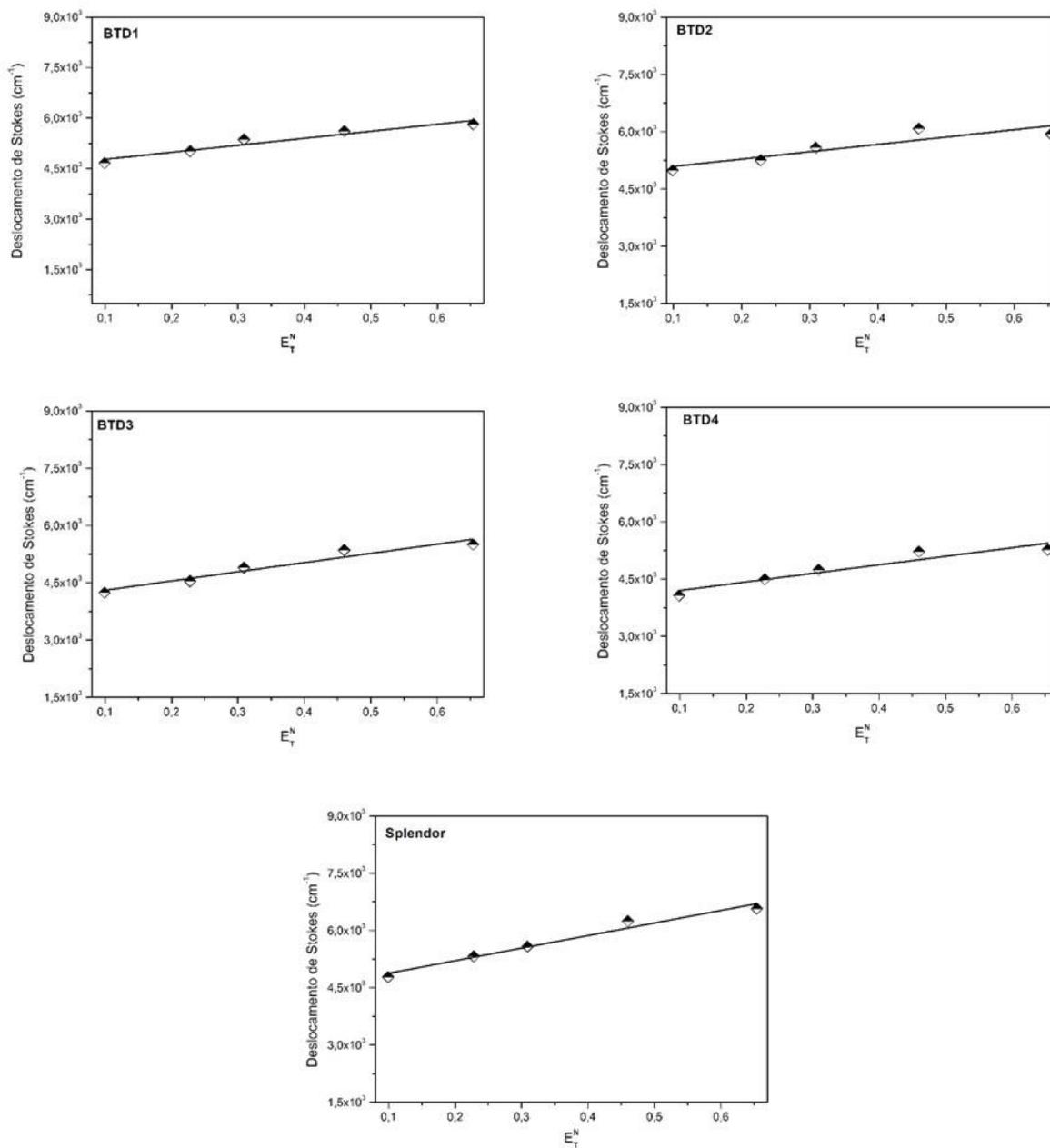


Figura 22. Deslocamento de Stokes (cm⁻¹) vs E_T^N nos solventes testados (tolueno, acetato de etila, diclorometano, acetonitrila e etanol).

Tabela 3. Valores de E_T^N dos solventes utilizados.^a

Solvente	E_T^N
Tolueno	0,099
Acetato de etila	0,228
Diclorometano	0,309
Acetonitrila	0,460
Etanol	0,654

^a valores extraídos da referência 54.

O deslocamento de Stokes é dado pela equação de Lippert-Mataga.^{17,62} Essa equação descreve os efeitos físico-químicos que os solventes exercem sobre o espectro de emissão dos fluoróforos, medindo assim sua sensibilidade em relação à polaridade do meio.⁶³ Quanto maior for a inclinação da reta, maior será a influência do solvente na estabilização do estado excitados dos fluoróforos. Quanto maior for o valor do coeficiente de inclinação, maior será a inclinação da reta (Tabela 4). A influência do processo ICT será medido pelo valor de R^2 . Valores acima de 0,7 indicam uma elevada estabilização por ICT.

Tabela 4. Equação da reta dos gráficos de Lippert-Mattaga das **BTD1**, **BTD2**, **BTD3**, **BTD4** e **Splendor**.

BTD	Equação da reta
BTD1	$Y = 4568.4 + 2083.4 X$
BTD2	$Y = 4898.5 + 1924.5 X$
BTD3	$Y = 4066.9 + 2407.1 X$
BTD4	$Y = 3979.6 + 2235.4 X$
Splendor	$Y = 4549.8 + 3291.1 X$

A Tabela 5 apresenta os valores de R^2 encontrados para os compostos estudados. O menor valor de R^2 encontrado foi de 0,74 para a **BTD2**. Isso indica que a geometria do composto não sofre grandes alterações no estado excitado o que, normalmente, indica pouca variação no momento dipolar.⁶⁴

Tabela 5. Valores de R^2 encontrados para as **BTD1**, **BTD2**, **BTD3**, **BTD4** e **Splendor**.

BTD	R^2
BTD1	0,91
BTD2	0,74
BTD3	0,92
BTD4	0,87
Splendor	0,96

Capítulo 5

Cálculos teóricos

5- Cálculos teóricos

Estudos teóricos foram realizados porque estes permitem uma melhor compreensão das propriedades eletrônicas dos compostos. Permitem, também, a determinação dos valores energéticos dos orbitais HOMO e LUMO, além da determinação da distribuição de densidade eletrônica ao longo da estrutura de uma molécula.

Desta forma, foi realizado, por meio da “functional density theory” (DFT), os cálculos das propriedades fotofísicas e espectroscópicas dos derivados BTDs estudados.

Com base nos resultados experimentais da geometria das moléculas (obtidos por difração de Raios-X) e seus estudos fotofísicos, foi realizada uma varredura com diversos funcionais de correlação e troca (Tabela 6 e Tabela 7) sendo escolhidos os métodos dos quais mais se aproximavam com os dados experimentais. Os funcionais CAM-B3LYP e PBE1PBR se mostraram os mais apropriados para todos os derivados do núcleo BTB estudados neste trabalho, sendo o primeiro escolhido para a otimização da geometria e estudos da distribuição de carga das moléculas e o segundo foi utilizado para o estudo dos orbitais moleculares destas moléculas. Em todos os métodos testados utilizou-se a função de base, $6-311+g(2d,p)$.

A Figura 23 apresenta os mapas de distribuição de densidade eletrônica, isto é a diferença entre as densidades de carga no estado excitado e no estado fundamental, para os compostos **BTB1**, **BTB2**, **BTB3**, **BTB4** e **Splendor**.

O mapa de distribuição de carga foi montado para se evidenciar a eficiência do processo ICT no processo de estabilização dessas estruturas no estado excitado. Os resultados se mostraram em acordo com os gráficos de Lippert-Mataga da Figura 22. A densidade de carga se acumula no anel da BTB, parte elétron receptora das moléculas no estado excitado, como pode ser observado na Figura 23.

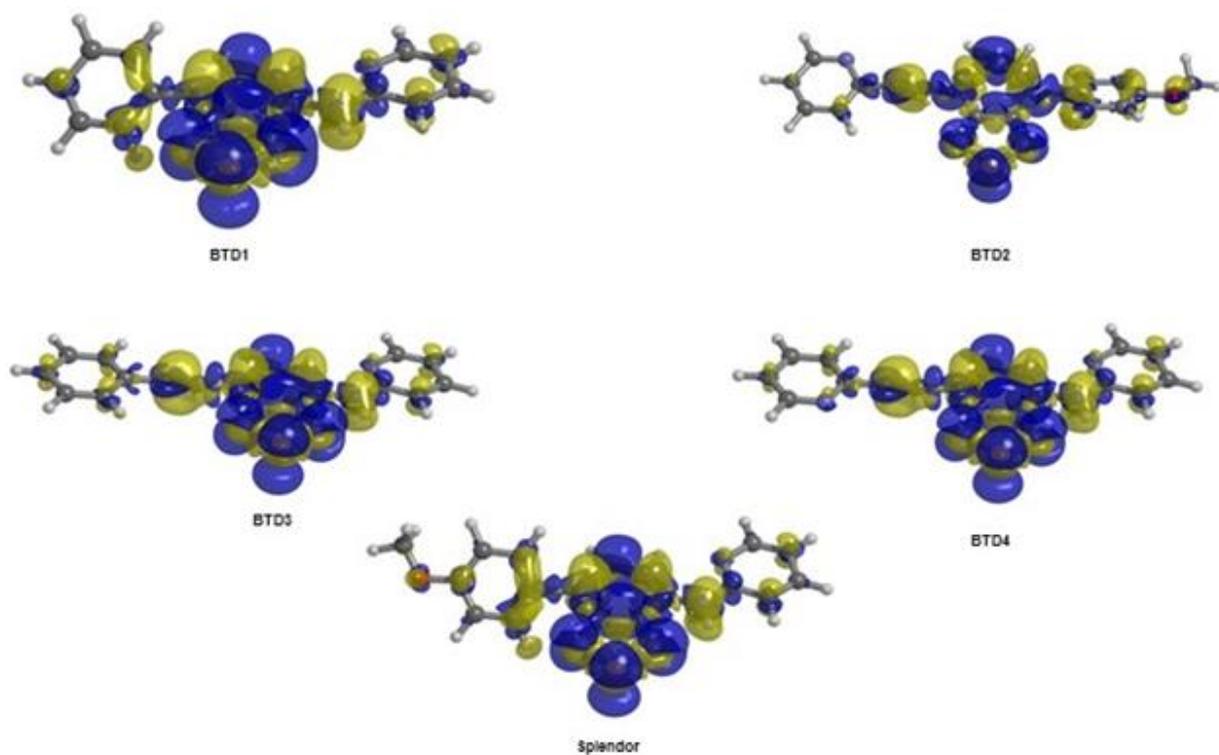


Figura 23. Mapa de distribuição de densidade eletrônica para as **BT01**, **BT02**, **BT03**, **BT04** e **Splendor** calculado com o método CAM-B3LYP/6-31+g(d). Amarelo representa a distribuição eletrônica antes do processo de ICT, e azul representa a distribuição após o processo de ICT.

Tabela 6. Dados Teóricos calculados para as **BTD1, BTD2, BTD3, BTD4 e Splendor**, nos estados fundamental e excitado obtidos com diferentes correlações funcionais de troca (CAM-B3LYP, M062X, PBE1PBE, wB97XD) usando 6-311+g(2d,p) *Pople's split-valence basis set*. Todos os resultados foram obtidos utilizando geometrias otimizadas com nível CAM-B3LYP/6-31+g(d).

BTD	XC	Estado	$\mu(D)$		HOMO(eV)		LUMO(eV)		$\Delta E_{HOMO-LUMO}(eV)$	
			Gás	Água	Gás	Água	Gás	Água	Gás	Água
BTD1	CAM-B3LYP	S ₀	2,70	3,75	-6,797	-6,896	-1,405	-1,500	5,392	5,395
		S ₁	5,83	8,44	-6,430	-6,539	-1,821	-1,886	4,609	4,653
	M062X	S ₀	2,66	3,70	-6,681	-6,808	-1,630	-1,746	5,052	5,063
		S ₁	5,80	8,45	-6,313	-6,449	-2,050	-2,138	4,263	4,311
	PBE1PBE	S ₀	2,69	3,79	-5,755	-5,866	-2,371	-2,482	3,383	3,384
		S ₁	5,77	8,52	-5,446	-5,573	-2,755	-2,829	2,691	2,743
wB97XD	S ₀	2,69	3,73	-7,329	-7,446	-0,784	-0,898	6,545	6,548	
	S ₁	5,82	8,42	-6,962	-7,089	-1,202	-1,288	5,760	5,801	
BTD2	CAM-B3LYP	S ₀	2,39	3,39	-6,615	-6,770	-1,338	-1,473	5,277	5,296
		S ₁	6,33	8,66	-6,157	-6,321	-1,740	-1,858	4,417	4,463
	M062X	S ₀	2,32	3,30	-6,511	-6,692	-1,564	-1,719	4,947	4,973
		S ₁	6,19	8,44	-6,053	-6,244	-1,971	-2,110	4,082	4,134
	PBE1PBE	S ₀	2,26	3,26	-5,567	-5,737	-2,297	-2,453	3,269	3,284
		S ₁	6,48	8,80	-5,173	-5,356	-2,663	-2,795	2,510	2,561
wB97XD	S ₀	2,36	3,36	-7,145	-7,319	-0,716	-0,872	6,429	6,447	
	S ₁	6,27	8,60	-6,685	-6,868	-1,122	-1,260	5,564	5,608	
BTD3	CAM-B3LYP	S ₀	3,04	4,45	-6,679	-6,823	-1,549	-1,684	5,130	5,141
		S ₁	5,01	7,37	-6,360	-6,527	-1,906	-2,018	4,454	4,509
	M062X	S ₀	3,01	4,41	-6,578	-6,749	-1,780	-1,936	4,797	4,813
		S ₁	4,94	7,40	-6,255	-6,448	-2,137	-2,271	4,118	4,177
	PBE1PBE	S ₀	3,05	4,59	-5,666	-5,827	-2,498	-2,645	3,168	3,181
		S ₁	5,02	7,25	-5,397	-5,582	-2,826	-2,945	2,571	2,636
wB97XD	S ₀	3,02	4,42	-7,201	-7,366	-0,940	-1,094	6,261	6,271	
	S ₁	5,01	7,40	-6,879	-7,066	-1,295	-1,429	5,583	5,637	
BTD4	CAM-B3LYP	S ₀	3,52	4,98	-6,779	-6,920	-1,567	-1,735	5,212	5,185
		S ₁	7,01	9,90	-6,481	-6,649	-1,920	-2,058	4,561	4,590
	M062X	S ₀	3,41	4,81	-6,672	-6,838	-1,800	-1,987	4,872	4,850
		S ₁	6,90	9,84	-6,370	-6,562	-2,151	-2,310	4,219	4,252
	PBE1PBE	S ₀	3,61	5,21	-5,768	-5,922	-2,521	-2,696	3,248	3,227
		S ₁	7,12	10,00	-5,519	-5,702	-2,845	-2,986	2,675	2,716
wB97XD	S ₀	3,50	4,94	-7,300	-7,460	-0,960	-1,147	6,340	6,312	
	S ₁	6,95	9,83	-6,999	-7,186	-1,311	-1,470	5,688	5,716	
Splendor	CAM-B3LYP	S ₀	1,08	1,39	-7,063	-7,235	-1,723	-1,869	5,340	5,366
		S ₁	4,49	7,32	-6,627	-6,730	-2,107	-2,270	4,520	4,459
	M062X	S ₀	1,02	1,28	-6,985	-7,185	-1,970	-2,138	5,015	5,047
		S ₁	4,46	7,38	-6,548	-6,677	-2,356	-2,545	4,190	4,132
	PBE1PBE	S ₀	1,24	1,53	-6,026	-6,206	-2,649	-2,819	3,377	3,387
		S ₁	4,97	7,95	-5,665	-5,797	-2,970	-3,145	2,695	2,651
wB97XD	S ₀	1,07	1,37	-7,593	-7,784	-1,123	-1,289	6,469	6,495	
	S ₁	4,36	7,13	-7,149	-7,271	-1,516	-1,703	5,634	5,567	

Tabela 7. Dados teóricos de TD-DFT das estruturas **BTD1**, **BTD2**, **BTD3**, **BTD4** e **Splendor** obtidos por diferentes correlações funcionais de troca (CAM-B3LYP, M062X, PBE1PBE, wB97XD) utilizando 6-311+g(2d,p) *Pople's split-valence basis set*. Todos os resultados foram obtidos com estruturas otimizadas com nível de cálculo CAM-B3LYP/6-31+g(d).

BTD	XC		Composição orbitalar (maiores contribuições)	Força de oscilador	λ (nm)	
BTD1	CAM-B3LYP	Gás	HOMO->LUMO (97%)	0,2588	410,83	
		Água	HOMO->LUMO (97%)	0,4422	424,28	
	M062X	Gás	HOMO->LUMO (98%)	0,2780	403,22	
		Água	HOMO->LUMO (97%)	0,4801	415,79	
	PBE1PBE	Gás	HOMO->LUMO (99%)	0,1901	466,75	
		Água	HOMO->LUMO (99%)	0,3414	481,94	
	wB97XD	Gás	HOMO->LUMO (96%)	0,2704	402,78	
		Água	HOMO->LUMO (95%)	0,4615	415,93	
	BTD2	CAM-B3LYP	Gás	HOMO->LUMO (96%)	0,2673	420,38
			Água	HOMO->LUMO (96%)	0,4373	432,60
M062X		Gás	HOMO->LUMO (97%)	0,2861	412,47	
		Água	HOMO->LUMO (97%)	0,4740	423,56	
PBE1PBE		Gás	HOMO->LUMO (99%)	0,1928	486,21	
		Água	HOMO->LUMO (99%)	0,3303	499,09	
wB97XD		Gás	HOMO->LUMO (94%)	0,2804	410,81	
		Água	HOMO->LUMO (94%)	0,4585	422,95	
BTD3		CAM-B3LYP	Gás	HOMO->LUMO (96%)	0,4338	429,42
			Água	HOMO->LUMO (96%)	0,7175	449,02
	M062X	Gás	HOMO->LUMO (97%)	0,4657	421,41	
		Água	HOMO->LUMO (97%)	0,7787	440,56	
	PBE1PBE	Gás	HOMO->LUMO (98%)	0,3102	493,47	
		Água	HOMO->LUMO (99%)	0,5631	513,01	
	wB97XD	Gás	HOMO->LUMO (95%)	0,4548	420,18	
		Água	HOMO->LUMO (95%)	0,7467	439,49	
	BTD4	CAM-B3LYP	Gás	HOMO->LUMO (96%)	0,4796	419,32
			Água	HOMO->LUMO (96%)	0,7760	444,32
M062X		Gás	HOMO->LUMO (97%)	0,5122	412,23	
		Água	HOMO->LUMO (97%)	0,8361	436,82	
PBE1PBE		Gás	HOMO->LUMO (98%)	0,3501	476,46	
		Água	HOMO->LUMO (99%)	0,6279	503,42	
wB97XD		Gás	HOMO->LUMO (95%)	0,4995	411,22	
		Água	HOMO->LUMO (95%)	0,8017	435,56	
Splendor		CAM-B3LYP	Gás	HOMO->LUMO (95%)	0,6431	391,29
			Água	HOMO->LUMO (94%)	0,9404	406,66
	M062X	Gás	HOMO->LUMO (97%)	0,6725	384,53	
		Água	HOMO->LUMO (96%)	0,9890	399,19	
	PBE1PBE	Gás	HOMO->LUMO (98%)	0,4861	446,38	
		Água	HOMO->LUMO (99%)	0,7505	466,68	
	wB97XD	Gás	HOMO->LUMO (93%)	0,6682	382,49	
		Água	HOMO->LUMO (92%)	0,9734	397,27	

As estruturas otimizadas das BTDs com seus orbitais HOMO e LUMO também foram calculadas. Os orbitais HOMO e LUMO são basicamente de caráter π . O orbital LUMO de todos os compostos é centrado no anel BTD, como pode ser visto na Figura 24.

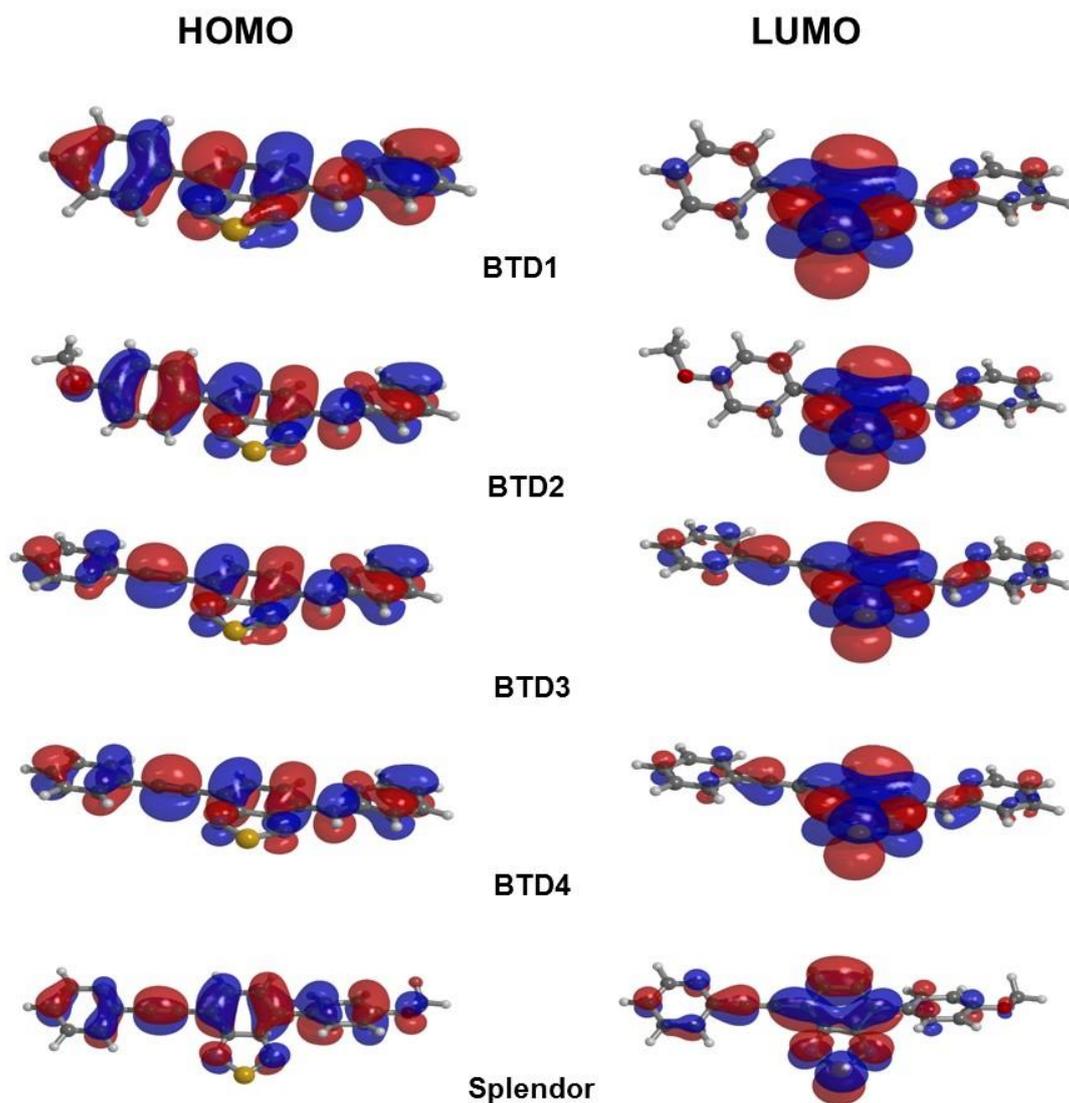


Figura 24. Estruturas otimizadas com os orbitais HOMO e LUMO na fase Gasosa das **BTD1**, **BTD2**, **BTD3**, **BTD4** e **Splendor**. Cálculos com nível PBE1PBE/6-311+G(2d,p)//CAM-B3LYP/6-31+g(d). As estruturas calculadas em água apresentaram localizações dos orbitais similares. Os orbitais obtidos utilizando PBE1PBE como funcional de correlação de troca forneceram resultados similares aos obtidos utilizando CAM-B3LYP.

Os diagramas de energia (valores de *band-gap*) também foram calculados e são apresentados na Figura 25. Os cálculos dos compostos estudados também foram simulados em água como um prelúdio para os experimentos de imageamento celular. Demonstrando que todos os compostos possuem comprimento de onda de absorção no espectro visível, importante característica para marcadores celulares.

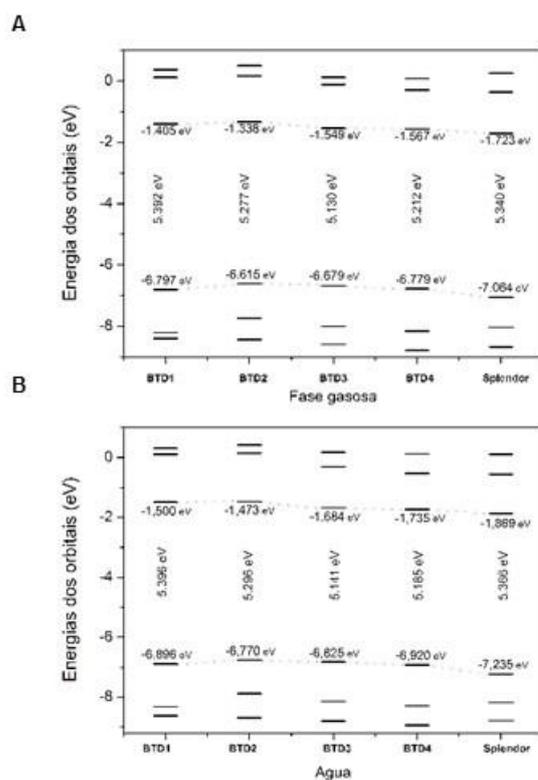


Figura 25. Diagrama de energia dos orbitais HOMO e LUMO em fase gasosa (A) e em água (B).

Capítulo 6

Imageamento celular

6- Imageamento celular

Os derivados monossustituídos, apresentados na Figura 12, já haviam sido testados em experimentos de imageamento celular em linhagens de câncer de mama (MCF-7), câncer de cólon de útero (Caco-2) e em células saudáveis (fibroblastos).⁴⁸ Esses derivados foram bastante seletivos para marcação de mitocôndrias, entretanto apresentaram os chamados “vazamentos”, ou seja, uma marcação não totalmente seletiva, mas de excelente qualidade.

Nesse sentido, em busca de melhorias na seletividade dos derivados BTDs e em suas propriedades espectroscópicas, os compostos dissustituídos não simétricos, **BTD1**, **BTD2**, **BTD3** e **BTD4** e **Splendor** foram testados em experimentos de imageamento celular em células (vivas e fixadas) de câncer da linhagem MCF-7.^{iv}

Os compostos foram excitados na faixa de 405-488 nm, e apresentaram sinal de fluorescência, variando do azul ao verde (Figura 26). Essa é uma característica importante para experimentos multicores no qual se utiliza mais de um marcador em uma mesma célula para o monitoramento simultâneo de mais de uma especificidade celular. Apesar do bom sinal de fluorescência apresentado pelos derivados **BTD1**, **BTD2**, **BTD3** e **BTD4** nenhum deles mostrou seletividade no interior da célula e foram encontrados dispersos no citosol. As **BTD1** e **BTD3** foram também encontradas parcialmente distribuídas no interior do núcleo das células.

Os resultados mais interessantes, no entanto, foram apresentadas pelas **BTD2**, que mostrou maior intensidade de fluorescência no interior da célula (maior efeito “*light up*”), e pela **BTD4**, que apresentou uma relativa seletividade para mitocôndrias (uma forte tendência).

A partir dessas observações, infere-se que o substituinte 4-fenilmetoxi seria responsável pelo efeito “*light up*”, o substituinte -C≡C-Py proporcionaria uma maior seletividade para a molécula (direcionador de mitocôndria) e a combinação das características das **BTD2** e **BTD4** em um só composto poderia retornar resultados promissores.

^{iv} Os experimentos de imageamento celular foram realizados em colaboração com o grupo do Prof. Dr. José Raimundo Corrêa (coorientador deste trabalho), do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília.

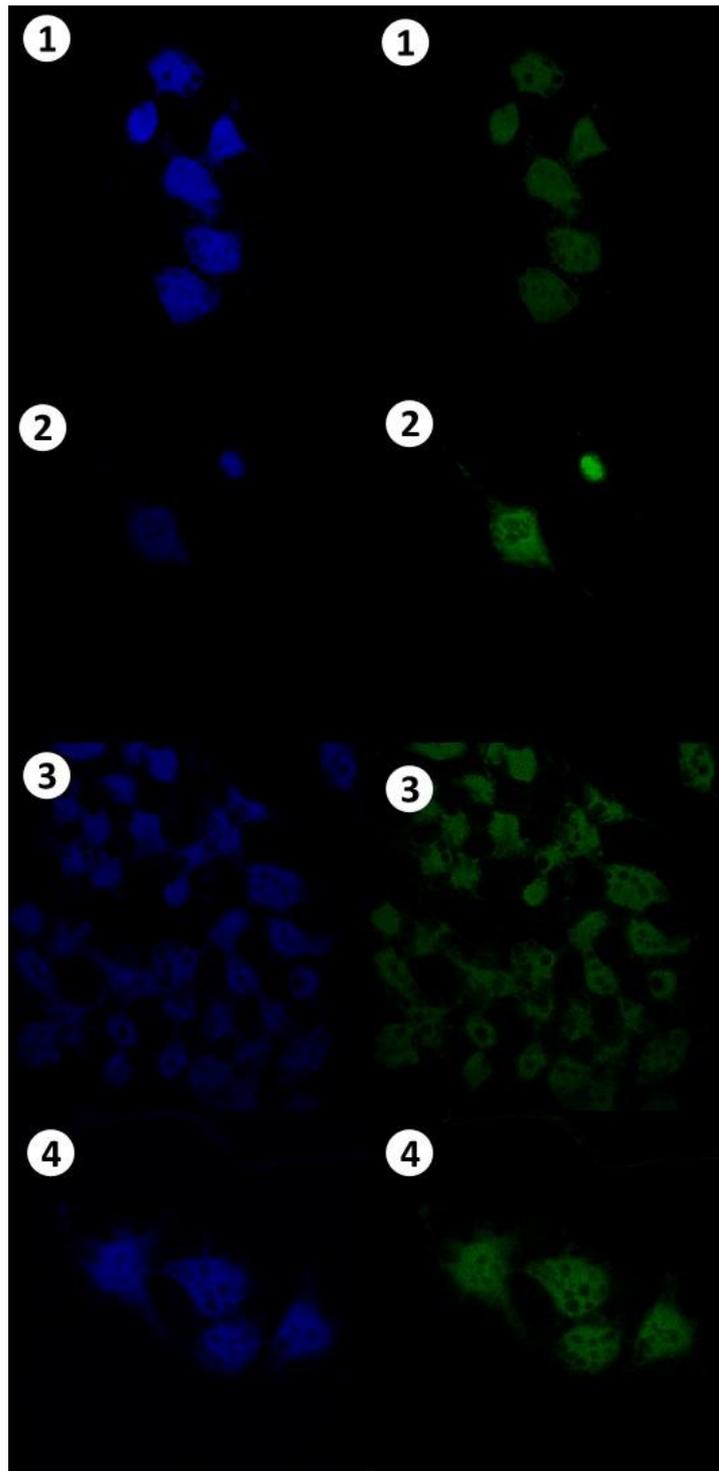


Figura 26. Células de câncer de mama (MCF-7) marcadas com (1) **BTD1**, (2) **BTD2**, (3) **BTD3**, (4) **BTD4**. (Esquerda) Emissão no canal do azul. (Direita) Emissão no canal do verde.

A molécula que combina as duas características em sua estrutura, **Splendor**, já havia sido sintetizada anteriormente pelo grupo,⁴⁹ e testada em experimentos *in vitro* de detecção e quantificação de dsDNA, e em monitoramentos

de PCR em tempo real.⁴⁹ A estrutura denominada **Splendor** também foi testada neste trabalho como marcador fluorescente em experimentos de imageamento celular. Os resultados obtidos podem ser vistos na Figura 27.

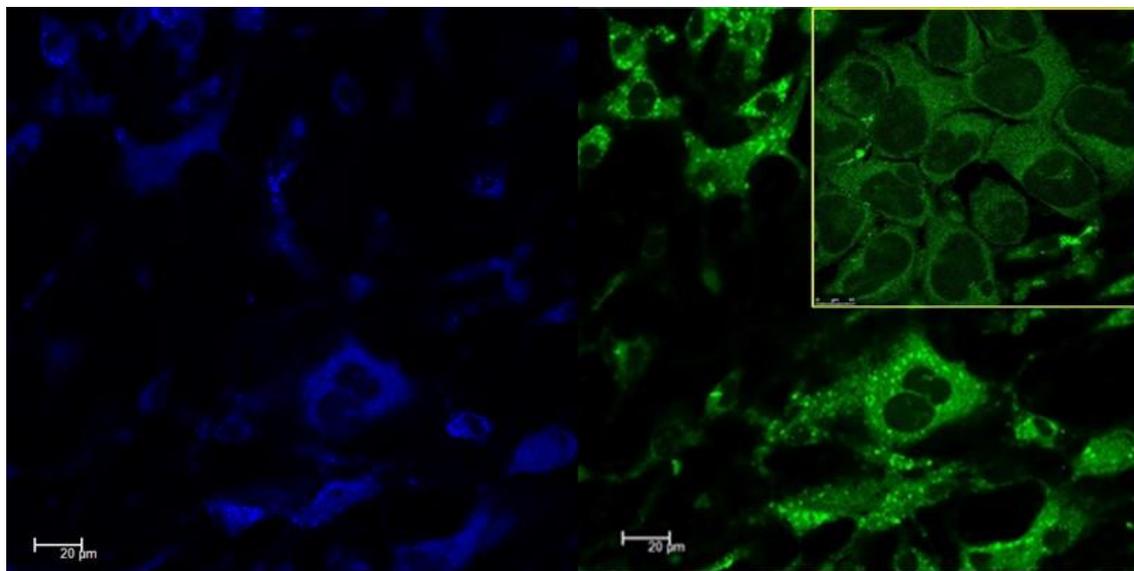


Figura 27. Célula de câncer de mama (MCF-7) marcada seletivamente com **Splendor**. (Esquerda) Emissão no canal do azul. (Direita) Emissão no canal do verde. A expansão à direita mostra uma figura expandida com a escala em 10 µM.

A molécula **Splendor** se mostrou um marcador altamente seletivo para mitocôndrias com excelente sinal de fluorescência. Como dito anteriormente, um dos grandes problemas dos marcadores comercialmente disponíveis são sua dificuldade para estocagem e baixa estabilidade dos produtos disponíveis. Na realização dos experimentos de imageamento celular com **Splendor**, primeiro foi utilizado uma solução do composto armazenada por mais de cinco anos. Em seguida, os experimentos foram reproduzidos com uma solução de um composto recém sintetizado. Ambos experimentos apresentaram resultados idênticos em qualidade e seletividade, evidenciando-se a grande estabilidade deste composto. Para se confirmar a localização do **Splendor** no interior da célula, e testar suas propriedades em experimentos de marcação multicores (Figura 28), este foi inserido em conjunto com o marcador comercial conhecido MitoTracker red (Figura 6). Igualmente, foram conduzidos experimentos na presença de marcador **BTDBT** (Figura 12) previamente descrito pelo nosso grupo⁴⁷ como seletivo para marcação de dsDNA nuclear celular.

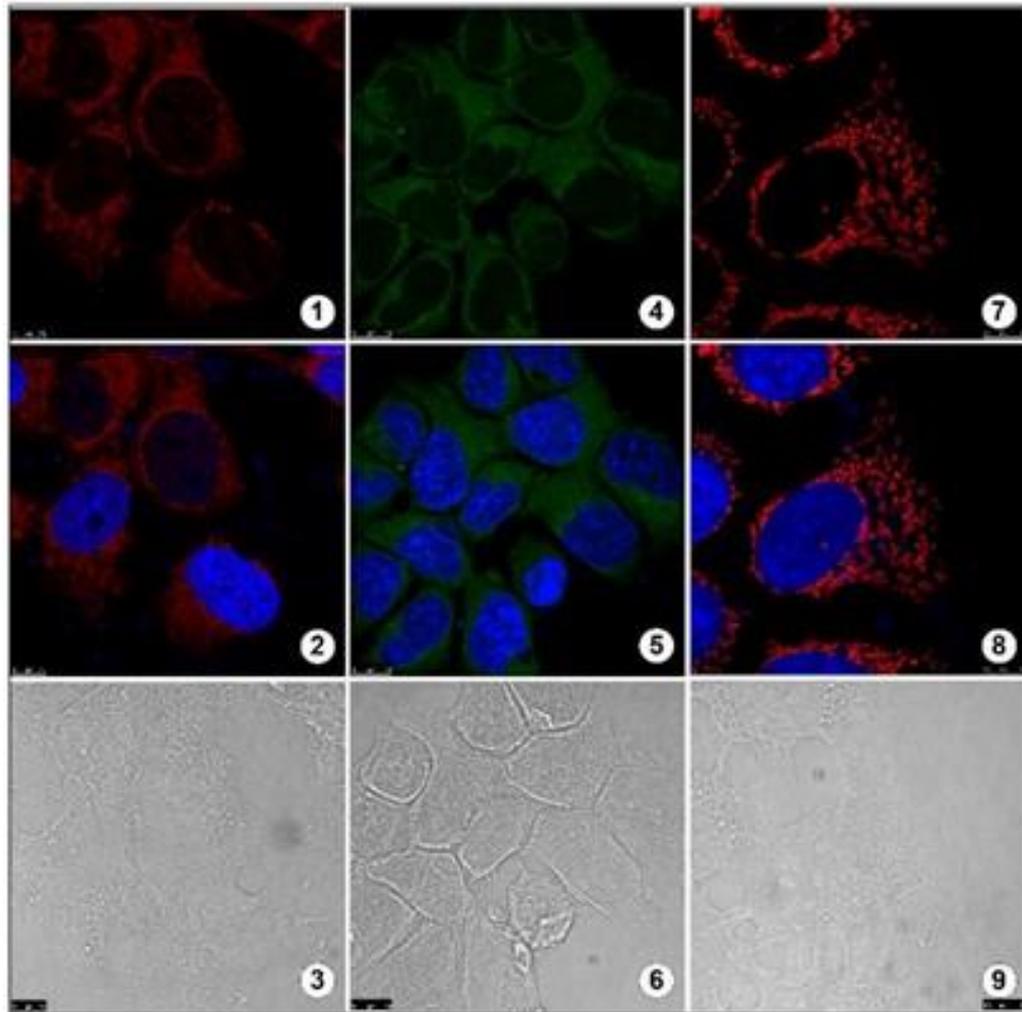


Figura 28. Experimentos de marcação com células de câncer de mama (MCF-7). (1) Mitocôndrias marcadas com o marcador comercial MitoTracker red. (2) Mitocôndrias marcadas com MitoTracker red (vermelho) e os núcleos marcados com **BTDBT** (azul). (3), (6) e (9) fase de contraste das imagens das células. (4) Mitocôndrias marcadas com Splendor. (5) Mitocôndrias marcadas com **Splendor** (verde) e núcleos marcados com **BTDBT** (azul). (7) Sobreposição de (1) e (4). Note que a emissão em laranja é devido às emissões em verde e vermelho dos marcadores. (8) Sobreposição de (2) e (5) onde, novamente, é possível observar a emissão laranja.

É interessante notar a excelente sobreposição do **Splendor** com o marcador comercial MitoTracker red no experimento de co-localização celular (Figura 28, painéis 7 e 8). Além de demonstrar que o marcador **Splendor** encontra-se nas mitocôndrias, é importante ressaltar que o MitoTracker red teve um aumento na sua emissão de fluorescência em 45% na presença do **Splendor**.

Experimentos com marcações multicores com o marcador comercial de núcleo DAPI (Esquema 3) também foram realizados e podem ser visualizados na Figura 29. Nesses experimentos **Splendor** foi inserido na célula juntamente com marcador DAPI, sendo possível monitorar o comportamento tanto do dsDNA quanto das mitocôndrias durante todo o processo de divisão celular (Figura 29). Durante os experimentos, foi constatado a superioridade do composto **Splendor**. Esse foi capaz de detectar a distribuição mitocondrial entre os cromossomos na fase de anáfase, e o marcador comercial MitoTracker Red não. Durante o processo de divisão celular, as mitocôndrias mais jovens possuem um menor potencial de membrana, por esta razão sua detecção é dificultada.

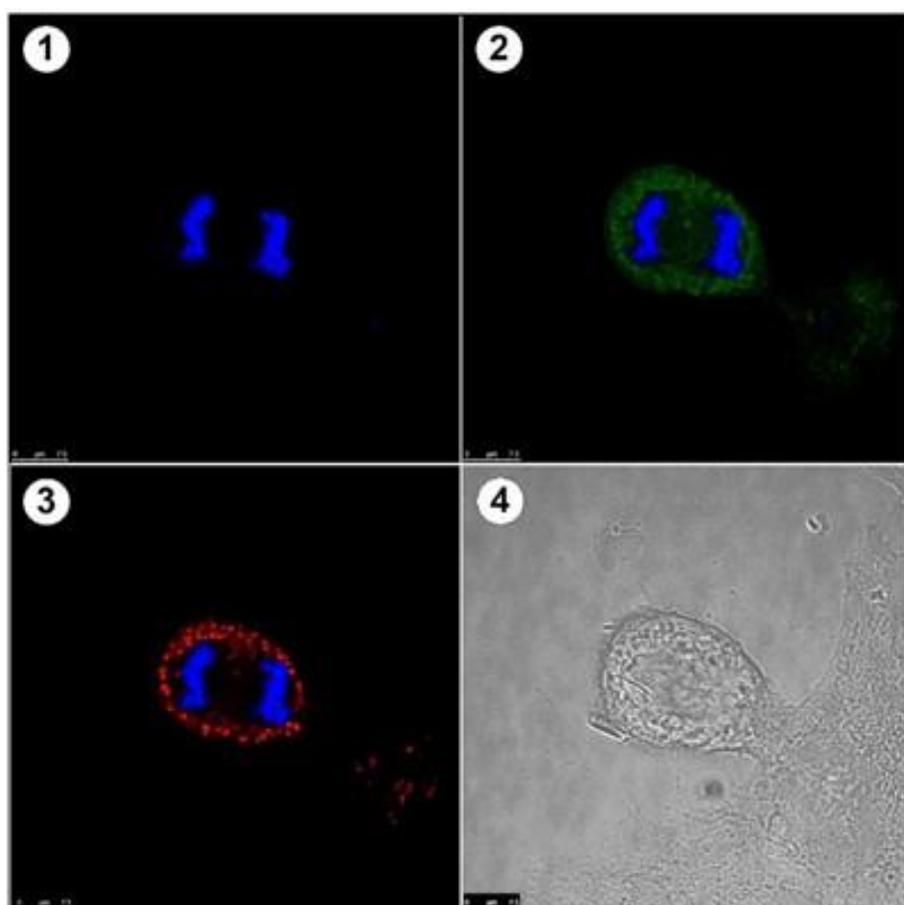


Figura 29. Células cancerígenas de mama (MCF-7) monitoradas durante o processo de divisão celular (fase de anáfase). (1) Núcleo marcado com marcador comercial DAPI (azul). (2) Mitocôndrias marcadas com **Splendor** (verde) e núcleo marcado com DAPI (azul). (3) Mitocôndrias marcadas com MitoTracker red (vermelho) e núcleo marcado com DAPI (azul). (4) Fase de contraste das imagens das células. Note que com o **Splendor** é possível ver que há uma distribuição mitocondrial homogênea entre os cromossomos, o que, com o MitoTracker red, não foi possível.

A Figura 30 apresenta imagens celulares em processo de divisão, durante a anáfase e durante a etapa de citocinese. Com essas imagens pode se observar claramente a distribuição das mitocôndrias entre os dois núcleos.

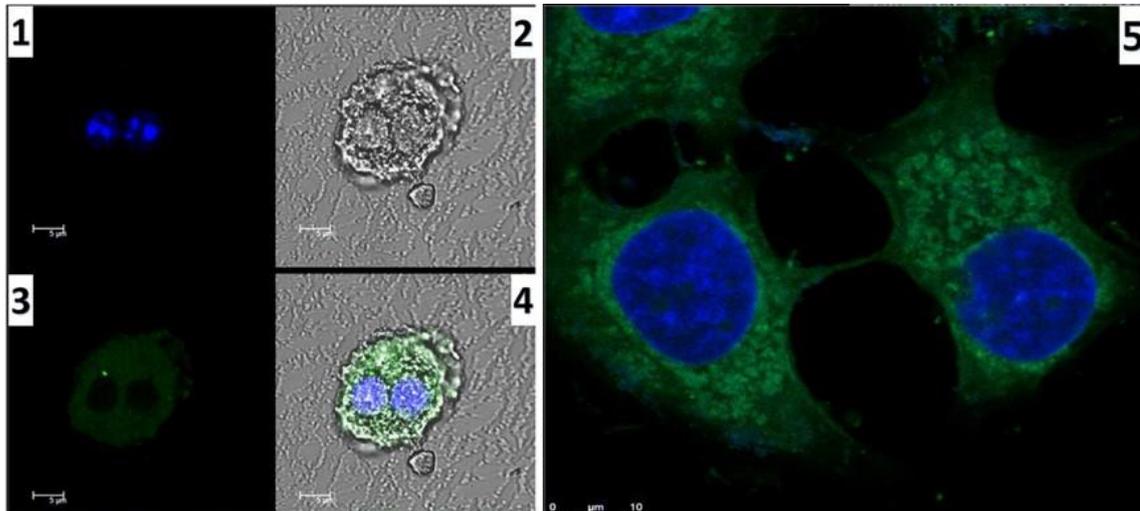


Figura 30. Células de câncer de mama (MCF-7) em experimentos de imageamento durante o ciclo de divisão celular, na etapa anáfase (1-4), visando a marcação e monitoramento das mitocôndrias até a etapa de citocinese (5). (1) Núcleo marcado com o marcador comercial DAPI (azul). (2) Imagem da fase de contraste das células. (3) Mitocôndria marcada com **Splendor** (verde) durante a anáfase. (4) Sobreposição dos painéis (1), (2) e (3). Note que usando **Splendor** é possível observar claramente a distribuição mitocondrial entre os dois núcleos na fase de anáfase até a etapa de citocinese.

Capítulo 7

Docking Molecular

7- Docking molecular

Devido aos experimentos realizados *in vitro* com o **Splendor**,⁴⁹ acreditava-se em uma possível interação com o mtDNA. Essa hipótese foi descartada, pois não foi observado sinal de fluorescência residual no interior do núcleo das células, indicando assim, que não deve haver interação entre o marcador e o DNA nuclear. Passou-se então a considerar a possibilidade de interação com proteínas encontradas na matriz das mitocôndrias. Dentre as milhares de proteínas possíveis, a *adenine nucleotide translocase* (ANT) apresentou-se como uma candidata bastante plausível. Essa proteína apresenta uma série de características que sugerem uma forte interação com o **Splendor**: (i) funciona como poro não específico para uma série de moléculas; (ii) é a mais abundante das proteínas no espaço inter-membranas e na matriz mitocondrial;⁶⁵ (iii) facilita o transporte de pequenas moléculas através das membranas;⁶⁵ (iv) possui baixa seletividade como poro de transição e canais de alta condutância e baixa seletividade;⁶⁶ (v) possui capacidade de formar poros que são responsáveis pela permeabilização da membrana interna. Devido a todas essas características, a probabilidade da ANT impedir com que **Splendor** alcance as moléculas de mtDNA é muito grande.

Para se verificar a compatibilidade dessa proteína com **Splendor** (e com as **BTD1**, **BTD2**, **BTD3** e **BTD4**), realizaram-se cálculos de *docking molecular*.^{v,67,68} Esses cálculos permitem a identificação de sítios de ligação potenciais e a determinação das conformações predominantes para os compostos testados. Este método permitiu também a medida da afinidade entre as moléculas testadas e a ANT.

O marcador **Splendor** ligou-se preferencialmente aos poros da proteína, enquanto que as **BTD1**, **BTD2**, **BTD3** e **BTD4** ligam-se exclusivamente fora desses poros e principalmente na superfície da proteína (Figura 32). A constante K_i , constante de inibição de Michaelis Menten, calculada e as energias de interação estimadas para as cinco moléculas testadas são apresentadas na Tabela 8.

^v Os cálculos de *Docking* Molecular foram realizados em colaboração com o grupo de pesquisa da Prof. Dr. Thereza A. Soares da Silva, da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

Tabela 8. Energias de interação estimadas e predição das constantes de inibição entre a proteína ANT e as BTDs estudadas.

BTD	E_{int} (kcal mol⁻¹)	K_i (mM)
BTD1	-2,92	7,20
BTD2	-2,41	17,2
BTD3	-3,39	3,30
BTD4	-2,57	13,0
Splendor	-4,86	0,30

Quanto menor for o valor da constante K_i de um substrato, maior será a sua afinidade pela proteína. Dentre os compostos testados, **Splendor** foi o que apresentou o menor valor de K_i, portanto a maior afinidade com a ANT, e o valor de energia de interação mais significativo. Dessa forma, os cálculos indicam a razão da forte preferência mitocondrial do **Splendor** e a razão pela qual as outras BTDs não foram seletivas nas células.

A proteína ANT está envolvida no processo de transporte de substratos para o interior e exterior das mitocôndrias, incluindo-se os substratos ADP/ATP. Acredita-se que para realizar essa tarefa, a ANT assuma duas conformações: (i) *cytosolic-open* em que a ADP se liga à ANT no citoplasma; (ii) *matrix-open* em que a ATP liga-se à proteína no interior da matriz das mitocôndrias. A conformação *cytosolic-open* é estabilizada pelo glicosídeo atractilosídeo (Figura 332), que interage com os sítios de ligações dos nucleotídeos encontrados no interior dos canais da proteína. A estrutura de raios-X do complexo entre a atractilosídeo e a proteína na conformação *cytosolic-open* está disponível (PDB código 1OKC) e foi utilizada como parâmetro para a realização dos cálculos.⁶⁹

Por meio do *docking molecular*, observou-se que o **Splendor** interage com a ANT de maneira análoga ao atractilosídeo (Figura 31). Os compostos testados formaram menos ligações de hidrogênio com a proteína, devido ao seu caráter mais hidrofóbico, quando comparado com a atractilosídeo. Pode ser observado na Figura 343 que a conformação e posição de interação do **Splendor** na proteína ocupa a mesma região que a parte mais hidrofóbica da atractilosídeo.

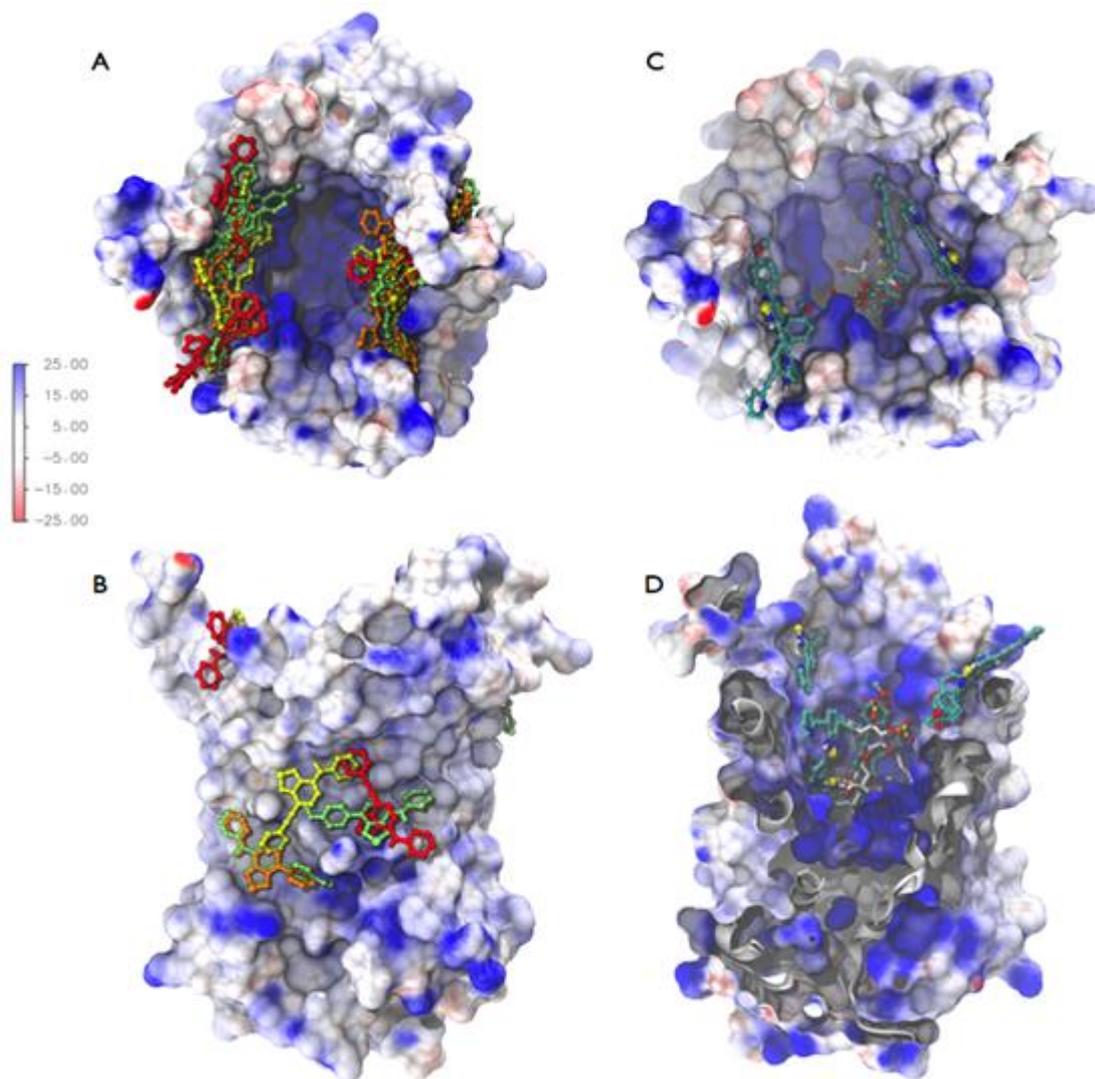


Figura 321. Conformações de menores energias para os compostos testados (A-B) **BTD1** (laranja), **BTD2** (verde), **BTD3** (vermelho), **BTD4** (amarelo) e **Splendor** (C-D). O potencial eletrostático da superfície da ANT é apresentado em azul, vermelho e branco para positivo, negativo e neutro, respectivamente. A escala para a carga da superfície é dado em $k_B T$ e vai de -25 a 25 $k_B T$.

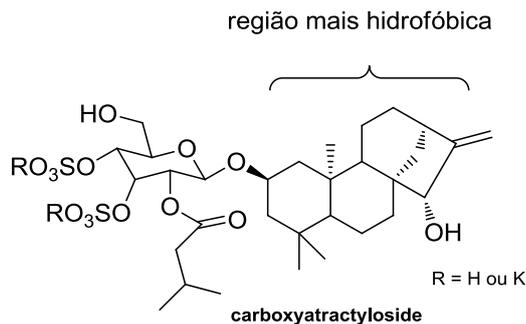


Figura 332. Estrutura da atractilósido.

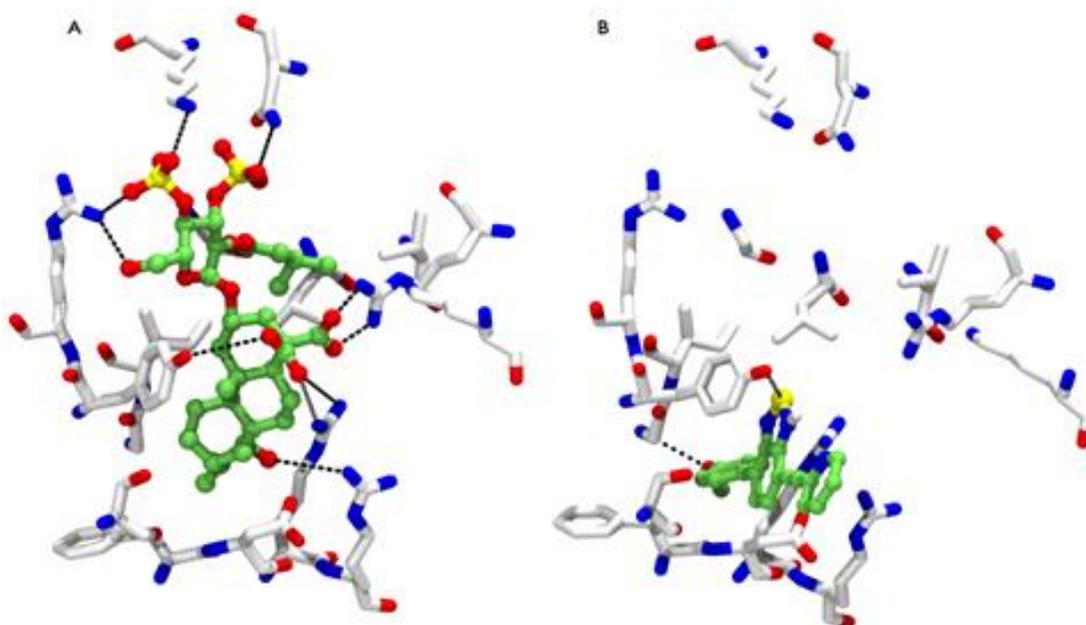


Figura 343. (A) Detalhes da interação da atractilósido (A) e a conformação de interação de menor energia para **Splendor** (B).

Os dados obtidos por meio do *docking* molecular estão de acordo com os dados obtidos experimentalmente e ajudam a explicar a alta seletividade do **Splendor** e a falta de seletividade para as **BTD1**, **BTD2**, **BTD3** e **BTD4**. O composto Splendor pode estar fixado na mitocôndria devido à sua forte interação com a ANT. Esse fato explicaria a razão da irreversibilidade da interação com a organela após os processos de lavagem e, mesmo, de fixação das células.

Capítulo 8

Conclusões e perspectivas

8- Conclusões e perspectivas

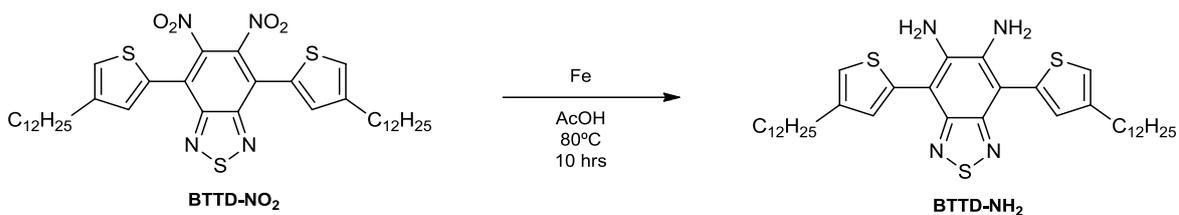
Por meio dos resultados obtidos neste trabalho pode-se caracterizar a estrutura de quatro novos compostos derivados do núcleo BTD (**BTD1**, **BTD2**, **BTD3** e **BTD4**), por meio das técnicas de RMN, IV, ESI-MS(/MS), CHN e difração de raios-X, bem como investigar suas propriedades fotofísicas e comportamento solvatocrômicos por meio de análises espectrofotométricas e espectrofluorimétricas.

Os compostos sintetizados foram testados em experimentos de imageamento celular e os resultados obtidos foram de grande importância para o planejamento da arquitetura molecular de um novo marcador. Devido aos resultados obtidos nos experimentos com as **BTD1**, **BTD2**, **BTD3** e **BTD4**, o composto **Splendor**, sintetizado anteriormente pelo grupo, também foi testado como possível marcador. Este composto apresentou excelente seletividade dentro da célula, elevada estabilidade em solução e no estado sólido. Utilizando-se **Splendor** como marcador, foi possível monitorar a distribuição de mitocôndrias durante o ciclo celular.

Os dados obtidos por *Docking* molecular estão de acordo com os resultados encontrados nos experimentos de imageamento celular. Indicam que o composto **Splendor** interage fortemente com a proteína ANT, diferentemente dos outros derivados testados que não apresentaram seletividade dentro da célula.

Com os resultados deste trabalho, ideias para novas moléculas com estruturas derivadas do composto **Splendor** surgiram, com o objetivo de se aprimorar ainda mais as propriedades espectroscópicas destes compostos. É a possibilidade de se realizar a síntese de compostos marcadores no interior da célula, por meio de reações intracelulares.

Após o início dos trabalhos do grupo com pequenas moléculas com o núcleo BTD, outros grupos de pesquisa também passaram a contribuir com o design, síntese e aplicação de novas BTDs fluorescente para estudos de imageamento celulares. Por exemplo, o grupo de Qian Jiang e colaboradores⁷⁰ sintetizou e aplicou o composto **BTTD-NO₂** (Esquema 11). Esse composto mostrou-se um potencial marcador para a detecção de células tumorais em condições de hipóxia.



Esquema 11. Redução do composto **BTDD-NO₂** (não fluorescente) para **BTDD-NH₂** (fluorescente), o qual foi utilizado em imageamento celular. Note que a nomenclatura deste esquema é a mesma usada pelos autores do trabalho original. (Adaptado da referência 52).

Ainda recentemente, outro derivado de BTDD (Figura 35) que tem em sua estrutura um grupo glicoligante foi testado em células de câncer (U937), e sua distribuição e interação com as membranas pôde ser monitorada por microscopia confocal de varredura a LASER.⁷¹

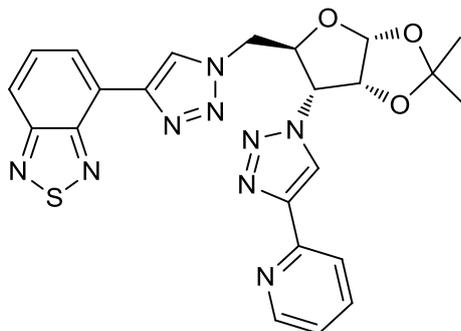


Figura 354. Derivado BTDD com um grupo glicoligante. (Estrutura exrtáida da referência 72).

Capítulo 9

Parte experimental

9.1- Equipamentos

- **^1H e ^{13}C RMN:** Os espectros de RMN foram obtidos em um espectrômetro Varian Mercury Plus de 7,05 T (300 MHz para ^1H e 76.4 MHz para ^{13}C , utilizando uma sonda de diâmetro interno de 5 mm (ATB) e como referência interna tetrametilsilano (TMS).
- **Infravermelho:** Os espectros de infravermelho foram obtidos em um equipamento Equinox 55 com transformada de Fourier da Bruker. As medidas foram realizadas utilizando-se uma célula horizontal de ATR de 7 cm de comprimento.
- **Espectrometria de Massas.** Experimentos de ESI-MS e ESI-MS/MS foram realizados no modo positivo (alcance de m/z 50-2000) em um equipamento Synapt HDMS (*high definition mass spectrometer*, Manchester, UK). Esse instrumento possui um sistema híbrido *quadrupole/ion mobility/orthogonal acceleration time-of-flight* (oa-TOF) e foi usado no modo TOF, com células de mobilidades desligadas, operando apenas como guia de íons. Todas as amostras foram dissolvidas em acetonitrila ou metanol, formando soluções de 50 μM que foram diretamente injetadas na fonte de ESI, com uma taxa de fluxo de 5 $\mu\text{L}/\text{min}$. As condições da Fonte de ESI foram: *capillary voltage* 3.0 kV, *sample cone* 30 V, *extraction cone* 3 V.
- **Difração de raios-X:** Os dados de raios-X foram obtidos em um difratômetro de cristal único Bruker CCD SMART APEX II com radiação Mo $K\alpha$ (0.71073 Å) a 293 K. Os dados foram processados com SAINT e corrigidos para absorção com SADABS. As estruturas foram resolvidas utilizando métodos diretos SHELXS-97. Mapas de Diferença Fourier forneceram as posições dos átomos, o refinamento foi realizado usando SHELXL-97. As estruturas das moléculas foram geradas com DIAMOND.
- **Pontos de fusão:** Os pontos de fusão foram medidos em um equipamento IA9000 Eletrotermal.
- **Espectrofotômetro de absorção:** Os espectros de absorção foram obtidos em um espectrofotômetro *CaryWin 50 Varian*.
- **Espectrofotômetro de Fluorescência:** Os espectros de fluorescência foram realizadas em um espectrofotômetro *Cary Eclipse Spectrophotometer*

Varian. As medidas foram realizadas a velocidade média, com alta voltagem, com slit de excitação com abertura de 5, e slit de emissão com abertura de 2,5.

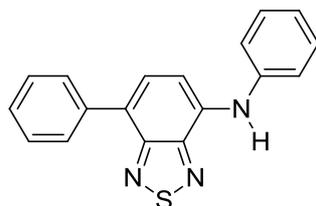
➤ **Cálculos Teóricos:** Os cálculos teóricos de todos os compostos foram realizados utilizando DFT com aproximação de *Gaussian 09 series of programs*.⁷² As otimizações das geometrias dos estados (S_0) e do primeiro estado excitado (S_1) (na fase Gasosa e em água) foram calculadas com 6-31+g(d) *Pople's split-valence basis set* e híbrido de funcional de correlação e troca utilizando CAM-B3LYP. Efetuaram-se cálculos de frequência harmônica para se verificar a veracidade do mínimo genuíno encontrado. Empregou-se as estruturas otimizadas dos estados S_0 e S_1 para os cálculos de ponto único TD-DFT, utilizando diferentes funcionais de correlação e troca (wB97XD, PBE1PBE, M062X e CAM-B3LYP) em combinação com 6-311+G(2d,p). Os espectros de absorção calculados foram obtidos com 6-311+G(2d,p) *basis set*.^{73,74} Para a inclusão dos efeitos de solventes (água) nos cálculos quânticos, foi empregada a aproximação de *self-consistent reaction field* (SCRF) com modelo de polarização contínuo (PCM) onde a molécula do soluto se encontra envolta em uma cavidade embutida em um meio dielétrico.

➤ **Docking Molecular.** As coordenadas para a proteína ANT foram obtidas da estrutura cristalográfica (PDB ID 1OKC). Os cálculos de *docking* molecular foram realizados no programa Autodock acoplado com ferramentas AutoDock Tools. Cargas atômicas e os parâmetros de Van der Waals das proteínas e dos derivados BTDs foram obtidos com AMBER *all-atom force field*. Os *grid maps* foram calculados utilizando AutoGrid. Os *Grid maps* para todos os pares de átomos e todos os tipos de átomos nas proteínas e ligantes foram calculados com dimensões de 126 x 126 x 126 pontos e um espaçador de *grid-point* de 0,250 Å. Cada par de *grid* foi sucessivamente centrado nas coordenadas cartesianas 19,314 Å 20,691 Å 29,559 Å. Os ângulos diedrais dos compostos foram consideradas como totalmente flexíveis. Os resultados obtidos foram organizados em ordem crescente de energia. As coordenadas das conformações de menor energia foram agrupadas com base em *root-mean-squared-deviation* of 2,0 Å.

➤ **Microscopia confocal de varredura a LASER:** As imagens celulares foram obtidas em microscópio confocal de varredura a LASER Leyca, modelo TCS SP5. As imagens foram adquiridas com laser operando a 25% de potência, em modo de duas varreduras por linha e com "pinhole" em abertura de 0,95 µm.

9.2- Síntese dos compostos

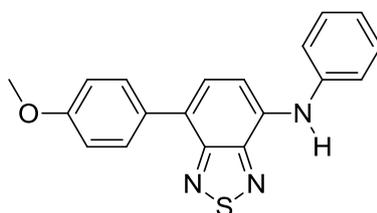
Os compostos já descritos **BTDBrBr**⁵⁷ e **BTDAP**⁴⁸ foram sintetizados utilizando metodologias publicadas previamente. O composto **BTD-PhBr** também foi sintetizado como publicado.



BTD1

7-fenil-4-(2-aminopiridina)-2,1,3-benzotiadiazola

BTD1. 60 mg (0,2 mmol) do **BTDPh** (4,7-2,1,3-benzotiadiazola) foram misturados com 78 mg (0,8 mmol) de 2-amino-piridina, 5 mol% de Pd(OAc)₂ (0,01 mmol, ca. 3 mg), 10 mol% de PPh₃ (0,02 mmol, ca. 6 mg), 93 mg (0,8 mmol) de *t*-BuOK. 5 mL de tolueno seco foram adicionados sob atmosfera inerte e aquecido a 100 °C por 48 horas. A mistura reacional foi purificada diretamente via coluna cromatográfica com 17% de rendimento. ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ ppm 8.57 (d, *J* = 10.0 Hz, 1 H), 8.39 (d, *J* = 5.0 Hz, 1 H), 7.93 (d, *J* = 6.9 Hz, 3 H), 7.74 (d, *J* = 10.0 Hz, 1H), 7.61-7.66 (m, 1H), 7.51 (m, 2 H), 7.38-7.41 (m, 1H), 7.00 (d, *J* = 15.0 Hz, 1H), 6.89 (m, 1H). ¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃) δ ppm 154,5; 153,5; 148,8; 148,0; 137,7; 137,6; 132,0; 130,2; 128,7; 128,6; 127,9; 125,5; 116,3; 111,6; 111,0. FTIR (KBr, cm⁻¹) 3367, 2931, 1715, 1600, 1535, 1482, 1423, 762, 724. Ponto de Fusão. 111-112 °C. High Resolution ESI(+)-MS(/MS) [C₁₇H₁₂N₄S + H]⁺ 305.0861, Encontrada 305.0883.



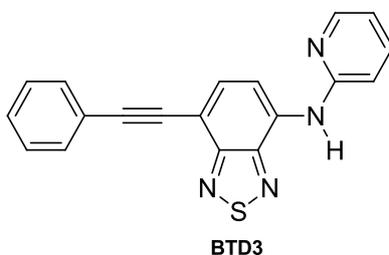
BTD2

7-(4-metoxifenil)-4-(2-aminopiridina)-
2,1,3-benzotiadiazola

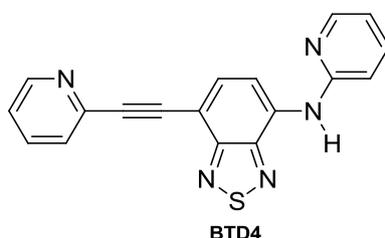
BTD2. Em um tubo Schlenk, uma mistura de 100 mg (0,3 mmol) de **BTDAP** (7-Bromo-4-(2-aminopiridina)-2,1,3-benzotiadiazola), 150 mg (1,0 mmol) do ácido 4-metoxifenil borônico, 5 mol% de Pd(OAc)₂ (0,01 mmol, ca. 4 mg), 10 mol% of

PPh₃ (0,02 mmol, ca. 8 mg), 103 mg de Na₂CO₃ de uma solução 2 M em água e 5 mL de tolueno é aquecida a 100 °C por 12 horas. A mistura reacional é purificada via coluna cromatográfica com 80% de rendimento.

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 8.51 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 8.37 (m, 1H), 7.96 (s, 1H), 7.90-7.84(m, 3H), 7.65 (d, *J* = 7.91 Hz, 1H), 7.63-7.57 (m, 1H), 7.07-7.02 (m, 2H), 6.96 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 6.88-6.84 (m, 1H), 3.87 (s, 3H). ¹³C RMN (APT, 75 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 154.5, 153.5, 148.7, 147.9, 137.5, 131.6, 131.5, 130.2, 129.8, 129.2, 125.2, 116.2, 116.1, 113.9, 112.4, 111.4, 111.2, 110.3, 55.5. FTIR (KBr, cm⁻¹) 3392, 3013, 2917, 1596, 1500, 1253, 1202, 1020, 830, 757. Ponto de Fusão. 163-165 °C. Anal Calcd. para C₁₈H₁₄N₄OS C, 64.65; H, 4.22; N, 16.75. Encontrada: C, 64.72; H, 4.31; N, 16.89.



7-(2-etinilbenzeno)-4-(2-aminopiridina)-2,1,3-benzotiadiazola



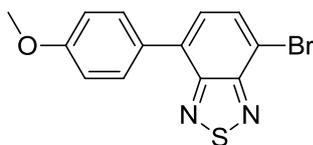
7-(2-etinilpiridina)-4-(2-aminopiridina)-2,1,3-benzotiadiazola

BTD3, BTD4. Em um tubo Schlenk, uma mistura de 307 mg (1,0 mmol) de **BTDAP**, ca. 210 μL (1,5 mmol trimetilsilacetileno), 10 mol% de PPh₃ (0,1 mmol, ca. 26 mg), 5 mol% de CuI (0,05 mmol, ca. 10 mg), 5 mol% de Pd(PPh₃)₂Cl₂ (0,05 mmol, ca. 35 mg) são diluídos em 5 mL de Et₃N seca sob atmosfera. A mistura é aquecida a 100 °C por 24 horas. Em seguida, a solução é filtrada em celite com acetato de etila. O solvente é removido, e a mistura é diluída em 25 mL de metanol com 1 g de KF, a solução é agitada por 18 horas a temperatura ambiente. A mistura reacional é cromatografada com Et₂O e o sólido obtido é imediatamente submetido

a um segundo acoplamento de Sonogashira. O sólido obtido é então tratado com 265 mg (1,3 mmol de 2-iodobenzeno) ou 265 mg (1,3 mmol de 2-bromopiridina), com 10 mol% de PPh₃ (0,1 mmol, ca. 34 mg), 5 mol% de CuI (0,06 mmol, ca. 12 mg), 5 mol% de Pd(PPh₃)₂Cl₂ (0,06 mmol, ca. 45 mg) e 5 mL de Et₃N seca. A mistura é aquecida a 60 °C por 24 horas. A mistura é purificada via coluna cromatográfica levando a obtenção de **BTD3**(40%) e **BTD4** (31%).

BTD3. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 8.42 (d, *J* = 7.9, 1H), 8.30-8.28 (m, 1H), 7.89 (s, 1H), 7.72 (d, *J* = 8.21 Hz, 1H), 7.63-7.59 (m, 2H), 7.52-7.46 (m, 1H), 7.36-7.29 (m, 3H), 6.84-6.78 (m, 2H). ¹³C RMN (APT, 75 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 154.5, 153.9, 147.8, 147.6, 137.4, 135.6, 133.0, 131.6, 128.2, 128.1, 123.2, 116.5, 111.8, 110.3, 107.1, 93.3, 85.9. FTIR (KBr, cm⁻¹) 3399, 300, 2910, 2200, 1596, 1552, 1524, 1465, 1414, 1360, 750. Ponto de Fusão. 103-105 °C. Anal Calcd. para C₁₉H₁₂N₄S C, 69.49; H, 3.68; N, 17.06. Encontrada: C, 69.33; H, 3.59; N, 16.91.

BTD4. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 8.65 (s, 1H), 8.51 (d, *J* = 6 Hz, 1H), 8.35 (d, *J* = 6 Hz, 1H), 8.03 (s, 1H), 7.86 (d, *J* = 9 Hz, 1H), 7.71-7.56 (m, 3H), 7.25-7.21 (m, 1H), 6.95 (d, *J* = 9 Hz, 1H), 6.90-6.86 (m, 1H). ¹³C RMN (APT, 75 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 154.6, 153.9, 150.0, 147.9, 147.6, 143.4, 137.6, 136.7, 136.1, 134.9, 127.2, 122.7, 116.8, 112.0, 110.2, 105.9, 92.4, 85.9. FTIR: 3385, 2917, 2209, 1582, 1538, 1480, 1428, 1370, 770. Ponto de Fusão. 168-170 °C. Anal Calcd. para C₁₈H₁₁N₅S C, 65.64; H, 3.37; N, 21.26. Encontrada: C, 65.53; H, 3.48; N, 21.37.



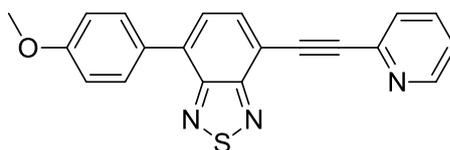
BTDOme

4-bromo-7-(4-metoxifenil)-7-2,1,3-benzotiadiazola

BTDOme. Em um tubo Schlenk 500 mg (1,0 mmol) de **BTDBrBr** (4,7-dibromo-2,1,3-benzotiadiazola), 75 mg (0,5 mmol) do ácido 4-metoxifenil borônico, 5 mol% de Pd(OAc)₂ (0,01 mmol, ca. 4 mg), 10 mol% of PPh₃ (0,02 mmol, ca. 8 mg), 103 mg de Na₂CO₃ de uma solução 2 M em água e 7 mL de tolueno é aquecida a 100 °C por 4 horas. A mistura reacional é purificada via coluna cromatográfica com 50% de rendimento.

BTDOme. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ ppm 7.9 (d, 1H, 7.7 Hz), 7.86 (d, 2H,

8.8 Hz), 7.52 (d, 1H, 7.7 Hz), 7.06 (d, 2H, 8.8 Hz), 3.88 (s, 3H). ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3 , APT) δ ppm 160.1, 153.9, 153.2, 133.6, 132.3, 130.4, 129.0, 127.4, 114.2, 112.2, 55.4.



Splendor

4-(4-metoxifenil)-7-(etinil-2-piridina)-2,1,3-benzotiadiazola

Splendor. Em um tubo Schlenk, uma mistura de 100 mg (0,3 mmol) de **BTDAP**, ca. 210 μL (1,5 mmol trimetilsilacetileno), 10 mol% de PPh_3 (0,1 mmol, ca. 26 mg), 5 mol% de CuI (0,05 mmol, ca. 10 mg), 5 mol% de $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2$ (0,05 mmol, ca. 35 mg) são diluídos em 5 mL de Et_3N seca sob atmosfera. A mistura é aquecida a 100 °C por 24 horas. Em seguida, a solução é filtrada em celite com acetato de etila. O solvente é removido, e a mistura é diluída em 25 mL de metanol com 500 mg de KF , a solução é agitada por 18 horas a temperatura ambiente. A mistura reacional é cromatografada com Et_2O e o sólido obtido é imediatamente submetido a um segundo acoplamento de Sonogashira. O sólido obtido é então tratado com 265 mg (1,3 mmol de 2-bromopiridina), com 10 mol% de PPh_3 (0,1 mmol, ca. 34 mg), 5 mol% de CuI (0,06 mmol, ca. 12 mg), 5 mol% de $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2$ (0,06 mmol, ca. 45 mg) e 5 mL de Et_3N seca. A mistura é aquecida a 60 °C por 24 horas. A mistura é purificada via coluna cromatográfica levando a obtenção de **Splendor** (30%).

Splendor. ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) δ ppm 8.69 (d, $J = 4.8$ Hz, 1H), 7.81 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 7.76 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 7.67-7.74 (m, 2H), 7.29-7.34 (m, 1H). ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3 , APT) δ ppm 154.1, 153.0, 150.2, 142.6, 136.3, 133.6, 131.9, 127.6, 123.4, 115.7, 115.6, 95.4, 83.9. FTIR (KBr, cm^{-1}) 3075, 2919, 2848, 1579, 1458, 1082. mp. 182-183 °C (literatura⁴⁹ 182 °C). Rendimento: 30%. Anal Calcd. para $\text{C}_{20}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{OS}$ C, 69.95; H, 3.82; N, 12.24. Encontrada: C, 70.08; H, 3.95; N, 12.37.

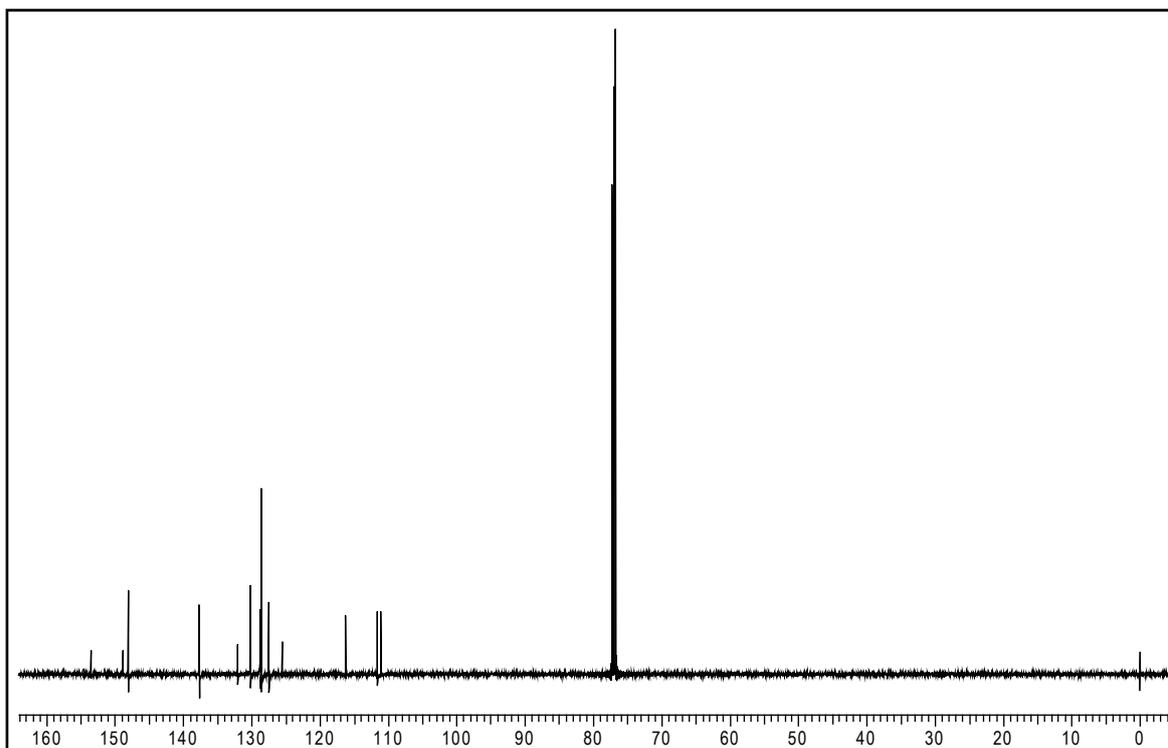
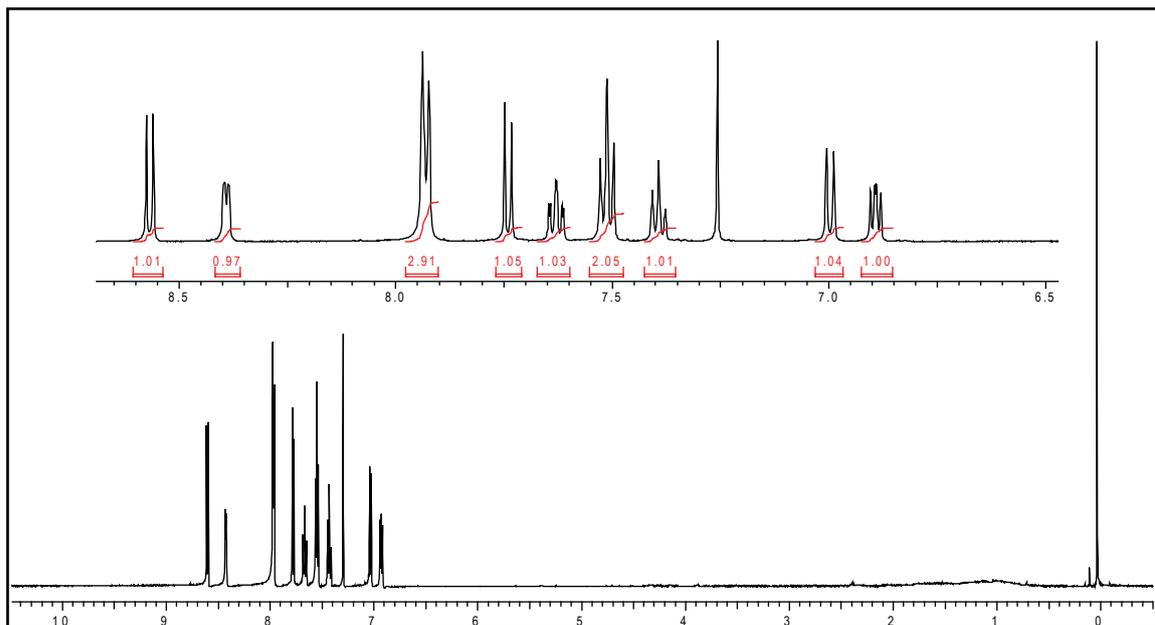


Figura S1. ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) e ^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3) da **BTD1**

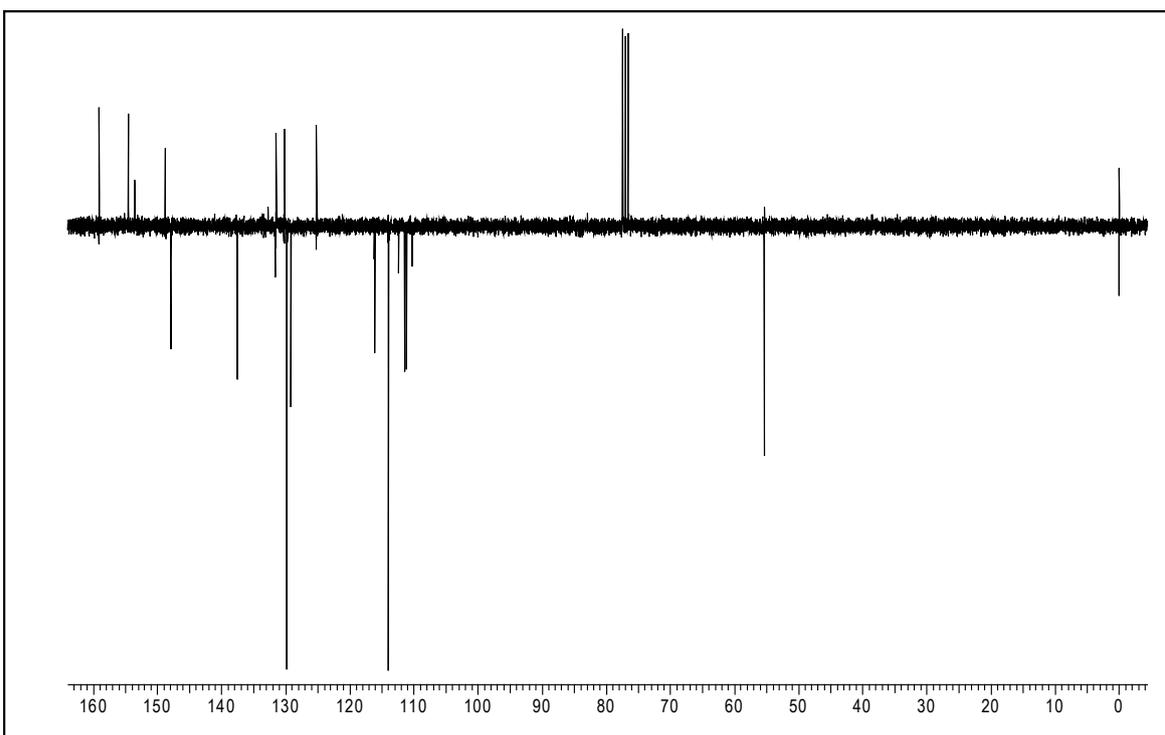
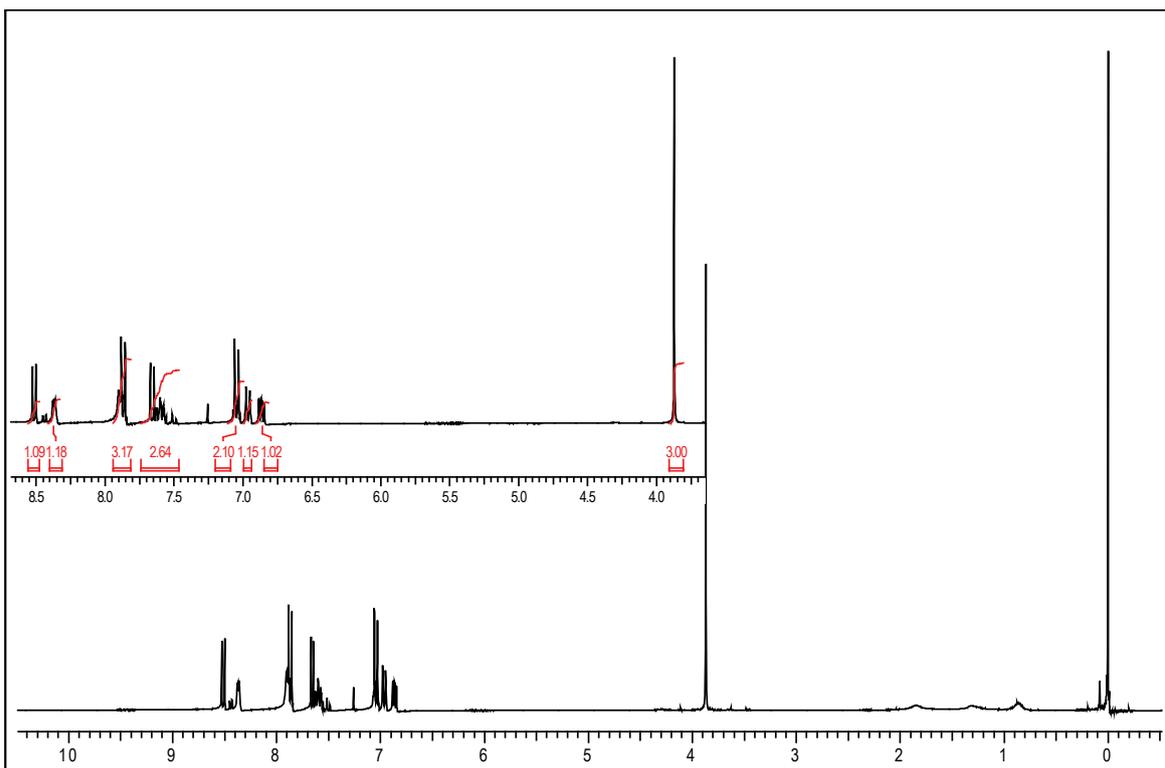


Figura S2. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) e ¹³C RMN (APT, 75 MHz, CDCl₃) da **BTD2**.

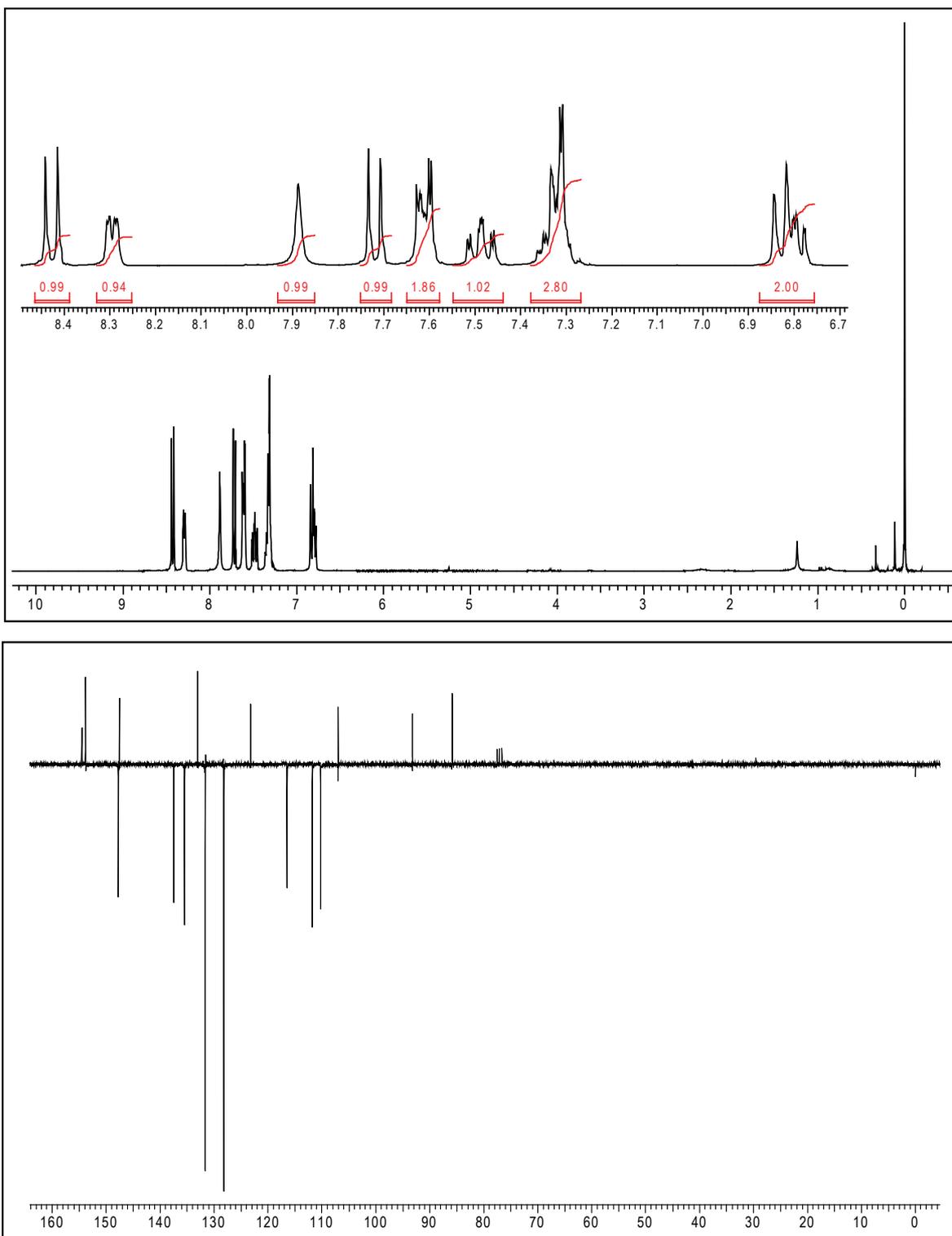


Figura S3. H RMN (300 MHz, CDCl₃) e ¹³C RMN (APT, 75 MHz, CDCl₃) da **BTD3**.

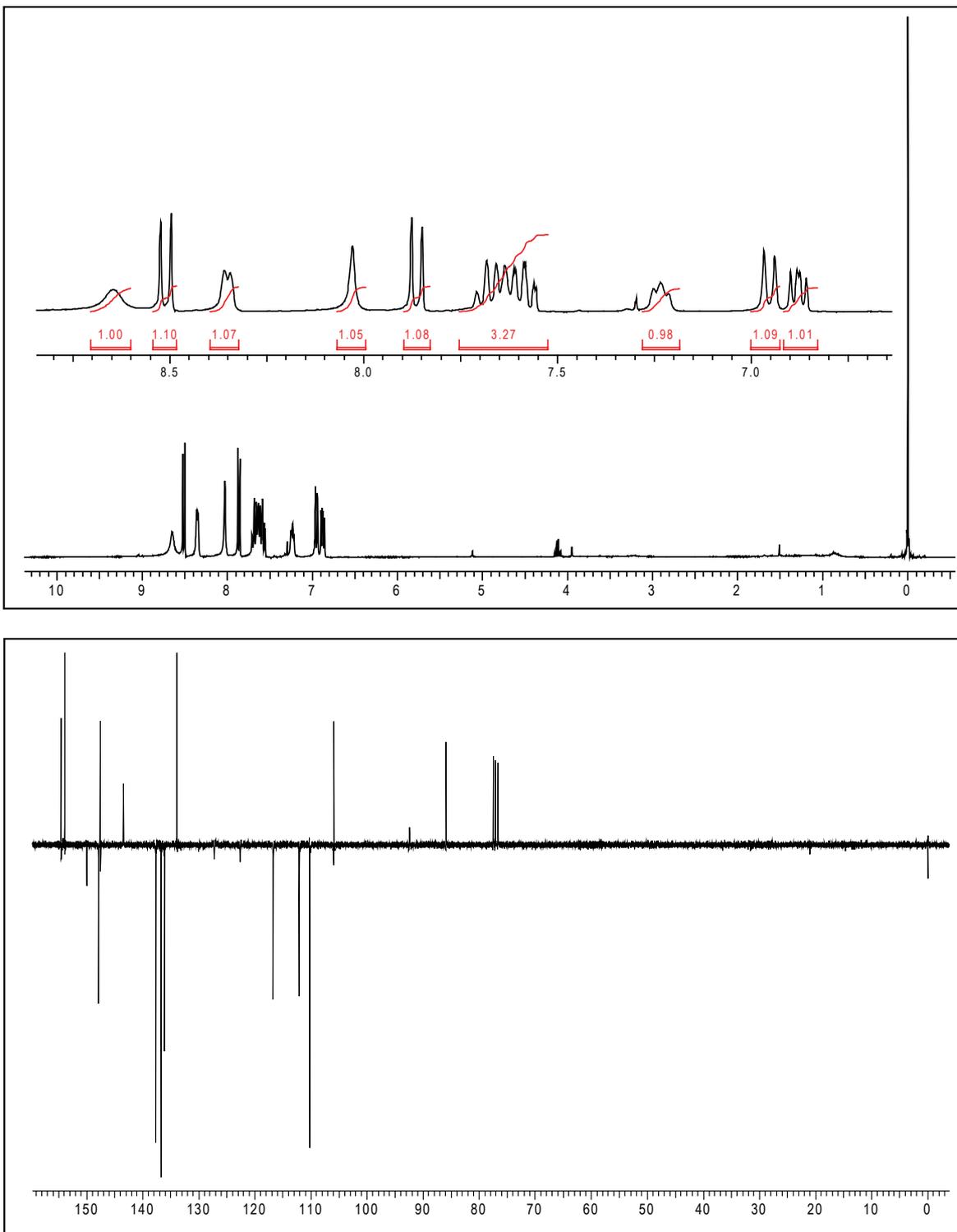


Figura S-4. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) e ¹³C RMN (APT, 75 MHz, CDCl₃) da BTD4.

Referências Bibliográficas

- (1) Karp, G. *Cell and Molecular Biology*; John Wiley & Sons: New Jersey, 2005.
- (2) Bruce Alberts, A. J., Julian Lewis, Martin Raff, Keith ROberts, Peter Walter *Molecular Biology of The Cell*; Garland Science: New York, 2002.
- (3) Nagy, Z.; Esiri, M. M.; Smith, A. D. *Acta Neuropathol.* **1997**, *93*, 294-300.
- (4) Preston-Martin, S.; Pike, M. C.; Ross, R. K.; Jones, P. A.; Henderson, B. E. *Cancer Res.* **1990**, *50*, 7415-7421.
- (5) acessado em 04/08/2014, 2014.
- (6) Douglas B. Murphy, M. W. D. *Fundamentals of Light Microscopy and Electronic Imaging*; Wiley-Blackwell: New Jersey, 2013.
- (7) Hibbs, A. R. *Confocal Microscopy for Biologists*; Springer: New York, 2004.
- (8) Diaspro, A. *Optical Fluorescence Microscopy*; Springer: Genova, 2011.
- (9) Giepmans, B. N. G.; Adams, S. R.; Ellisman, M. H.; Tsien, R. Y. *Science* **2006**, *312*, 217-224.
- (10) Fritschy, J.-M.; Härtig, W. In *eLS*; John Wiley & Sons, Ltd: 2001.
- (11) Crivat, G.; Taraska, J. W. *Trends Biotechnol.*, *30*, 8-16.
- (12) Lavis, L. D.; Raines, R. T. *ACS Chem. Biol.* **2008**, *3*, 142-155.
- (13) Czarnik, A. W. *Fluorescent CHemosensors for Ion and Molecule Recognition*; ACS: Washington, DC, 1993.
- (14) Chris D. Geddes, J. R. L. *Topics in Fluorescence SPectroscopy*; Springer: Maryland, 1991; Vol. 9.
- (15) Nicholas J. Turro, V. R., J.C. Scaiano *Modern Molecular Photochemistry of Organic Molecules*; University Science Books: California, 2010.
- (16) Douglas A. Skoog, F. J. H., Stanley R. Crouch *Princípios de Análise Instrumental*; Bookman: Porto Alegre, 2007.
- (17) Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence*; Springer: Maryland, 2010.
- (18) Chan, Y.-P.; Fan, L.; You, Q.; Chan, W.-H.; Lee, A. W. M.; Shuang, S. *Tetrahedron* **2013**, *69*, 5874-5879.
- (19) Yasuteru Urano, D. A., Yukihiko Hama, Yoshinori Koyama, Tristan Barrett, Mako Kamiya, Tetsuo Nagano, Toshiaki Watanabe, Akira Hasegawa, Peter L Choyke & Hisataka Kobayashi *Nature Medicine* **2009**, *15*, 104-109.
- (20) Ke, B.; Chen, W.; Ni, N.; Cheng, Y.; Dai, C.; Dinh, H.; Wang, B. *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 2494-2496.
- (21) Wu, Z.; Cui, J.; Qian, X. *Tetrahedron Lett.* **2013**, *54*, 2575-2578.
- (22) Lu, C.; Xu, Z.; Cui, J.; Zhang, R.; Qian, X. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 3554-3557.
- (23) Murphy, M. C.; Rasnik, I.; Cheng, W.; Lohman, T. M.; Ha, T. *Biophys. J.* **2004**, *86*, 2530-2537.
- (24) Hanson, G. T.; Hanson, B. J. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening* **2008**, *11*, 505-513.
- (25) Jane R. Stout, A. L. Y., James A. Powers. Chantal LeBlanc, Stephanie C. Ems.McClung, Claire E. Walczak *Molecular Biology of the Cell* **2011**, *22*, 3070-3080.
- (26) http://www.macroevolution.net/metaphase.html#.U4oeV_m-2Sp acessado em 31/05/2014.
- (27) Haugland, R. P.; Spence, M. T. Z.; Johnson, I. D. *The Handbook: A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies*; Molecular Probes, 2005.
- (28) Wysocki, L. M.; Lavis, L. D. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2011**, *15*, 752-759.
- (29) Wagner, B. *Molecules* **2009**, *14*, 210-237.
- (30) Loudet, A.; Burgess, K. *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 4891-4932.

- (31) Ziessel, R.; Ulrich, G.; Harriman, A. *New J. Chem.* **2007**, *31*, 496-501.
- (32) Rhee, H.-W.; Lee, S. W.; Lee, J.-S.; Chang, Y.-T.; Hong, J.-I. *ACS Combinatorial Science* **2013**, *15*, 483-490.
- (33) Katrin, H.; William, M. *Nature* **2003**, *426*, 127-128.
- (34) <http://academic.pgcc.edu> acessado em 14-05-2014.
- (35) Gogvadze, V.; Orrenius, S.; Zhivotovsky, B. *Trends in Cell Biology* **2008**, *18*, 165-173.
- (36) Schiff, M.; Loublier, S.; Coulibaly, A.; Bénit, P.; Ogier de Baulny, H.; Rustin, P. *Journal of Inherited Metabolic Disease* **2009**, *32*, 684-698.
- (37) Roberto Scatena, P. B., Bruno Giardina *Advances in Mitochondrial Medicine* New York, 2012.
- (38) Linnane, A.; Ozawa, T.; Marzuki, S.; Tanaka, M. *The Lancet* **1989**, *333*, 642-645.
- (39) Neto, B. A. D.; Correa, J. R.; Silva, R. G. *RSC Adv.* **2013**, *3*, 5291-5301.
- (40) Cottet-Rousselle, C.; Ronot, X.; Leverve, X.; Mayol, J.-F. *Cytometry Part A* **2011**, *79A*, 405-425.
- (41) Hoye, A. T.; Davoren, J. E.; Wipf, P.; Fink, M. P.; Kagan, V. E. *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 87-97.
- (42) Guo, D.; Chen, T.; Ye, D.; Xu, J.; Jiang, H.; Chen, K.; Wang, H.; Liu, H. *Org. Lett.* **2011**, *13*, 2884-2887.
- (43) Denora, N.; Laquintana, V.; Trapani, A.; Suzuki, H.; Sawada, M.; Trapani, G. *Pharm. Res.* **2011**, *28*, 2820-2832.
- (44) Xue, L.; Li, G.; Yu, C.; Jiang, H. *Chem.-Eur. J.* **2012**, *18*, 1050-1054.
- (45) Horinouchi, T.; Nakagawa, H.; Suzuki, T.; Fukuhara, K.; Miyata, N. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 2000-2002.
- (46) Neto, B. A. D.; Lapis, A. A. M.; da Silva Júnior, E. N.; Dupont, J. *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, *2013*, 228-255.
- (47) Oliveira, F. F. D.; Santos, D. C. B. D.; Lapis, A. A. M.; Corrêa, J. R.; Gomes, A. F.; Gozzo, F. C.; Moreira Jr, P. F.; de Oliveira, V. C.; Quina, F. H.; Neto, B. A. D. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 6001-6007.
- (48) Neto, B. A. D.; Carvalho, P. H. P. R.; Santos, D. C. B. D.; Gatto, C. C.; Ramos, L. M.; Vasconcelos, N. M. d.; Correa, J. R.; Costa, M. B.; de Oliveira, H. C. B.; Silva, R. G. *RSC Adv.* **2012**, *2*, 1524-1532.
- (49) Neto, B. A. D.; Lapis, A. A. M.; Mancilha, F. S.; Vasconcelos, I. B.; Thum, C.; Basso, L. A.; Santos, D. S.; Dupont, J. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 4001-4004.
- (50) D. Neto, B. A.; Corrêa, J. R.; Carvalho, P. H. P. R.; Santos, D. C. B. D.; Guido, B. C.; Gatto, C. C.; Oliveira, H. C. B. d.; Fasciotti, M.; Eberlin, M. N.; Silva Jr., E. N. d. *J. Braz. Chem. Soc.* **2012**, *23*, 770-781.
- (51) Cao, H. C., J.; Chen, Q.; He, J.; He, Q. 2009; Vol. CN101550234.
- (52) da Cruz, E. H. G.; Carvalho, P. H. P. R.; Correa, J. R.; Silva, D. A. C.; Diogo, E. B. T.; de Souza Filho, J. D.; Cavalcanti, B. C.; Pessoa, C.; de Oliveira, H. C. B.; Guido, B. C.; da Silva Filho, D. A.; Neto, B. A. D.; da Silva Junior, E. N. *New J. Chem.* **2014**, *38*, 2569-2580.
- (53) Sandanayaka, A. S. D.; Matsukawa, K.; Ishi-i, T.; Mataka, S.; Araki, Y.; Ito, O. *The Journal of Physical Chemistry B* **2004**, *108*, 19995-20004.
- (54) Dinçalp, H.; Çimen, O.; Ameri, T.; Brabec, C. J.; İçli, S. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **2014**, *128*, 197-206.
- (55) Shekhar, S.; Ryberg, P.; Hartwig, J. F.; Mathew, J. S.; Blackmond, D. G.; Strieter, E. R.; Buchwald, S. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 3584-3591.
- (56) Sonogashira, K.; Tohda, Y.; Hagihara, N. *Tetrahedron Letters* **1975**, 4467-4470.
- (57) Neto, B. A. D. Síntese de novas moléculas fotoluminescentes com conjugações π -estendidas com potencial para aplicação em sistemas OLEDs, UFRGS, 2006.

- (58) Neto, B. A. D.; Lapis, A. A. M.; Mancilha, F. S.; Batista Jr, E. L.; Netz, P. A.; Rominger, F.; Basso, L. A.; Santos, D. S.; Dupont, J. *Mol. BioSyst.* **2010**, *6*, 967-975.
- (59) Reichardt, C. *Chem. Rev.* **1994**, *94*, 2319-2358.
- (60) Laurent, A. D.; Houari, Y.; Carvalho, P. H. P. R.; Neto, B. A. D.; Jacquemin, D. *RSC Adv.* **2014**, *4*, 14189-14192.
- (61) Reichardt, C. *Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry* Weinheim, 2003.
- (62) Mataga, N.; Torihashi, Y.; Ezumi, K. *Theor. Chim. Acta* **1964**, *2*, 158-167.
- (63) Guérin, J.; Aronica, C.; Boeuf, G.; Chauvin, J.; Moreau, J.; Lemerrier, G. *J. Lumin.* **2011**, *131*, 2668-2673.
- (64) Filarowski, A.; Kluba, M.; Cieslik-Boczula, K.; Koll, A.; Kochel, A.; Pandey, L.; De Borggraeve, W. M.; Van der Auweraer, M.; Catalan, J.; Boens, N. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2010**, *9*, 996-1008.
- (65) Wang, X. *Genes Dev.* **2001**, *15*, 2922-2933.
- (66) Chen, X. *J. Hum. Mol. Genet.* **2002**, *11*, 1835-1843.
- (67) Soares, T. A.; Goodsell, D. S.; Ferreira, R.; Olson, A. J.; Briggs, J. M. *Journal of Molecular Recognition* **2000**, *13*, 146-156.
- (68) Soares, T. A.; Goodsell, D. S.; Briggs, J. M.; Ferreira, R.; Olson, A. J. *Biopolymers* **1999**, *50*, 319-328.
- (69) Pebay-Peyroula, E. D.-G., C.; Kahn, R.; Treze-; guet, V. L., G. J. M.; Brandolin, R. *Nature* **2003**, *426*, 39-44.
- (70) Jiang, Q.; Zhang, Z.; Lu, J.; Huang, Y.; Lu, Z.; Tan, Y.; Jiang, Q. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 7735-7741.
- (71) Garcia, L.; Lazzaretti, M.; Diguët, A.; Mussi, F.; Bisceglie, F.; Xie, J.; Pelosi, G.; Buschini, A.; Baigl, D.; Policar, C. *New J. Chem.* **2013**, *37*, 3030-3034.
- (72) Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Mennucci, B.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Caricato, M.; Li, X.; Hratchian, H. P.; Izmaylov, A. F.; Bloino, J.; Zheng, G.; Sonnenberg, J. L.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Vreven, T.; Montgomery, J. A.; Peralta, J. E.; Ogliaro, F.; Bearpark, M.; Heyd, J. J.; Brothers, E.; Kudin, K. N.; Staroverov, V. N.; Kobayashi, R.; Normand, J.; Raghavachari, K.; Rendell, A.; Burant, J. C.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Cossi, M.; Rega, N.; Millam, J. M.; Klene, M.; Knox, J. E.; Cross, J. B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Martin, R. L.; Morokuma, K.; Zakrzewski, V. G.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Farkas, Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cioslowski, J.; Fox, D. J. Wallingford CT, 2009.
- (73) Fonseca, T. L.; de Oliveira, H. C. B.; Castro, M. A. *Chem. Phys. Lett.* **2008**, *457*, 119-123.
- (74) Marana, N. L.; Longo, V. M.; Longo, E.; Martins, J. B. L.; Sambrano, J. R. *J. Phys. Chem. A* **2008**, *112*, 8958-8963.