



**UnB**

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

**TESE DE DOUTORADO**

**Design Racional de Híbridos Fluorescentes de Cumarinas para  
Aplicação em Bioimageamento**

Saulo de Tarso Alves dos Passos

Orientador: Dr. Wender Alves da Silva  
Coorientador: Dr. Brenno Amaro da Silveira Neto

**Brasília, DF**

2021



**UnB**

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

**TESE DE DOUTORADO**

**Design Racional de Híbridos Fluorescentes de Cumarinas para  
Aplicação em Bioimageamento**

Tese apresentada como requisito parcial para  
obtenção do título de Doutor em Química.

Saulo de Tarso Alves dos Passos

Orientador: Dr. Wender Alves da Silva

Coorientador: Dr. Brenno Amaro da Silveira Neto

**Brasília, DF**

2021



O problema são problemas demais  
Se não correr atrás da maneira  
certa de solucionar

Lembro quase tudo que sei  
E organizando as ideias  
Lembro que esqueci de tudo  
Mas eu escuto o samba

E você samba de que lado, de que  
lado você samba  
Você samba de que lado, de que  
lado você samba  
De que lado, de que lado, de que  
lado, de que lado você vai  
sambar?

Trecho da música Samba de Lado de  
Chico Science e Nação Zumbi



## Lista de Publicações durante o período de doutorado.

### Publicação relacionada a tese

- (1) Saulo T.A. Passos, Gisele C. Souza, Douglas C. Brandão, Daniel F.S. Machado, Cesar K. Grisolia, Jose R. Correa, Wender A. da Silva and Brenno A.D. Neto. Plasma membrane staining with fluorescent hybrid benzothiadiazole and coumarin derivatives: Tuning the cellular selection by molecular design, *Dyes Pigm.*, **186**, **2021**, 109005.

### Demais publicações realizadas no período de doutorado

- (2) Gabriela H. C. Oliveira, Luciana M. Ramos, Raíssa K. C. de Paiva, Saulo T. A. Passos, Marina M. Simões, Fabricio Machado, José R. Correa and Brenno A. D. Neto. Synthetic enzyme-catalyzed multicomponent reaction for Isoxazol-5(4*H*)-one Syntheses, their properties and biological application; why should one study mechanisms? *Org. Biomol. Chem.*, **2021**, *19*, 1514.
- (3) Elon F. Freitas, Roberto Y. Souza, Saulo T. A. Passos, José A. Dias, Silvia C. L. Dias and Brenno A. D. Neto. Tuning the Biginelli reaction mechanism by the ionic liquid effect: the combined role of supported heteropolyacid derivatives and acidic strength *RSC Adv.*, **2019**, *9*, 27125.
- (4) Saulo T. A. Passos, José R. Correa, Samira L. M. Soares, Wender A. da Silva and Brenno A. D. Neto. Fluorescent Peptoids as Selective Live Cell Imaging Probes. *J. Org. Chem.* **2016**, *6*, 2646

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha avó Alda, por toda sua sabedoria, pelos conselhos e ensinamentos. Agradeço por ela ser a melhor pessoa que conheço. Obrigado por existir e ser parte fundamental da minha vida. À minha mãe Magdalena por ser meu porto seguro, pelo carinho nos momentos mais, difíceis e pelo amor/apoio incondicional. Ao meu pai Saulo, por sempre estar disposto a ajudar, por sempre me fazer acreditar na minha capacidade sempre tentando me ensinar o caminho correto. Ao meu irmão João por sempre me apoiar nos momentos difíceis que com certeza me fez uma pessoa melhor. Ao Matias, pela força, pelas lições de vida e ensinamentos

Aos meus amigos e orientadores Dr. Wender Silva e Dr. Brenno Neto, pelos ensinamentos, orientação, desenvolvimento do meu senso crítico e sobretudo amizade nestes últimos quatro anos de doutorado. Sei que ainda tenho muito caminho a percorrer nesta jornada longa e difícil que é ser pesquisador no Brasil (principalmente nos dias de hoje), mas com certeza vocês são peças fundamentais para o meu desenvolvimento como pesquisador.

Aos professores Dr. José Raimundo Corrêa, Dr. Daniel Scalabrini e Dr. César Grisolia pelos estudos de imageamento celular, cálculos teóricos e ensaios de *Zebrafish*, respectivamente.

Aos amigos de laboratório: Tatá, Cadu, Felipe, Flávia, Marcos, Michele, Yuri, Lucília e Thiago, Haline, Gisele e Alberto pela longa parceria e troca de ideias. Aos meus amigos de química: Arilson, Daniel, Flávio, Matheus, Ítalo, João, Jorge, Pedro, Ricardo, Thiago, Vinícius, Ieri, Matheus Braga, Nathan, Pedro Pimenta, Pedro Tavares Eduardo, Rafael Marques, Rafael Vian, Vinícius, Paulo, Eduardo e Gabriel, por esses doze anos de apoio e amizade. Aos meus amigos de D3/ensino médio: André, Arthur, Daniel, Emanuel, Henrique, João Pedro, João Rafael, Lucas, Lucas Resende, Marcos, Matheus, Matheus Melo, Phellipe, Renato Gomide e Victor André, pelo incentivo em sempre continuar e pelos intermináveis papos no nosso amado Jungle Bar.

Aos técnicos da CAIQ (central analítica do Instituto de Química) pela realização das análises.

Aos membros da banca examinadora Dr. Guilherme Brand, Dr. Giovanni Amarante, Dr. Fábio Gozzo e Dr. Alberto Mota por aceitarem o convite.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001

## RESUMO

A partir de um design racional molecular foi possível a preparação de várias estruturas fluorescentes com alta aplicabilidade em diversas áreas da química biológica, sendo utilizadas principalmente em estudos de imageamento celular. Na respectiva tese de doutorado, foram sintetizados e caracterizados, por diversas técnicas espectroscópicas e espectrométricas, oito exemplos de derivados de cumarinas inéditas. Após a caracterização dos produtos, realizou-se análises fotofísicas completas dos oito produtos, com o objetivo de elucidar o comportamento destas moléculas no estado excitado concluindo que todas as estruturas analisadas se provaram emissores estáveis. Cálculos de deslocamento de Stokes, rendimento quântico e lipofilicidade foram essenciais para se obter informações fotofísicas importantes e para a continuação dos estudos. Algumas destas estruturas apresentaram altos deslocamentos de Stokes (maiores que 100 nm) e altos valores de rendimento quântico, características fundamentais para aplicação em imageamento celular. Estudos teóricos foram realizados para comprovar o comportamento de estabilização no estado excitado de duas estruturas, destacando a molécula (**BTD-NH-Cum**), que apresentou uma alta estabilização por ICT e a molécula (**Cum-NH-BTD**) que se pode comprovar um mecanismo de estabilização local, apenas estabilizado pelo núcleo da cumarina. Estudos de viabilidade célula forma importantes para prever efeitos deletérios nas linhagens celulares estudadas, ambas as sondas tiveram uma viabilidade celular acima de 80%. Também foram realizados estudos quantitativos de intensidade de fluorescência e concluiu-se que o produto **Cum-NH-BTD** tem uma grande intensidade no canal azul ao passo que a **BTD-NH-Cum** tem uma fluorescência predominante no canal verde. Os compostos foram testados como sondas fluorescentes em estudos de imageamento celular, ambos os produtos apresentaram excelente fotoestabilidade (tanto em solução quanto em culturas celulares), sendo inclusive mais estável que a própria sonda comercial **CellMask** e uma enorme seletividade na membrana plasmática de todas as cinco linhagens celulares testadas (tanto em células vivas quanto em células fixada). Finalmente as sondas fluorescentes embriões de Zebrafish foram usados como modelos complexos para estudos de bioimageamento. Estes embriões foram seletivamente marcados na parte cerebral e na região dos sômitos (ricos em estruturas lipofílicas), indicando assim as vantagens das sondas em nível multicelular em comparação ao marcador comercial.

Palavras-chave: Sondas fluorescentes, Estudos de Imageamento celular, Membrana Plasmática, Cumarinas, Benzotiadiazolas.

## **ABSTRACT**

From a rational molecular design, it was possible to prepare several fluorescent structures with high applicability in several areas of biological chemistry, used mainly in cell imaging studies. In the respective doctoral thesis, eight examples of unpublished coumarin derivatives were synthesized and characterized by various spectroscopic and spectrometric techniques. After the characterization of the products, photophysical analyzes of the eight products were carried out in order to elucidate the behavior of these molecules in the excited state, concluding that all analyzed structures proved to be stable emitters. Stokes shift, quantum yield and lipophilicity calculations were essential to obtain important photophysical data. Some of these structures presented high Stokes shift (greater than 100 nm) and high quantum yield, essential characteristics for application in cell imaging. Theoretical studies were carried out to prove the mechanism of stabilization in the excited state. The molecule (**BTD-NH-Cum**) showed a high stabilization by ICT, and the molecule (**Cum-NH-BTD**) showed a local stabilization mechanism, only stabilized by the coumarin moiety. Cell viability studies were important to predict deleterious effects in the studied cell lines, both probes had a cell viability above 80%. Quantitative fluorescence intensity studies were also performed and it was concluded that the **Cum-NH-BTD** has a high intensity in the blue channel whereas **BTD-NH-Cum** has a predominant fluorescence in the green channel. The compounds were tested as fluorescent probes in cell imaging studies, both products showed excellent photostability (both in solution and in cell cultures), being even more stable than the commercial probe **CellMask** and an enormous selectivity in the plasma membrane of all five cell lines tested (in both live and fixed cells). Finally the Zebrafish embryo fluorescent probes were used as complex models for bioimaging studies. These embryos were selectively marked in the brain part and in the region of the somites (rich in lipophilic structures), thus indicating the advantages of the probes at the multicellular level compared to the commercial marker

Keywords: Fluorescents probes, Cellular imaging studies, Plasmatic Membrane, Coumarin, Benzothiadiazoles.

# SUMÁRIO

Lista de Publicações durante o período de doutorado.....	iv
<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	v
<b>RESUMO</b> .....	vi
<b>ABSTRACT</b> .....	vii
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	ix
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	xiv
<b>LISTA DE SÍMBOLOS, NOMENCLATURAS E ABREVIACÕES.</b> .....	xv
<b>LISTA DE ANEXOS</b> .....	xvi
<b>1. Introdução e Revisão Bibliográfica.</b> .....	1
1.1. Fotoluminescência e suas aplicações em bioimageamento.....	1
1.2. Moléculas Orgânicas Fluorescentes.....	6
1.3. Cumarinas.....	9
1.4. Benzotiadiazolas.....	21
<b>2. Objetivos</b> .....	26
2.1. Gerais.....	26
2.2. Específicos.....	26
<b>3. Resultados e Discussão</b> .....	27
3.1. Síntese de Derivados de Cumarinas Fluorescentes.....	28
3.2. Análise Fotofísica.....	48
3.3. Cálculos Teóricos.....	56
3.4. Imageamento Celular.....	61
<b>4. Conclusões e Perspectivas</b> .....	72
<b>5. Materiais e Métodos</b> .....	74
<b>6. Referências Bibliográficas</b> .....	84
<b>7. Anexos</b> .....	89

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Transições eletrônicas do fenômeno da fluorescência (esquerda) e fosforescência (direita). .....	1
<b>Figura 2.</b> Célula sem contraste (esquerda) e célula com multimarcações (direita) em organelas celulares usando marcadores comerciais disponíveis. Imagem feita pelo aplicativo <i>Cell Staining Tool</i> . <sup>8</sup> .....	4
<b>Figura 3.</b> Exemplos de marcadores comerciais já estabelecidos no mercado e seus núcleos fluorescentes. ....	5
<b>Figura 4.</b> Exemplos recentes de sondas fluorescentes aplicadas em imageamento celular. <sup>33-38</sup> .....	8
<b>Figura 5.</b> Estrutura da warfarina e cumarina. Estrutura do heterociclo cumarina destacado em vermelho. ....	9
<b>Figura 6.</b> Estruturas dos antibióticos Novobiocina, Clorobiocina e Coumermicina. <sup>47</sup> .....	10
<b>Figura 7.</b> Derivados de cumarina mais efetivos para inibição do vírus Chicungunha. <sup>50</sup> .....	10
<b>Figura 8.</b> Derivados de cumarina (destacadas em azul) biologicamente ativas publicadas recentemente. <sup>51-56</sup> .....	11
<b>Figura 9.</b> Comparação entre aquecimento convencional e irradiação por micro-ondas. <sup>66,67</sup> ....	14
<b>Figura 10.</b> Efeito da substituição no rendimento quântico dos derivados de cumarinas. <sup>68</sup> .....	15
<b>Figura 11.</b> Isomerização da ligação C=N no estado excitado de derivados de cumarina e espectros de absorção (a) e emissão (b) dos derivados na presença de Zn. <sup>70</sup> Adaptado com permissão de (Wu, J.-S.; Liu, W.-M.; Zhuang, X.-Q.; Wang, F.; Wang, P.-F.; Tao, S.-L.; Zhang, X.-H.; Wu, S.-K.; Lee, S.-T. <i>Org. Lett.</i> 2007, 9, 33) da American Chemical Society (2007). ....	16
<b>Figura 12.</b> Derivado de cumarina na ausência e presença de Cu <sup>2+</sup> . Orbitais de fronteira relevantes da estrutura (89) para supressão de fluorescência. Espectros de absorção (a) e emissão (b) dos derivados na presença de várias concentrações de Cu <sup>2+</sup> . Bioimageamento do composto fluorescente (a) campo claro de células LLC-MK2 (b) 5 µM de Cu <sup>2+</sup> (c) 25 µM de Cu <sup>2+</sup> (d) 50 µM de Cu <sup>2+</sup> (e) 100 µM de Cu <sup>2+</sup> (f) Adição de 500 µM EDTA para o sequestro de Cu <sup>2+</sup> e o retorno da intensidade de fluorescência. Adaptado com permissão de (Jung, H. S.; Kwon, P. S.; Lee, J. W.; Kim, J. I.; Hong, C. S.; Kim, J. W.; Yan, S.; Lee, J. Y.; Lee, J. H.; Joo, T.; Kim, J. S. <i>J. Am. Chem. Soc.</i> 2009, 131, 2008) da American Chemical Society (2009). ....	17
<b>Figura 13.</b> Rendimentos e rendimentos quânticos de peptóides cumarínicos fluorescentes. <sup>72</sup> 18	
<b>Figura 14.</b> Perfil de fluorescência de células MCF-7 incubadas com o peptóide <b>(93)</b> (10 nM, emissão azul). (I) As <b>Figuras A e C</b> mostram amostras de células vivas e fixas, respectivamente. A <b>Figuras B e D</b> mostram os aspectos morfológicos normais das amostras por microscopia de contraste de fase. As setas amarelas mostram o padrão de coloração fluorescente (azul), que foi concentrado em uma região celular restrita perto dos núcleos das células, ou seja, concentrado na mitocôndria. (II) Perfis fluorescentes de células MCF-7 incubadas com peptóide <b>(93)</b> e <b>MitoTracker Red</b> . As <b>Figuras A e C</b> mostram padrões de fluorescência de células incubadas com peptóide <b>(93)</b> e <b>MitoTracker Red</b> , respectivamente. As setas amarelas indicam a região de	

acumulação de citoplasma das mesmas células para ambos os marcadores. (D) Imagem produzido pela sobreposição (roxa) das imagens de fluorescência azul (**93**) e vermelha (**MitoTracker Red**) das Figuras A e C para comprovar o acúmulo de (**93**) nas mitocôndrias. (B) Aspectos morfológicos das amostras por microscopia de contraste de fase. Barra de escala de referência de 25 µm. <sup>72</sup> Adaptado com permissão de (Passos, S. T. A.; Correa, J. R.; Soares, S. L. M.; da Silva, W. A.; Neto, B. A. D. *J. Org. Chem.* 2016, *81*, 2646) da American Chemical Society (2016). ..... 19

**Figura 15.** Emissões de fluorescência (**93**) e **MitoTracker Red** após fotobranqueamento. Os retângulos amarelos são as regiões de interesse (ROI) analisadas. <sup>72</sup> Adaptado com permissão de (Passos, S. T. A.; Correa, J. R.; Soares, S. L. M.; da Silva, W. A.; Neto, B. A. D. *J. Org. Chem.* 2016, *81*, 2646) da American Chemical Society (2016). ..... 20

**Figura 16.** Exemplos de híbridos de BTD fluorescentes com aplicações em bioimageamento. <sup>81-87</sup> ..... 25

**Figura 17.** Espectro de <sup>1</sup>H RMN 600 MHz (CDCl<sub>3</sub>) da cumarina (**132**). ..... 30

**Figura 18.** Espectro de <sup>13</sup>C RMN 150 MHz (CDCl<sub>3</sub>) cumarina (**132**). ..... 30

**Figura 19.** <sup>1</sup>H RMN 600MHz (CDCl<sub>3</sub>) da **Cum-NH-BTD**. ..... 34

**Figura 20.** <sup>13</sup>C RMN 150 MHz (CDCl<sub>3</sub>) da **Cum-NH-BTD**. ..... 34

**Figura 21.** <sup>1</sup>H RMN 600MHz (CDCl<sub>3</sub>) da **Cum-NH-HOBT**. ..... 36

**Figura 22.** <sup>13</sup>C RMN 150MHz (CDCl<sub>3</sub>) do composto **Cum-NH-HOBT**. ..... 37

**Figura 23.** Comparação entre os sinais de <sup>1</sup>H RMN dos produtos de Lakshman e do produto **Cum-NH-HOBT**. <sup>93</sup> ..... 38

**Figura 24.** <sup>1</sup>H RMN 600MHz (CDCl<sub>3</sub>) da **Cum-NH-TRIP**. ..... 39

**Figura 25.** <sup>13</sup>C RMN 150MHz (CDCl<sub>3</sub>) da **Cum-NH-TRIP**. ..... 39

**Figura 26.** <sup>1</sup>H RMN 300 MHz (CDCl<sub>3</sub>) do produto **BTD-NH-Cum**. ..... 41

**Figura 27.** <sup>13</sup>C RMN 75 MHz (CDCl<sub>3</sub>) do produto **BTD-NH-Cum**. ..... 41

**Figura 28.** <sup>1</sup>H RMN 600 MHz (CDCl<sub>3</sub>) do produto **Cum-O-Naftol**. ..... 42

**Figura 29.** <sup>13</sup>C RMN 150 MHz (CDCl<sub>3</sub>) do produto **Cum-O-Naftol**. ..... 42

**Figura 30.** <sup>1</sup>H RMN 600 MHz (CDCl<sub>3</sub>) do produto **Cum-NH-Naftil**. ..... 43

**Figura 31.** <sup>13</sup>C RMN 150 MHz (CDCl<sub>3</sub>) do produto **Cum-NH-Naftil**. ..... 43

**Figura 32.** <sup>1</sup>H RMN 600 MHz (CDCl<sub>3</sub>) do produto **Cum-NH-Piperonil**. ..... 44

**Figura 33.** <sup>13</sup>C RMN 150 MHz (CDCl<sub>3</sub>) do produto **Cum-NH-Piperonil**. ..... 44

**Figura 34.** <sup>1</sup>H RMN 600 MHz (CDCl<sub>3</sub>) do produto **Cum-NH-Bifenil**. ..... 45

**Figura 35.** <sup>13</sup>C RMN 150 MHz (CDCl<sub>3</sub>) do produto **Cum-NH-Bifenil**. ..... 45

**Figura 36.** Espectros de absorção (esquerda) e de emissão (direita) dos produtos **Cum-NH-BTD** e **BTD-NH-Cum**. Experimentos realizados com concentrações de 10 µM para todas as medidas. .... 50

**Figura 37.** Espectros de absorção (esquerda) e emissão (direita) dos produtos **Cum-NH-Bifenil**, **Cum-NH-HOBT**, **Cum-NH-Naftil**, **Cum-NH-Naftol** (de cima para baixo). Experimentos realizados com concentrações de 10 µM para todas as medidas. .... 51

<b>Figura 38.</b> Espectros de absorção (esquerda) e emissão (direita) dos produtos <b>Cum-NH-Piperonil e Cum-NH-Triptamina</b> . Todas as análises foram realizadas em 10 µM de cada moléculas nos seus respectivos solventes. ....	52
<b>Figura 39.</b> Gráficos de efeitos solvatocrômicos de Reichardt para <b>Cum-NH-BTD</b> (acima e a esquerda) e <b>BTD-NH-Cum</b> (acima e a direita) e para as demais moléculas sintetizadas (abaixo). ....	53
<b>Figura 40.</b> Emissão de fluorescência em função da variação de pH do produto <b>Cum-NH-BTD</b> . As análises foram realizadas em uma concentração de 10 µM. ....	54
<b>Figura 41.</b> Emissão de fluorescência em função da variação de concentração de SDS do produto <b>Cum-NH-BTD</b> e <b>BTD-NH-Cum</b> . As análises foram realizadas em uma concentração de 10 µM. ....	55
<b>Figura 42.</b> Erros médios absolutos em várias funções de densidades comparando as posições máximas teóricas e experimentais em diferentes solventes. O comprimento de onda máximo corresponde à maior banda de comprimento de onda associadas às transições $S_0 \rightarrow S_1$ . ....	56
<b>Figura 43.</b> Espectros de absorção e emissão teóricos e experimentais ampliados com uma gaussiana de 3000 $\text{cm}^{-1}$ centrada em osciladores verticais dos produtos <b>Cum-NH-BTD</b> e <b>BTD-NH-Cum</b> em acetonitrila. Os cálculos foram realizados em com TD-DFT empregando 6-311 + G(2d,p). As geometrias $S_0$ e $S_1$ foram otimizadas em CAM-B3LYP/6-311 +G(d). ....	57
<b>Figura 44.</b> (A) Estruturas otimizadas em acetonitrila (IEF-PCM) da <b>BTD-NH-Cum</b> (direita) e da <b>Cum-NH-BTD</b> (esquerda). (B) Espectros de absorção obtidos a partir de cálculos DFT. Os comprimentos de onda de absorção (azul) e emissão (vermelho) foram calculados em o M06/6-311 + G(2d,p) // CAM-B3LYP/6-311 + G(d) e LC-BLYP/6-311 + G(2d,p) // CAM-B3LYP/6-311 + G(d) para <b>Cum-NH-BTD</b> e <b>BTD-NH-Cum</b> respectivamente, mostrando comprimentos de ligação selecionados (em Å, ligações duplas e hidrogênios foram omitidos para maior clareza). ....	58
<b>Figura 45.</b> Orbitais moleculares da <b>BTD-NH-Cum</b> (obtida pela densidade M06/6-311+G(2d,p)//CAM-B3LYP/6-311+G(d)) e <b>Cum-NH-BTD</b> (obtida pela densidade LC-BLYP/6-311+G(2d,p)//CAM-B3LYP/6-311+G(d)) associada com os maiores comprimentos de onda. (B) Diferenças de densidade eletrônicas entre o estado fundamental $S_0$ e $S_1$ dos dois fluoróforos. ....	59
<b>Figura 46.</b> Orbitais de transições naturais (NTO) da transição $S_0 \rightarrow S_1$ para <b>Cum-NH-BTD</b> pela densidade LC-BLYP/6-311+G(2d,p). ....	59
<b>Figura 47.</b> Representação da membrana plasmática. ....	61
<b>Figura 48.</b> Viabilidade celular das linhagens MDAMB-231, MCF-7, Caco-2, T47D e HUVEC, incubadas nas concentrações utilizadas para diluições (100 µM, 10 µM e 1µM) dos compostos <b>Cum-NH-BTD</b> (esquerda) e <b>BTD-NH-Cum</b> (direita), no período de 24 horas. ....	62
<b>Figura 49.</b> Gráficos adquiridos pela citometria de fluxo de <b>Cum-NH-BTD</b> (esquerda) e <b>BTD-NH-Cum</b> (direita) para a quantificação de fluorescência dos fluoróforos (10 µM) em 30 min de análise. As análises se referem a 10 mil eventos por canal usando os padrões Amycian (canal verde) e Pacific Blue (azul). ....	63
<b>Figura 50.</b> Fotoestabilidade de <b>Cum-NH-BTD</b> (esquerda) e <b>BTD-NH-Cum</b> (direita). Acima a fotoestabilidade dos produtos adquiridos à temperatura ambiente por excitação em seus	



máximos de absorção enquanto é monitorado os máximos de emissão. A dependência do tempo da intensidade da fotoluminescência foi realizada com uma lâmpada Xe (400 W). Abaixo a emissão de fluorescência no interior das cinco linhagens celulares. Em amarelo a solução de PBS sem os produtos, vermelho é referido como células vivas (exceto para a medição dos gráficos de solução, que é uma solução de PBS contendo corante) e azul é referido como células fixas. .... 64

**Figura 51.** Perfil de fluorescência em cinco linhagens celulares vivas diferentes incubadas com **Cum-NH-BTD** (1  $\mu$ M). Coluna de esquerda para direita: (esquerda) aspectos morfológicos normais da célula. (Centro) emissão no canal azul e (direita) emissão no canal verde. Escala 10  $\mu$ m..... 65

**Figura 52.** Perfil de fluorescência em cinco linhagens celulares vivas diferentes incubadas com **BTD-NH-Cum** (1  $\mu$ M). Coluna de esquerda para direita: (esquerda) aspectos morfológicos normais da célula. (Centro) emissão no canal azul e (direita) emissão no canal verde. Escala 10  $\mu$ m..... 66

**Figura 53.** Perfil de fluorescência em cinco linhagens celulares pré-fixadas diferentes incubadas com **BTD-NH-Cum** (1  $\mu$ M). Coluna de esquerda para direita: (esquerda) aspectos morfológicos normais da célula. (Centro) emissão no canal azul e (direita) emissão no canal verde. Escala 10  $\mu$ m..... 67

**Figura 54.** Perfil de fluorescência em cinco linhagens celulares pré-fixadas diferentes incubadas com **Cum-NH-BTD** (1  $\mu$ M). Coluna de esquerda para direita: (esquerda) aspectos morfológicos normais da célula. (Centro) emissão no canal azul e (direita) emissão no canal verde. Escala 10  $\mu$ m..... 68

**Figura 55.** Marcação com células MCF-7. Da esquerda para direita: aspectos morfológicos normais das amostras. Marcação intracelular com iodeto de propídio (vermelho), sinal fluorescente das células incubadas com **Cum-NH-BTD** (azul), sinal fluorescente das células incubadas com **BTD-NH-Cum** (verde) e a sobreposição das imagens dos sinais de fluorescência de PI e dos fluoróforos. Escala 10  $\mu$ m. .... 69

**Figura 56.** Co-marcção em células MCF-7. Da esquerda para direita: aspectos morfológicos normais das amostras. Marcação na região de membrana plasmática com **Cum-NH-BTD** (azul), Marcação na região de membrana plasmática (verde) com **BTD-NH-Cum**. Marcação com a sonda comercial CellMark (vermelho) e a sobreposição das imagens de marcação de CellMark e dos fluoróforos. (roxo e laranja). Escala 10  $\mu$ m. .... 70

**Figura 57.** Coeficientes de correlação de Pearson adquiridos para as estruturas **Cum-NH-BTD** (esquerda) e **BTD-NH-Cum** (direita)..... 70

**Figura 58.** Embriões de *Zebrafish* vivos e fixados marcados com **Cum-NH-BTD** (esquerda acima), **BTD-NH-Cum** (direita acima) e **CellMask** (abaixo). Escala 200  $\mu$ m..... 71

## LISTA DE ESQUEMAS

<b>Esquema 1.</b> Exemplos de mecanismos de dissipação. ....	2
<b>Esquema 2.</b> Mecanismos de estabilização por ICT e ESIPT quando a estrutura molecular sofre uma modificação química.....	3
<b>Esquema 3.</b> Aplicações de moléculas orgânicas fluorescentes. ....	6
<b>Esquema 4.</b> Sonda fluorescente <b>BP-N<sub>2</sub>H<sub>4</sub></b> seletiva para a detecção de hidrazina. <sup>31</sup> .....	7
<b>Esquema 5.</b> Sonda fluorescente para clivagem enzimática. <sup>32</sup> .....	7
<b>Esquema 6.</b> Principais metabólitos secundários proveniente do fenipropeno cumaroil-coenzima A. <sup>57,58</sup> .....	12
<b>Esquema 7.</b> Mecanismo proposto por Shimizu e colaboradores para a biossíntese da 7-hidroxi-cumarina. <sup>58,59</sup> .....	13
<b>Esquema 8.</b> Alguns exemplos de reações para preparação de derivados de cumarinas. <sup>60-65</sup> .	13
<b>Esquema 9.</b> Síntese da sonda fluorescente <b>Splendor</b> <sup>75</sup> .....	21
<b>Esquema 10.</b> Síntese da sonda fluorescente <b>BTD-QN</b> . <sup>76</sup> .....	22
<b>Esquema 11.</b> Síntese intracelular de duas sondas fluorescentes <b>BTD-Ph</b> e <b>BTD-2APy</b> . <sup>77</sup> .....	22
<b>Esquema 12.</b> Síntese da <b>BTD-4APTEG</b> . <sup>78</sup> .....	23
<b>Esquema 13.</b> Síntese da <b>BTD-4PBu</b> , <b>BTD-4POc</b> e <b>BTD-4APBuP</b> . <sup>79</sup> .....	24
<b>Esquema 14.</b> Síntese da <b>BTDIm</b> . <sup>80</sup> .....	24
<b>Esquema 15.</b> Representação geral da retrossíntese dos derivados de cumarinas.....	27
<b>Esquema 16.</b> Síntese do ácido de Meldrum. ....	28
<b>Esquema 17.</b> Síntese da 7-dietilamino 3- ácido carboxílico cumarina.....	28
<b>Esquema 18.</b> Mecanismo proposto para reação de formação do derivado de cumarina. <sup>63</sup> .....	29
<b>Esquema 19.</b> Tentativa de síntese da estrutura <b>Cum-NH-BTD</b> utilizando a metodologia do SOCl <sub>2</sub> .....	31
<b>Esquema 20.</b> Mecanismo proposto para formação de amidas e ésteres. <sup>90,91</sup> .....	32
<b>Esquema 21.</b> Estruturas dos compostos sintetizados. ....	33
<b>Esquema 22.</b> Tentativa de síntese do composto <b>(160)</b> .....	35
<b>Esquema 23.</b> Síntese do composto <b>Cum-NH-HOBT</b> .....	35
<b>Esquema 24.</b> Mecanismo proposto para a preparação de <b>Cum-NH-HOBT</b> . ....	36
<b>Esquema 25.</b> Possíveis mecanismos da reação de azabenzotriazóis e agentes de acoplamentos. ....	38
<b>Esquema 26.</b> Rota sintética do produto <b>BTD-NH-Cum</b> . ....	40
<b>Esquema 27.</b> Mecanismo proposto para a formação produto <b>BTD-NH-Cum</b> . <sup>97</sup> .....	40

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Tentativas de preparação da <b>Cum-NH-BTD</b> .....	31
<b>Tabela 2.</b> Sinais diagnósticos dos produtos sinterizados.....	46
<b>Tabela 3.</b> Dados de espectrometria (ESI(+)) MS de massas no modo positivo das estruturas sintetizadas.....	47
<b>Tabela 4.</b> Dados fotofísicos dos produtos sintetizados.....	48
<b>Tabela 5.</b> Energias Livres de solvatação em soluções de água e octanol dos fluoróforos <b>BTD-NH-Cum</b> e <b>Cum-NH-BTD</b> .....	60

## LISTA DE SÍMBOLOS, NOMENCLATURAS E ABREVIACÕES.

**BTD**- benzotiadiazola

**BODIPY**- Boro-dipirrometeno

**CACO-2**- Linhagem celular de adenocarcinoma colorretal humano.

**ESI/MS** - Espectrometria de massa com ionização eletrospray (do inglês, *electrospray ionization mass spectrometry*)

**ESIPT**- Transferência intramolecular de próton no estado excitado (do inglês, *excited state intramolecular proton transfer*)

**F6'H1**- Feruloil CoA orto-hidroxilase

**FAL**- Fenilalanina amônia-liase

**FRET**- Transferência de energia por ressonância de Froster (do inglês, *fluorescence resonance energia transfer*)

**HIV** - *Human Immunodeficiency Virus*

**HUVEC**- Linhagem celular endoteliais de veia umbilical humana

**ICT** - Transferência de carga interna (do inglês, *intramolecular charge transfer*)

**LLC-MK2** – Linhagem celular epiteliais do rim de macaco-rhesus

**MDA-MB 231**- Linhagem celular de adenocarcinoma de mama humano

**MLCT** – Transferência de carga metal- ligantes (do inglês, *metal ligand charge transfer*)

**MCF-7**- Linhagem celular de adenocarcinoma da mamária humana

**PET**- Transferência de elétron fotoinduzida (do inglês, *photoinduced electron transfer*)

**RMC** - Reação multicomponente

**RMN** - Ressonância magnética nuclear

**T47D**- Linhagem celular de adenocarcinoma de mama humano

## LISTA DE ANEXOS

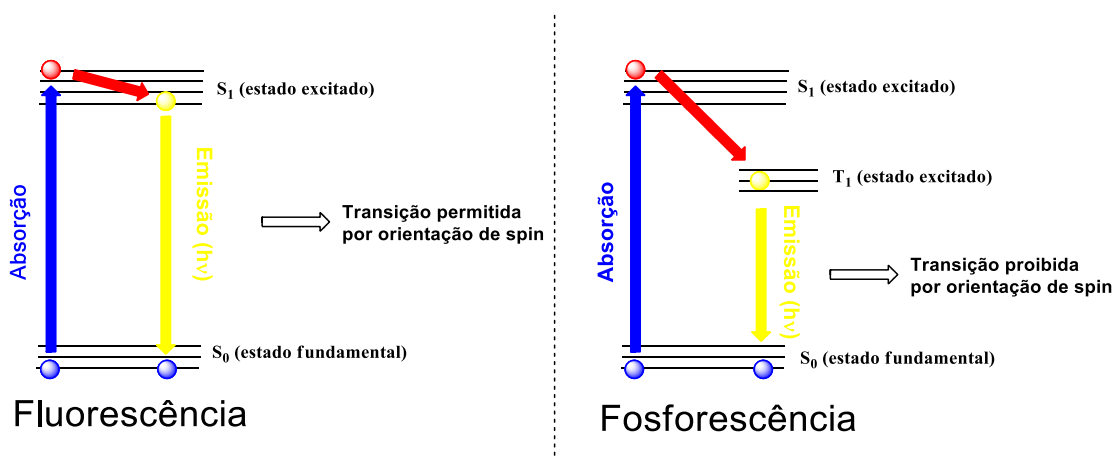
<b>Tabela S1.</b> Coordenadas cartesianas das estruturas otimizadas <b>Cum-NH-BTD</b> e <b>BTD-NH-Cum</b> no estado fundamental obtido no nível de teoria CAMB3LYP/6-311+G(d).....	89
<b>Tabela S2.</b> Coordenadas cartesianas das estruturas otimizadas <b>Cum-NH-BTD</b> e <b>BTD-NH-Cum</b> no primeiro estado excitado obtido no nível de teoria CAMB3LYP/6-311+G(d).....	102
<b>Figura S1.</b> <sup>1</sup> H RMN 600 MHz (CDCl <sub>3</sub> ) do ácido de Meldrum. ....	104
<b>Figura S2.</b> <sup>13</sup> C RMN 151 MHz (CDCl <sub>3</sub> ) do ácido de Meldrum. ....	105
<b>Figura S3.</b> <sup>1</sup> H RMN 600 MHz (CDCl <sub>3</sub> ) da <i>N,N</i> dietilamino-cumarina 3-ácido carboxílico. ....	106
<b>Figura S4.</b> <sup>13</sup> C RMN 151 MHz (CDCl <sub>3</sub> ) <i>N,N</i> dietilamino-cumarina 3-ácido carboxílico. ....	107
<b>Figura S5.</b> <sup>1</sup> H RMN 600 MHz (CDCl <sub>3</sub> ) da <b>Cum-NH-BTD</b> . ....	108
<b>Figura S6.</b> <sup>13</sup> C RMN 150 MHz (CDCl <sub>3</sub> ) da <b>Cum-NH-BTD</b> . ....	109
<b>Figura S7.</b> ESI(+)-MS da <b>Cum-NH-BTD</b> . Sinais do produto [C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub> S + H] <sup>+</sup> = 395,1171 Da e [C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub> S + Na] <sup>+</sup> = 417,0616 Da. ....	110
<b>Figura S8.</b> <sup>1</sup> H RMN 300 MHz (CDCl <sub>3</sub> ) da <b>BTD-NH-Cum</b> . ....	111
<b>Figura S9.</b> <sup>13</sup> C RMN 75 MHz (CDCl <sub>3</sub> ) da <b>BTD-NH-Cum</b> . ....	112
<b>Figura S10.</b> ESI(+)-MS da <b>BTD-NH-Cum</b> . Sinais do produto [C <sub>16</sub> H <sub>11</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> S + H] <sup>+</sup> = 310,0638 Da e [C <sub>16</sub> H <sub>11</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> S + Na] <sup>+</sup> = 331,9984 Da. ....	113
<b>Figura S11.</b> <sup>1</sup> H RMN 600 MHz (CDCl <sub>3</sub> ) da <b>Cum-NH-TRIP</b> . ....	114
<b>Figura S12.</b> <sup>13</sup> C RMN 150 MHz (CDCl <sub>3</sub> ) da <b>Cum-NH-TRIP</b> . ....	115
<b>Figura S13.</b> ESI(+)-MS da <b>Cum-NH-TRIP</b> . Sinais do produto [C <sub>24</sub> H <sub>25</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> + H] <sup>+</sup> = 404,1993 Da e [C <sub>24</sub> H <sub>25</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> + Na] <sup>+</sup> = 426,1820 Da. ....	116
<b>Figura S14.</b> <sup>1</sup> H RMN 600 MHz (CDCl <sub>3</sub> ) da <b>Cum-NH-HOBT</b> . ....	117
<b>Figura S15.</b> <sup>13</sup> C RMN 150 MHz (CDCl <sub>3</sub> ) da <b>Cum-NH-HOBT</b> . ....	118
<b>Figura S16.</b> ESI(+)-MS da <b>Cum-NH-HOBT</b> . Sinais do produto [C <sub>23</sub> H <sub>25</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub> + H] <sup>+</sup> = 436,1988 Da. ....	119
<b>Figura S17.</b> <sup>1</sup> H RMN 600 MHz (CDCl <sub>3</sub> ) da <b>Cum-NH-BIFENIL</b> . ....	121
<b>Figura S18.</b> <sup>13</sup> C RMN 150 MHz (CDCl <sub>3</sub> ) da <b>Cum-NH-BIFENIL</b> . ....	122
<b>Figura S19.</b> ESI(+)-MS da <b>Cum-NH-BIFENIL</b> . Sinais do produto [C <sub>26</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> + H] <sup>+</sup> = 413,1885 Da e [C <sub>26</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> + Na] <sup>+</sup> = 435,1707 Da. ....	124
<b>Figura S20.</b> <sup>1</sup> H RMN 600 MHz (CDCl <sub>3</sub> ) da <b>Cum-NH-PIPERONIL</b> . ....	126
<b>Figura S21.</b> <sup>13</sup> C RMN 150 MHz (CDCl <sub>3</sub> ) da <b>Cum-NH-PIPERONIL</b> . ....	127
<b>Figura S22.</b> ESI(+)-MS da <b>Cum-NH-PIPERONIL</b> . Sinais do produto [C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> + H] <sup>+</sup> = 395,1626 Da e [C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> + Na] <sup>+</sup> = 417,1448 Da. ....	128
<b>Figura S23.</b> <sup>1</sup> H RMN 600 MHz (CDCl <sub>3</sub> ) da <b>Cum-NH-NAFTIL</b> . ....	129
<b>Figura S24.</b> <sup>13</sup> C RMN 150 MHz (CDCl <sub>3</sub> ) da <b>Cum-NH-NAFTIL</b> . ....	130
<b>Figura S25.</b> ESI(+)-MS da <b>Cum-NH-NAFTIL</b> . Sinais do produto [C <sub>24</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> + H] <sup>+</sup> = 387,1630 Da e [C <sub>24</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> + Na] <sup>+</sup> = 409,1547 Da. ....	131
<b>Figura S26.</b> <sup>1</sup> H RMN 600 MHz (CDCl <sub>3</sub> ) da <b>Cum-NH-NAFTOL</b> . ....	132

<b>Figura S27.</b> $^{13}\text{C}$ RMN 150 MHz ( $\text{CDCl}_3$ ) da <b>Cum-NH-NAFTOL</b> . .....	133
<b>Figura S28.</b> ESI(+)-MS da <b>Cum-NH-NAFTOL</b> . Sinais do produto $[\text{C}_{24}\text{H}_{21}\text{NO}_4 + \text{H}]^+ = 388,1563$ Da e $[\text{C}_{24}\text{H}_{21}\text{NO}_4 + \text{Na}]^+ = 410,1388$ Da. ....	134
<b>Figura S29.</b> Permissão de uso de figura da referência 70. ....	135
<b>Figura S30.</b> Permissão de uso de figura da referência 71. ....	136
<b>Figura S31.</b> Permissão de uso de figura da referência 72. ....	137

# 1. Introdução e Revisão Bibliográfica.

## 1.1. Fotoluminescência e suas aplicações em bioimageamento.

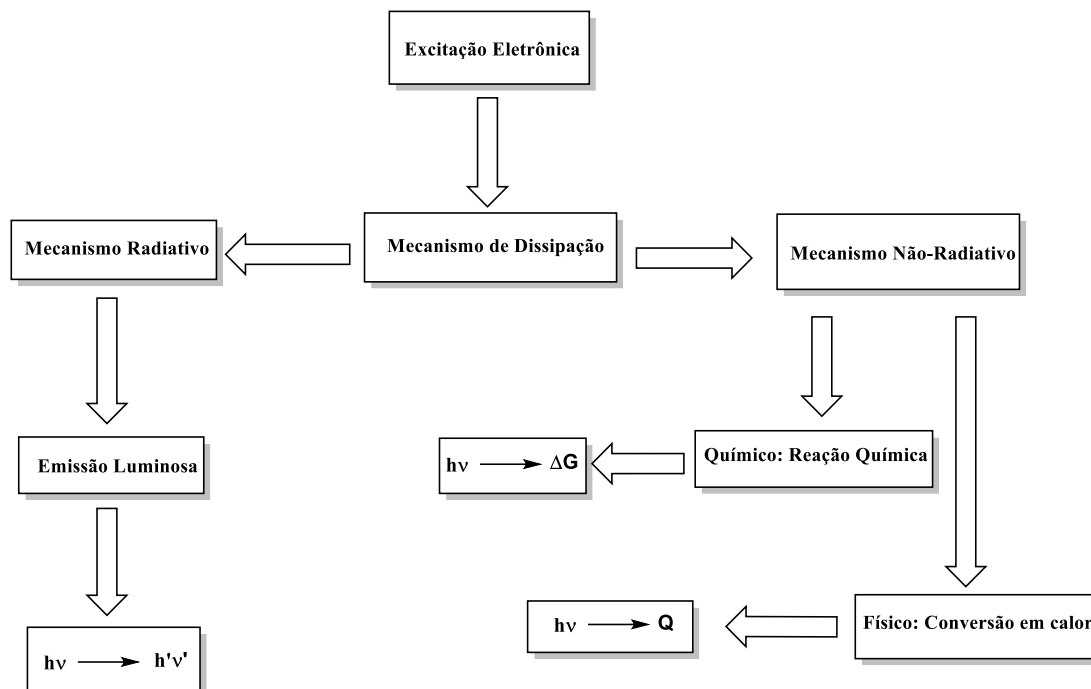
O fenômeno da fotoluminescência, descrito por George Stokes, baseia-se na emissão de luz de qualquer substância (ou fluoróforo) em um comprimento de onda maior, quando estas mesmas substâncias absorvem luz em um comprimento de onda menor.<sup>1 2</sup> De maneira geral, o fenômeno da luminescência pode ser dividido em duas categorias distintas e dependentes da natureza do estado excitado: **fluorescência** e **fosforescência**. A diferença das duas se dá exatamente no tempo que o estado excitado de uma determinada substância leva para emitir um fóton.<sup>2</sup> Uma explicação mais formal do fenômeno da fluorescência envolve, apenas, os estados singletos (excitado e fundamental). Quando ocorre a absorção de luz um elétron vai para o estado excitado, o retorno deste elétron com orientação oposta ao elétron do estado fundamental é uma transição ( $S_1-S_0$ ) permitida por spin.<sup>2</sup> Por conta disto, o tempo da emissão de um fóton é em geral mais curto, na faixa de  $10^{-8}$  segundos. Já o fenômeno da fosforescência ocorre de uma maneira bastante distinta, pois a natureza da transição eletrônica é diferente, já que envolve os estados excitados tripleto. O elétron é excitado com a mesma orientação de spin do estado fundamental e passa por uma transição não radioativa chamada cruzamento intersistema, que envolve a mudança de multiplicidade do elétron. Esta transição é proibida ( $T_1-S_0$ ) por orientação de spin ( $\Delta S \neq 0$ ), mas mesmo assim o fenômeno é observado devido ao acoplamento spin-orbita, uma interação do momento magnético do spin com o campo magnético gerado pelo momento angular do orbital. A emissão de um fóton por fosforescência demanda muito mais tempo, na faixa de milissegundos.<sup>2</sup>



**Figura 1.** Transições eletrônicas do fenômeno da fluorescência (esquerda) e fosforescência (direita).

Os métodos de emissão (**Esquema 1**) de uma determinada substância pode ser divididas em dois grupos diferentes: mecanismos de dissipação radiativos (sendo este o mais comum e utilizado neste

trabalho), que consiste na emissão de energia em forma de luz. O outro não-radiativo, no qual a energia emitida pode ser convertida em reações químicas ou na dissipação de calor.<sup>2</sup>



**Esquema 1.** Exemplos de mecanismos de dissipação.

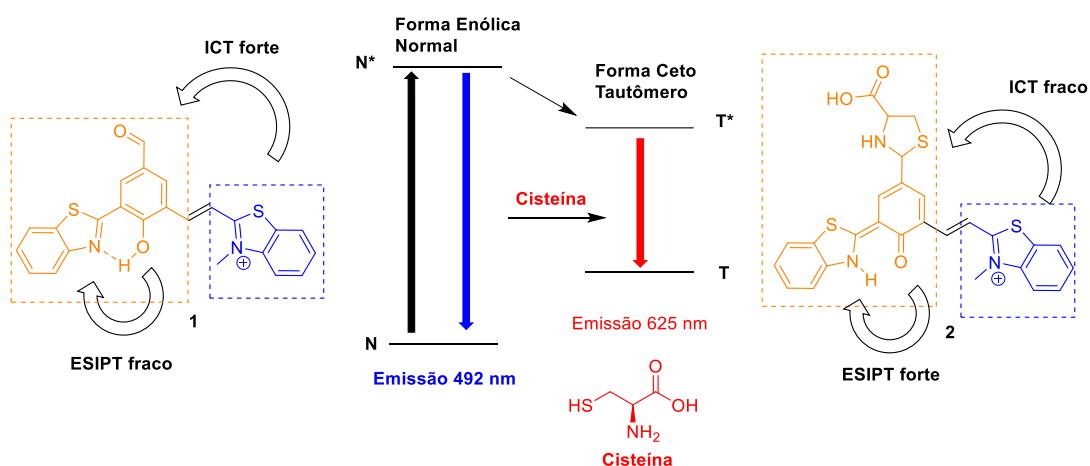
Uma das aplicações dos fluoróforos é como sondas fluorescentes, inúmeros grupos de pesquisas vêm desenvolvendo trabalhos em diversas áreas da ciência e tecnologia. A principal aplicação está no estudo de células, sendo estes fluoróforos preparados com o intuito de realizar experimentos de imageamento celular.<sup>3</sup> Estas sondas podem potencializar sua intensidade de fluorescência quando são estabilizados por mecanismos no seu estado excitado. A boa compreensão destes mecanismos de estabilização são fundamentais para se ter ideia de como transições eletrônicas no estado excitado acontecem, e finalmente, com planejamento racional obter uma arquitetura molecular coerente com as propriedades biológicas propostas, e sintetizar sondas mais estáveis (maior tempo de emissão de luz) e com maior eficiência.<sup>3</sup>

Os mecanismos mais comuns incluem transferência de carga intramolecular (ICT, do inglês *intramolecular charge transfer*), um mecanismo adiabático que transfere densidade eletrônica de um grupo doador para um grupo aceitador por um período de tempo; transferência de elétrons fotoinduzida (PET, do inglês *photoinduced electron transfer*), transferência não-adiabática que ocorre durante acoplamento eletrônico entre grupos doadores de elétrons e grupos aceitadores de elétrons (diferenciando do mecanismo ICT por ser um processo não adiabático); transferência de energia de ressonância de Förster (FRET, do inglês *fluorescence resonance energia transfer*), um processo não-radiativo no qual a energia do estado excitado do doador é transferido para um grupo aceitador no estado fundamental através de



interações dipolo-dipolo de longo alcance e transferência intramolecular de prótons do estado excitado (ESIPT, do inglês *excited state intramolecular proton transfer*). Para este trabalho dois mecanismos principais podem ocorrer, são os mecanismos de estabilização por ICT e por ESIPT.<sup>3,4</sup>

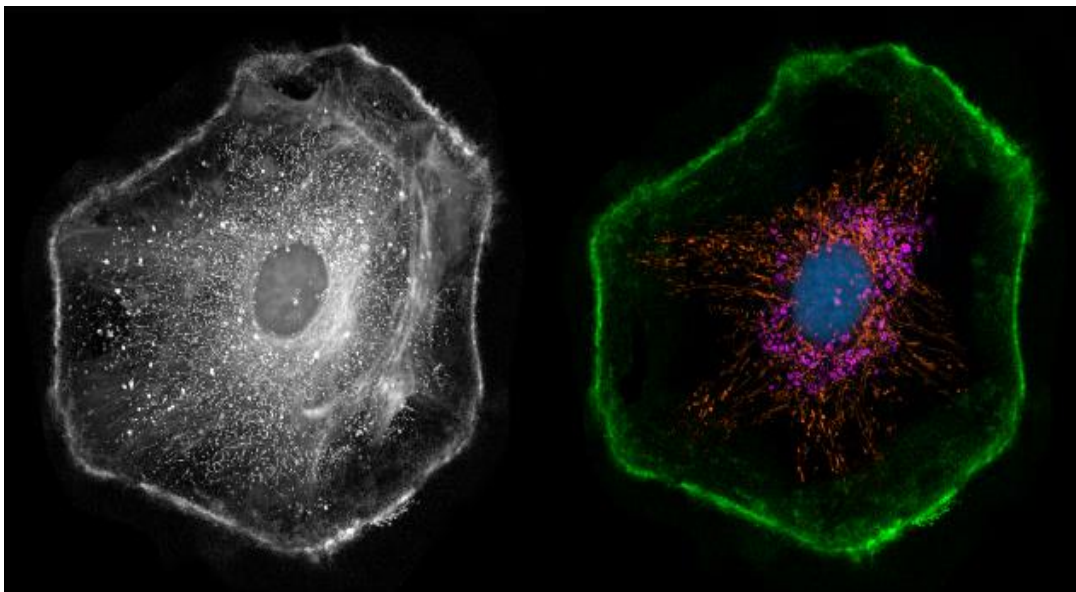
O trabalho de Upadhyay e colaboradores<sup>5</sup> exemplifica bem os processos de ESIPT e ICT, podendo ocorrer simultaneamente ou não com simples modificações estruturais. Os autores prepararam sondas fluorescentes para detecção de cisteína, como visto na **Esquema 2**. Na forma enólica e na ausência de cisteína foi detectado um forte mecanismo de estabilização por ICT na região do azul. ( $\lambda_{\text{máx}} = 492 \text{ nm}$ ). Após o ataque nucleofílico no grupo carbonila (diminuindo o caráter aceitador de densidade eletrônica) o mecanismo ESIPT é favorecido, tendo em vista o deslocamento da banda de emissão para a região do vermelho ( $\lambda_{\text{máx}} = 625 \text{ nm}$ ), devido à disponibilidade de transferência protônica.



**Esquema 2.** Mecanismos de estabilização por ICT e ESIPT quando a estrutura molecular sofre uma modificação química.

Moléculas orgânicas fluorescentes são excelentes ferramentas em estudos de química biológica, principalmente na área de citologia. Com uma forte aplicação destas estruturas em células vivas. O tema desperta um amplo interesse da comunidade científica, onde vários grupos de pesquisa obtiveram progresso e puderam compreender melhor processos dinâmicos celulares, como: transporte e crescimento metabólico, excitabilidade e sinalização celular, além de refinar técnicas de detecção de fluorescência em células fixadas, como a imunofluorescência<sup>6,7</sup> Este tipo de técnica se tornou importante não apenas em pesquisas biológicas, mas também para o diagnóstico e tratamento de doenças. A técnica deve ser sensível o suficiente para visualizar compostos biológicos em concentrações fisiológicas, que na maioria dos casos variam de nanomolares a micromolares e com uma alta resolução temporal para analisar a sinalização dinâmica de processos celulares. Além disso, o método utilizado não deve ser invasivo, necessitando que o marcador celular não possua efeitos citotóxicos.<sup>4</sup> A **Figura 4** permite uma melhor visualização de algumas organelas presentes nas células, com o auxílio de marcadores comerciais para visualização do contraste, representa uma co-marcação teórica que foi produzida através da ferramenta gratuita **Cell Staining Tool**, disponível no sítio eletrônico da *Thermo Fisher Scientific Inc.*<sup>8</sup> Em

verde marcação da membrana celular, em vermelho a marcação de mitocôndrias, em lilás a marcação de lisossomos e em azul a marcação do núcleo.

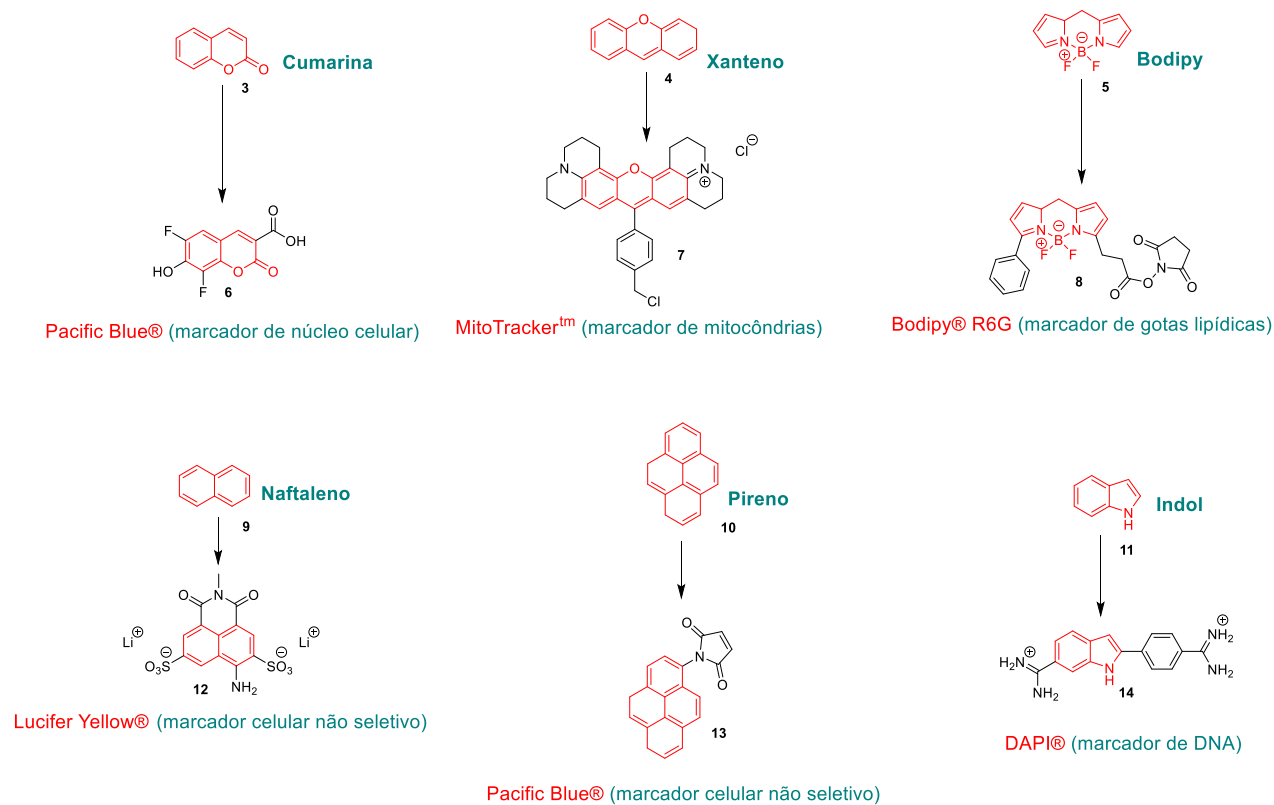


**Figura 2.** Célula sem contraste (esquerda) e célula com multimarcações (direita) em organelas celulares usando marcadores comerciais disponíveis. Imagem feita pelo aplicativo *Cell Staining Tool*.<sup>8</sup>

Algumas características fotoquímicas são necessárias para que compostos fluorescentes tenham uma maior eficácia em aplicações biológicas. É desejável que ele possua um alto valor de rendimento quântico, altos deslocamentos de Stokes,<sup>9</sup> alta fotoestabilidade (para que a estrutura permaneça emitindo luz por longos períodos de tempo),<sup>10</sup> rigidez estrutural e um efetivo sistema  $\pi$ -conjugado (para que o mecanismo de dissipação de energia seja efetivo em toda a molécula).<sup>11</sup> Além destas características é necessário que o fluoróforo estudado seja seletivo em uma região celular específica, ou seja, que tenham afinidade para interagir com mitocôndrias, lipídios, membrana plasmática, proteínas, DNA e etc.<sup>7,12</sup> Ter uma cinética razoável em água sob restrições de pH fisiológico e na presença de sistemas ricos em sais e tióis nucleofílico (por exemplo, glutatona e a cisteína). Finalmente, devem estar presentes em baixas concentrações (geralmente nanomolares).<sup>13</sup> Além de todos esses requisitos, as sondas fluorescentes devem seguir os princípios da bioortogonalidade: não devem interferir em processos celulares e devem gerar produtos/subprodutos inertes e atóxicos para os seres vivos. Portanto, o principal desafio químico para o bioimageamento é identificar reações adequadas que mesclam quimiosseletividade e bioortogonalidade.<sup>13</sup>

Alguns marcadores (**Figura 5**) estão disponíveis no mercado, algumas empresas se especializaram na fabricação e venda destas estruturas, é o caso da **Termo Fisher Scientific** e a **Merck**. Alguns destes marcadores comerciais possuem algumas desvantagens, na estocagem (necessário temperaturas abaixo de  $-18^{\circ}\text{C}$ ), na fotoestabilidade destes compostos e principalmente no elevado preço destes produtos.<sup>14</sup>

Portanto, se torna cada vez mais necessário a inovação de novas sondas fluorescentes para que se consiga um alcance maior na produção de trabalhos científicos, sobretudo em laboratórios com orçamentos limitados.

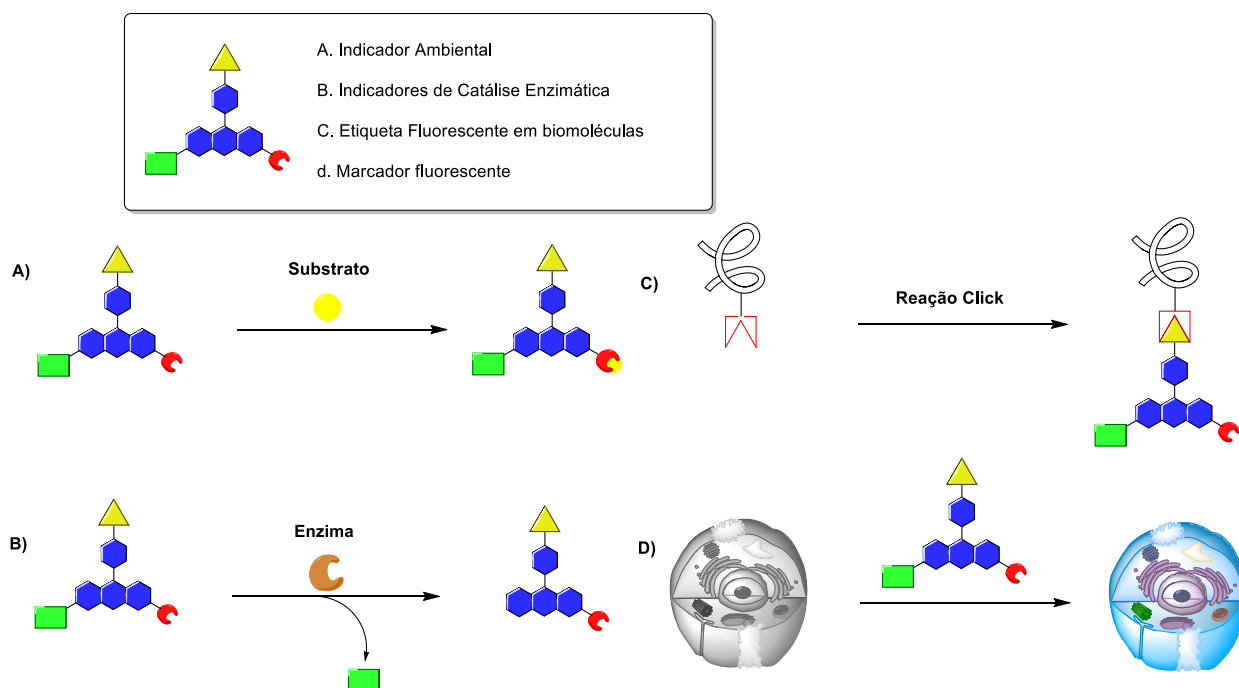


**Figura 3.** Exemplos de marcadores comerciais já estabelecidos no mercado e seus núcleos fluorescentes.

## 1.2. Moléculas Orgânicas Fluorescentes

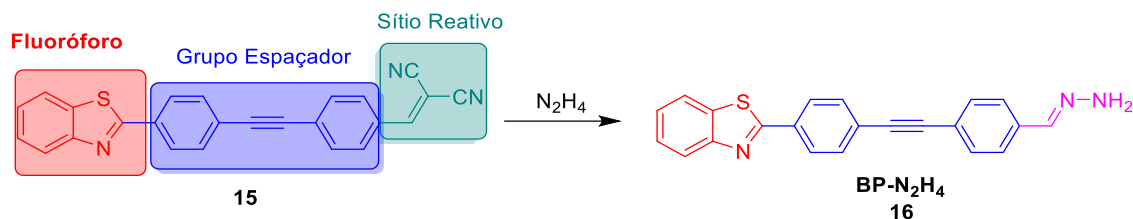
Em 1845, Fredrick Herschel realizou pela primeira vez um estudo empírico das propriedades fotoquímicas do sulfato de quinina, sendo esta estrutura a primeira molécula orgânica fluorescente bem definida. Apenas sete anos depois em 1852, os conceitos de fluorescência e fosforescência foram introduzidos por George Stokes, usando o próprio sulfato de quinina nos seus estudos.<sup>15</sup> Desde então moléculas orgânicas fluorescentes são ferramentas importantes no desenvolvimento em vários campos da química, biologia e engenharias.

Geralmente, as moléculas orgânicas fluorescentes devem conter dois grupos com funções distintas: o fluoróforo que é responsável pela emissão de fluorescência e o ligante que é responsável pelo reconhecimento molecular, interagindo com o analito em questão. Entre os dois ligantes geralmente há a presença de um grupo espaçador que permite a transferência de elétrons. Em moléculas orgânicas fluorescentes o fluoróforo é o principal responsável pela sensibilidade, enquanto o ligante é o principal responsável pela seletividade da sonda.<sup>16</sup> A primeira etapa da construção deste tipo de estrutura é a síntese orgânica eficiente, já que modificações estruturais mudam características fotofísicas destas estruturas. Então, com um desenho racional planejado, estas moléculas orgânicas fluorescentes podem ser funcionalizadas e aplicadas em vários campos distintos da ciência. Por exemplo: como indicador ambiental para algum tipo de poluente específico,<sup>17,18</sup> como indicadores de catálise enzimática,<sup>19</sup> como etiquetas fluorescentes em biomoléculas<sup>20</sup> e como marcador celular.<sup>19,21-30</sup>



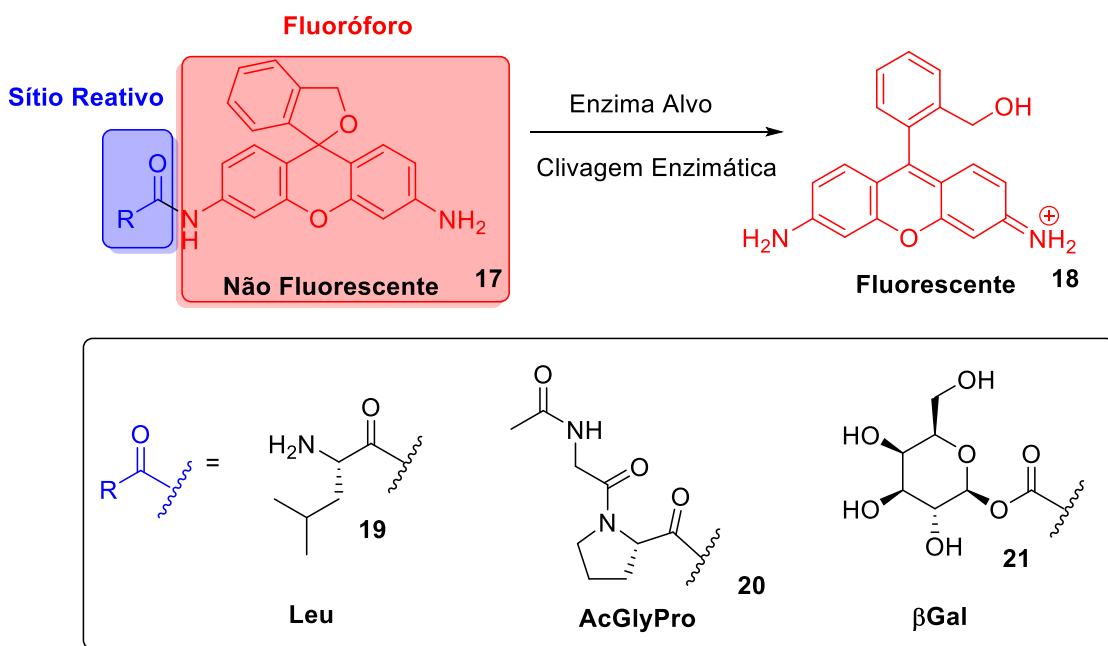
**Esquema 3.** Aplicações de moléculas orgânicas fluorescentes.

Um excelente exemplo de moléculas fluorescentes usadas para a detecção de poluentes é o trabalho de Qian e colaboradores.<sup>31</sup> Os autores, por meio de um design racional, sintetizaram uma sonda altamente seletiva para hidrazina (**Esquema 4**), um conhecido poluente tóxico, sendo absorvido rapidamente pela pele, via oral e/ou por inalação. Os autores reportaram um baixo limite de detecção, menor que 0,11 ppb. O que indica que esta sonda é altamente sensível para a detecção deste poluente.



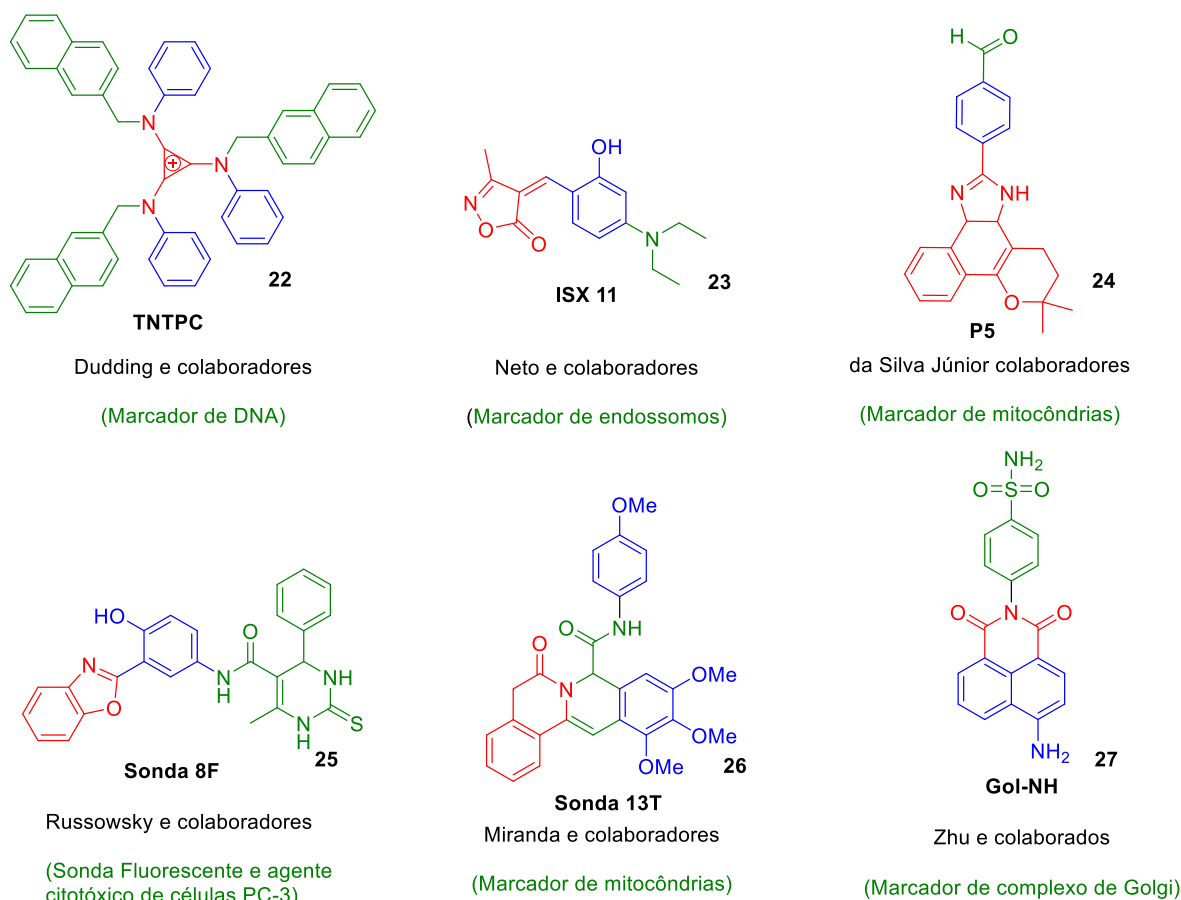
**Esquema 4.** Sonda fluorescente **BP-N<sub>2</sub>H<sub>4</sub>** seletiva para a detecção de hidrazina.<sup>31</sup>

Outro trabalho que vale a pena ser destacado é o de Urano e colaboradores.<sup>32</sup> Os pesquisadores desenvolveram derivados de hidroximetil rodamina como sondas fluorescentes sensíveis para proteases e glicosidases. Quando estes eram substituídos por frações dos substratos, as sondas eram clivadas na presença da enzima alvo e emitia uma forte emissão de fluorescência. A partir destes dados, os autores sintetizaram sondas seletivas para leucil-aminopeptidase,  $\beta$ -galactosidase e a ativação de fibroblastos, que é responsável pela síntese do colágeno e elastina. Como pode ser visto no **Esquema 5** o produto spirociclizado não é fluorescente, quando esta estrutura é clivada pela enzima há uma extensão da conjugação e, portanto, o híbrido começa a emitir num comprimento de onda em torno de 540 nm.



**Esquema 5.** Sonda fluorescente para clivagem enzimática.<sup>32</sup>

Como dito anteriormente, moléculas orgânicas fluorescentes podem ser aplicadas em estudos de imageamento celular. Alguns exemplos são mostrados na **Figura 4**. O primeiro exemplo é um marcador derivado do cátion ciclopropenila realizado por Dudding e colaboradores.<sup>33</sup> Este marcador se mostrou seletivo para o DNA. Outras duas moléculas usadas como sondas fluorescentes são as de da Silva Júnior e colaboradores<sup>34</sup> e Miranda e colaboradores,<sup>35</sup> que prepararam estruturas seletivas para marcação de mitocôndrias utilizando derivados de lapachonas e isoquinolinas, respectivamente. A sonda de Neto e colaboradores<sup>36</sup> foi utilizada como marcador de endossomos e a molécula de Zhu e colaboradores<sup>37</sup> tem uma grande afinidade pelo complexo de Golgi (derivado de fenil sulfonamida). Russowsky e colaboradores<sup>38</sup> prepararam derivados de dihidropirimidinonas fluorescentes, através da reação de Biginelli. Os autores não reportaram nenhuma marcação de uma organela específica para esta sonda, entretanto a estrutura se mostrou um excelente agente citotóxico em células PC-3 (células de adenocarcinoma de próstata). Com todos estes trabalhos publicados recentemente, é justificável a continuação de produção de novas moléculas orgânicas fluorescentes. Através de reações relativamente simples é possível sintetizar uma enorme variedade dessas moléculas capazes de atuar em diferentes campos da ciência.

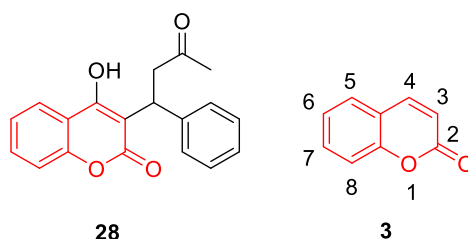


**Figura 4.** Exemplos recentes de sondas fluorescentes aplicadas em imageamento celular.<sup>33-38</sup>

### 1.3. Cumarinas

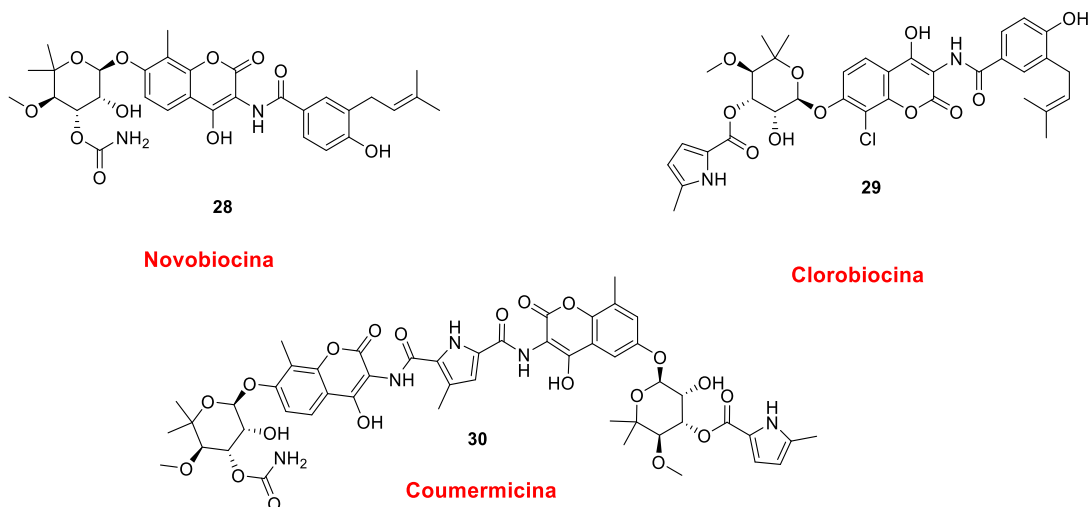
Cumarinas são moléculas naturais heterocíclicas, isoladas pela primeira vez por Vogel em 1820, de sementes de árvores popularmente conhecidas como cumaru, encontradas principalmente na floresta amazônica e na América Central.<sup>39</sup> Esta importante classe de metabolitos secundários não estão presentes apenas em sementes de cumaru. Mas em diversos tipos de plantas, flores, fungos que são capazes de biossintetizar a cumarina.<sup>40</sup> Existem cerca de 1300 derivados de cumarinas nas quais foram catalogadas e isoladas de diversos tipos de fontes naturais.<sup>40</sup> A síntese de cumarinas se tornou uma atrativa alternativa para a indústria, pois sua síntese relativamente simples e limpa é uma boa possibilidade quando comparadas às extrações dessas moléculas da semente do cumaru. O uso de cumarinas na indústria de flavorizantes é apenas um exemplo da versatilidade dessas estruturas, atualmente estudos mostram suas significantes propriedades biológicas e farmacológicas. O derivado de cumarina Warfarina (**Figura 5**) é o primeiro exemplo das atividades anticoagulantes de cumarinas.<sup>41</sup>

As cumarinas apresentam amplo e versátil espectro de atividades as quais se destacam antivirais,<sup>42</sup> antioxidantes<sup>43</sup> e anti-inflamatórias,<sup>44</sup> além de propriedades fotofísicas significantes, sendo largamente estudadas como sondas fluorescentes para marcação celular.<sup>45</sup> Em termos estruturais, esses compostos também podem ser chamados de benzo[ $\alpha$ ]pironas, pois sua estrutura é composta por um anel benzênico fundido em um anel pirona. As diversas mudanças das propriedades (biológicas e fotofísicas) das cumarinas se dá pelas possíveis modificações estruturais que podem ser facilmente feitas, principalmente nas posições 3 e 7.<sup>46</sup>



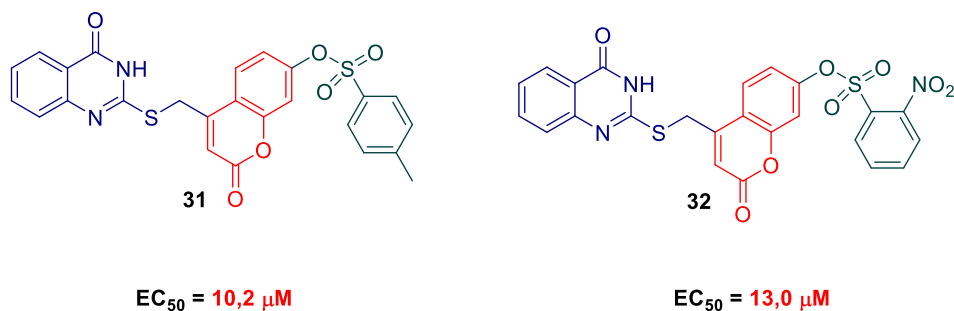
**Figura 5.** Estrutura da warfarina e cumarina. Estrutura do heterociclo cumarina destacado em vermelho.

Essas moléculas heterocíclicas estão presentes também em fármacos. Alguns exemplos de medicamentos, são vistos na **Figura 6**, como os antibióticos Novobiocina®, Clorobiocina® e Coumermicina®, metabólitos secundários extraídos de espécies de *Streptomyces*. Todas as três estruturas têm em comum o anel de 3-amino-4-hidroxi cumarina e um desoxisacarídeo substituído.<sup>47</sup> A diferença se dá justamente pela substituição no desoxisacarídeo (**Figura 6**).



**Figura 6.** Estruturas dos antibióticos Novobiocina, Clorobiocina e Coumermicina. <sup>47</sup>

Ainda destacando aspectos farmacológicos, derivados de cumarinas são objetos de estudos por se tratarem de moléculas com grande potencial inibidor de HIV (do inglês, *human immunodeficiency vírus*) <sup>48</sup>, hepatite <sup>49</sup> e recentemente estruturas cumarínicas foram sintetizadas com o objetivo de inibir o vírus da Chicungunha. Um exemplo é a pesquisa Neyts e colaboradores, <sup>50</sup> que sintetizaram compostos derivados de uracil-cumarinas-arenos altamente eficientes contra a Chicungunha (**Figura 7**). Os pesquisadores modificaram a extensão de conjugação de derivados de cumarinas e concluíram que quanto maior a extensão da conjugação mais efetiva é a inibição. Além disso eles testaram estruturas com e sem o grupo –SO<sub>2</sub>– como extensor da molécula e constataram que esse grupo é essencial para se obter um produto com excelente inibição.

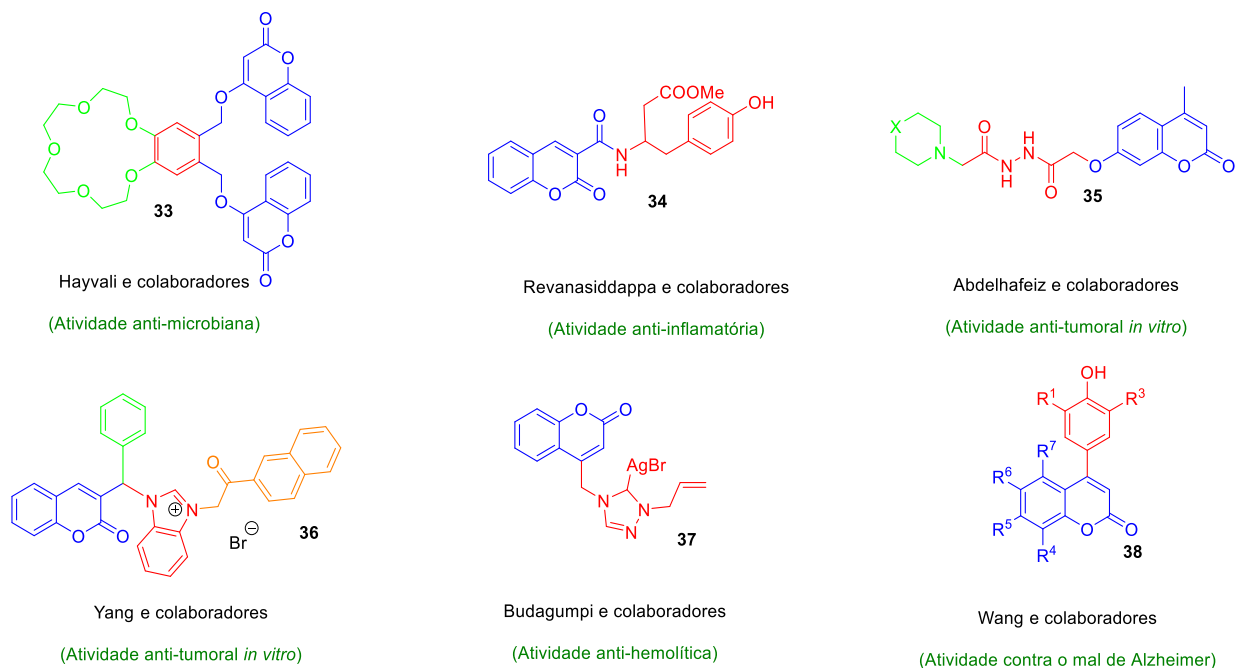


**Figura 7.** Derivados de cumarina mais efetivos para inibição do vírus Chicungunha. <sup>50</sup>

De acordo com a plataforma de buscas de artigos científicos *Web of Science* apenas no primeiro semestre do ano de 2020 o termo cumarina (*coumarin\**, do inglês) estava presente em mais de cem trabalhos publicados. Justificando assim, a importância do estudo desta estrutura em vários campos da ciência. A **Figura 8** mostra alguns derivados de cumarinas recentes (primeiro semestre do ano de 2020) sintetizados por vários grupos de pesquisa ao redor do mundo. Hayvai e colaboradores <sup>51</sup> prepararam um

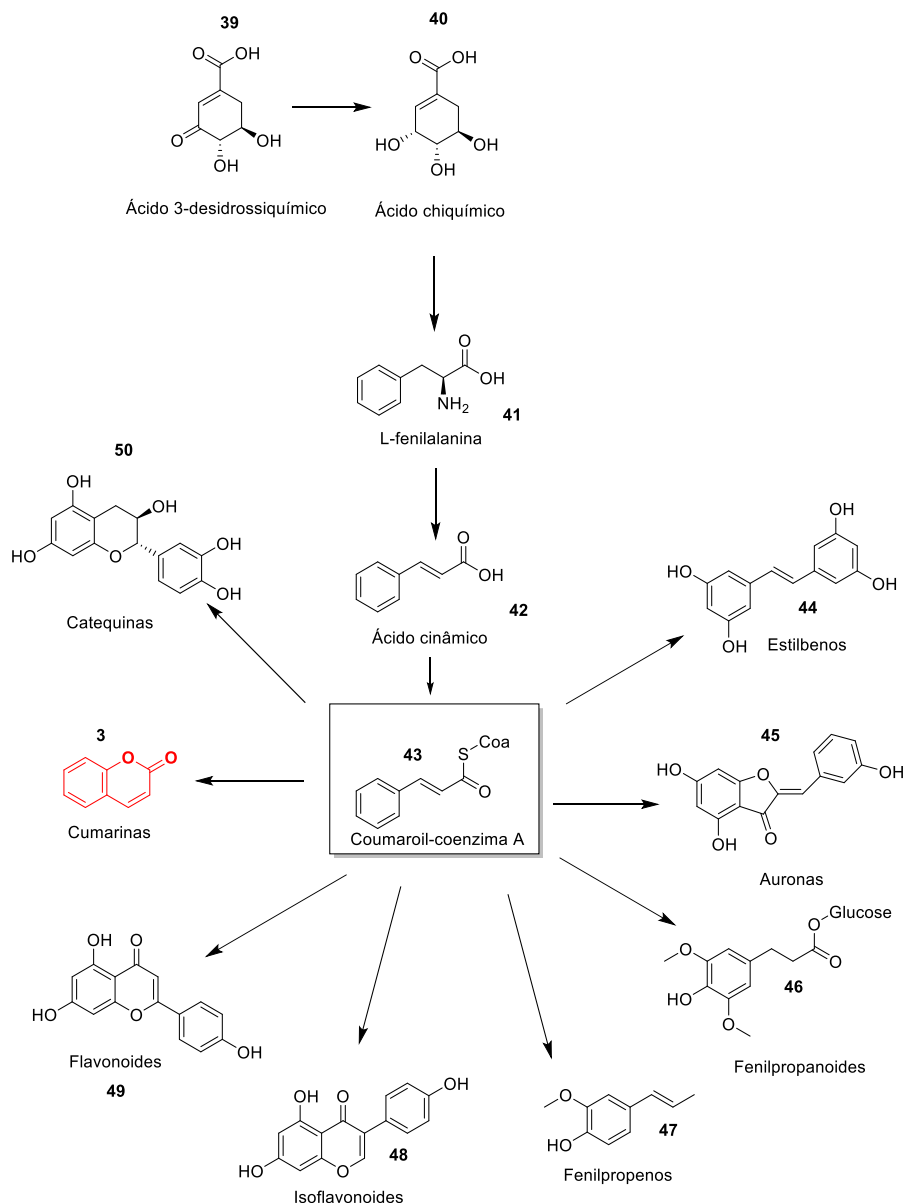


importante derivado de cumarina e éter de coroa que possui uma boa atividade antimicrobiana. Já Revanasiddappa e colaboradores <sup>52</sup> sintetizaram derivados de cumarinas com atividade anti-inflamatória. Abdelhafeiz e colaboradores <sup>53</sup> e Yang e colaboradores <sup>54</sup> prepararam derivados com atividade antitumoral *in vitro*. Bundagumpi e colaboradores <sup>55</sup> prepararam carbenos derivados de cumarinas com boa atividade anti-hemofílica. E por último, Wang e colaboradores <sup>56</sup> sintetizaram potentes derivados de cumarinas com função de atividade contra o mal de Alzheimer.



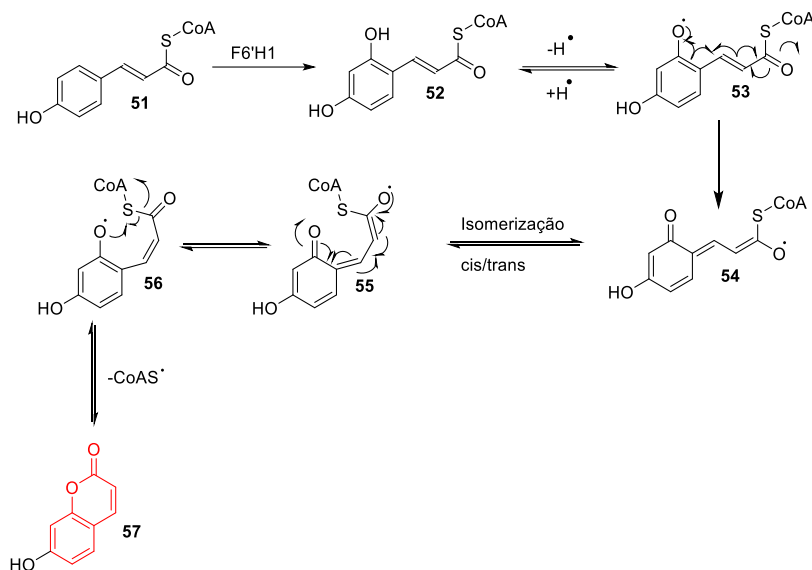
**Figura 8.** Derivados de cumarina (destacadas em azul) biologicamente ativas publicadas recentemente. <sup>51-56</sup>

Como visto anteriormente, cumarinas e seus derivados podem se originar naturalmente (biossintetizadas). Cumarinas são bioquimicamente formadas pelo metabolismo da L-fenilalanina, tendo como precursor principal o fenilpropeno coumaroil-coenzima A. O metabolismo geral desse fenilpropanoide gera não só cumarina, mas sim uma grande variedade de metabólitos secundários numa combinação de redutases, oxigenases e transferases, onde o resultado é um padrão de metabólitos de desenvolvimento específico para cada espécie de planta (**Esquema 6**). <sup>57</sup>



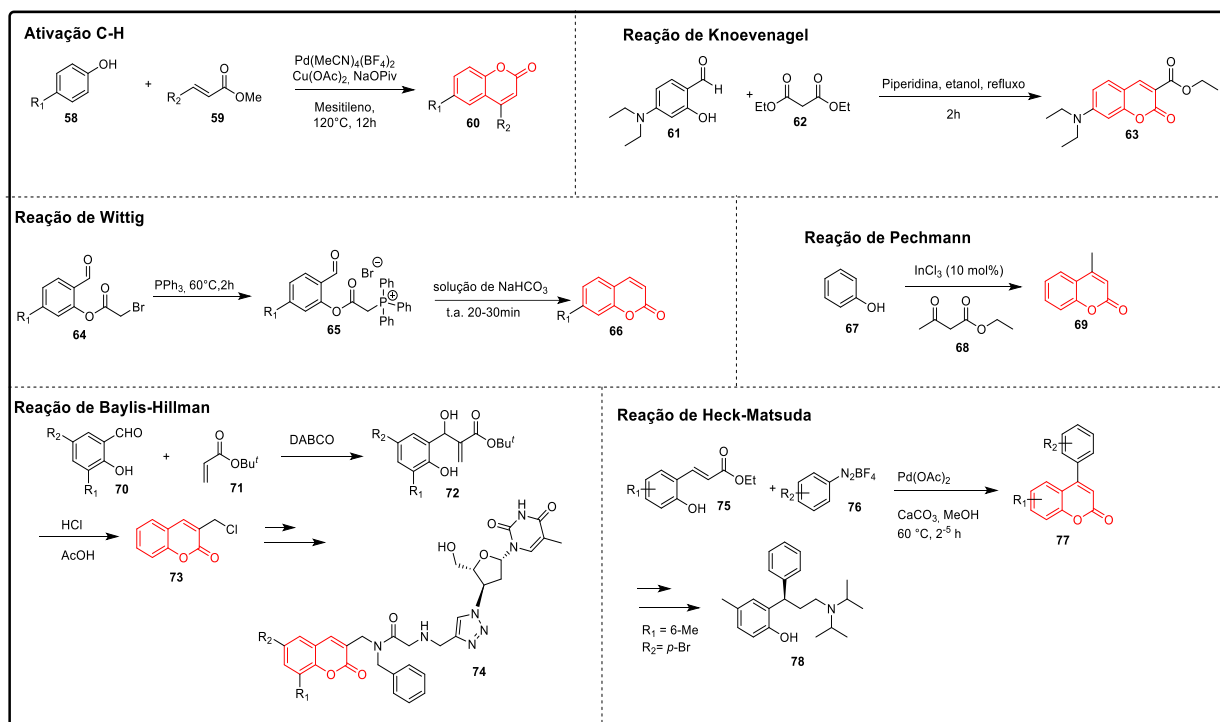
**Esquema 6.** Principais metabólitos secundários proveniente do fenilpropano coumaroil-coenzima A. <sup>57,58</sup>

Em 2008 Shimizu e colaboradores<sup>59</sup> propuseram um mecanismo via radical da biossíntese do derivado da 7-hidroxycumarina (**Esquema 7**). A fenilalanina formada pela via biossintética do chiquimato, é convertida pela fenilalanina amônia-liase (FAL) no ácido trans-cinâmico. Tendo como passo seguinte a formação do metabólito central coumaroil-S-CoA. Esse intermediário crucial pode ser transformado em muitas classes de fenilpropanoides, como visto anteriormente. A biossíntese da cumarina de coumaroil-S-CoA ocorre através da orto-hidroxilação catalisada pelo agente dependente de 2-oxoglutarato dioxigenase F6'H1, a isomerização trans-cis da ligação dupla exocíclica e, por último, a reação final de lactonização.<sup>58,59</sup>



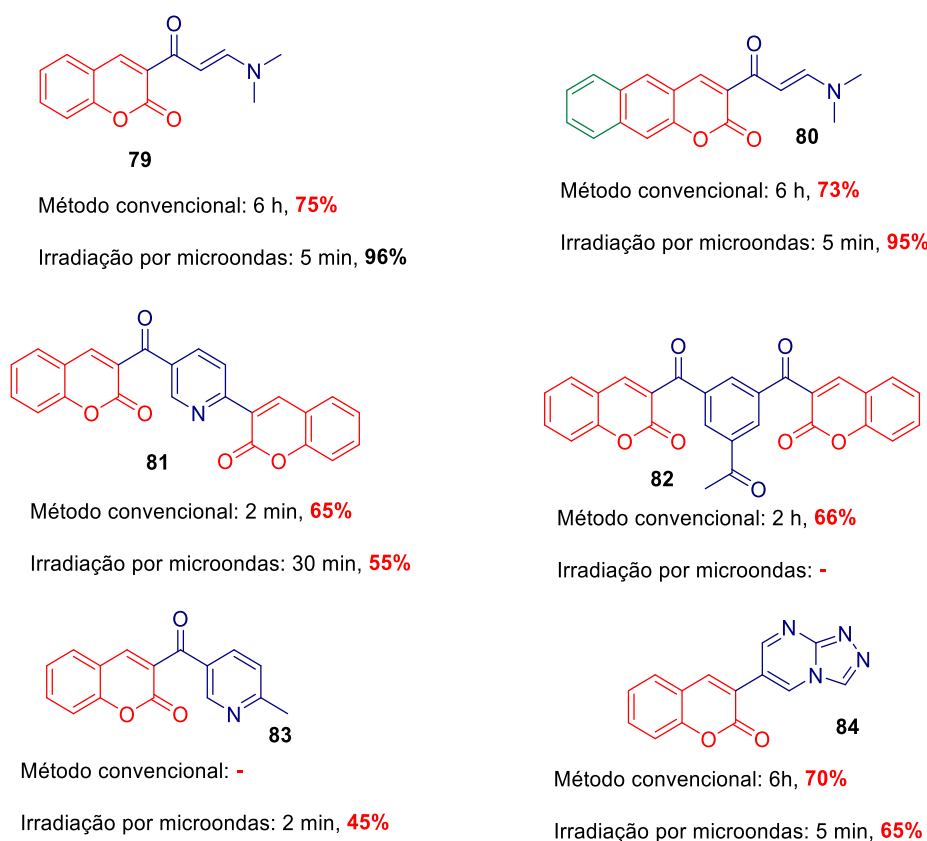
**Esquema 7.** Mecanismo proposto por Shimizu e colaboradores para a biossíntese da 7-hidroxi-cumarina. <sup>58,59</sup>

Derivados de cumarinas podem ser preparados por diversos métodos de reação, ocorrendo geralmente no anel benzopirona. Os derivados de cumarinas mais usuais são facilmente preparados por reações clássicas, por exemplo: alcenilação da ligação C-H, <sup>60</sup> Pechmann, <sup>61</sup> Baylis-Hilman, <sup>62</sup> Knoevenagel, <sup>63</sup> Wittig, <sup>64</sup> Heck-Matsuda, <sup>65</sup> entre outras. Alguns exemplos destas reações podem ser vistos no **Esquema 8**.



**Esquema 8.** Alguns exemplos de reações para preparação de derivados de cumarinas. <sup>60-65</sup>

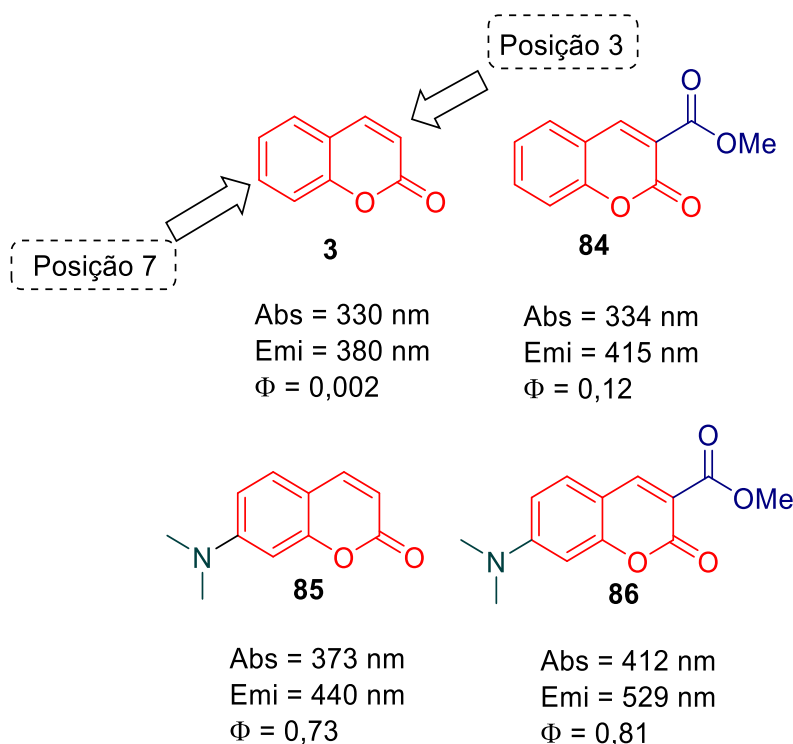
Algumas dessas reações requerem reagentes com alto valor agregado e condições reacionais particulares com elevado tempo reacional e em geral com rendimentos não tão elevados. A alternativa para reverter esses problemas, pode ser a utilização de métodos de geração de energia não-convencionais, como micro-ondas e ultrassom (**Figura 9**). O trabalho de Al-Zaydi e colaboradores<sup>66</sup> faz um comparativo do método de aquecimento convencional e o método de irradiação em micro-ondas. Na maioria dos casos, o método de micro-ondas foi muito mais eficaz que o método de aquecimento convencional. Em poucos minutos de reação havia formação produtos derivados de cumarinas com rendimentos superiores a 40%, já em aquecimento convencional a reação demandava um tempo superior para acontecer, com rendimentos inferiores à técnica de micro-ondas. Em alguns casos, mesmo com a reação sob condições de micro-ondas não foi efetiva para a formação do produto, possivelmente por degradar as substâncias envolvidas na reação, no caso o produto (**82**). E em outro caso o aquecimento convencional não foi efetivo, como visto no produto (**83**).



**Figura 9.** Comparação entre aquecimento convencional e irradiação por micro-ondas. <sup>66,67</sup>

Outras importantes propriedades que se destacam nesta classe são as fotofísicas, como absorção e fluorescência de derivados de cumarinas têm sido estudados por diversos grupos de pesquisa em vários ramos da química. <sup>68</sup> Suas características mudam ao passo que ocorre substituições de grupos funcionais em sua “espinha dorsal”, mais precisamente na posição **3** e **7** do esqueleto cumarínico. <sup>68</sup> As cumarinas

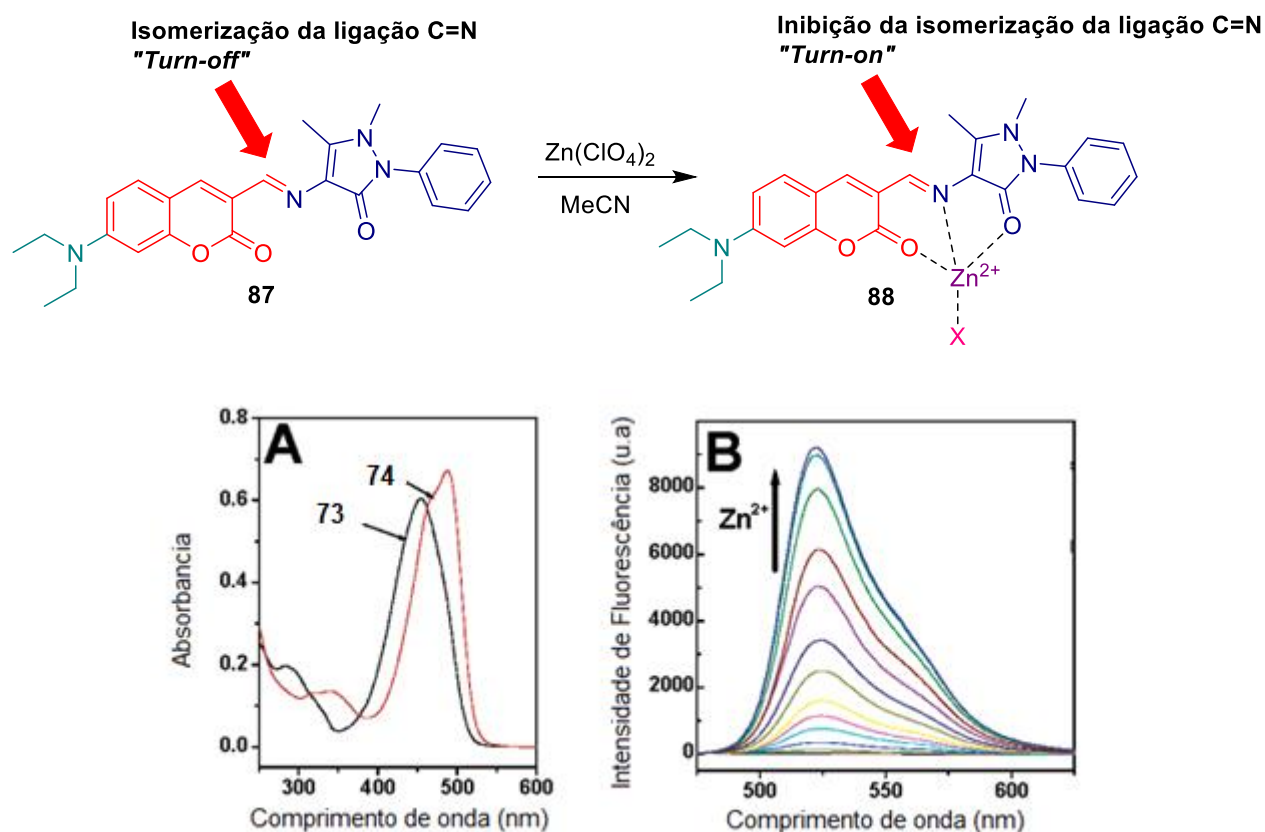
sem modificações estruturais apresentam uma absorção máxima em 330 nm, uma emissão de fluorescência em 380 nm e um rendimento quântico baixo, em torno de 0,002.<sup>68</sup> Já quando a cumarina é estruturalmente modificada, pode se perceber um deslocamento dessas propriedades.<sup>68</sup> Isso ocorre porque há um efeito mais pronunciado da transferência de carga interna na espinha dorsal dos derivados de cumarinas. Esse efeito chamado de ICT <sup>68</sup> (do inglês *Intramolecular Charge Transfer*) é mais pronunciado quando grupos doadores de elétrons são colocados na posição **7** e grupos receptores de elétrons são colocados na posição **3** do anel cumarínico, ocorrendo uma transferência de carga mais efetiva em torno do anel, estabilizando o estado excitado da estrutura. Com um ICT mais efetivo, o deslocamento das bandas de absorção e emissão são mais pronunciados, e há um incremento do rendimento quântico da molécula, visto no derivado de cumarina **(86)** <sup>68</sup>



**Figura 10.** Efeito da substituição no rendimento quântico dos derivados de cumarinas. <sup>68</sup>

Estruturas fluorescentes com comprimentos de onda maiores, ou seja, menos energéticos, são considerados mais atrativos quando se fala em imageamento celular.<sup>69</sup> Alguns problemas podem aparecer quando se trabalha com estruturas com baixo comprimento de onda de emissão, pode-se citar alguns, como: **(I)** Interferência de autofluorescência de substâncias biológicas; **(II)** Profundidade de imagens limitadas, **(III)** Fotodegradação das amostras e “fotobranqueamento” do fluoróforo. <sup>69</sup> Uma extensão na estrutura da cumarina, nas posições **3** e **7** e utilizando grupos funcionais adequados é essencial para a aplicação mais coerente em imageamento celular. Nessa linha outra aplicação das propriedades fotofísicas de derivados de cumarinas é a utilização dessas moléculas como quimiossensores

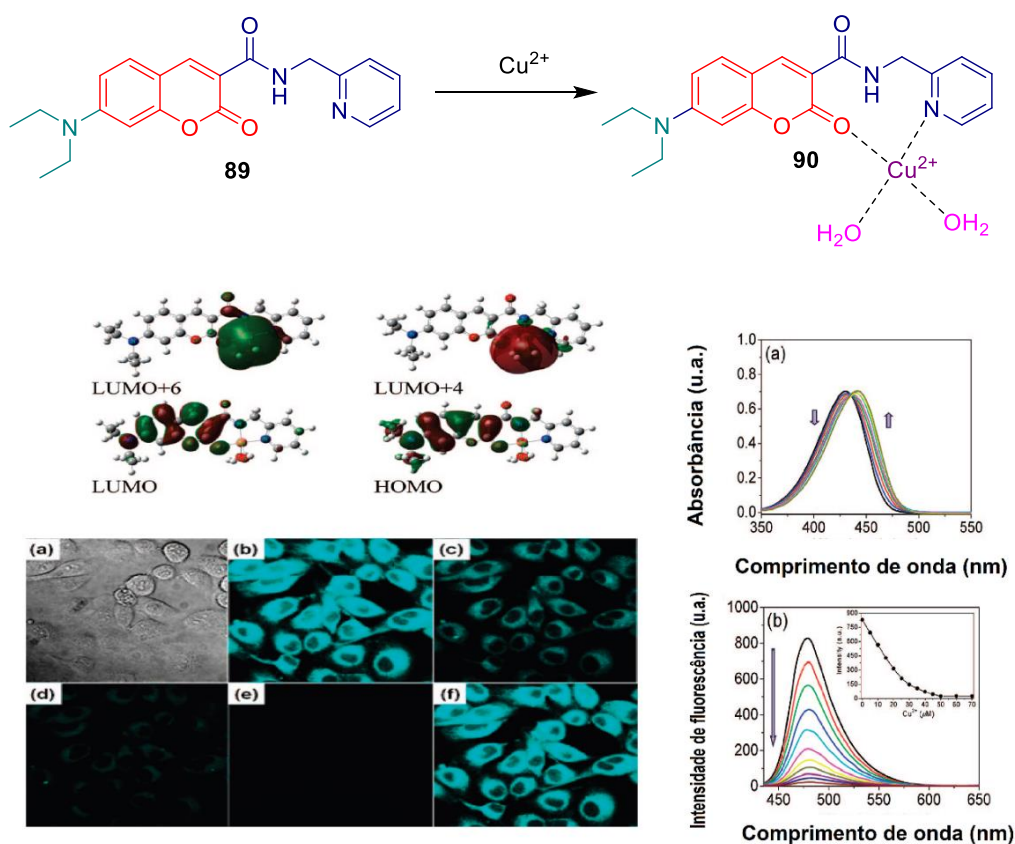
fluorescentes. Estes quimiossensores são estruturas moleculares que mudam suas características físico-químicas após uma interação com uma espécie química, no qual se produz um sinal detectável.<sup>69</sup> Nesse caso, derivados de cumarinas podem servir como ligantes seletivos para vários tipos de íons metálicos. O trabalho de Wu e colaboradores<sup>70</sup> exemplifica muito bem essas propriedades, os pesquisadores sintetizaram um derivado de cumarinas que na ausência de íons  $Zn^{2+}$  não apresenta emissão de fluorescência, já na presença desses íons a fluorescência é detectada. Os autores destacam que a isomerização da ligação C=N o principal mecanismo de decaimento no estado excitado. Esta rápida isomerização no estado excitado é primordial para inibição da fluorescência do ligante, e que quando há a complexação com íons  $Zn^{2+}$  não há uma rotação livre da ligação C=N e conseqüentemente uma se detecta de intensidade de fluorescência, já que se aumenta a rigidez estrutural do fluoróforo. Esta conclusão é confirmada pelo cálculo do rendimento quântico da espécie complexada (0,30), além das medidas de fluorescência, que cresce à medida que concentração de  $Zn^{2+}$  é acrescida.



**Figura 11.** Isomerização da ligação C=N no estado excitado de derivados de cumarina e espectros de absorção (a) e emissão (b) dos derivados na presença de Zn. <sup>70</sup> Adaptado com permissão de (Wu, J.-S.; Liu, W.-M.; Zhuang, X.-Q.; Wang, F.; Wang, P.-F.; Tao, S.-L.; Zhang, X.-H.; Wu, S.-K.; Lee, S.-T. *Org. Lett.* 2007, 9, 33) da American Chemical Society (2007).

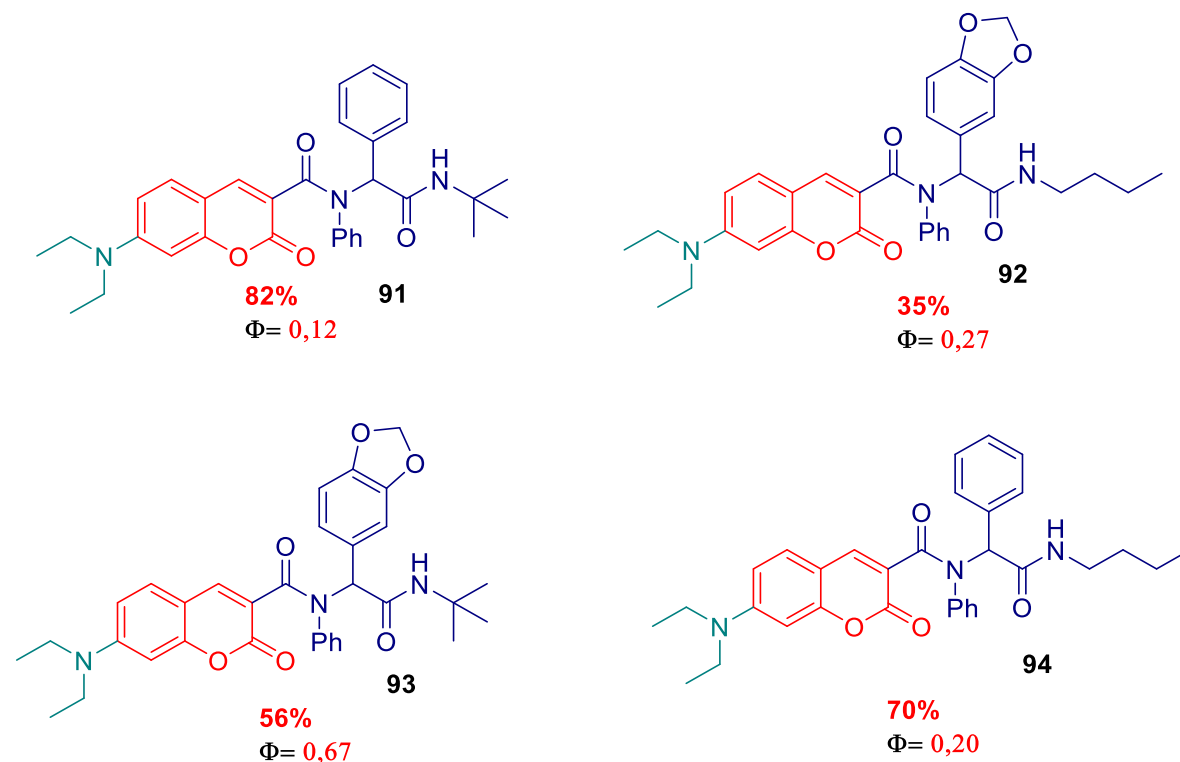
Kim e colaboradores<sup>71</sup> sintetizaram derivados ligantes seletivos (foram testados outros catorze íons, mas sem uma mudança significativa de intensidade de fluorescência) de íons  $Cu^{2+}$  e aplicaram esses

produtos em células LLC-MK2 (células epiteliais do rim de *macaco-rhesus*). Inicialmente os pesquisadores obtiveram espectros de absorção e emissão do composto em várias concentrações de  $\text{Cu}^{2+}$ . Adicionando 10 equivalentes do íon houve um deslocamento de 15 nm do máximo de absorção. Já na emissão de fluorescência, houve um decaimento da intensidade quando se adicionava mais íons  $\text{Cu}^{2+}$ , como pode ser visto na **Figura 12**. Os autores realizaram experimentos de fluorescência resolvida no tempo medidas em femtosegundos, para propor um mecanismo de transferência de energia da estrutura complexada. A supressão de fluorescência quando  $\text{Cu}^{2+}$  é adicionado pode ser explicado através do mecanismo de transferência de energia do ligante para o orbital D do metal e/ou transferência de carga do metal para o ligante (MLCT, do inglês *metal ligand charge transfer*). Foi reportado também o imageamento celular, onde os autores usaram células vivas de rins, no qual já é conhecido o acúmulo de  $\text{Cu}^{2+}$ . Inicialmente observou-se uma forte imagem fluorescente (**b**), na região perinuclear das células. Ao ser adicionado íons  $\text{Cu}^{2+}$  a imagem foi suprimida (**C**= 25  $\mu\text{m}$ , **D**= 50  $\mu\text{m}$ , **E**= 100  $\mu\text{m}$ ). A **Imagem F** representa o fluoróforo livre de  $\text{Cu}^{2+}$  na presença de EDTA (500  $\mu\text{m}$ ) e o retorno da intensidade de fluorescência, **Figura 15**.



**Figura 12.** Derivado de cumarina na ausência e presença de  $\text{Cu}^{2+}$ . Orbitais de fronteira relevantes da estrutura (89) para supressão de fluorescência. Espectros de absorção (a) e emissão (b) dos derivados na presença de várias concentrações de  $\text{Cu}^{2+}$ . Bioimageamento do composto fluorescente (a) campo claro de células LLC-MK2 (b) 5  $\mu\text{M}$  de  $\text{Cu}^{2+}$  (c) 25  $\mu\text{M}$  de  $\text{Cu}^{2+}$  (d) 50  $\mu\text{M}$  de  $\text{Cu}^{2+}$  (e) 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{Cu}^{2+}$  (f) Adição de 500  $\mu\text{M}$  EDTA para o sequestro de  $\text{Cu}^{2+}$  e o retorno da intensidade de fluorescência. Adaptado com permissão de (Jung, H. S.; Kwon, P. S.; Lee, J. W.; Kim, J. I.; Hong, C. S.; Kim, J. W.; Yan, S.; Lee, J. Y.; Lee, J. H.; Joo, T.; Kim, J. S. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 2008) da American Chemical Society (2009).

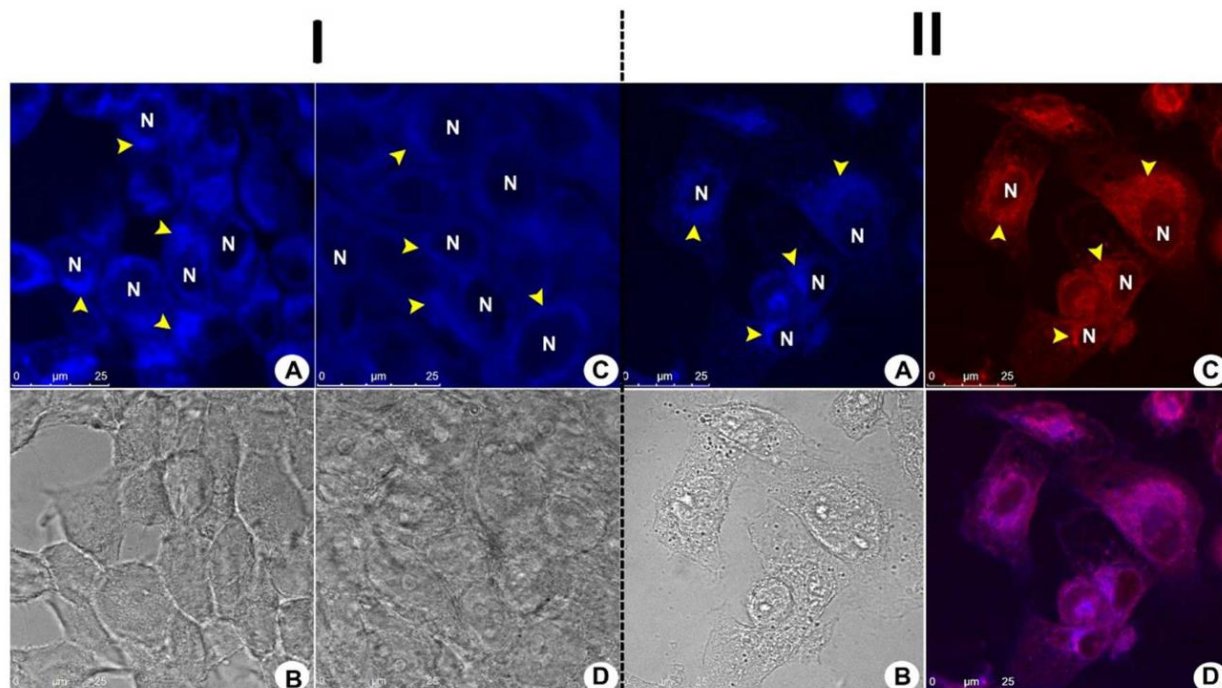
Derivados de cumarinas também podem ser usadas como sondas fluorescentes sem a necessidade de estar complexada com algum metal. É o exemplo de Silva e colaboradores<sup>72</sup> preparam pseudopeptídeos derivados de cumarinas fluorescentes a partir de reação multicomponente de Ugi. Essas moléculas (**Figura 13**) foram preparadas a partir de um derivado de cumarina fluorescente, com substituições na posição **3** e **7** com o objetivo de se obter uma maior emissão de fluorescência. Vale ressaltar ainda que este trabalho foi fruto da dissertação de mestrado do autor, concluído no ano de 2016.



**Figura 13.** Rendimentos e rendimentos quânticos de peptídeos cumarínicos fluorescentes.<sup>72</sup>

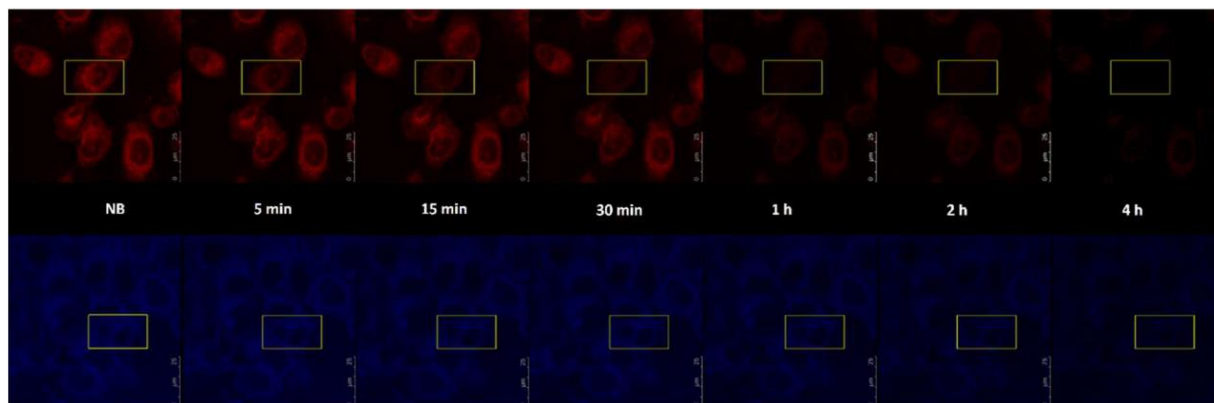
Estes produtos foram inseridos em células MCF-7 (linhagem celular de adenocarcinoma de mama humano, **Figura 14**) e um produto específico (**93**) foi seletivo para marcação de mitocôndrias, localizada na região perinuclear da célula MCF-7.





**Figura 14.** Perfil de fluorescência de células MCF-7 incubadas com o peptídeo **(93)** (10 nM, emissão azul). (I) As **Figuras A e C** mostram amostras de células vivas e fixas, respectivamente. A **Figuras B e D** mostram os aspectos morfológicos normais das amostras por microscopia de contraste de fase. As setas amarelas mostram o padrão de coloração fluorescente (azul), que foi concentrado em uma região celular restrita perto dos núcleos das células, ou seja, concentrado na mitocôndria. (II) Perfis fluorescentes de células MCF-7 incubadas com peptídeo **(93)** e **MitoTracker Red**. As **Figuras A e C** mostram padrões de fluorescência de células incubadas com peptídeo **(93)** e **MitoTracker Red**, respectivamente. As setas amarelas indicam a região de acumulação de citoplasma das mesmas células para ambos os marcadores. (D) Imagem produzido pela sobreposição (roxa) das imagens de fluorescência azul **(93)** e vermelha (**MitoTracker Red**) das Figuras A e C para comprovar o acúmulo de **(93)** nas mitocôndrias. (B) Aspectos morfológicos das amostras por microscopia de contraste de fase. Barra de escala de referência de 25 µm.  
<sup>72</sup> Adaptado com permissão de (Passos, S. T. A.; Correa, J. R.; Soares, S. L. M.; da Silva, W. A.; Neto, B. A. D. *J. Org. Chem.* 2016, *81*, 2646) da American Chemical Society (2016).

Foram realizados experimentos de fotobranqueamento com o objetivo de saber a estabilidade de fluorescência ao longo do tempo. O peptídeo **(93)** se mostrou muito mais estável comparado ao marcador comercial **MitoTracker Red**, seletivo para mitocôndrias, em quatro horas de experimento a emissão de fluorescência do marcador comercial já estava quase completamente suprimida, entretanto em quatro horas o composto ainda tinha uma fluorescência intensa e bem definida, como pode ser visto na **Figura 15**.

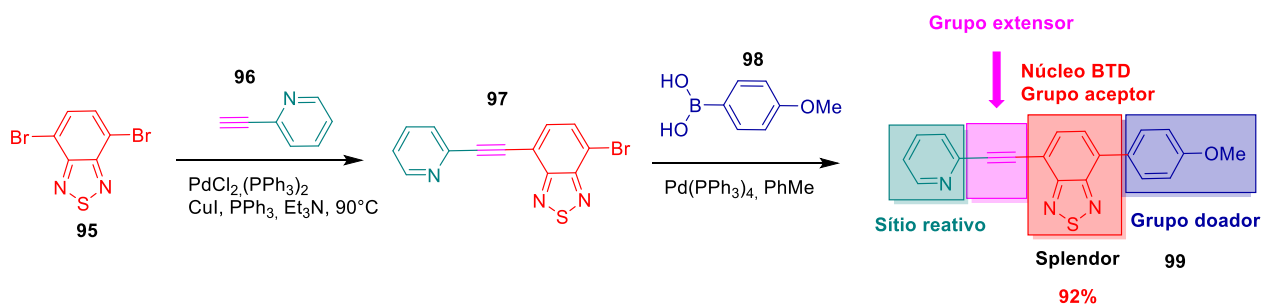


**Figura 15.** Emissões de fluorescência (**93**) e **MitoTracker Red** após fotobranqueamento. Os retângulos amarelos são as regiões de interesse (ROI) analisadas. <sup>72</sup> Adaptado com permissão de (Passos, S. T. A.; Correa, J. R.; Soares, S. L. M.; da Silva, W. A.; Neto, B. A. D. *J. Org. Chem.* 2016, 81, 2646) da American Chemical Society (2016).

## 1.4. Benzotiadiazolas

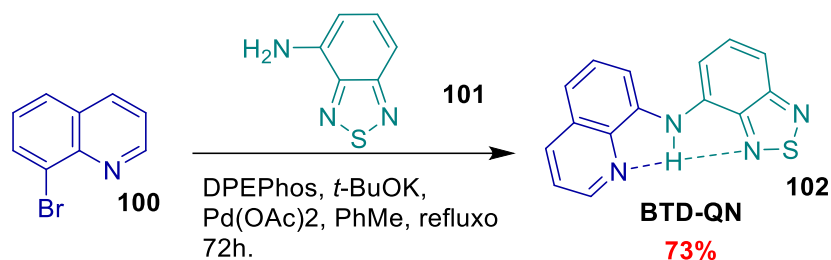
Derivados  $\pi$ -estendidos de benzotiadiazolas (BTD) são moléculas luminescentes conhecidas por suas inúmeras aplicações em química biológica. Elas são bicíclios fundidos formados por um anel aromático e um núcleo tiazola e as suas propriedades fotofísicas estão diretamente relacionadas com sua estrutura. O artigo de revisão de Neto e colaboradores <sup>73</sup> enumera tais características destes derivados de BTD que justifica a importância destas moléculas. Os autores reportaram que **(I)** Derivados de BTD são geralmente fluoróforos eficientes e estáveis, mesmo em estados excitados. **(II)** O anel BTD tem uma forte capacidade de retirada de elétrons o que facilita o processo de estabilização por ICT. **(III)** BTDs normalmente proporcionam estruturas cristalinas bem ordenadas devido a sua alta polarizabilidade e interações  $\pi - \pi$ . **(IV)** BTDs fluorescentes normalmente exibem grandes deslocamentos de Stokes. **(V)** Emissão de fluorescência de sondas fluorescentes baseadas em BTD geralmente não desaparecem mesmo após longos períodos de irradiação. **(VI)** BTDs normalmente exibem emissão constante durante os períodos de tempo de imageamento celular. **(VII)** A relação sinal-ruído, é normalmente aceitável para sondas fluorescentes derivadas de BTD. **(VIII)** Quase todas as BTDs descritas na literatura usadas como sondas em bioimageamento são capazes de transpor a membrana celular (com algumas exceções), uma característica primordial para a eficiência das mesmas. **(IX)** BTDs podem ser armazenados por tempos muito longos em temperatura ambiente. **(X)** Sinais de emissão de autofluorescência das células podem ser evitadas utilizando derivados de BTD, já que elas são normalmente excitadas na região do visível e facilitando a diminuição da intensidade do laser. **(XI)** Cálculos teóricos podem ser usados como uma ferramenta importante para prever as propriedades fotofísicas de derivados de BTD.

Apesar de apresentarem características importantes em aplicações de imageamento celular, as BTDs só começaram a serem usadas em aplicações biológicas há apenas 14 anos atrás, em 2007. Neto e colaboradores <sup>74</sup> preparam derivados de BTDs como moléculas capazes de detectar seletivamente o DNA. Sete anos depois, em 2014, Neto e colaboradores <sup>75</sup> usaram uma das estruturas de Neto (agora chamada de **Splendor**) e realizaram estudos de imageamento celular. Esta estrutura se mostrou uma sonda extremamente seletiva, capaz de transpor a membrana plasmática e corar mitocôndrias.



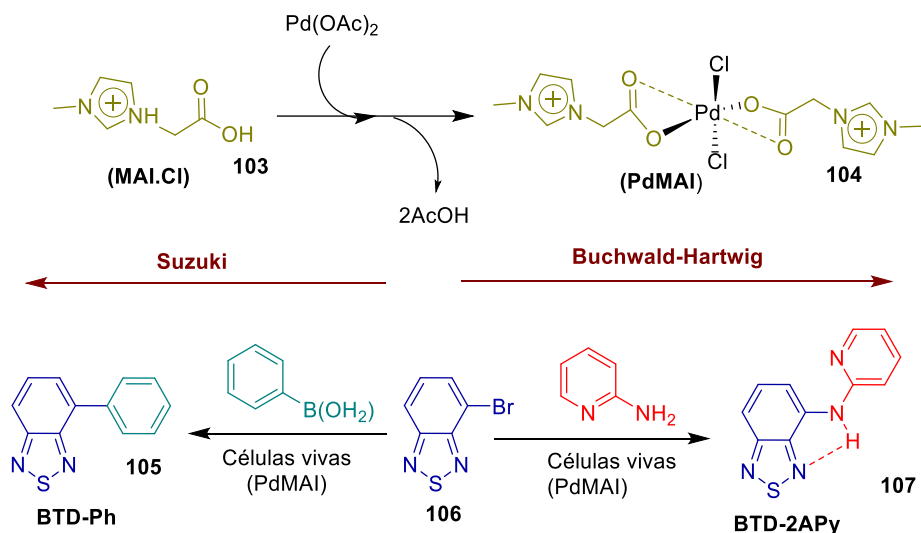
**Esquema 9.** Síntese da sonda fluorescente **Splendor** <sup>75</sup>

Um exemplo recente da versatilidade de derivados de BTD é o artigo de Neto e colaboradores.<sup>76</sup> Os autores reportaram uma nova sonda fluorescente baseada em BTD e quinolina. Esta sonda se mostrou seletiva para gotas lipídicas após experimentos de bioimageamento em células de Caco-2 (células de adenocarcinoma de colorretal humano). Os autores também realizaram estudos *in vivo* em *C. elegans*, sendo o novo derivado um melhor marcador que o próprio marcador comercial BODIPY. Finalmente os autores realizaram estudos de cirurgia em ratos vivos. Os autores constataram um acúmulo de fluorescência nos adipócitos (responsável pelo acúmulo de gordura e ricos em lipídios) dos ratos.



**Esquema 10.** Síntese da sonda fluorescente **BTD-QN**.<sup>76</sup>

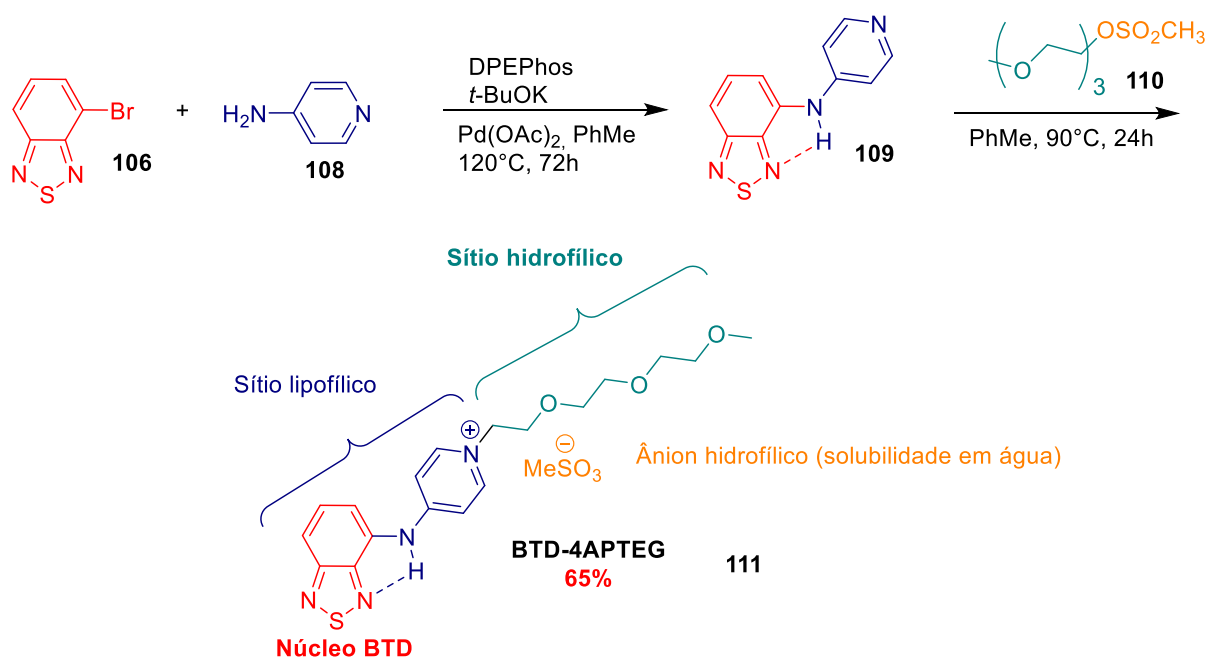
O trabalho de Neto e colaboradores de 2019<sup>77</sup> descreve pela primeira vez a preparação de derivados de BTD intracelular. Esta síntese não é simples devido ao alto grau de complexidade do ambiente celular. Para isso os autores utilizaram um catalisador baseado em Paládio e um líquido iônico de tarefa específica (TSIL, do inglês *task specific ionic liquid*) solúvel em água e prepararam dois derivados (**BTD-Ph** e **BTD-2APy**). Os pesquisadores monitoraram a formação do produto por meio de experimentos de bioimageamento. Sendo estes dois derivados específicos para mitocôndrias era possível observar um acúmulo de emissão de fluorescência nesta região no decorrer do tempo. E, pela primeira vez, a aminação de Buchwald-Hartwig foi realizada de forma intracelular.



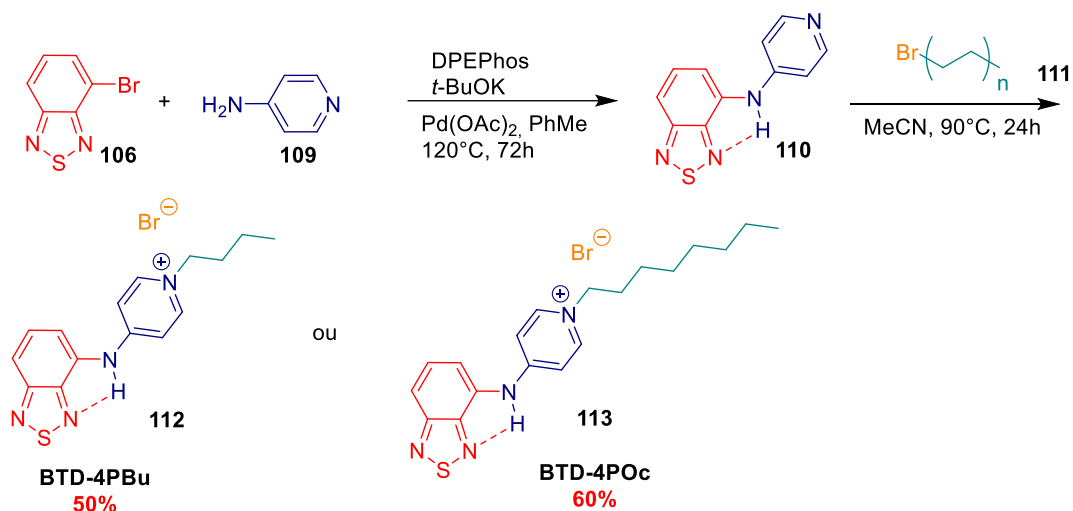
**Esquema 11.** Síntese intracelular de duas sondas fluorescentes **BTD-Ph** e **BTD-2APy**.<sup>77</sup>

Outros dois trabalhos de Neto e colaboradores mostram que derivados de BTD podem ser sondas seletivas para membrana plasmática e mitocôndrias. No primeiro trabalho <sup>78</sup> os autores preparam derivados de BTD seguindo o protocolo de aminação de Buchwald-Hartwig usando bromo-BTD e amino piridina. Posteriormente, foi adicionado uma cadeia lipofílica na estrutura. O produto final (**BTD-4APTEG**) é um sal solúvel em água. Os autores reportaram uma excelente fotoestabilidade e altos deslocamentos de Stokes. Finalmente estudos de bioimageamento foram realizados demonstrando que a **BTD-4APTEG** possuía uma grande afinidade pela membrana plasmática, devido ao design racional realizados pelos autores e mostrado no esquema abaixo.

No artigo publicado em 2020 os autores sintetizaram derivados de BTD neutros, carregados (**BTD-4PBu**) e duplamente carregados (**BTD-4POc**) com intuito de selecionar mitocôndrias. <sup>79</sup> Primeiramente, os autores planejaram o derivado com a presença de um cátion trifenilfosfônico, este cátion permite que as sondas fluorescentes adentrem à membrana plasmática e interajam (e marquem) as mitocôndrias. O derivado de carga simples se mostrou seletivo para a organela desejada, enquanto o produto duplamente carregado (e com o cátion trifenilfosfônico), de forma totalmente inesperada, mostrou preferência em corar a membrana plasmática com alta seletividade. Os autores confirmaram tal marcação com experimentos de co-marcação usando o marcador comercial de mitocôndrias **MitoTracker Red** e o marcador comercial de membrana plasmática **CellMask**. Além disto experimentos de EPR (do inglês, *electron paramagnetic resonance*) foram realizados para o marcador de mitocôndrias **BTD-4PBu**. A estrutura não mostrou ser interferente na produção de espécies reativas de oxigênio.

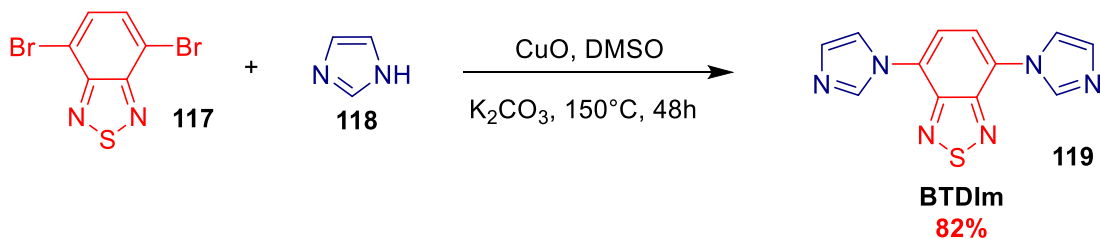


**Esquema 12.** Síntese da **BTD-4APTEG**. <sup>78</sup>



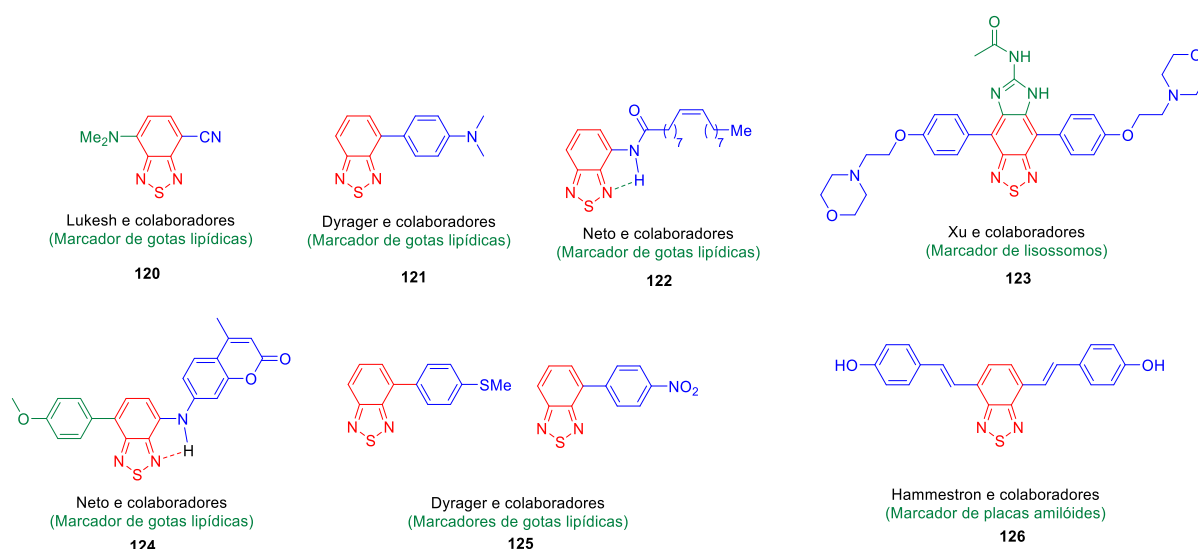
**Esquema 13.** Síntese da **BTD-4PBu**, **BTD-4POc** e **BTD-4APBuP**.<sup>79</sup>

O trabalho de Neto e colaboradores de 2020 mostra um novo derivado contendo um núcleo BTD e um núcleo imidazol.<sup>80</sup> A estrutura do imidazol que permite ligações de hidrogênios torna o produto solúvel em água, o que é muito atrativo para experimentos de bioimageamento. Os autores reportaram uma grande fotoestabilidade, devido ao processo de estabilização ICT, além de altos deslocamentos de Stokes. Por fim, os autores realizaram experimentos de imageamento celular e a sonda se mostrou seletiva para lisossomos. Outras moléculas deste mesmo trabalho não apresentaram seletividade para uma organela específica, permanecendo dispersar na região citoplasmática.



**Esquema 14.** Síntese da **BTDIm**.<sup>80</sup>

Outros trabalhos recentes contribuem para os estudos de aplicações biológicas empregando derivados de BTB. Neto e colaboradores<sup>81,82</sup> e Lukesh e colaboradores<sup>83</sup> prepararam derivados de amino-BTB substituídas seletivas para gotas lipídicas. Já Dyrager e colaboradores<sup>84,85</sup> sintetizaram derivados de BTB via acoplamento de Suzuki catalisada por paládio, as três moléculas foram altamente seletivas também para gotas lipídicas. Xu e colaboradores<sup>86</sup> sintetizaram derivados de BTB com um grupo imidazol fundido e reportaram uma grande preferência pelos lisossomos, além disso realizaram o bioimageamento em diferentes concentrações de pH (5-8) e constataram um decréscimo de emissão de fluorescência com o aumento do pH. Hammestron e colaboradores<sup>87</sup> desenvolveu uma sonda capaz de interagir seletivamente com as placas amilóides, que aparacem devido ao acúmulo anormal de peptídeos  $\beta$ -amilóides. Este excesso de peptídeos  $\beta$ -amilóides são tóxicos para os neurônios e é um dos principais causadores do Mal de Alzheimer.



**Figura 16.** Exemplos de híbridos de BTB fluorescentes com aplicações em bioimageamento.<sup>81-87</sup>

Com todos estes exemplos mostrados e discutidos nesta introdução é mais que justificável continuar explorando a área não só de cumarinas e benzotiadiazolas, mas estudando híbridos fluorescentes de maneira geral. Pequenas modificações estruturais podem mudar completamente a maneira que estas moléculas se comportam no meio celular. Portanto se torna cada vez mais necessário o aprimoramento do design racional para a preparação de novas moléculas, com o intuito de aumentar sua seletividade e, seguindo os princípios da bioortogonalidade, ou seja, é necessária uma interação celular seletiva sem a possibilidade de ocorrer reações paralelas nos componentes celulares presentes de forma natural no meio intracelular. A bioortogonalidade é indispensável para a aquisição de novas sondas fluorescentes aplicadas em biologia celular. Com todas estas condições em mente, o design racional de novos híbridos fluorescentes foi seguido tentando contemplar todos os parâmetros listados ao longo da introdução do trabalho. Sempre buscando uma melhor seletividade/direcionalidade como consequência de pequenas modificações estruturais dos núcleos principais

## **2. Objetivos**

### **2.1. Gerais**

Os objetivos gerais baseiam-se na síntese, caracterização, análise fotofísica, realização de cálculos teóricos e estudos de imageamento celular de derivados de cumarinas fluorescentes.

### **2.2. Específicos**

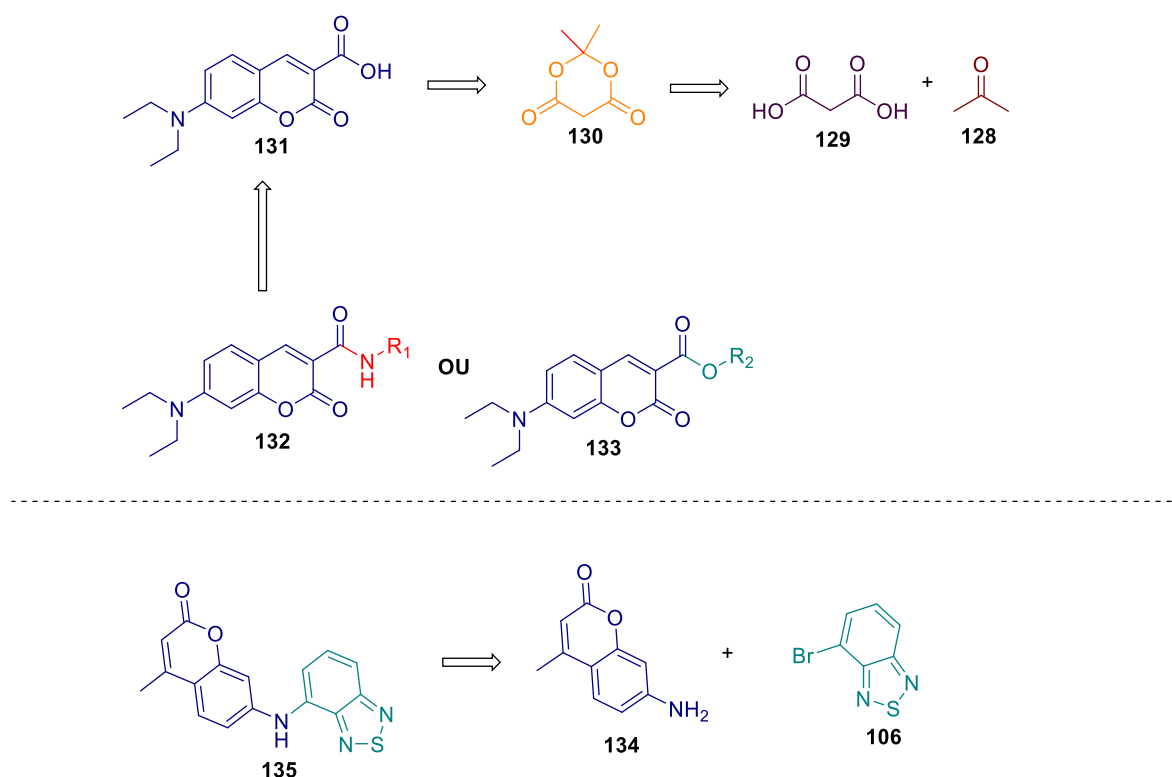
1. Síntese e caracterização de híbridos fluorescentes.
2. Análise fotofísica dos híbridos fluorescentes sintetizados.
3. Estudos teóricos das estruturas mais promissoras para o bioimageamento.
4. Testes de imageamento celular, estudo quantitativo de intensidades de fluorescência, testes de estabilidades e testes *in vivo* com embriões de *Zebrafish*.



### 3. Resultados e Discussão

A proposta inicial de pesquisa nessa etapa do trabalho foi sintetizar compostos fluorescentes com procedimento versátil, envolvendo apenas uma etapa reacional com purificação simplificada, além de características fotofísicas, como alto deslocamento de Stokes, rendimentos quânticos razoáveis, altos valores de absorvidade molar, espectros de absorção e espectros de emissão bem definidos. Com essas motivações foi necessário encontrar a reação que mais se adequasse à proposta de versatilidade, baixo custo, rapidez e fácil purificação. Foram testados vários métodos para a formação de amidas e ésteres, o que se destacou foi o método que utiliza pyBOP como agente de acoplamento, utilizando a metodologia de Hawker e colaboradores.<sup>88</sup> Então foi necessário a preparação de um derivado de cumarina com um grupo ácido carboxílico para posterior transformação em amidas e ésteres com uma potencial aplicação biológica.

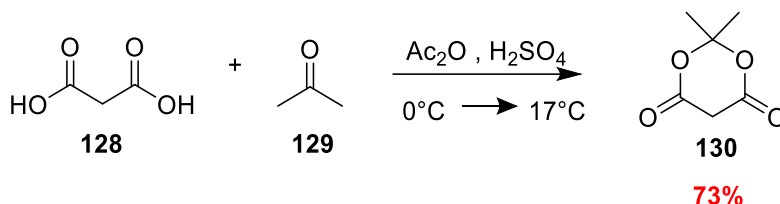
De forma geral, a parte sintética do trabalho se deu com a preparação do ácido de Meldrum (**130**) usado como precursor na preparação do derivado ácido da cumarina (**131**), via condensação de Knoevenagel com o aldeído derivado de salicilaldeído (**136**). Após purificação iniciou-se as reações de acoplamento para a formação de amidas e ésteres fluorescentes, visto no **Esquema 15**.



**Esquema 15.** Representação geral da retrossíntese dos derivados de cumarinas.

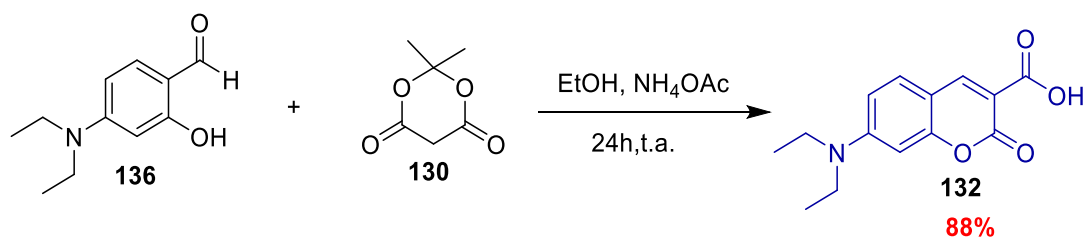
### 3.1. Síntese de Derivados de Cumarinas Fluorescentes

A primeira etapa da síntese (**Esquema 16**) envolveu a preparação do ácido de Meldrum (**130**), o reagente necessário para a preparação do derivado ácido de cumarina (**131**). Esse reagente foi preparado utilizando acetona P.A e ácido malônico (**128**) na presença de anidrido acético, através de uma reação de condensação, sendo catálise ácida fundamental para o sucesso da reação. Foram obtidos cristais de ácido de Meldrum com 73% de rendimento após recristalização em acetona. A caracterização foi realizada por ressonância magnética nuclear de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (**Figuras S1 e S2**).



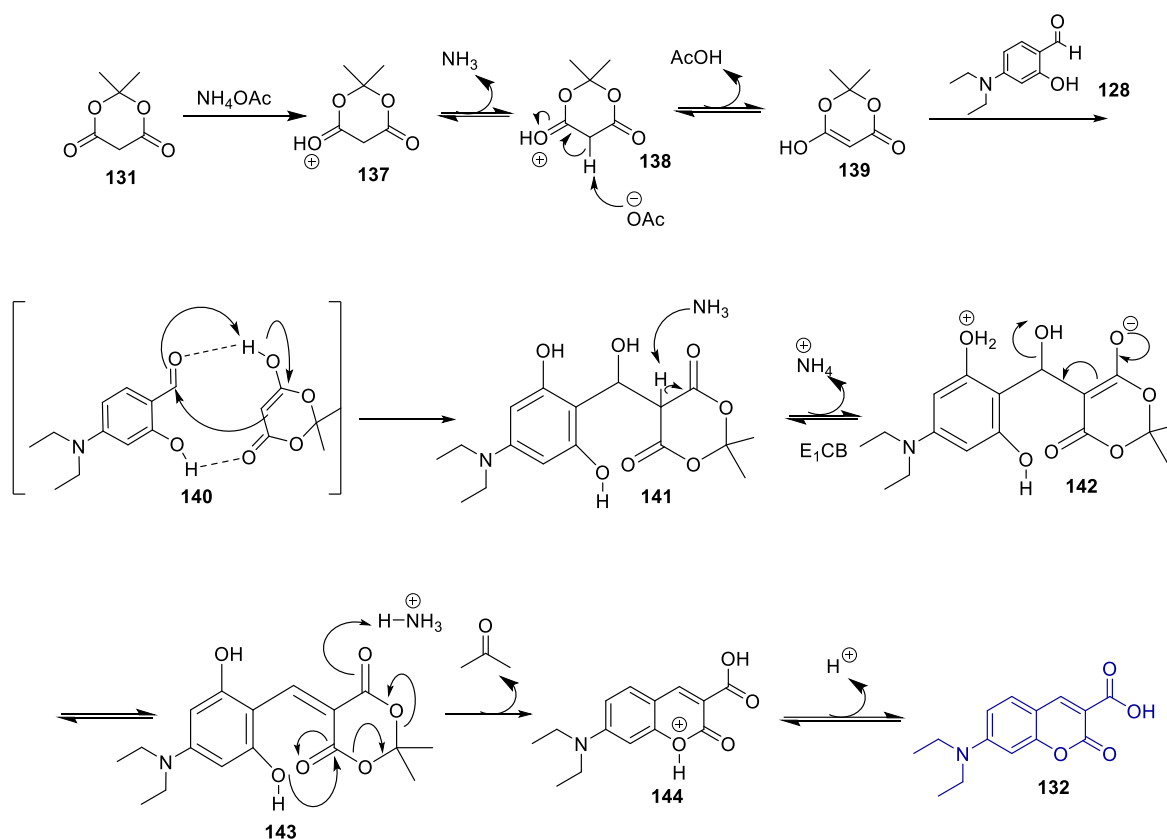
**Esquema 16.** Síntese do ácido de Meldrum.

A síntese da molécula (**131**) se processou via reação de condensação de Knoevenagel (**Esquema 17**), utilizando 3- dietilamino salicilaldeído (**136**) (10 mmol) e ácido de Meldrum (**127**) em excesso (12 mmol) na presença de etanol e  $\text{NH}_4\text{OAc}$ . O tempo reacional foi de 24h e o precipitado formado foi recristalizado em etanol. O 7-dietilamino 3- ácido carboxílico cumarina foi obtido em 88% de rendimento e caracterizado por  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  RMN.



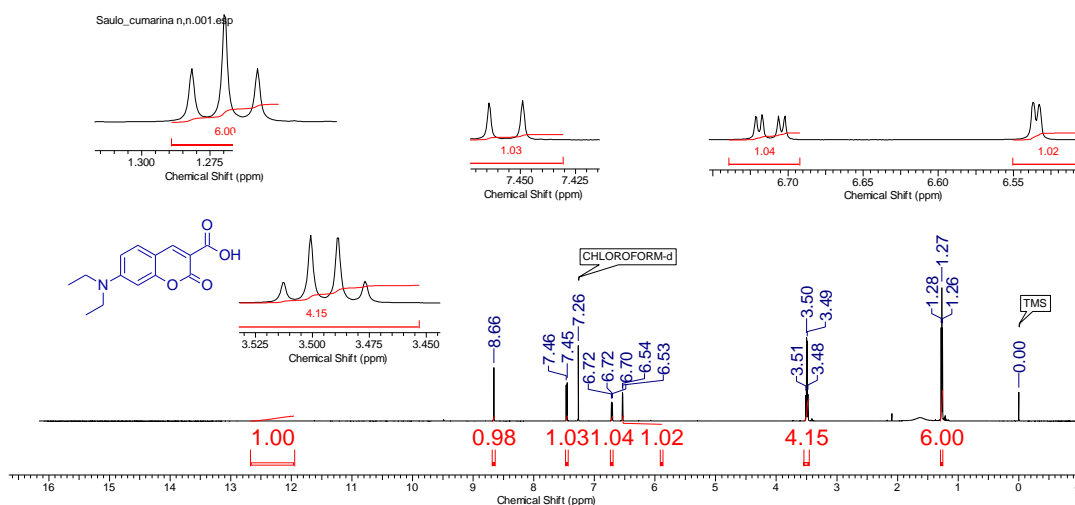
**Esquema 17.** Síntese da 7-dietilamino 3- ácido carboxílico cumarina.

Como dito anteriormente, a reação da formação do derivado ácido de cumarina se dá pela condensação de Knoevenagel.<sup>63</sup> O mecanismo se inicia com a protonação da carbonila do ácido de Meldrum seguida pela abstração de um próton ácido do carbono  $\alpha$  do ácido de Meldrum ( $\text{pK}_a = 4,97$ )<sup>89</sup> pelo íon acetato. Em seguida, a adição do enolato na carbonila do aldeído substituído (**95**) e a desidratação do intermediário via  $\text{E}_1\text{CB}$  (**142**). O último passo do mecanismo é a ciclização da estrutura (**144**) em consequência da perda de uma molécula de acetona para formar o derivado de cumarina. O mecanismo de Knoevenagel para reação de preparação do composto pode ser visto no **Esquema 18**.



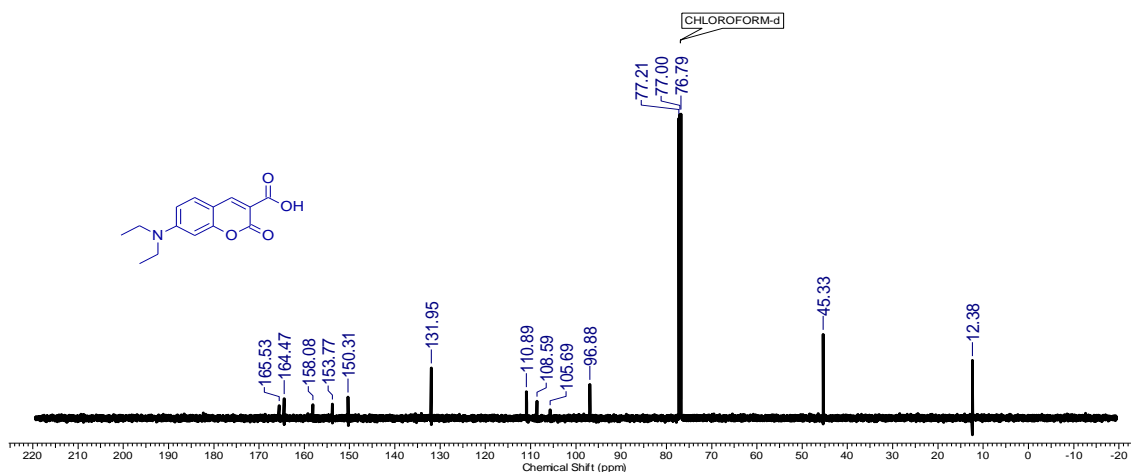
**Esquema 18.** Mecanismo proposto para reação de formação do derivado de cumarina. <sup>63</sup>

Pelo espectro de  $^1\text{H}$  RMN (**Figura 17**) do composto 3-ácido carboxílico 7-dietilamino cumarina, que o sinal diagnóstico da estrutura é o hidrogênio que está em 8,68 ppm, correspondente ao  $\text{H}_4$  da estrutura, esse hidrogênio mostra que houve ciclização do intermediário (**143**). O tripleto ( $J = 7,2\text{Hz}$ ) entre 1,27 ppm são os seis hidrogênios terminais do grupo dietilamino. Já o quarteto ( $J = 7,1\text{Hz}$ ) em 3,50 ppm representam os quatro hidrogênios vizinhos ao nitrogênio do grupo dietilamino. O duplo dubleto ( $J_1 = 9,2\text{Hz}$  e  $J_2 = 2,6\text{Hz}$ ) em 6,71 ppm, o dubleto ( $J = 9,2\text{Hz}$ ) em 7,46 ppm, o dubleto ( $J = 2,6\text{Hz}$ ) em 6,53 ppm são os hidrogênios aromáticos do derivado. O singlete em 12,23 ppm representa o hidrogênio do ácido carboxílico da estrutura.



**Figura 17.** Espectro de <sup>1</sup>H RMN 600 MHz (CDCl<sub>3</sub>) da cumarina (**132**).

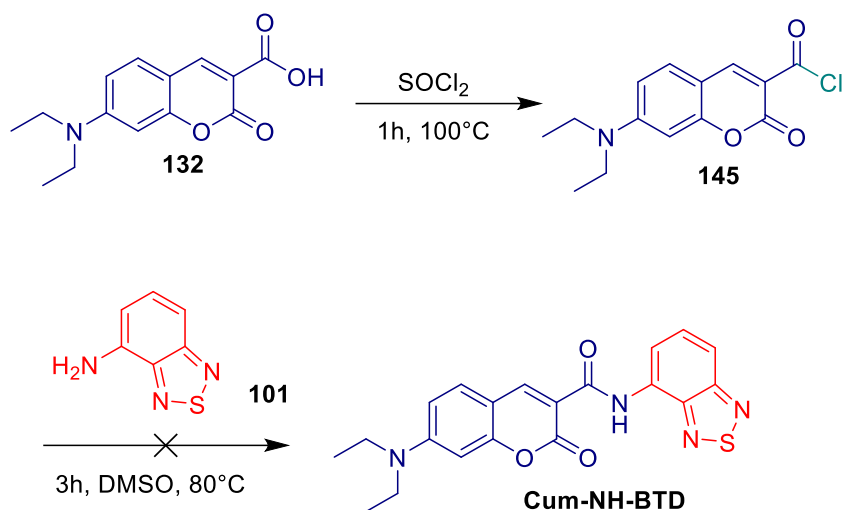
No espectro de <sup>13</sup>C (**Figura 18**) os picos que demonstram a formação do composto são os que se referem as carboxilas do ácido carboxílico e da lactona e são respectivamente, o sinal em 165,5 ppm e o sinal em 164,5 ppm. Os sinais em 45,3 ppm e 12,4 ppm são dos grupos etila presentes e os demais representam carbonos aromáticos.



**Figura 18.** Espectro de <sup>13</sup>C RMN 150 MHz (CDCl<sub>3</sub>) cumarina (**132**).

Com a 7-(dietilamino) -cumarina-3-ácido carboxílico já purificada foi a vez de sintetizar os compostos finais. Para os primeiros testes das sínteses utilizou-se como metodologia a preparação do cloreto de acila do derivado (**131**), visto no **Esquema 19**, e na seqüência adicionou-se a amina ou o álcool para fazer o respectivo composto. Para a preparação do cloreto de ácido o cloreto de tionila (SOCl<sub>2</sub>) foi

colocado na mistura reacional após uma destilação simples. Mesmo realizando a destilação do reagente e deixando o sistema livre de água sob atmosfera inerte, as reações não forneceram os produtos desejados.



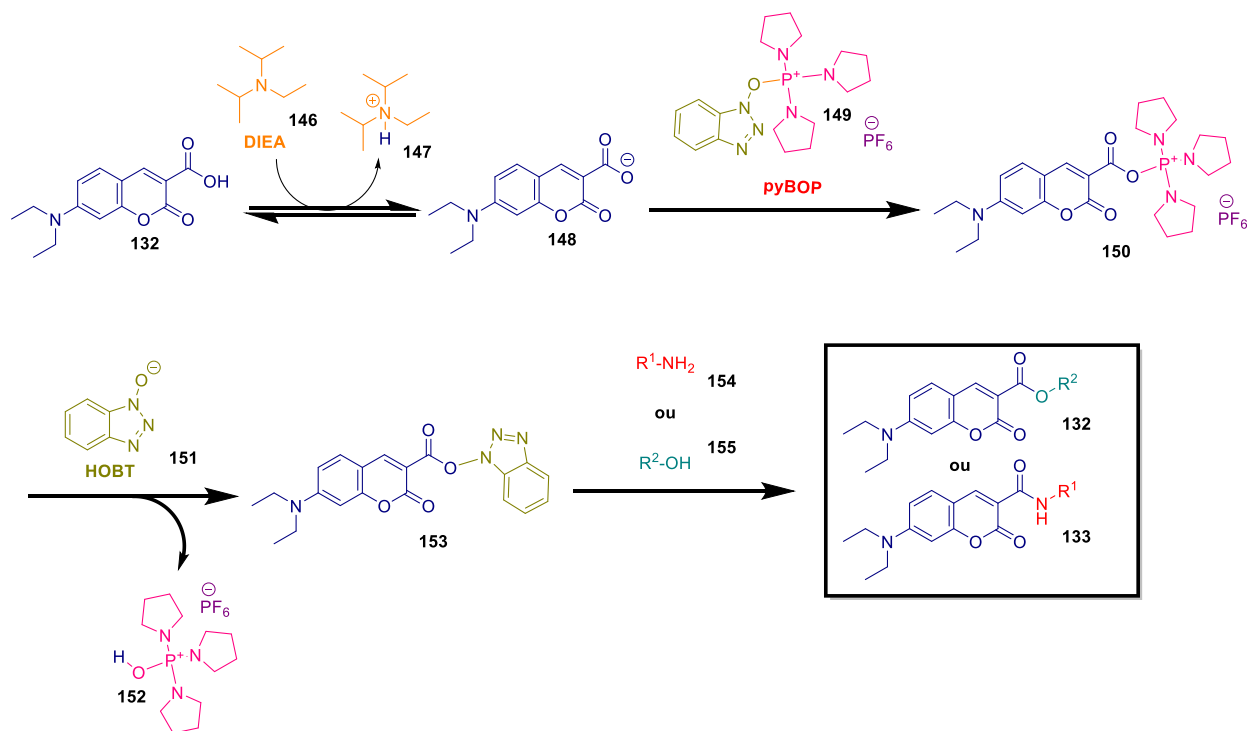
**Esquema 19.** Tentativa de síntese da estrutura **Cum-NH-BTD** utilizando a metodologia do  $\text{SOCl}_2$ .

Após várias tentativas, trocando o tempo reacional e temperatura, a metodologia de cloreto de ácido foi descartada, já que não se observou a formação de produto. A metodologia de Hawker e colaboradores,<sup>88</sup> se mostrou bastante interessante pois sintetizava compostos semelhantes, em temperatura ambiente e com rendimentos elevados, utilizando o reagente de acoplamento de peptídeo pyBOP na presença de uma base forte DIEA.

**Tabela 1.** Tentativas de preparação da **Cum-NH-BTD**.

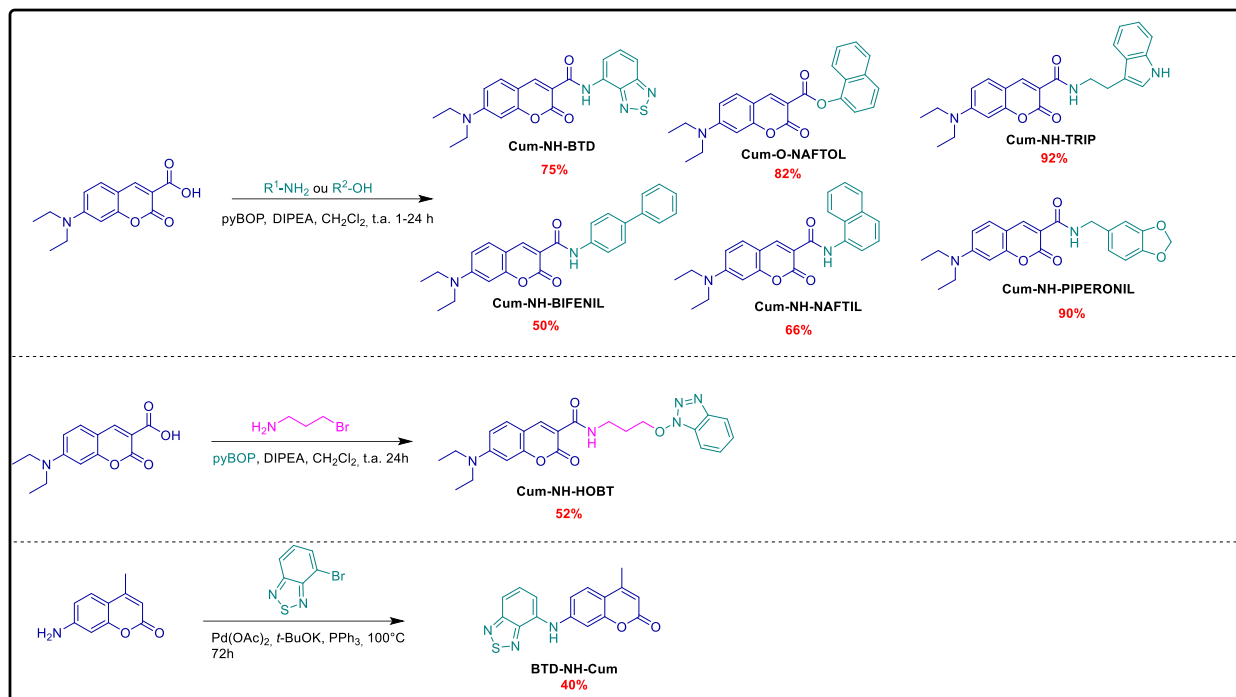
Temperatura ( $^\circ\text{C}$ )	Tempo (h)	Rendimento (%)
60	3	-
70	1	-
70	3	-
80	1	-
80	2	-
80	3	-
80	5	-
80	24	-
90	1	-
90	24	-
100	1	-
100	3	-
100	24	-

O mecanismo da reação (**Esquema 20**) de formação de amidas e ésteres usando um agente de acoplamento se dá da seguinte forma: primeiramente o próton do ácido carboxílico é abstraído pela base, nesse caso a (*N,N*-diisopropiletilamina) DIEPA, em seguida acontece o ataque do carboxílico no fósforo com carga positiva e quebra da ligação P-O. Posteriormente, o grupo hidroxibenzotriazol (HOBT) é adicionado a carboxila do intermediário (**150**), formando o intermediário (**153**). A última etapa da reação é exatamente o ataque do grupo amina ou hidroxila e a saída do núcleo HOBT para a formação do respectivo grupo amida ou éster (**132-133**).<sup>90,91</sup>



**Esquema 20.** Mecanismo proposto para formação de amidas e ésteres.<sup>90,91</sup>

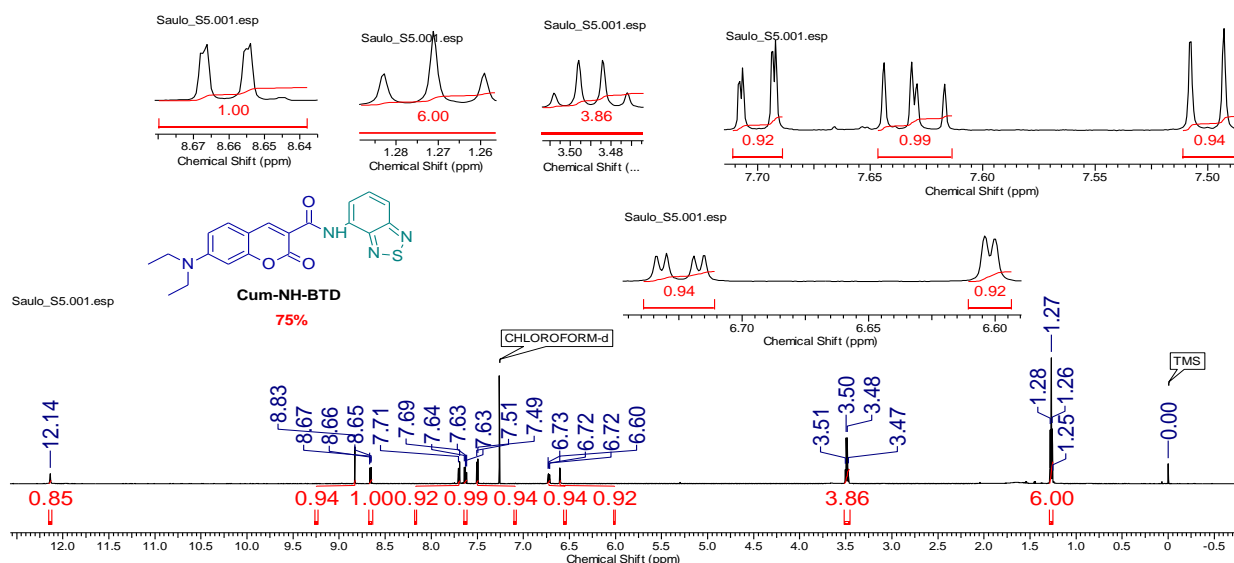
A metodologia de acoplamento direto foi bastante efetiva, e com isso foram sintetizadas oito compostos, usando diferentes tipos de aminas aromáticas e fenóis. Os rendimentos reacionais foram variados e satisfatórios, bem como as técnicas de purificação eficientes. Todos os produtos foram caracterizados por <sup>1</sup>H RMN, <sup>13</sup>C RMN, além de espectrometria de massas. As estruturas dos compostos são mostradas na **Esquema 21**.



**Esquema 21.** Estruturas dos compostos sintetizados.

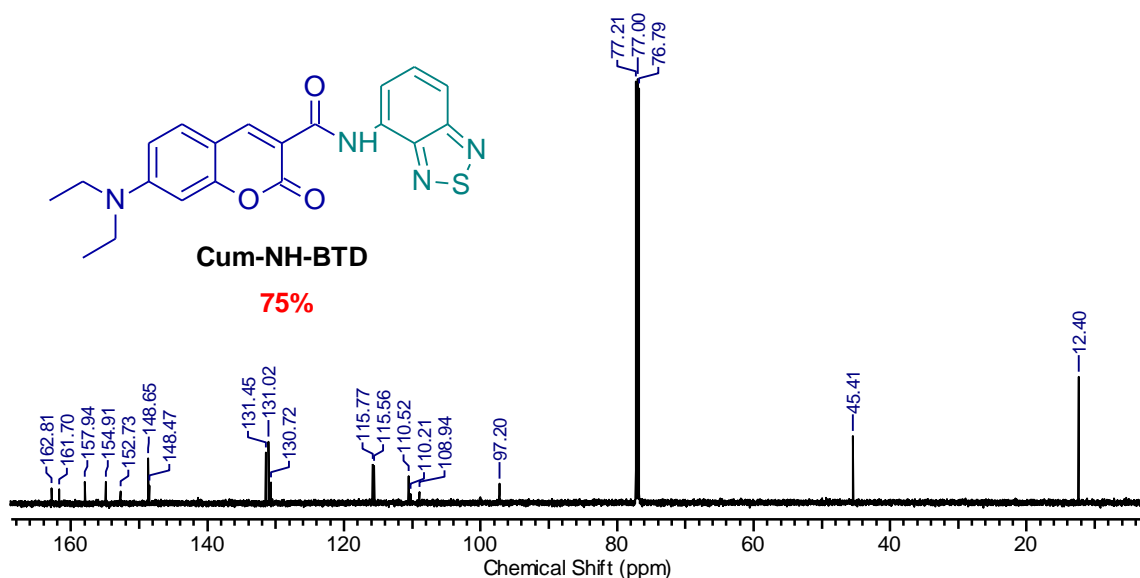
Os núcleos acoplados no derivado de cumarina já é visto como potenciais sondas fluorescentes utilizada para imageamento celular, é o caso por exemplo do núcleo benzotiadiazola (BTD) que já foi utilizado em vários trabalhos<sup>34,73,81,82,92</sup> e já está consolidado como um excelente biomarcador. O composto **Cum-NH-BTD** foi sintetizado com o intuito de se ter um uma parte altamente fluorescente, no caso o derivado de cumarina e outra parte com um alto potencial seletivo para imageamento celular, no caso o grupo BTD, além de uma extensão do sistema  $\pi$ -conjugado favorecendo a estabilização por ICT.

O produto **Cum-NH-BTD** foi caracterizado via ressonância magnética nuclear e espectroscopia de massas. No  $^1\text{H}$  RMN (**Figura 19**) o sinal diagnóstico da formação do produto é o singlete em 12,14 ppm que representa o hidrogênio da amida. Vale ressaltar também, o singlete em 8,83 ppm que representa o hidrogênio da instauração do núcleo cumarina, este agora mais desblindado quando comparado ao reagente (**132**). O tripleto em 1,27 ppm e o quarteto em 3,49 ppm são os 10 hidrogênios do grupo amina substituído na posição 7 do grupo cumarina.



**Figura 19.**  $^1\text{H}$  RMN 600MHz ( $\text{CDCl}_3$ ) da **Cum-NH-BTD**.

No  $^{13}\text{C}$  RMN (**Figura 20**) o sinal em 162,8 ppm representa o carbono ( $\text{C}_0$ ) da amida, o sinal principal para comprovar a formação do produto. O sinal em 161,7 ppm representa a lactona da cumarina. Os demais sinais representam os carbonos aromáticos e os carbonos alifáticos do grupo amina.

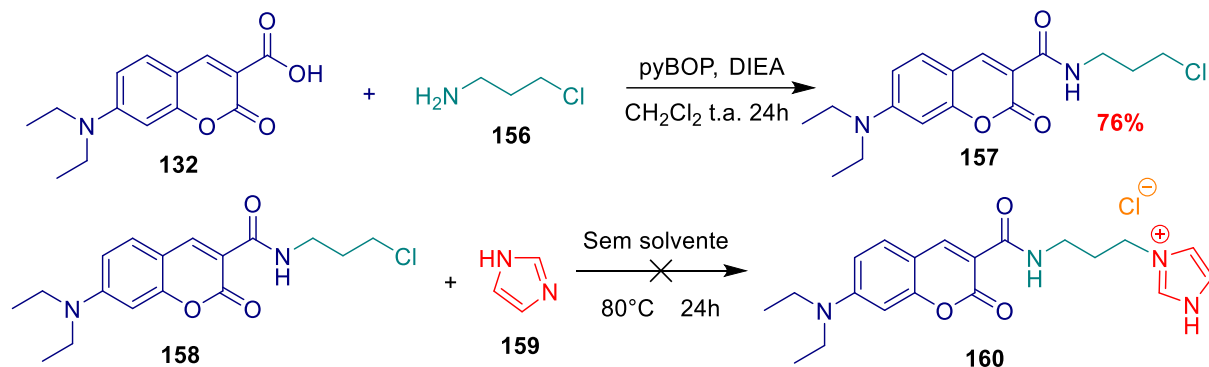


**Figura 20.**  $^{13}\text{C}$  RMN 150 MHz ( $\text{CDCl}_3$ ) da **Cum-NH-BTD**.

Outra síntese que é importante comentar é a da preparação da **Cum-NH-HOBT**. Em um primeiro momento tinha-se em mente a preparação de uma estrutura de um derivado de cumarina com um núcleo imidazol (**159**) ligado através de uma ligação N-C, no qual pode ser visto no **Esquema 22**. Para isso foi

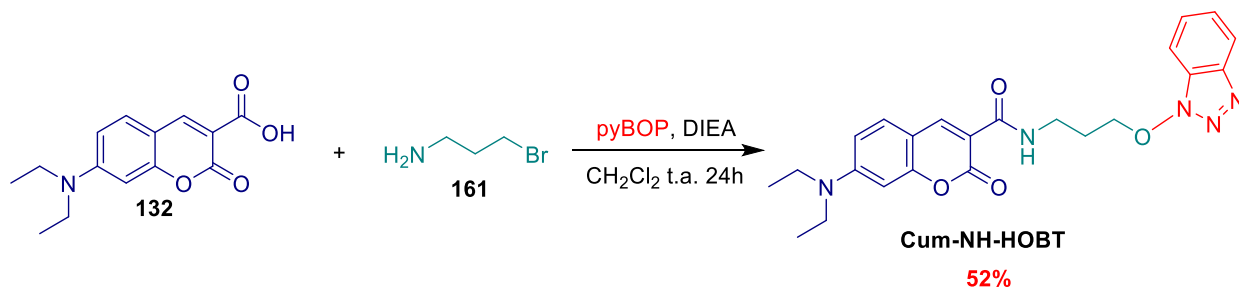


necessário aplicar a metodologia de pyBOP e DIEA usando o derivado de cumarina feito anteriormente e um grupo cloropropilamina (**156**). Esta estrutura foi facilmente preparada com um rendimento de 76%. A segunda etapa da reação é a substituição do grupo cloro por um grupo imidazol. Após algumas tentativas, variando tempos reacionais e temperaturas, em sucessivas reações, o produto desejado não foi isolado.

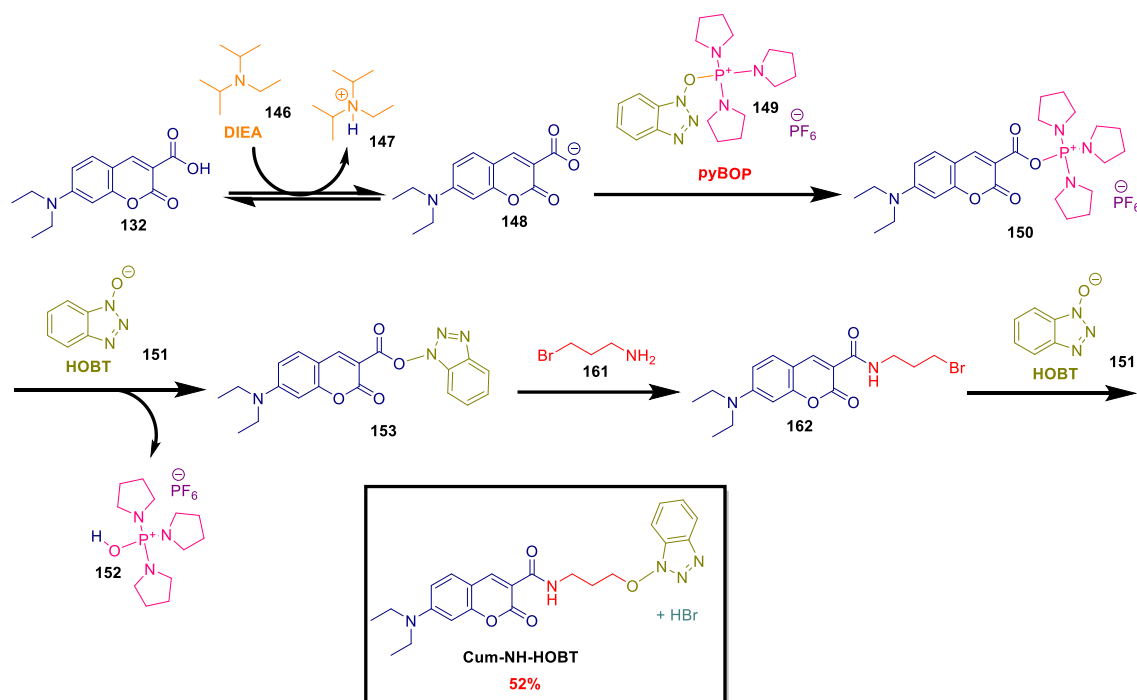


**Esquema 22.** Tentativa de síntese do composto (**160**).

Uma alternativa para preparação (**Esquema 23**) do produto (**153**) foi a troca do reagente (**156**) por bromopropilamina (**161**), tinha-se em mente que a reação de substituição aconteceria de forma mais eficiente, já que o bromo é um melhor grupo de saída que o cloro. De forma surpreendente, o grupo HOBT proveniente do pyBOP foi substituído logo na primeira etapa da reação. Foi visto então, que produto formado seria mais interessante que a própria estrutura (**160**), já que ela surgiu a partir de uma reação multicomponente usando 3 reagentes. Realizou-se uma revisão bibliográfica e concluiu-se que, até o momento, esta reação 3 componentes usando HOBT como um dos componentes é inédita na literatura.



**Esquema 23.** Síntese do composto **Cum-NH-HOBT**.



Esquema 24. Mecanismo proposto para a preparação de **Cum-NH-HOBT**.

O sinal característico (Figura 21) da formação do da **Cum-NH-HOBT** é o tripleto ( $J = 5,2$  Hz) em 9,02 ppm, que representa o hidrogênio da amida. É importante salientar que o sinal aparece como um tripleto porque existe um acoplamento a longa distância com o CH<sub>2</sub> vizinho. O mesmo acontece com CH<sub>2</sub> vizinho à amida, que é representado por um quarteto em 3,76 ppm ( $J = 6,6$  Hz) e não por um tripleto, como era esperado. Os outros sinais são representados por hidrogênios aromáticos da cumarina e da unidade HOBT, além dos hidrogênios alifáticos da estrutura.

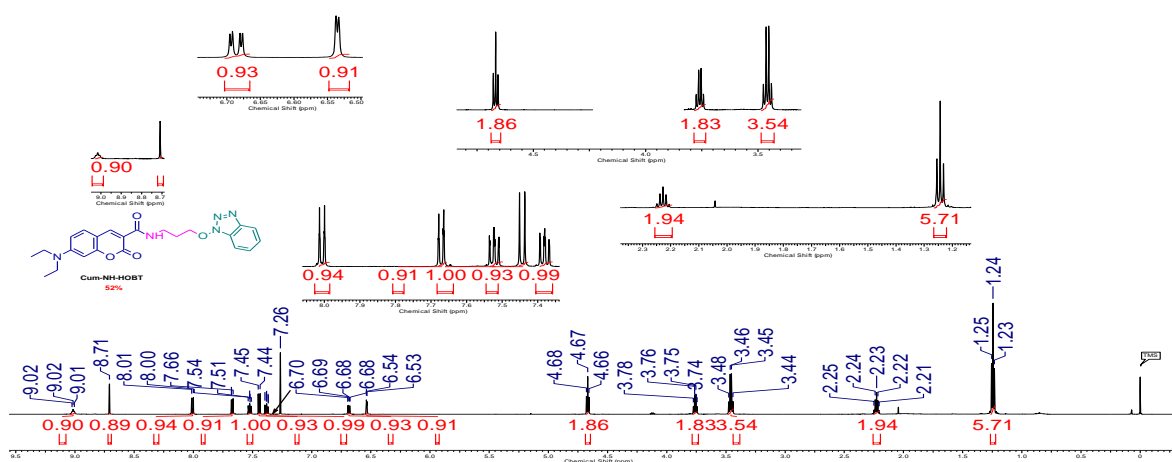
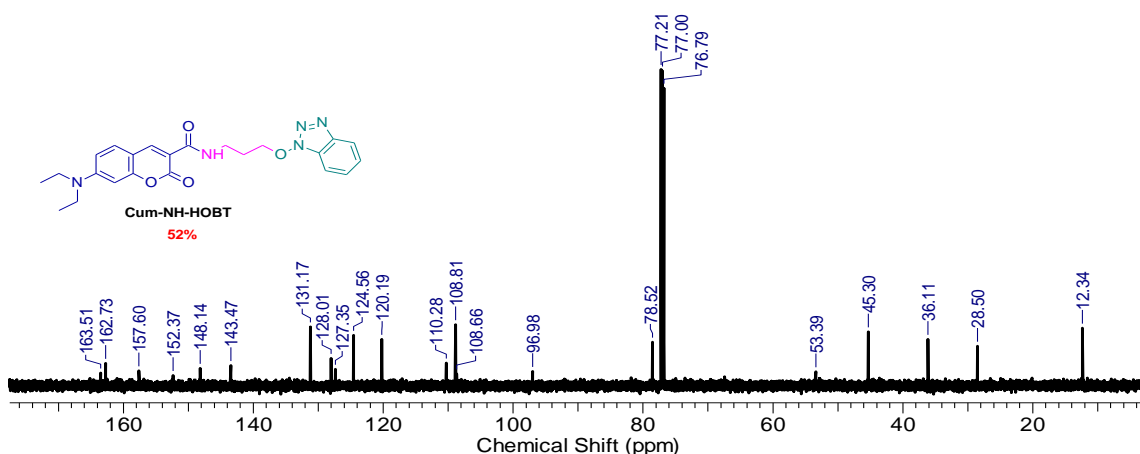


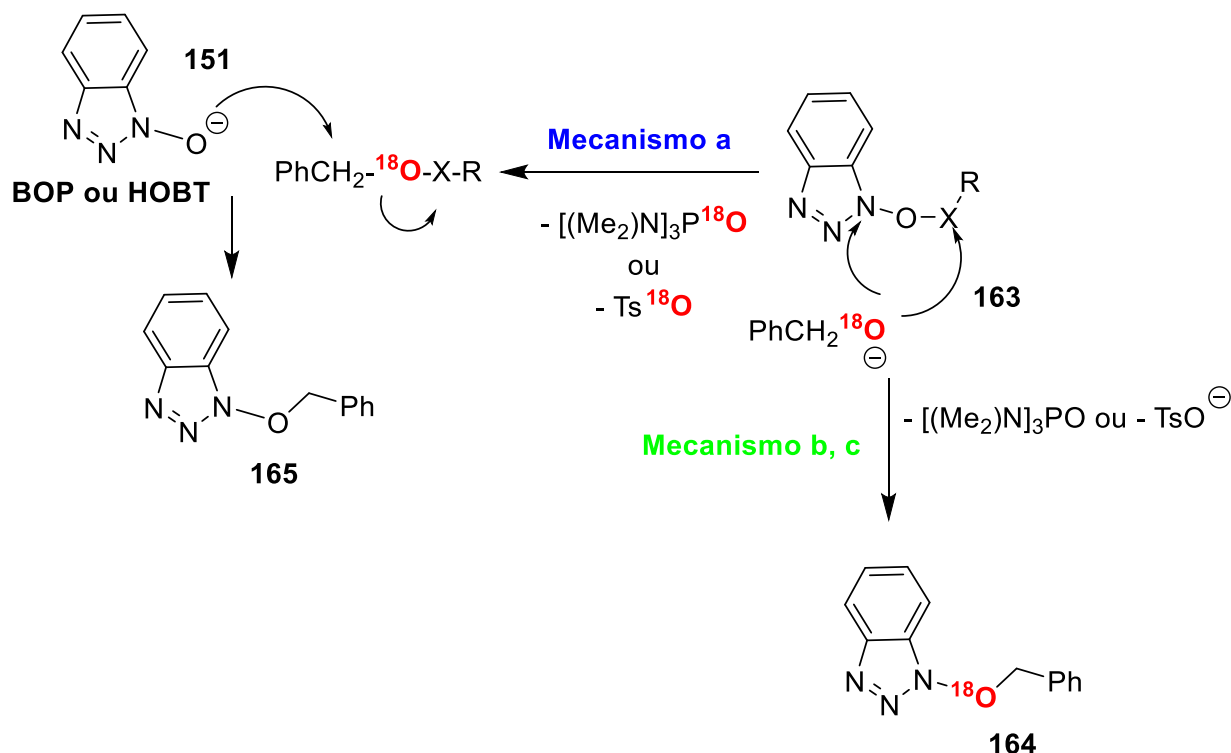
Figura 21. <sup>1</sup>H RMN 600MHz (CDCl<sub>3</sub>) da **Cum-NH-HOBT**.

Ainda na caracterização da **Cum-NH-HOBT** o sinal principal está na faixa de 163,5 ppm, que representa o sinal da carboxila do grupo amida. Outro sinal importante é o que está em 53,4 ppm, no qual representa o carbono ligado ao oxigênio do grupo HOBT. Os demais sinais são carbonos aromáticos da cumarina e do grupo HOBT e carbonos alifáticos da molécula (**Figura 22**).



**Figura 22.**  $^{13}\text{C}$  RMN 150MHz ( $\text{CDCl}_3$ ) do composto **Cum-NH-HOBT**.

Uma dúvida surgiu acerca da alquilação do grupo HOBT. A dúvida em questão era se a alquilação ocorreria no nitrogênio (formando um sal de amônio) ou se ela ocorreria no próprio oxigênio. O trabalho Lakshman e colaboradores<sup>93</sup> resolve muito bem esta questão, os autores reportaram a síntese de uma série de derivados de azabenzotriazóis através de reagentes de acoplamento peptídico, inclusive utilizando pyBOP como um dos exemplos. Os autores reportaram três mecanismos possíveis usando etiqueta de marcação de  $^{18}\text{O}$  para tentar elucidar um mecanismo plausível. Para que a reação se processe via mecanismo A nenhum produto marcado deve ser observado, ao passo que nas propostas **b** e **c** os produtos teriam que ser marcados com  $^{18}\text{O}$ . E se houvesse competição dos três mecanismos teria que haver uma mistura de produtos. O estudo mecanístico indica que as reações se processam via formação de derivados de ácidos fosfônicos (com BOP) ou tosilatos (com Bt-OTS) e não pelo ataque do nitrogênio via  $\text{SN}_2$  (**Esquema 25**).



Esquema 25. Possíveis mecanismos da reação de azabenzotriazóis e agentes de acoplamentos.

Portanto, com a justificativa deste importante trabalho, chegou-se à conclusão que realmente o produto **Cum-NH-HOBT** foi produzido via alquilação do oxigênio no grupo alquila e não a alquilação do nitrogênio neste mesmo grupo alquila (não existe evidência de formação de um sal de amônio). Para não restar dúvidas foi comparado os sinais de ressonância magnética nuclear de hidrogênio com os produtos de Lakshman. Foi visto que o sinal diagnóstico da formação de azabenzotriazóis (159-160) se dá numa região de 4,50 a 4,80 ppm (Figura 23). Sendo esta faixa muito próxima do CH<sub>2</sub> do produto **Cum NH-HOBT**.

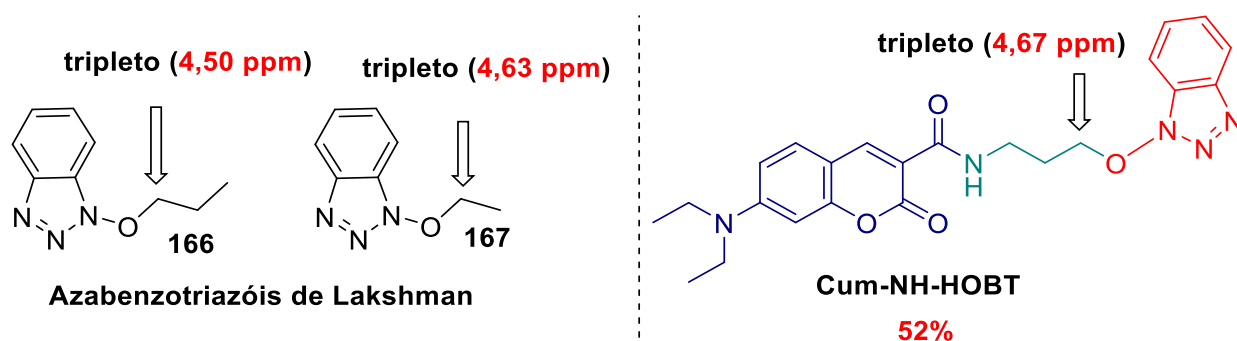
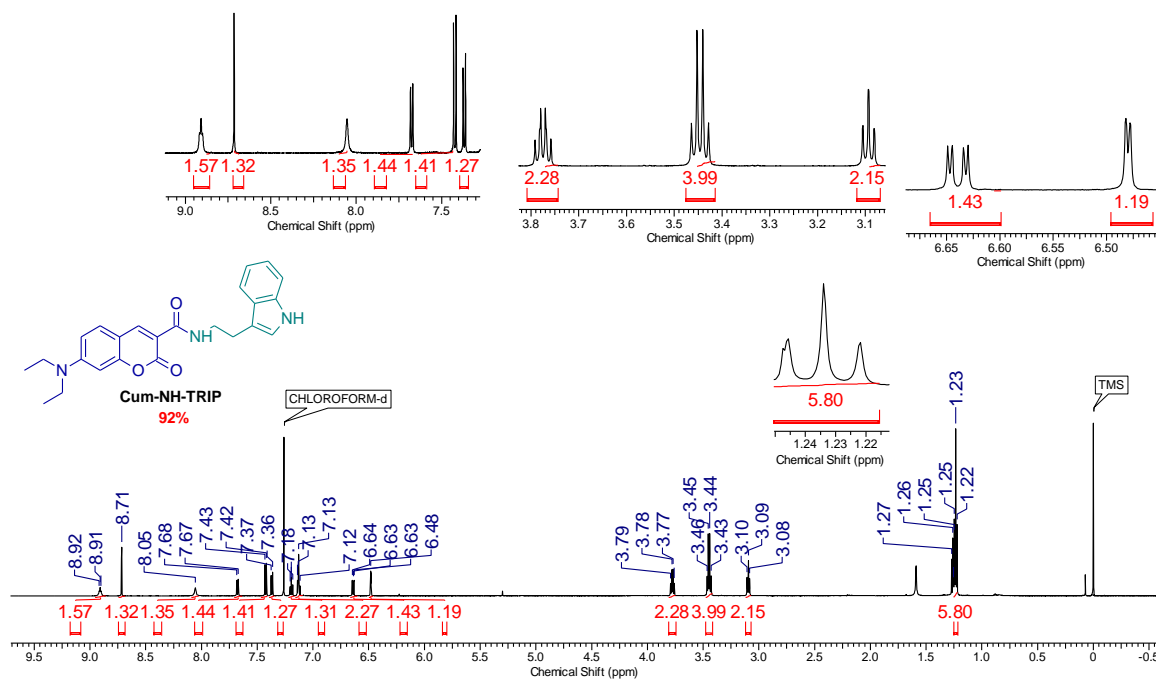


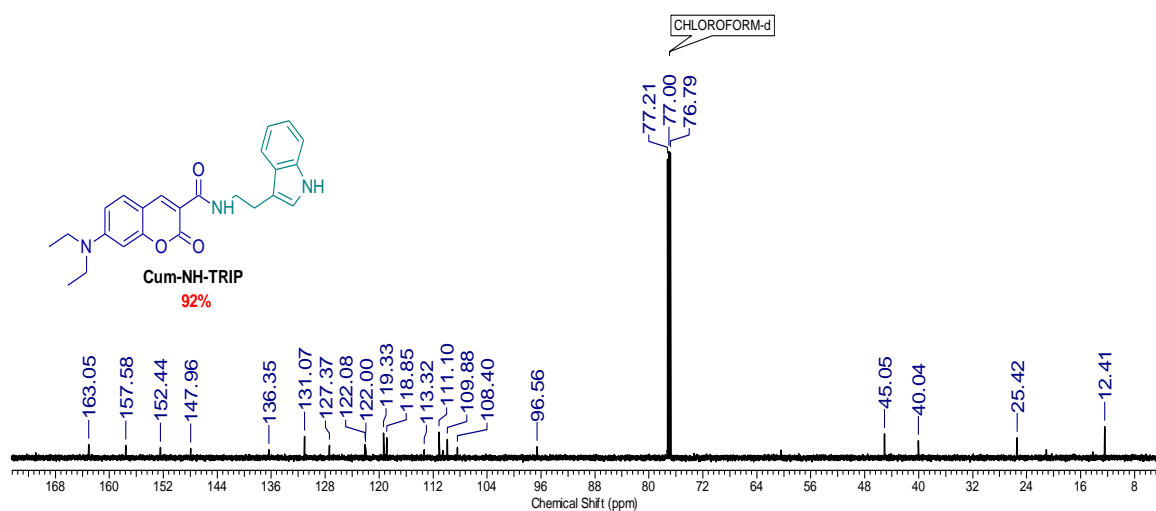
Figura 23. Comparação entre os sinais de <sup>1</sup>H RMN dos produtos de Lakshman e do produto **Cum-NH-HOBT**.<sup>93</sup>

Para o composto **Cum-NH-TRIP** o sinal que corrobora a formação do produto é o tripleto em 8,91 ppm ( $J= 5,3$  Hz) que representa o hidrogênio do N-H da estrutura. Os outros sinais são os hidrogênios aromáticos e alifáticos da estrutura (**Figura 24**).



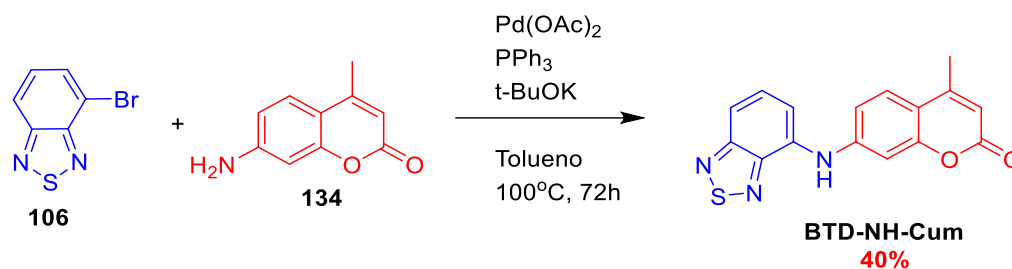
**Figura 24.**  $^1\text{H}$  RMN 600MHz ( $\text{CDCl}_3$ ) da **Cum-NH-TRIP**.

O sinal característico do espectro de  $^{13}\text{C}$  (**Figura 25**) do produto **Cum-NH-TRIP** é o sinal em 163,0 ppm que representa o carbono da carboxila do grupo amida, os restantes dos picos representam os carbonos aromáticos e alifáticos da estrutura.



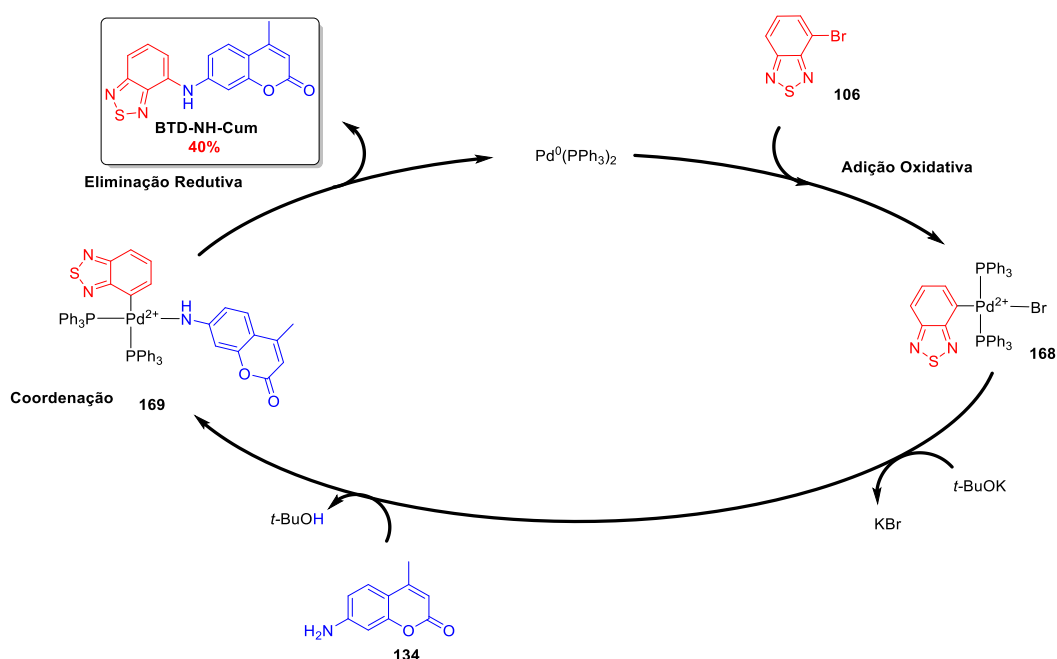
**Figura 25.**  $^{13}\text{C}$  RMN 150MHz ( $\text{CDCl}_3$ ) da **Cum-NH-TRIP**.

A síntese do produto **BTD-NH-Cum** foi realizada de maneira totalmente distinta dos demais compostos sintetizados. Alguns artigos já reportaram o emprego da reação de Buchwald-Harwig<sup>94-96</sup> em sínteses de derivados de BTD, em vista disto optou-se por realizar este tipo de reação para a formação do produto (**Esquema 26**).



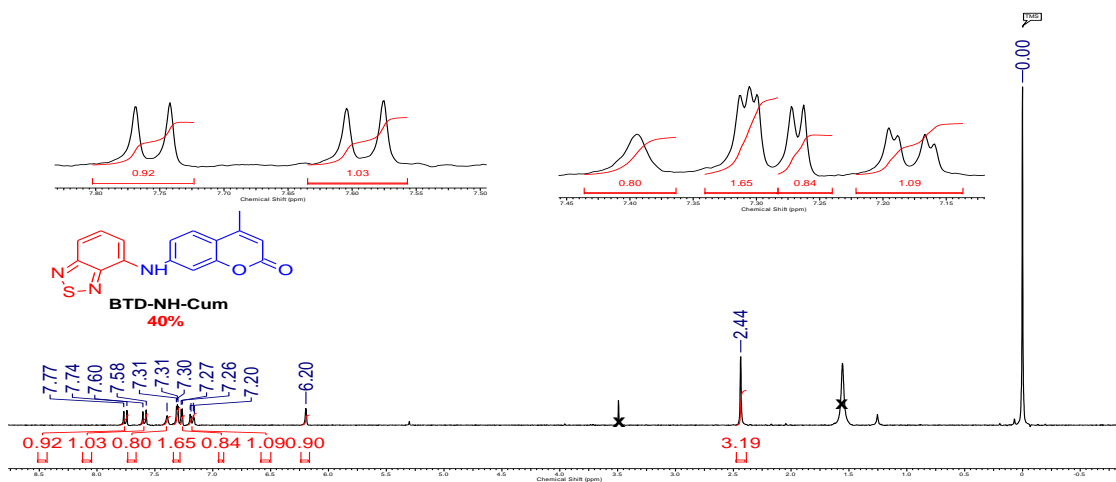
**Esquema 26.** Rota sintética do produto **BTD-NH-Cum**.

A reação de Buchwald-Hartwig consiste na formação de uma ligação carbono nitrogênio catalisada por paládio. É necessário ainda uma adição de um ligante volumoso (neste caso a trifenilfosfina) para que se possa aumentar todas as velocidades das etapas do ciclo catalítico (adição oxidativa e eliminação redutiva) além de diminuir a taxa de velocidade da eliminação de  $\beta$ -hidreto. O mecanismo reacional tem início com a formação de  $\text{Pd}^0$  e em seguida a adição oxidativa do grupo arila (**106**) formando um complexo de  $\text{Pd}^{2+}$  (**168**). O passo seguinte é a inserção da aminocumarina (**134**) no metal, troca de ligantes para a formação do intermediário (**169**) e por último a eliminação redutiva do  $\text{Pd}^{2+}$  para  $\text{Pd}^0$  e consequentemente a formação do produto **BTD-NH-Cum**.<sup>97</sup>



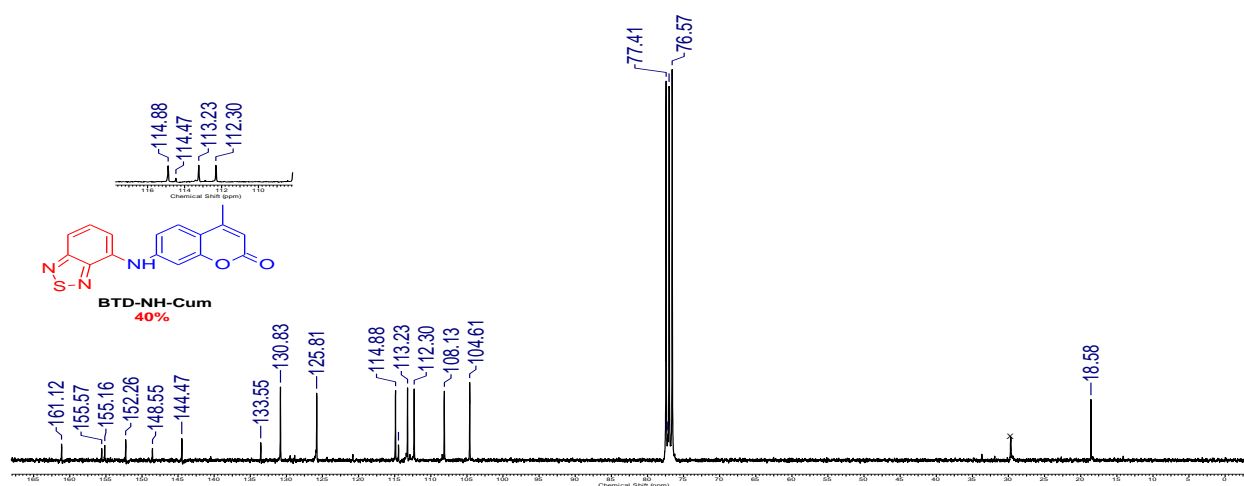
**Esquema 27.** Mecanismo proposto para a formação produto **BTD-NH-Cum**.<sup>97</sup>

O ligante trifenilfosfina que foi usado para realizar a reação de Buchwald-Hartwig não é o ligante ideal para este tipo de reação, os ligantes de fósforo bidentados apresentam uma maior atividade quando ligados ao paládio, já que estes ligantes aumentam a estabilidade do centro metálico.<sup>98</sup> Entretanto a reação ocorreu com um rendimento razoável, já que a natureza não ideal do ligante foi compensada utilizando-se tempos reacionais consideravelmente altos e uma temperatura relativamente alta. O produto **BTD-NH-Cum** foi caracterizado por <sup>1</sup>H (Figura 26) e <sup>13</sup>C (Figura 27) RMN. O sinal diagnóstico que comprova a formação do produto é o singleto em 7,39 ppm referente ao hidrogênio da amina secundária formada. Os demais sinais são referentes aos hidrogênios aromáticos e alifáticos do produto.



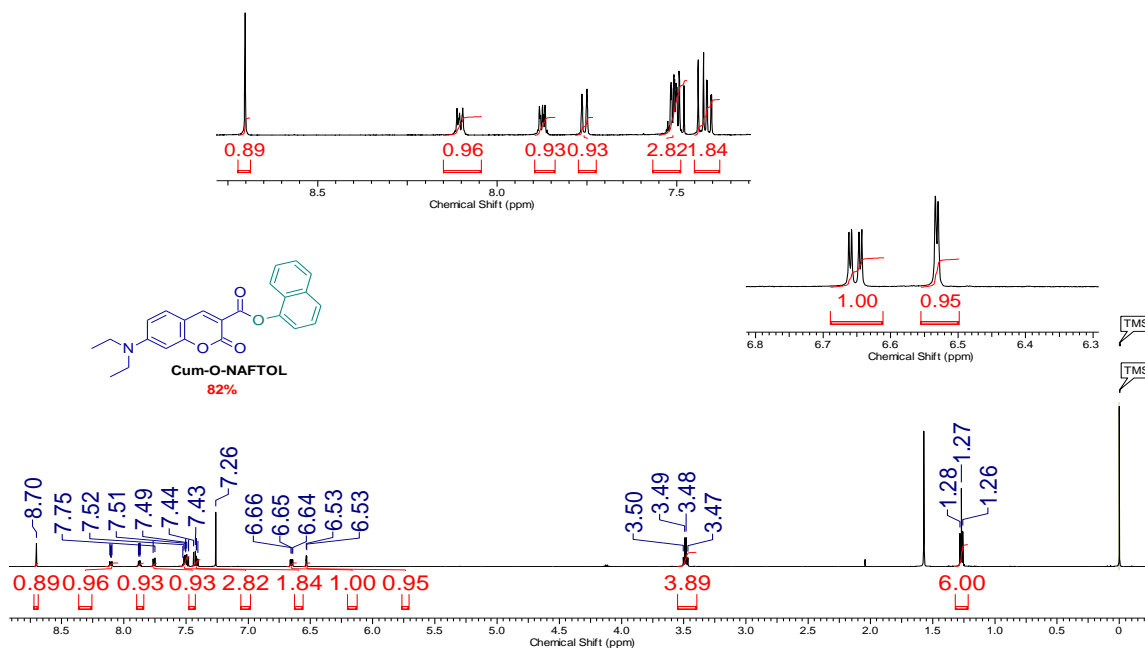
**Figura 26.** <sup>1</sup>H RMN 300 MHz (CDCl<sub>3</sub>) do produto **BTD-NH-Cum**.

Como visto no <sup>13</sup>C RMN o sinal diagnóstico que represente a formação dos produtos é o sinal em 136,6 ppm referente ao carbono diretamente ligado ao nitrogênio. A desblindagem deste carbono é a comprovação que ele está em um ambiente químico diferente (ligação halogênio/ligação nitrogênio).

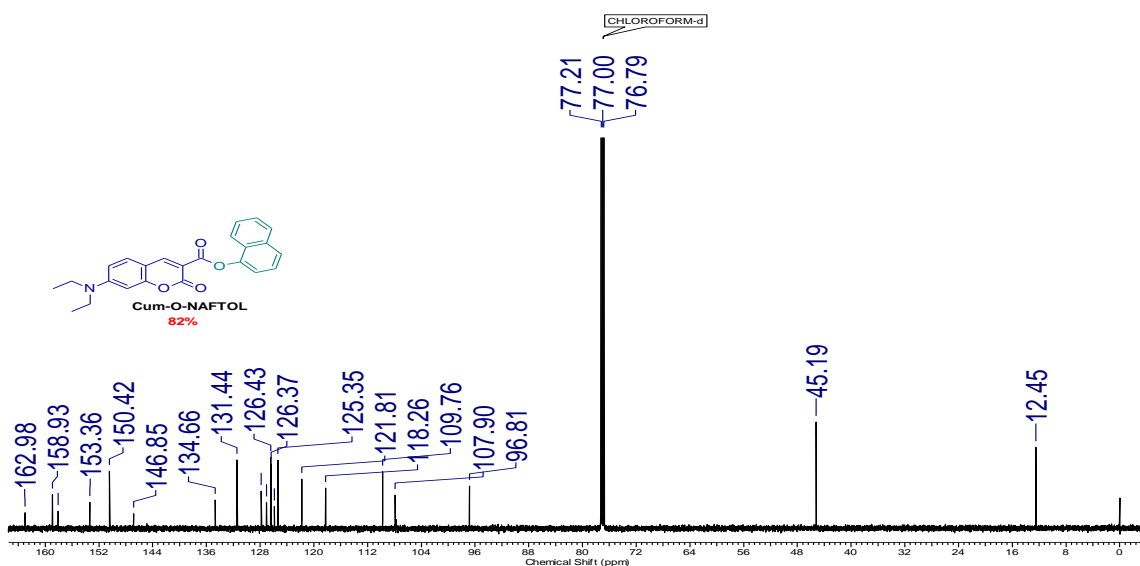


**Figura 27.** <sup>13</sup>C RMN 75 MHz (CDCl<sub>3</sub>) do produto **BTD-NH-Cum**.

Os sinais dos hidrogênios diagnósticos dos produtos **Cum-O-Naftol** e **Cum-NH-Naftil** se encontram na região de 8,70 ppm (hidrogênio da dupla ligação) um pouco mais desblindado em comparação ao sinal do mesmo hidrogênio da cumarina ácida e o sinal em 11,53 ppm relativo ao hidrogênio do grupo amida (**Cum-NH-Naftil**). Já os sinais do carbono do grupo carboxila do éster e o carbono referente a carboxila da amida podem ser encontrados em 163,0 ppm e 163,5 ppm respectivamente, estes carbonos são também considerados comprovações que realmente houve a formação do produto.



**Figura 28.**  $^1\text{H}$  RMN 600 MHz ( $\text{CDCl}_3$ ) do produto **Cum-O-Naftol**.



**Figura 29.**  $^{13}\text{C}$  RMN 150 MHz ( $\text{CDCl}_3$ ) do produto **Cum-O-Naftol**.



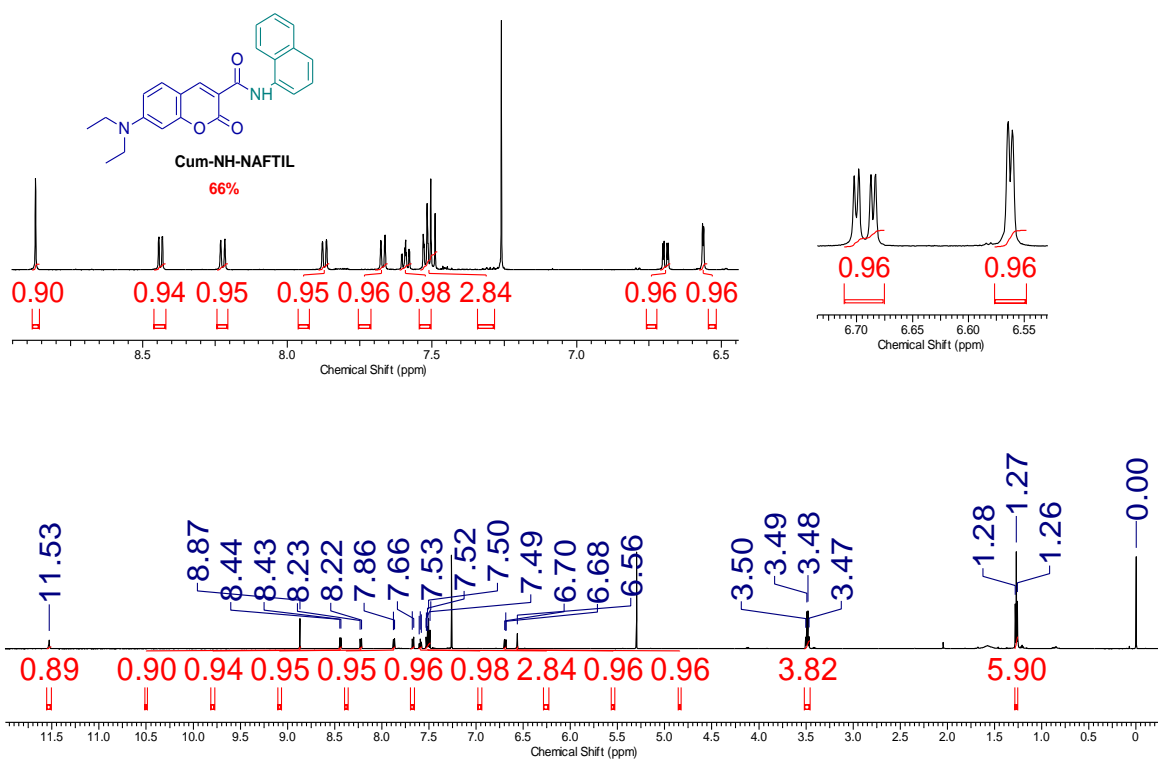


Figura 30.  $^1\text{H}$  RMN 600 MHz ( $\text{CDCl}_3$ ) do produto Cum-NH-Naftil.

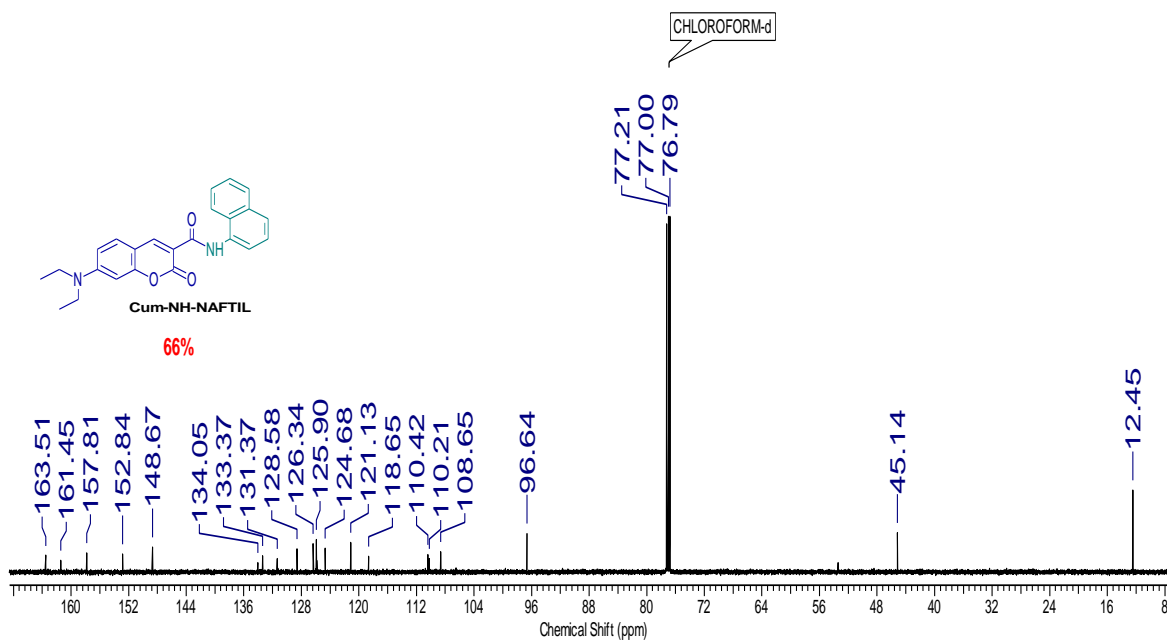
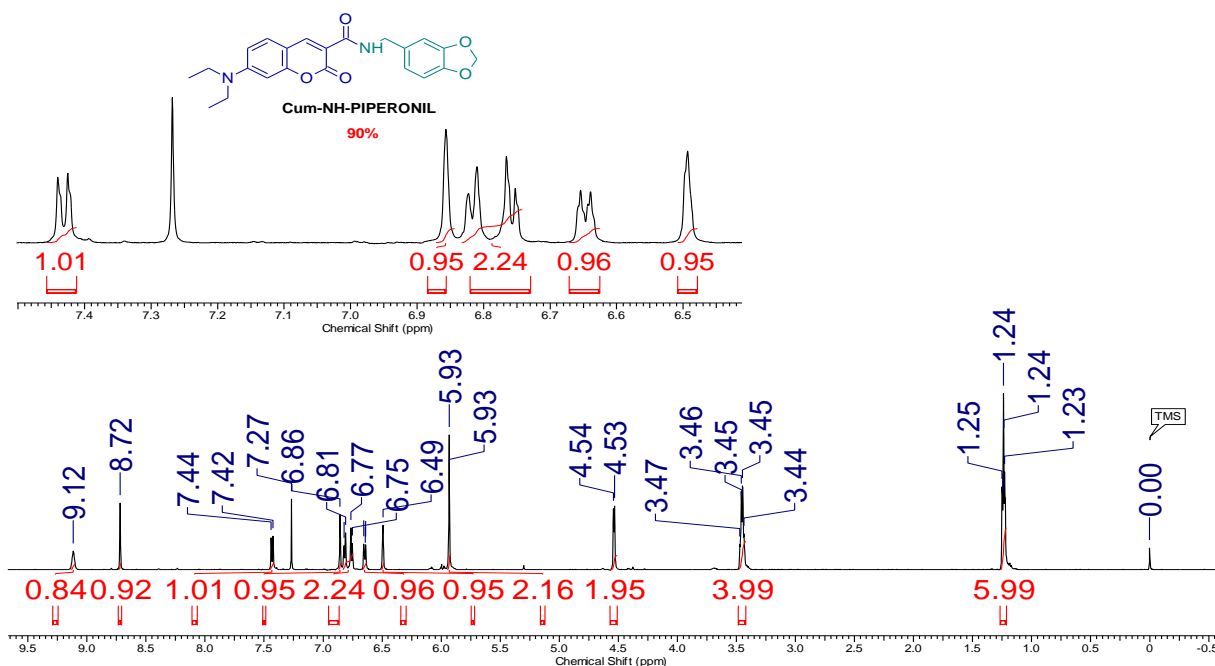
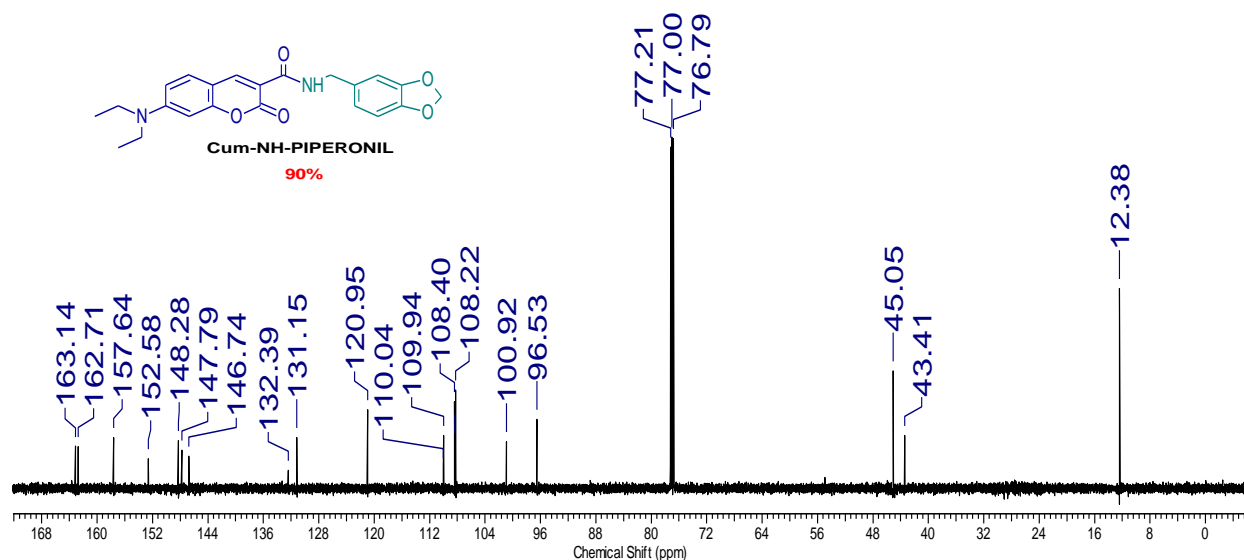


Figura 31.  $^{13}\text{C}$  RMN 150 MHz ( $\text{CDCl}_3$ ) do produto Cum-NH-Naftil.

Para os produtos **Cum-NH-Piperonil** e **Cum-NH-Bifenil** os sinais dos hidrogênios diagnósticos são encontrados na região de 9,12 ppm e 10,95 ppm, respectivamente. Eles também são referentes aos hidrogênios dos grupos amida formados na reação. Os sinais mais importantes dos carbonos são os da região de 163,1 ppm (em ambos os espectros) no qual se referem aos sinais do carbono do grupo carboxila da amida.



**Figura 32.**  $^1\text{H}$  RMN 600 MHz ( $\text{CDCl}_3$ ) do produto **Cum-NH-Piperonil**.



**Figura 33.**  $^{13}\text{C}$  RMN 150 MHz ( $\text{CDCl}_3$ ) do produto **Cum-NH-Piperonil**.

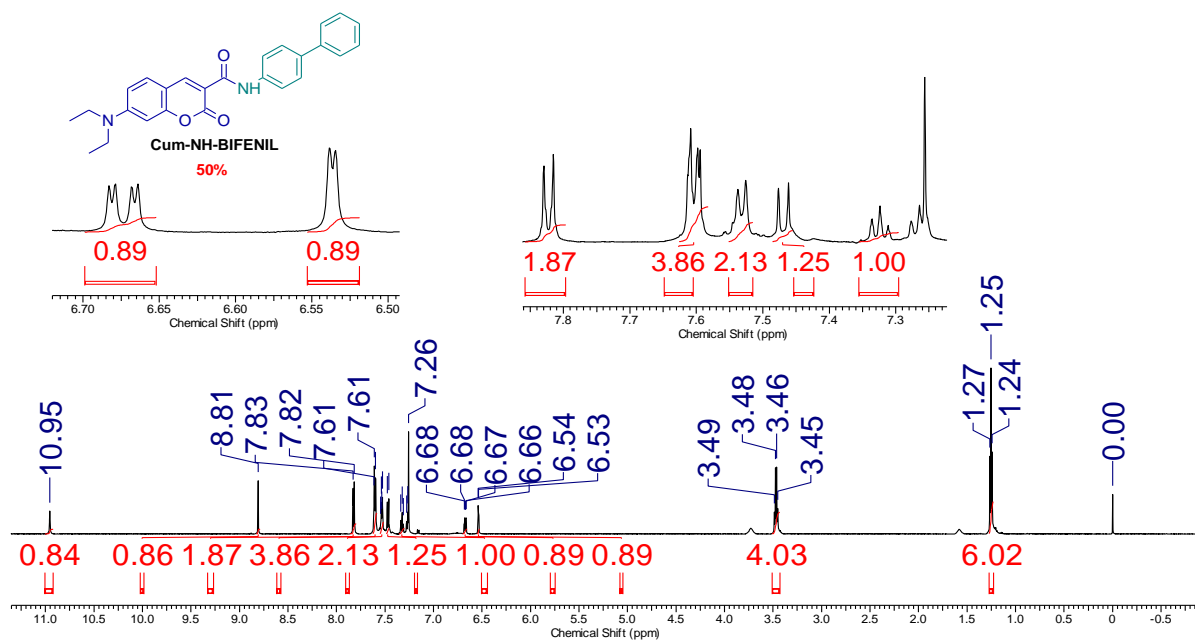


Figura 34. <sup>1</sup>H RMN 600 MHz (CDCl<sub>3</sub>) do produto Cum-NH-Bifenil.

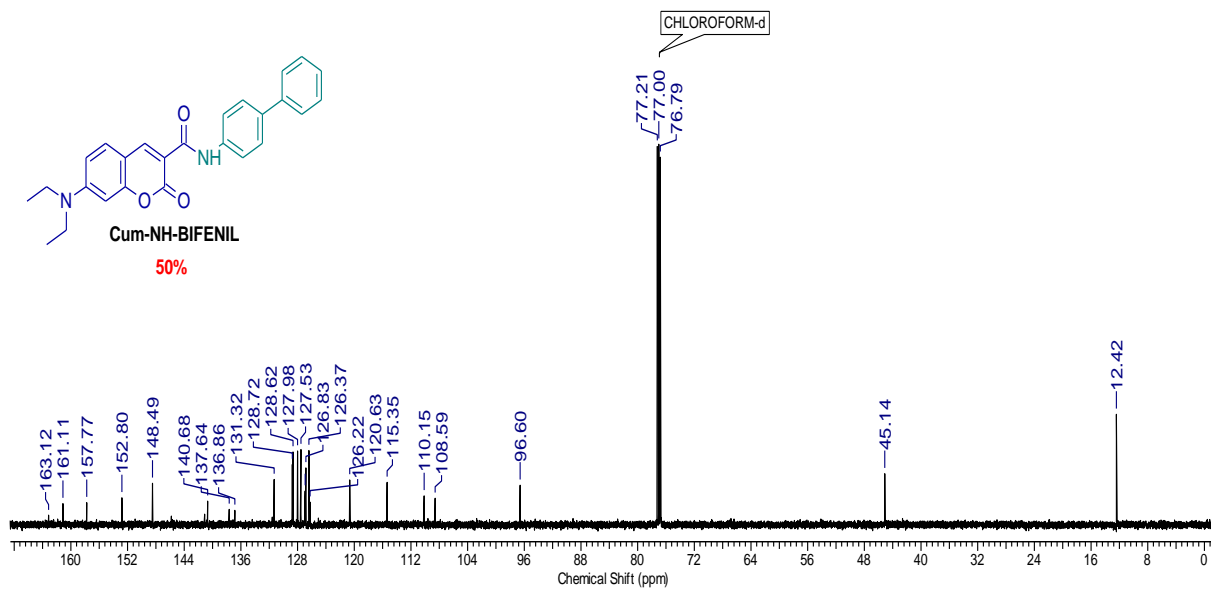


Figura 35. <sup>13</sup>C RMN 150 MHz (CDCl<sub>3</sub>) do produto Cum-NH-Bifenil.

Com as informações provenientes dos experimentos de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  RMN foi possível a montagem de uma tabela referente aos sinais diagnósticos de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , além de multiplicidade e constantes de acoplamento de todas as estruturas sintetizadas. Como pode ser visto logo abaixo na **Tabela 2**.

**Tabela 2.** Sinais diagnósticos dos produtos sinterizados.

<b>Código</b>	<b>Sinal diagnóstico <math>^1\text{H}</math> (ppm)</b>	<b>Multiplicidade</b>	<b><math>J</math> (Hz)</b>	<b>Sinal diagnóstico <math>^{13}\text{C}</math> (ppm)</b>
<b>Cum-NH-BTD</b>	12,14 O=C-NHR	Singleto		162,8 O=C-NHR
<b>BTD-NH-Cum</b>	7,39 HC=C	Singleto		136,6 C-NHR
<b>Cum-NH-HOBT</b>	9,02 O=C-NHR	Tripleto	5,2	163,5 O=C-NHR
<b>Cum-NH-Trip</b>	8,91 O=C-NHR	Tripleto	5,3	163,0 O=C-NHR
<b>Cum-NH-Pip</b>	9,12 O=C-NHR	Singleto		163,1 O=C-NHR
<b>Cum-NH-Naftil</b>	11,53 O=C-NHR	Singleto		163,5 O=C-NHR
<b>Cum-O-Naftol</b>	8,70 HC=C	Singleto		163,0 O=C-OR
<b>Cum-NH-Bif</b>	10,95 O=C-NHR	Singleto		163,1 O=C-NHR

Para não restar dúvidas e corroborar as caracterizações dos derivados de cumarinas junto com os dados espectroscópicos, foram realizados experimentos de espectrometria de massas no modo positivos para todas as estruturas sintetizadas usando soluções de 1 ppm de cada estrutura e adicionando 0,1% de ácido fórmico para uma melhor protonação das moléculas. Finalmente, uma tabela foi construída para resumir os sinais de  $m/z$  encontrados e calculados. A **Tabela 3** resume todas as fórmulas estruturais, as massas encontradas e calculadas e o erro experimental.

**Tabela 3.** Dados de espectrometria (ESI(+)-MS) de massas no modo positivo das estruturas sintetizadas.

<b>Código</b>	<b>Fórmula molecular</b>	<b>Massas (Da)</b>		<b>Erro Experimental (ppm)</b>
		<b>Calculada</b>	<b>Encontrada</b>	
<b><i>Cum-NH-BTD</i></b>	$[\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_3\text{S} + \text{H}]^+$	395,1172	395,1171	-0,2
<b><i>BTD-NH-Cum</i></b>	$[\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_2\text{S} + \text{H}]^+$	310,0645	310,0638	-2,2
<b><i>Cum-NH-TRIP</i></b>	$[\text{C}_{24}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_3 + \text{Na}]^+$	426,1794	426,1820	6,1
<b><i>Cum-NH-HOBT</i></b>	$[\text{C}_{23}\text{H}_{25}\text{N}_5\text{O}_4 + \text{H}]^+$	436,1979	436,1988	2,0
<b><i>Cum-NH-BIFENIL</i></b>	$[\text{C}_{26}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_3 + \text{Na}]^+$	435,1685	435,1707	5,0
<b><i>Cum-NH-PIPERONIL</i></b>	$[\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_5 + \text{H}]^+$	395,1601	395,1625	6,0
<b><i>Cum-NH-NAFTIL</i></b>	$[\text{C}_{24}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_3 + \text{Na}]^+$	409,1528	409,1547	4,6
<b><i>Cum-NH-NAFTOL</i></b>	$[\text{C}_{24}\text{H}_{21}\text{NO}_4 + \text{Na}]^+$	410,1368	410,1388	4,9

### 3.2. Análise Fotofísica

Os estudos fotofísicos são análises preliminares para posteriormente realizar estudos com cálculos computacionais (e comparar com os estudos experimentais) além de dar características fundamentais dos fluoróforos, como: características de transição, de estabilidade e de rendimento quântico. Para a realização das análises fotofísicas foram usadas a técnicas de espectroscopia de UV-vis e espectroscopia de fluorescência para aquisição de espectros de absorção e emissão de todos os compostos sintetizados. Vários solventes de diferentes polaridades foram utilizados para o processamento das análises (acetato de etila, acetonitrila, clorofórmio, diclorometano, etanol, hexano, metanol e água) justamente para estudar o comportamento do estado excitado dos produtos em solventes com propriedades distintas. As soluções foram diluídas até que se chegasse numa concentração de 10  $\mu$ M, sendo importante para minimizar efeitos de reabsorção, que é a absorção da luz emitida pela mesma solução antes que esta saia da cubeta. A **Tabela 4** mostra medidas de comprimento de onda de absorção máximo, comprimento de onda de emissão máximo, absortividade molar, deslocamento de Stokes e rendimento quântico foi feita a partir dos espectros adquiridos para melhor análise dos dados.

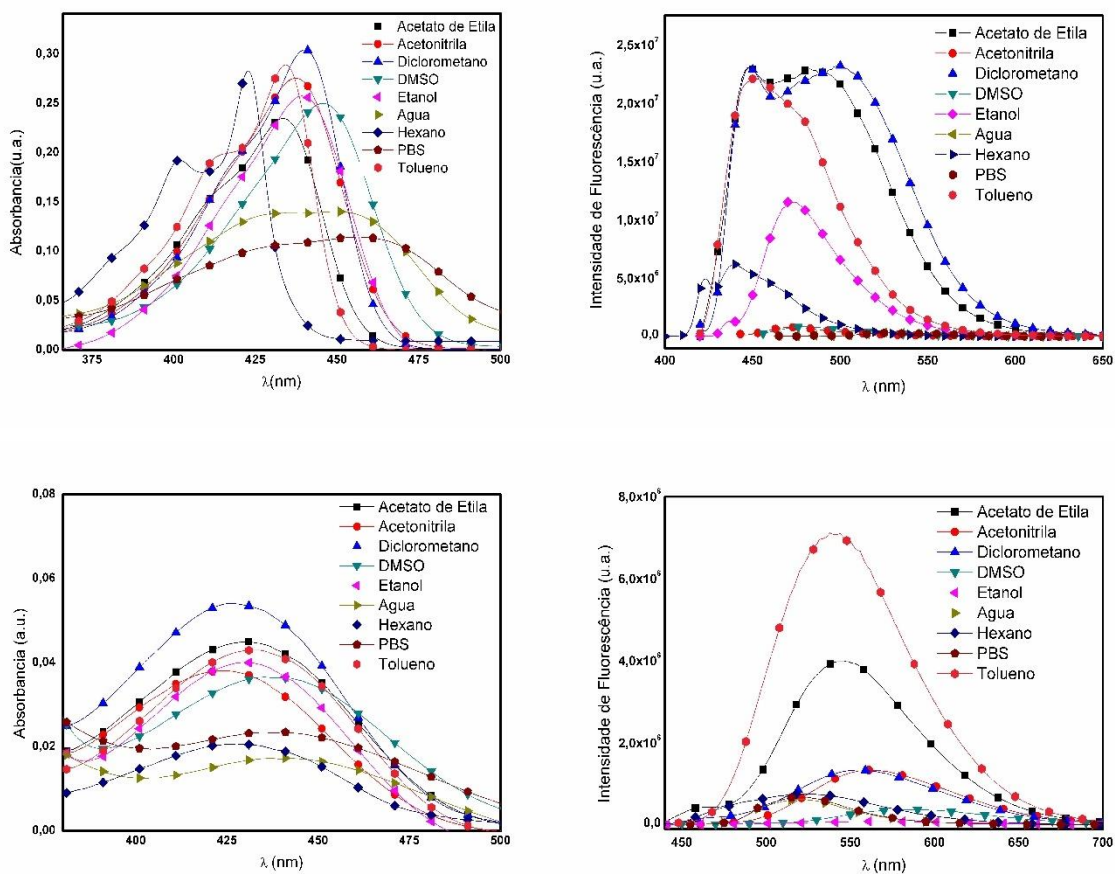
**Tabela 4.** Dados fotofísicos dos produtos sintetizados.

<b>Código</b>	<b>Solvente</b>	<b><math>\lambda_{\max}</math> abs (nm)</b>	<b>Log <math>\epsilon</math></b>	<b><math>\lambda_{\max}</math> em (nm)</b>	<b>Deslocamento de Stokes (nm)</b>	<b><math>\Phi</math></b>
<b>Cum-NH-BTD</b>	Acetato de Etila	433	4,37	486	53	0,41
	Acetonitrila	438	4,44	473	35	0,01
	Água	450	4,15	527	77	0,03
	Hexano	422	4,45	443	21	0,05
	Etanol	440	4,41	473	33	0,04
	DMSO	446	4,39	467	21	0,04
	Diclorometano	440	4,48	500	60	0,42
	Solução PBS	456	4,05	519	63	0,03
	Tolueno	434	4,46	477	43	0,19
<b>BTD-NH-Cum</b>	Acetato de Etila	431	3,65	544	113	0,47
	Acetonitrila	425	3,63	561	136	0,43
	Água	444	3,22	519	75	0,25
	Hexano	427	3,30	524	97	0,33
	Etanol	431	3,60	575	144	0,11
	DMSO	438	3,56	588	150	0,32
	Diclorometano	428	3,73	555	127	0,39
	Solução PBS	436	3,37	523	87	0,20
	Tolueno	432	3,57	538	106	0,41
<b>Cum-NH-HOBT</b>	Acetato de Etila	411	4,54	493	82	0,19
	Acetonitrila	416	4,22	485	69	
	Clorofórmio	421	3,80	477	56	
	Diclorometano	415	4,25	492	77	
	Etanol	422	5,47	463	41	
	Hexano	407	4,27	450	43	
	Metanol	420	4,25	465	45	
	Água	435	4,38	477	42	

<b>Cum-NH-Trip</b>	Acetato de Etila	409	3,95	445	36	0,17
	Acetonitrila	415	3,94	462	47	
	Clorofórmio	419	4,00	449	30	
	Diclorometano	418	4,17	466	48	
	Etanol	420	4,04	461	41	
	Hexano	407	4,02	439	32	
	Metanol	420	4,07	464	44	
	Água	430	3,86	483	53	
<b>Cum-O-Naftol</b>	Acetato de Etila	418	4,19	452	34	0,21
	Acetonitrila	424	4,26	459	35	
	Clorofórmio	428	4,40	466	38	
	Diclorometano	428	4,37	479	51	
	Etanol	428	4,39	465	37	
	Hexano	412	4,18	452	40	
	Metanol	426	4,13	464	38	
	Água	445	4,13	533	88	
<b>Cum-NH-Bif</b>	Acetato de Etila	426	3,80	460	34	0,18
	Acetonitrila	429	3,75	471	42	
	Clorofórmio	432	3,75	474	42	
	Diclorometano	433	3,77	463	30	
	Etanol	434	3,80	472	38	
	Hexano	417	3,79	449	32	
	Metanol	433	3,71	475	42	
	Água	456	3,26	535	79	
<b>Cum-NH-Pip</b>	Acetato de Etila	411	4,41	515	104	0,12
	Acetonitrila	415	4,40	474	59	
	Clorofórmio	421	4,51	521	100	
	Diclorometano	419	4,40	523	104	
	Etanol	422	4,49	459	37	
	Hexano	416	2,88	493	77	
	Metanol	405	4,46	465	60	
	Água	425	3,42	467	42	
<b>Cum-NH-Naftil</b>	Acetato de Etila	412	4,40	519	107	0,18
	Acetonitrila	418	4,44	489	71	
	Clorofórmio	434	4,55	527	93	
	Diclorometano	437	4,54	528	91	
	Etanol	417	4,36	459	42	
	Hexano	401	4,17	486	85	
	Metanol	416	4,34	467	51	
	Água	418	4,20	478	60	

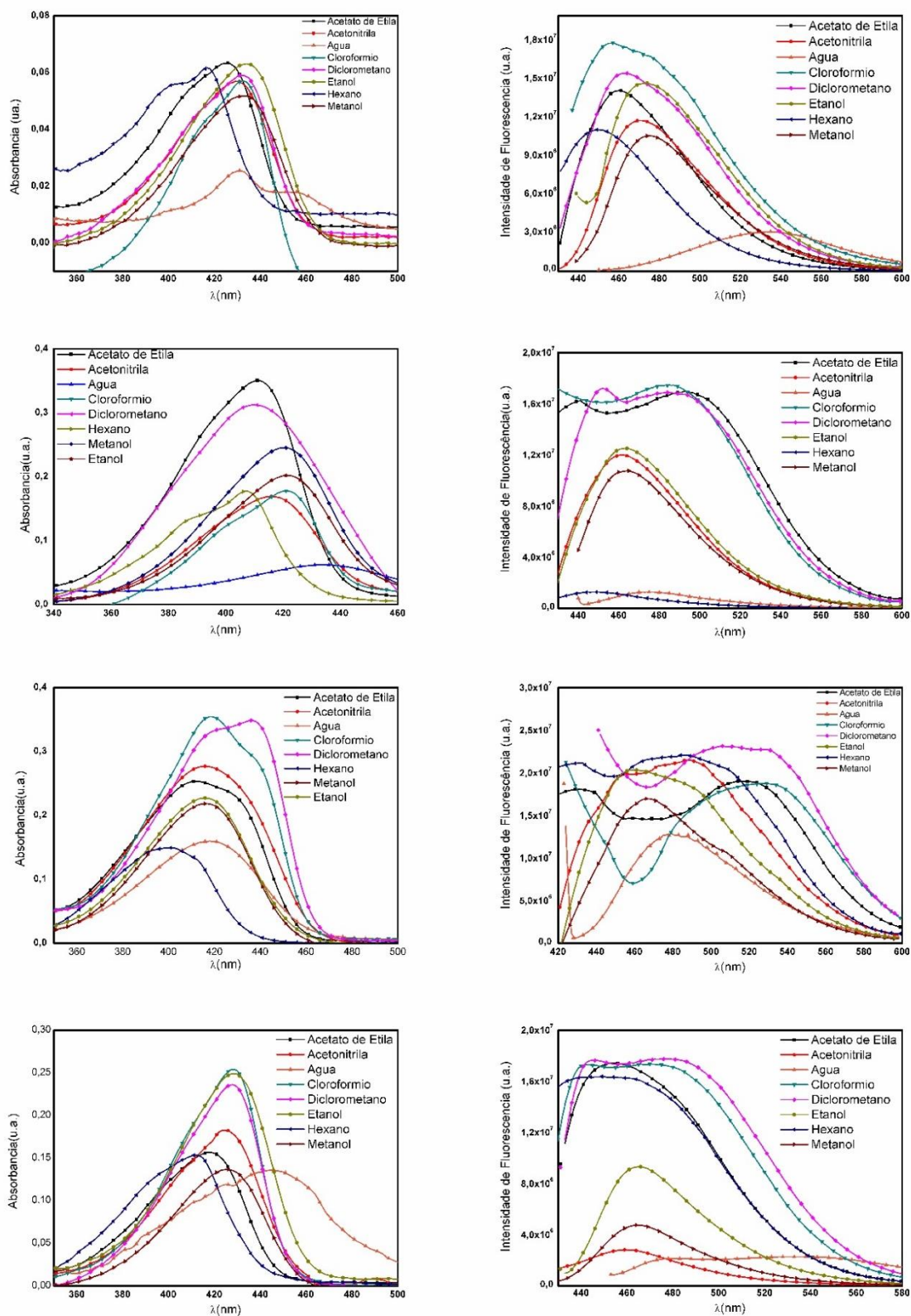
Pode-se observar que na maioria dos compostos analisados o deslocamento de Stokes é bastante largo, alguns compostos mostraram deslocamento acima de 100 nm em alguns solventes específicos. Outros, no entanto apresentaram deslocamento de Stokes relativamente discretos, como no caso da **Cum-NH-BTD**, com deslocamento entre 21 e 77 nm. Como dito anteriormente, um composto que apresenta altos deslocamentos de Stokes tem uma estabilidade associada no seu estado excitado, já estruturas que possuem baixos deslocamentos não possuem tal estabilidade. Os rendimentos quânticos das estruturas foram medidos e todos os derivados mostraram ótimos resultados, acima de 0,12. O

rendimento quântico foi calculado pelo método comparativo do rendimento quântico do sulfato de quinina. No caso foi utilizado uma solução 1 mol L<sup>-1</sup> de sulfato de quinina em ácido sulfúrico, que em 366 nm, tem um rendimento de 0,53. Todas as estruturas possuem altos valores de absorvidade molar, sendo a maioria acima de 4. Os espectros de absorção (esquerda) e emissão (direita) dos oito compostos analisados podem ser visualizados na **Figura 36-38**:

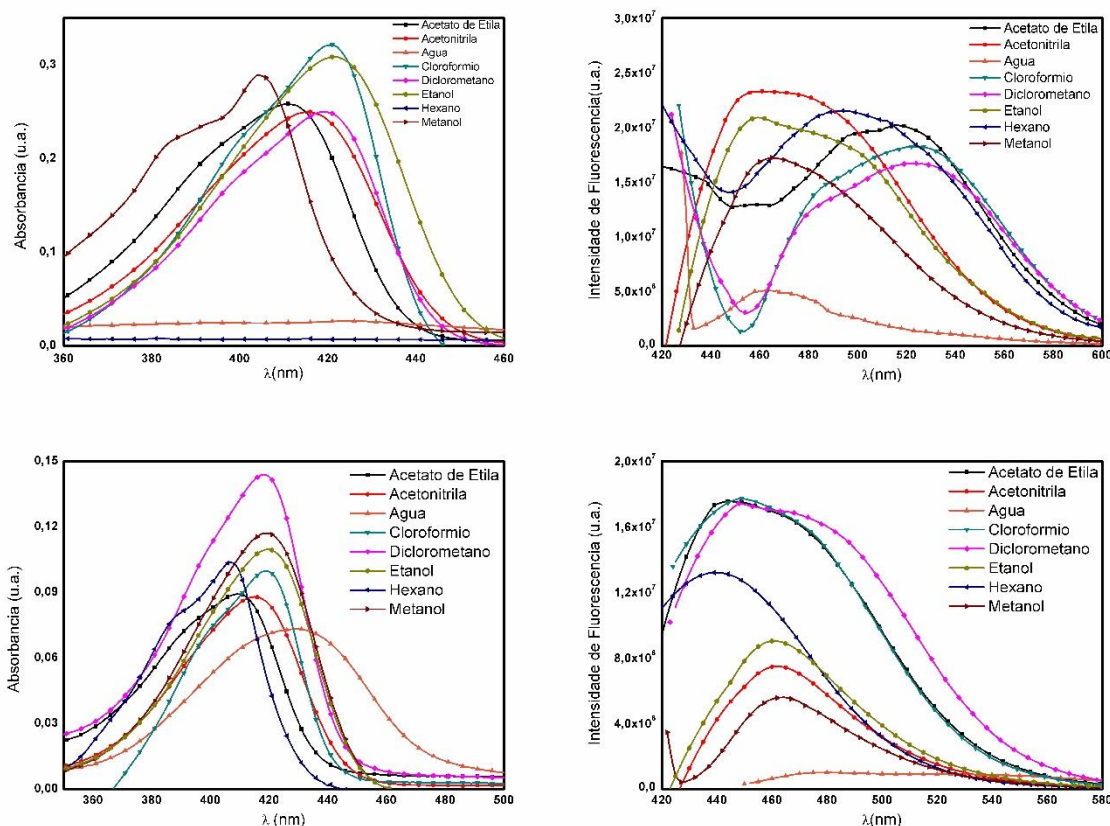


**Figura 36.** Espectros de absorção (esquerda) e de emissão (direita) dos produtos **Cum-NH-BTD** e **BTD-NH-Cum**. Experimentos realizados com concentrações de 10 µM para todas as medidas.





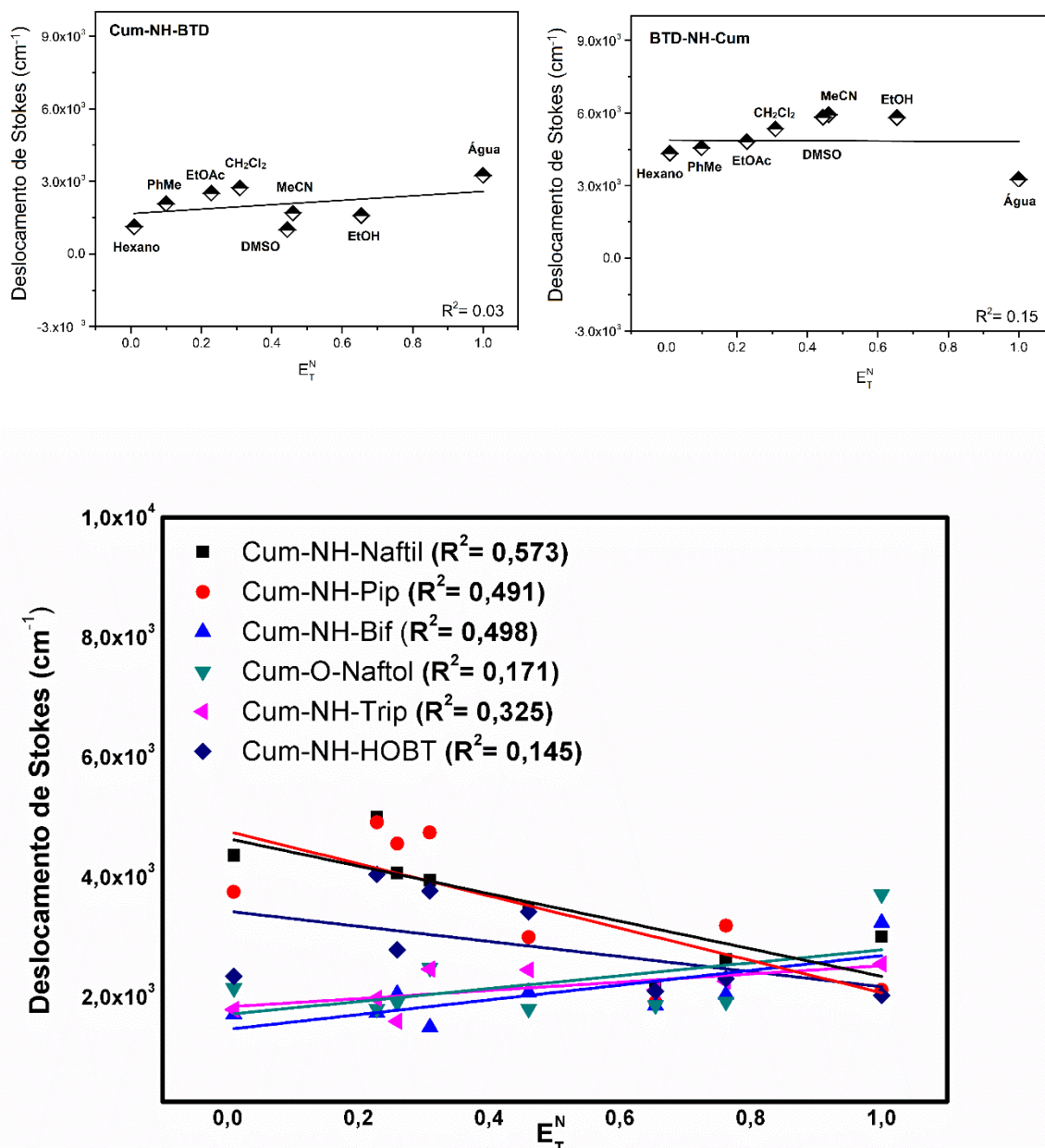
**Figura 37.** Espectros de absorção (esquerda) e emissão (direita) dos produtos **Cum-NH-Bifenil**, **Cum-NH-HOBT**, **Cum-NH-Naftil**, **Cum-NH-Naftol** (de cima para baixo). Experimentos realizados com concentrações de 10  $\mu$ M para todas as medidas.



**Figura 38.** Espectros de absorção (esquerda) e emissão (direita) dos produtos **Cum-NH-Piperonil** e **Cum-NH-Triptamina**. Todas as análises foram realizadas em 10  $\mu\text{M}$  de cada moléculas nos seus respectivos solventes.

Nota-se que as absorções de menor energia observadas nos gráficos de UV-VIS são referentes às transições  $\pi\text{-}\pi^*$  e são do tipo HOMO-LUMO (do inglês, *Highest Occupied Molecular Orbital- Lowest Occupied Molecular Orbital*). Estas absorções são responsáveis pela excitação eletrônica  $S_0$ . Ainda não se pode concluir qual o mecanismo de estabilização do estado excitado predomina nas estruturas, em análises preliminares indicam que o mecanismo pode ser via ICT (transferência de carga interna) já que a maioria das estruturas possuem deslocamentos de Stokes apenas razoáveis, apesar do fato de terem suas devidas substituições nas posições 3 (doador) e 7 (aceptor), com exceção da **BTD-NH-Cum**. Pode-se perceber ainda que na maioria das estruturas preparadas possuem vários sítios que solventes polares próticos podem interagir, fazendo com que haja uma certa estabilização do estado excitado dessas moléculas. Para se ter inferências a respeito do mecanismo de estabilização no estado excitado foram traçados gráficos de polaridade de Reichardt.<sup>99</sup> Um gráfico que mede a sensibilidade do fluoróforo em relação à polaridade do solvente (**Figura 39**). De maneira prática e usual, valores de  $R^2$  elevados indicam uma relação linear entre as energias de estabilização e os parâmetros de Reichardt e consequentemente

a estabilização destas estruturas pode estar relacionada com mecanismos ICT, já que a energia do estado excitado é dependente da polaridade do solvente.

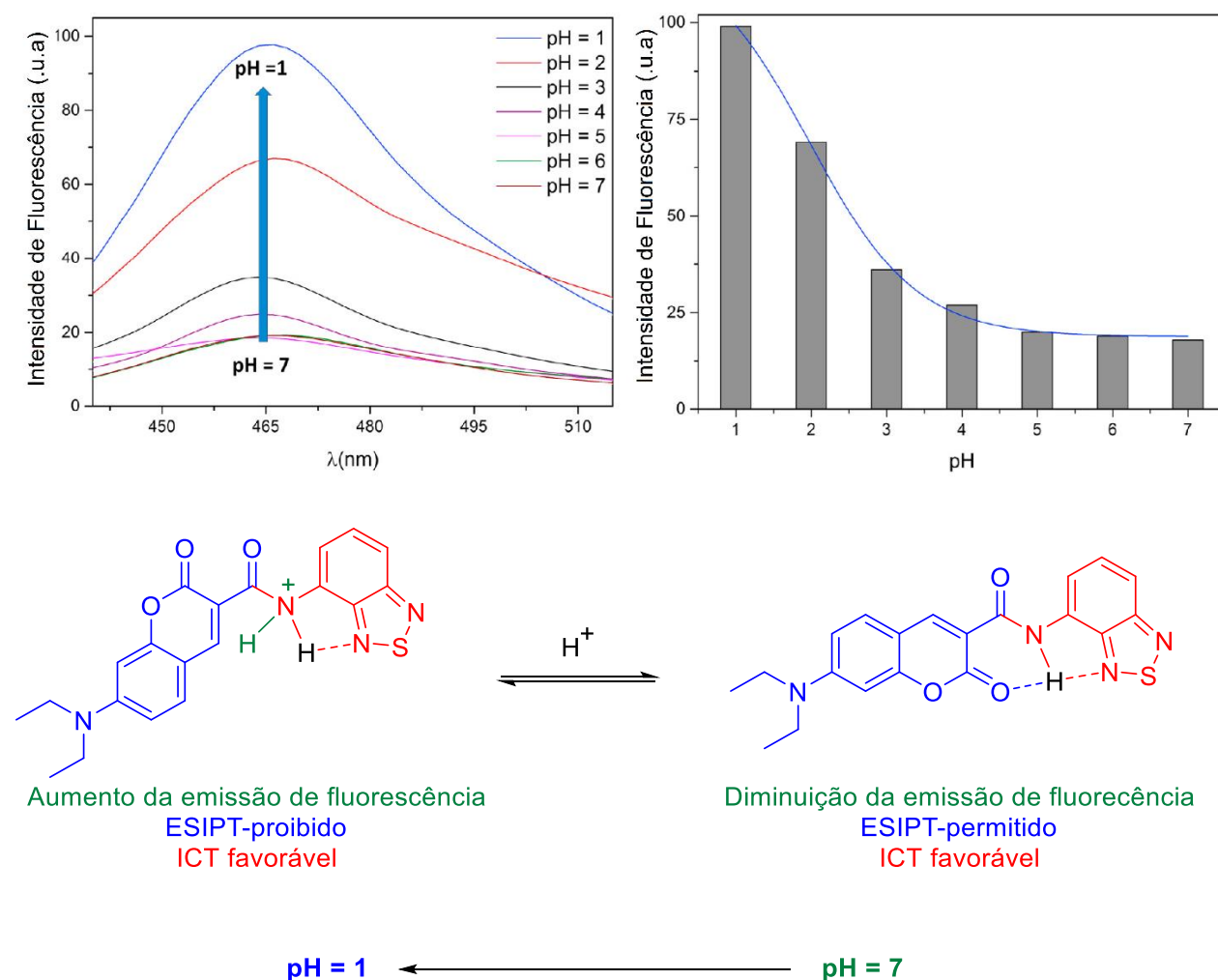


**Figura 39.** Gráficos de efeitos solvatocrômicos de Reichardt para **Cum-NH-BTD** (acima e a esquerda) e **BTD-NH-Cum** (acima e a direita) e para as demais moléculas sintetizadas (abaixo).

Analisando os gráficos de Reichardt, pode se ter uma ideia que nenhum dos produtos parecem estar sendo estabilizados pelo processo ICT. As estruturas não parecem ter uma dependência de estabilização do seu estado em relação à polaridade do solvente, inclusive algumas tendo um maior

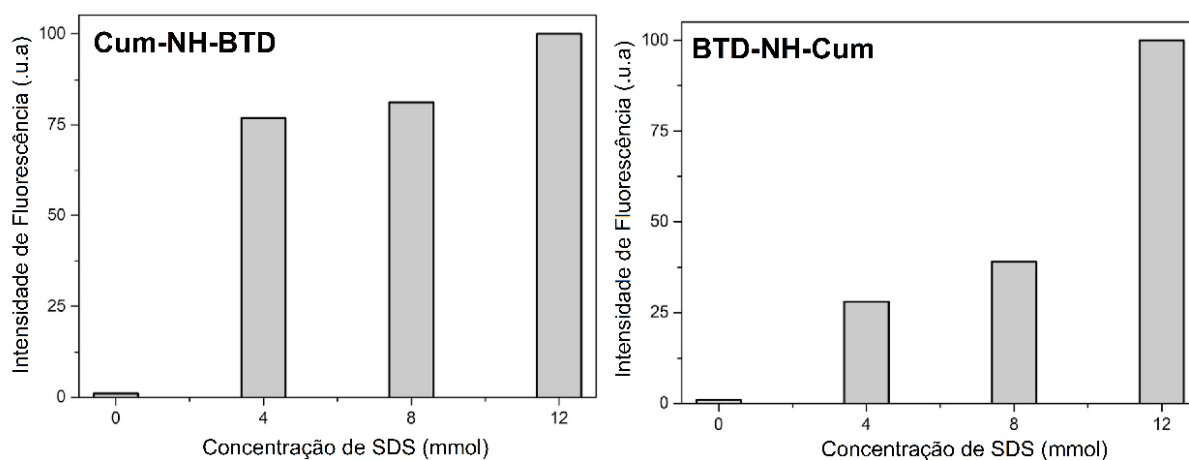
deslocamento de Stokes em solventes apolares. As estruturas podem estar sendo estabilizadas por outros mecanismos, como por exemplo ESIPT ou apenas sendo estabilizados pelo fragmento da cumarina. Outros experimentos são necessários para a comprovação de tal teoria, como por exemplo experimentos de fluorescência resolvido no tempo ou a realização de cálculos teóricos para se obter resultados acerca da geometria das moléculas no estado excitado.

Também foram produzidos gráficos de emissão de fluorescência em função de variações de pH (1-7) para o produto **Cum-NH-BTD**, a fim de saber um pouco mais sobre o processo de estabilização (ESIPT ou ICT) das espécies no estado excitado. Ao se diminuir os valores de pH para mais ácido nota-se um aumento da emissão de fluorescência (**Figura 40**). É importante salientar que a estrutura com o nitrogênio protonado produzido pela diminuição de pH não permite o mecanismo ESIPT. Portanto, cada vez mais, o processo de estabilização por ICT parece ser o mais favorável para a **Cum-NH-BTD**. Não foi necessário realizar este tipo de experimento para o produto **BTD-NH-Cum**, uma que vez que a estrutura não contém hidrogênios ácidos e o mecanismo ESIPT sempre será proibido.



**Figura 40.** Emissão de fluorescência em função da variação de pH do produto **Cum-NH-BTD**. As análises foram realizadas em uma concentração de 10  $\mu$ M.

Por fim, foram realizados experimentos de emissão de fluorescência na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS, do inglês *sodium dodecyl sulfate*) a fim de entender um pouco mais sobre o efeito do aumento de emissão de fluorescência na presença de estruturas lipofílicas. Este experimento é fundamental para correlacionar a lipofilicidade do fluoróforo com sua emissão de fluorescência. Nota-se em ambos os gráficos este aumento de fluorescência quando se aumenta a concentração de SDS. Os resultados destes experimentos é um bom indício da alta lipofilicidade das duas sondas fluorescentes.

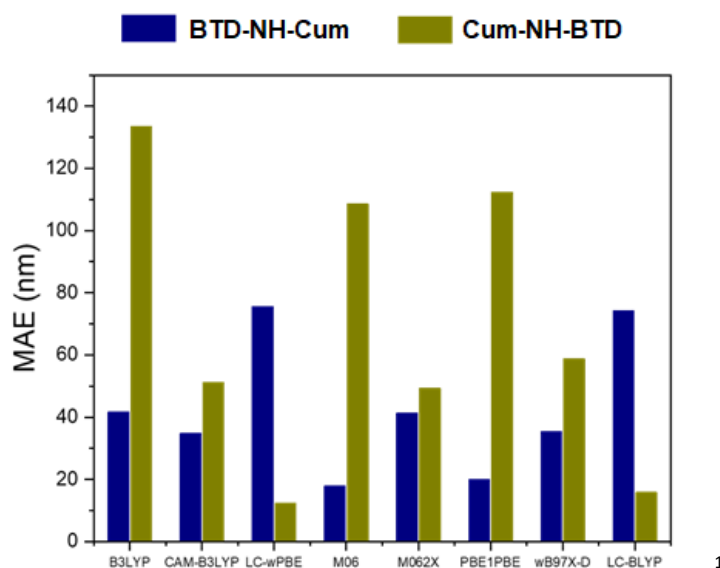


**Figura 41.** Emissão de fluorescência em função da variação de concentração de SDS do produto **Cum-NH-BTD** e **BTD-NH-Cum**. As análises foram realizadas em uma concentração de 10  $\mu$ M.



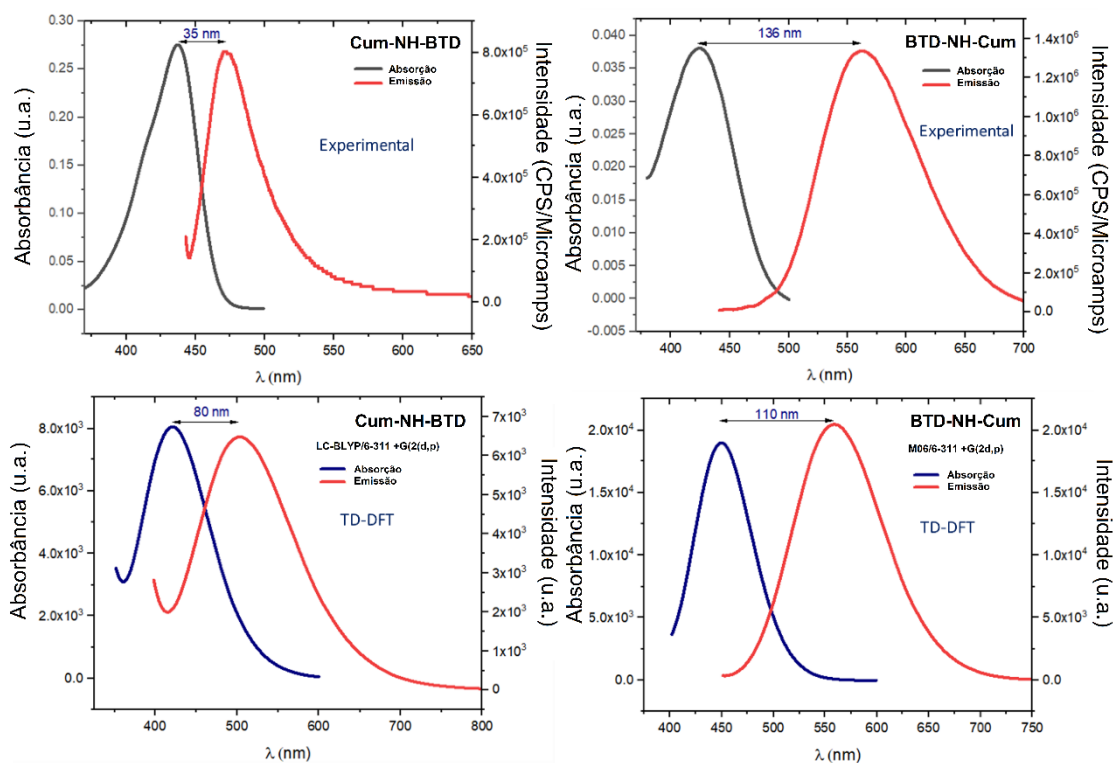
### 3.3. Cálculos Teóricos

Os cálculos teóricos se tornaram fundamentais para entender a natureza das transições eletrônicas de dois derivados de cumarinas. (**Cum-NH-BTD** e **BTD-NH-Cum**), baseando-se na abordagem da teoria funcional da densidade. Os cálculos teóricos não foram realizados em todos os compostos sintetizados pois todos as estruturas apresentam similaridades na arquitetura molecular da **Cum-NH-BTD**, ao passo que, a única molécula que possui diferenciação estrutural é a **BTD-NH-Cum** (não possui função amida ou éster). O estudo começou com o cálculo do erro médio absoluto (MAE) dos comprimentos de onda experimentais e teóricos, levando em consideração o desvio médio ( $\lambda_{\text{teo}} - \lambda_{\text{exp}}$ ) em todos os solventes e em várias funções de densidade (**Figura 42**). As funções de densidade híbridas usadas para a realização dos cálculos computacionais foram diferentes para os dois compostos. Na estrutura **Cum-NH-BTD** a densidade LC<sub>w</sub>-PBE se mostrou muito mais condizente com a análise fotofísica experimental, já na estrutura **BTD-NH-Cum** a melhor opção de densidade foi a M06. A **Figura 43** mostra a comparação dos dois espectros teóricos e experimentais de ambos os produtos em acetonitrila. Valores de deslocamento com diferenças de 35-80 nm (**Cum-NH-BTD**) e 136-110 nm (**BTD-NH-Cum**) podem ser observadas quando comparados os espectros teóricos e experimentais. Tendo em mente que o objetivo do trabalho não é obter uma concordância numérica entre os valores de deslocamento de Stokes teóricos e experimentais, chega-se a conclusão que a densidade de teoria funcional empregada é um bom modelo para correlacionar de forma qualitativa a diferença nos deslocamentos de Stokes.



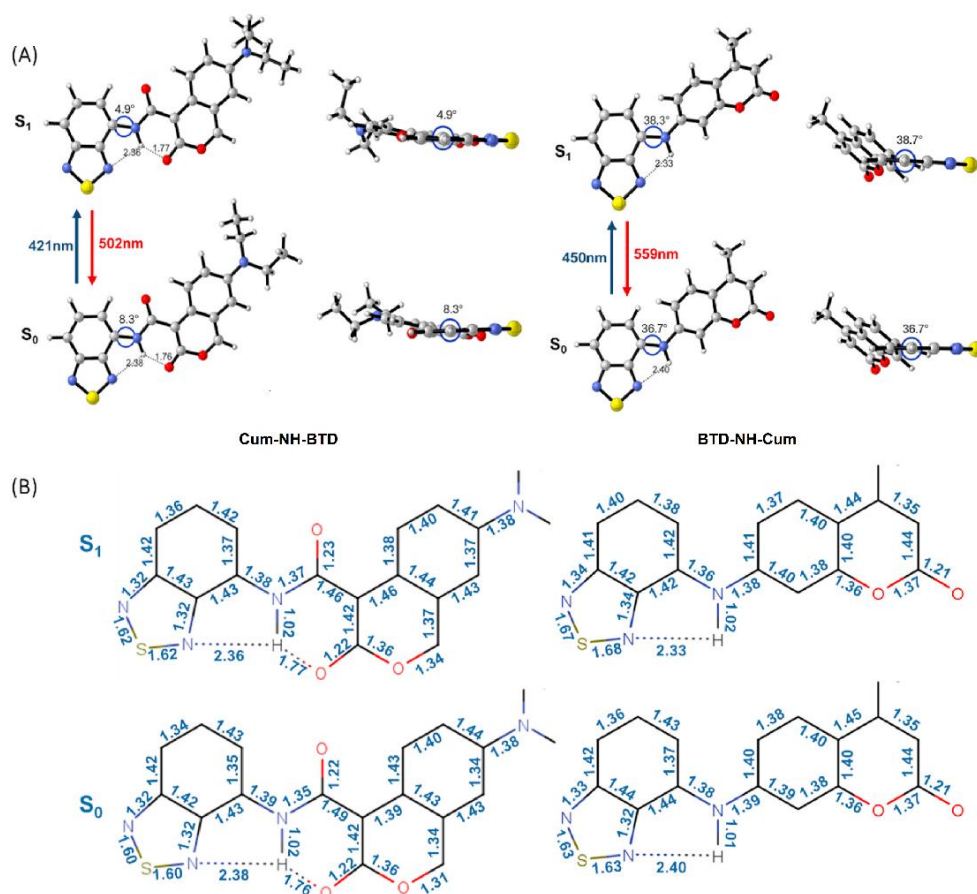
**Figura 42.** Erros médios absolutos em várias funções de densidades comparando as posições máximas teóricas e experimentais em diferentes solventes. O comprimento de onda máximo corresponde à maior banda de comprimento de onda associadas às transições  $S_0 \rightarrow S_1$ .

<sup>1</sup> Os cálculos teóricos foram realizados em parceria com o professor Dr. Daniel Scalabrini (IQ/UnB).



**Figura 43.** Espectros de absorção e emissão teóricos e experimentais ampliados com uma gaussiana de  $3000\text{ cm}^{-1}$  centrada em osciladores verticais dos produtos **Cum-NH-BTD** e **BTD-NH-Cum** em acetonitrila. Os cálculos foram realizados em com TD-DFT empregando 6-311 + G(2d,p). As geometrias  $S_0$  e  $S_1$  foram otimizadas em CAM-B3LYP/6-311 + G(d).

Os dois fluoróforos tiveram suas geometrias otimizadas no estado fundamental e no primeiro estado excitado (**Figura 44**). O produto **Cum-NH-BTD** mostrou uma estrutura quase plana tanto nos estados  $S_0$  e  $S_1$ , devido a duas ligações de hidrogênios intramoleculares. Esta ligação de hidrogênio adicional reduz a torção entre o núcleo BTD e o fragmento de cumarina para  $8,3^\circ$  ( $S_0$ ) e  $4,9^\circ$  ( $S_1$ ). Na molécula **BTD-NH-Cum**, onde tais interações não são permitidas, a torção diedral é quase cinco vezes superior. Ainda na **Figura 44** é mostrado que após a absorção de fótons, todos os fragmentos adjacentes ao núcleo BTD exibem cargas marginais e um alongamento das ligações N–S no estado excitado, isto se deve ao papel de aceitador de densidade eletrônica desempenhado pela BTD. **Figura 44 (B)** mostra que para estas moléculas os comprimentos de ligação do núcleo BTD não são afetados quando estas se encontram no estado excitado, um indicativo de que o núcleo BTD não está participando destas transições eletrônicas. Cálculos também revelaram que ambos os comprimentos das ligações de hidrogênio nos dois híbridos permanecem quase inalterados após excitações e relaxamentos eletrônicos. A acidez dos átomos de hidrogênios é consequentemente inalterada o que seria um bom indicativo de que o mecanismo ES IPT não é o responsável pela estabilização do estado excitado.



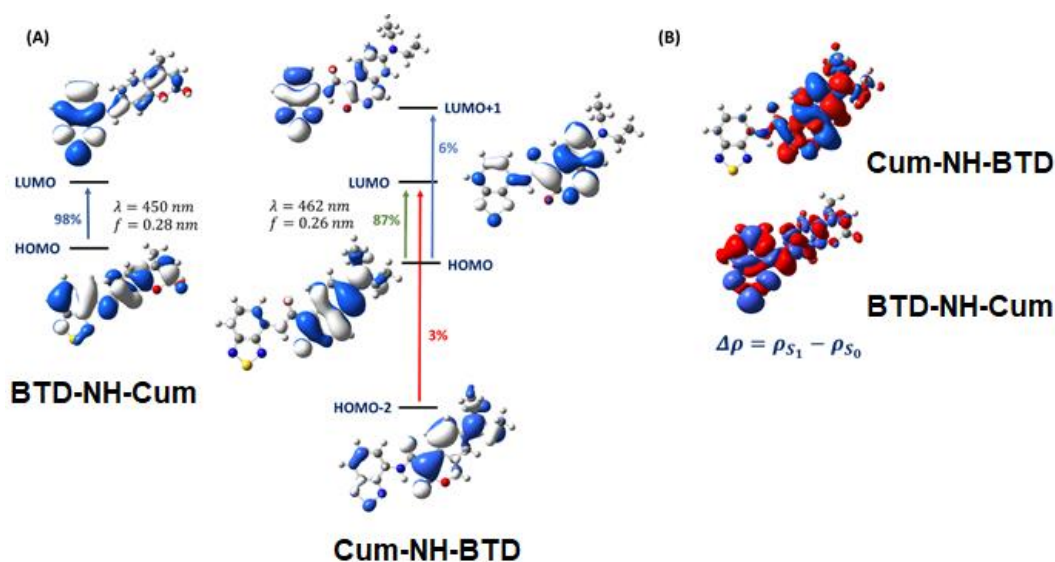
**Figura 44.** (A) Estruturas otimizadas em acetonitrila (IEF-PCM) da **BTD-NH-Cum** (direita) e da **Cum-NH-BTD** (esquerda). (B) Espectros de absorção obtidos a partir de cálculos DFT. Os comprimentos de onda de absorção (azul) e emissão (vermelho) foram calculados em o M06/6-311 + G(2d,p) // CAM-B3LYP/6-311 + G(d) e LC-BLYP/6-311 + G(2d,p) // CAM-B3LYP/6-311 + G(d) para **Cum-NH-BTD** e **BTD-NH-Cum** respectivamente, mostrando comprimentos de ligação selecionados (em Å, ligações duplas e hidrogênios foram omitidos para maior clareza).

Os espectros teóricos de absorção dos dois híbridos foram determinados (**Figura 45**). As primeiras impressões ao observar as bandas calculadas revelam que, para a **Cum-NH-BTD**, os deslocamentos solvatocrômicos, são muito pequenos quando comparados aos desvios do produto **BTD-NH-Cum**. Esta mesma conclusão foi feita de forma experimental, na parte da análise fotofísica discutida anteriormente.

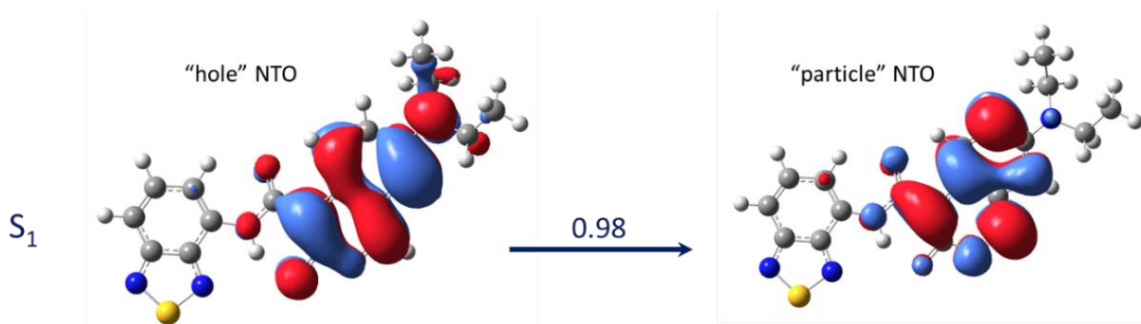
Os orbitais moleculares envolvidos nas excitações eletrônicas  $S_0 \rightarrow S_1$  associadas à maior faixa de comprimento de onda são exibidos na **Figura 45 (A)** mostrando que essas transições são de natureza muito distinta, dependendo das estruturas das moléculas. Para a **BTD-NH-Cum**, a banda de absorção visível é uma transição HOMO-LUMO com forte caráter  $\pi-\pi^*$ . A diferença de densidade entre o primeiro estado excitado  $S_1$  e o estado fundamental  $S_0$ , como mostrado na Figura abaixo, demonstra claramente que a absorção é um forte ICT da parte cumarínica da molécula (grupo doador de elétrons) até o núcleo da BTD (grupo receptor de elétrons). Para a estrutura **Cum-NH-BTD**, as diferenças de densidade entre



os estados  $S_1$  e  $S_0$  não mostram participação do núcleo BTB na transição eletrônica, como mostrado na **Figura 45 (B)**. A maior planaridade da geometria da **Cum-NH-BTD** não é suficiente para acoplar os orbitais moleculares da BTB às porções da cumarina. Uma alternativa para facilitar a compreensão da natureza da transição  $S_0 \rightarrow S_1$  que ocorre na **Cum-NH-BTD** é através da análise da matriz de densidade de transição por meio de orbitais de transição natural (NTOs, do inglês *natural transition orbitals*), **Figura 46**, mostrando que não há separação clara entre as densidades dos buracos e das partículas, mostrando que para a **Cum-NH-BTD** essa transição é predominantemente localizada sobre a parte da cumarina. Simplificando, a absorção não se dá por ICT, mas por uma excitação local. Isso explica muito bem a diferença dos deslocamentos de Stokes das duas estruturas analisada. Este resultado é consistente com o trabalho de Dyrager e colaboradores<sup>84</sup> e foi objeto de estudo da primeira citação do artigo publicado da tese.<sup>100</sup>



**Figura 45.** Orbitais moleculares da **BTB-NH-Cum** (obtida pela densidade M06/6-311+G(2d,p)//CAM-B3LYP/6-311+G(d)) e **Cum-NH-BTD** (obtida pela densidade LC-BLYP/6-311+G(2d,p)//CAM-B3LYP/6-311+G(d)) associada com os maiores comprimentos de onda. (B) Diferenças de densidade eletrônicas entre o estado fundamental  $S_0$  e  $S_1$  dos dois fluoróforos.



**Figura 46.** Orbitais de transições naturais (NTO) da transição  $S_0 \rightarrow S_1$  para **Cum-NH-BTD** pela densidade LC-BLYP/6-311+G(2d,p).

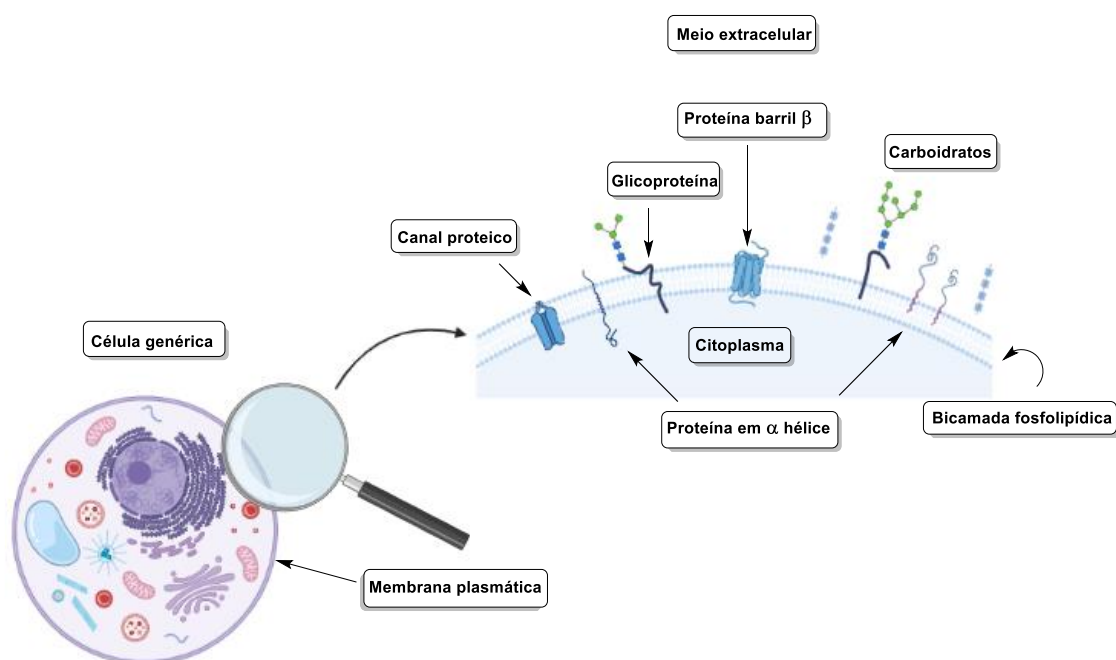
Finalmente, cálculos de DFT foram empregados para a previsão da lipofilicidade das duas estruturas analisadas. Experimentalmente, a medida da lipofilicidade pode ser realizada por meio do logaritmo do coeficiente de partição n-octanol / água ( $\log P_{\text{água}} / \text{n-octanol}$ ), que é definido como a razão de concentração de equilíbrio do analito distribuída entre fases de polaridade oposta.<sup>101</sup> Na **Tabela 5** a seguir são mostradas as energias livres de solvatação em soluções de água e n-octanol onde os efeitos do solvente foram contabilizados no modelo de solvatação baseado na densidade de elétrons do soluto (SMD).<sup>102</sup> Os cálculos de DFT mostraram que tanto o **BTD-NH-Cum** quanto o **Cum-NH-BTD** preferem a fase apolar. Ocorreu uma exceção para o **Cum-NH-BTD** quando a densidade B97D3 é empregada. Além disso os resultados indicam que **Cum-NH-BTD** tem um caráter mais lipofílico do que **BTD-NH-Cum**.

**Tabela 5.** Energias Livres de solvatação em soluções de água e octanol dos fluoróforos **BTD-NH-Cum** e **Cum-NH-BTD**.

<b>BTD-NH-Cum</b>			
Densidade	$\Delta G_{\text{água}}^{\text{solv}}$	$\Delta G_{\text{n-octanol}}^{\text{solv}}$	$\log K_{ow}$
B3LYP	-15.4	-15.91	0.347
B97D3	-13.88	-14.89	0.743
M06-2X	-15.46	-15.65	0.138
M11	-16.61	-16.62	0.005
PBE1PBE	-15.61	-16.18	0.420
$\omega$ B97XD	-15.31	-15.54	0.172
<b>Cum-NH-BTD</b>			
Densidade	$\Delta G_{\text{água}}^{\text{solv}}$	$\Delta G_{\text{n-octanol}}^{\text{solv}}$	$\log K_{ow}$
B3LYP	-15.44	-16.97	1.212
B97D3	-18.6239	-18.16	-0.341
M06-2X	-16.42	-17.92	1.106
M11	-17.65	-18.64	0.726
PBE1PBE	-16.19	-17.48	0.944
$\omega$ B97XD	-15.90	-18.15	1.646

### **3.4. Imageamento Celular**

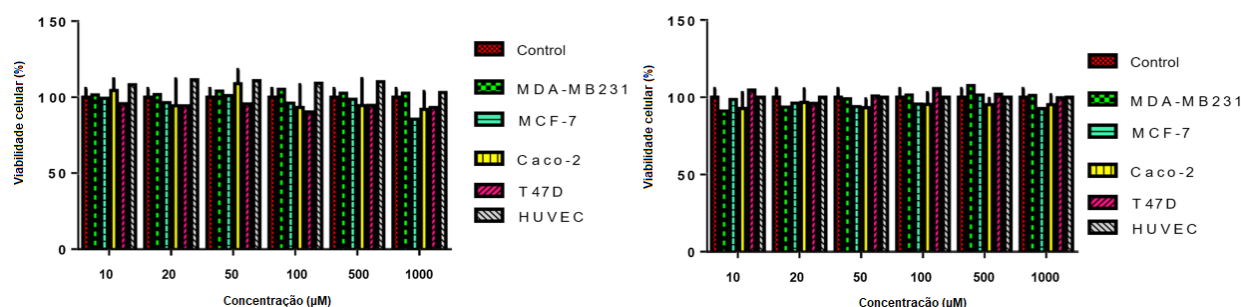
As células eucarióticas são limitadas pela membrana plasmática, uma estrutura importante que impede a entrada de partículas extracelular e também impede a saída do conteúdo celular para o ambiente externo. A membrana plasmática é constituída por uma variedade altamente complexa de lipídios, portanto esta estrutura possui uma natureza hidrofóbica. A membrana plasmática pode ser dividida em duas partes: uma fase condensada rica em colesterol e esfingomielina e uma fase fluida constituída principalmente de glicerofosfolipídios.<sup>103</sup> Transdução de sinal transmembrana e captação seletiva de moléculas são alguns exemplos de eventos celulares importantes que podem ser encontrados na região da membrana plasmática. Outra função da membrana é fornecer regiões específicas para interação com proteínas, estas de extrema importância para a sobrevivência celular.<sup>104</sup> Processos de endocitose, exocitose, migração e adesão celular (processos fundamentais para a homeostase multicelular) são dependentes da membrana plasmática.<sup>105</sup> Portanto, o design racional de moléculas fluorescentes para marcação de membranas plasmáticas se torna um grande desafio sintético. É necessária uma estrutura com características lipofílicas não muito elevadas, já que estas têm uma tendência a adentrar a membrana plasmática e interagir com gotas lipídicas. Além dessa característica, é estritamente necessário que as moléculas a serem utilizadas como sondas fluorescentes, em geral, seguirem os princípios da bioortogonalidade, já discutido anteriormente.



**Figura 47.** Representação da membrana plasmática.<sup>2</sup>

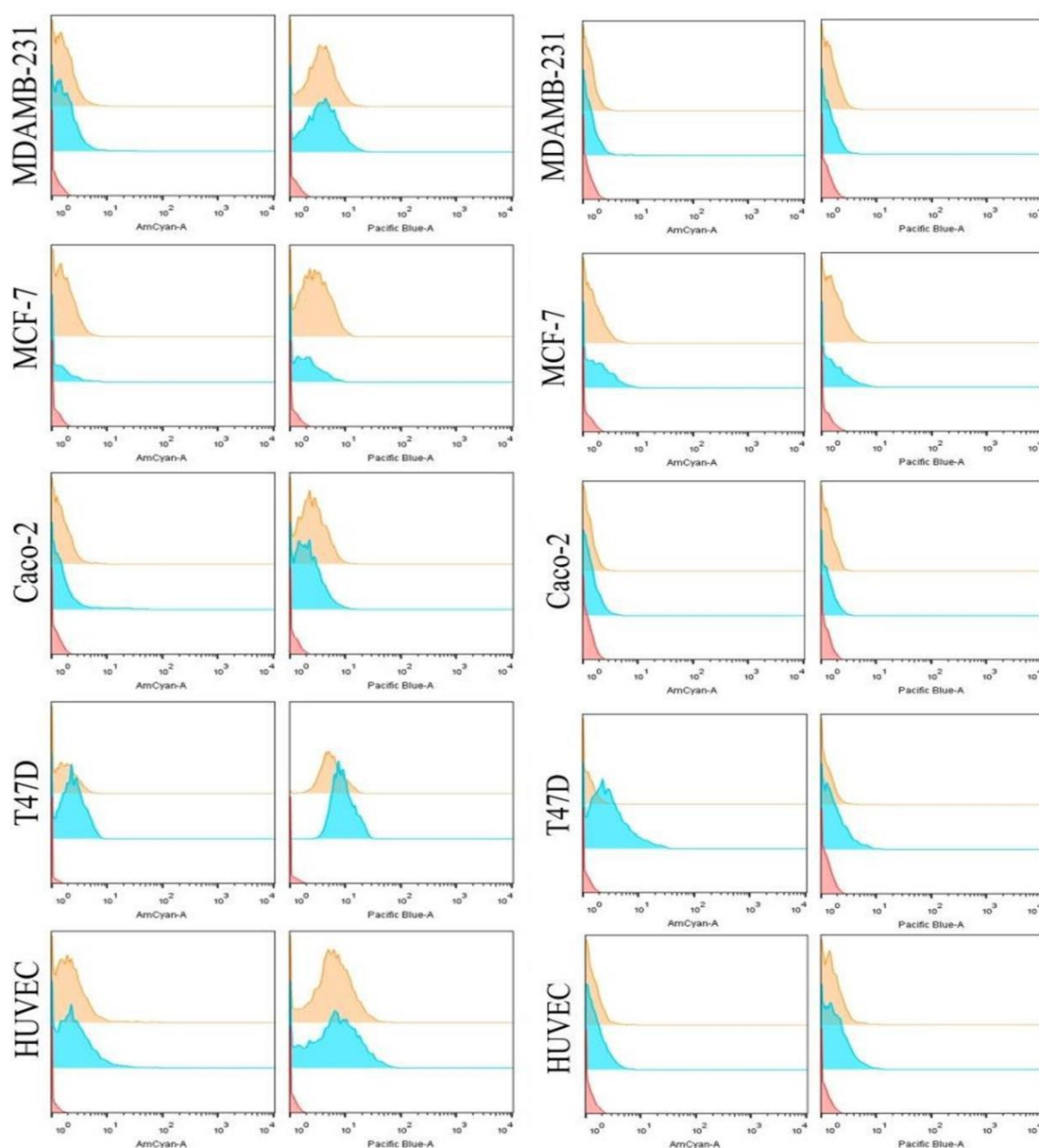
<sup>2</sup> Os estudos de imageamento celular foram realizados em parceria com o professor Dr. José Raimundo Correa (IB-UnB)

Os experimentos de imageamento celular tiveram início com a avaliação de viabilidade (Figura 48) celular de dois híbridos sintetizados (**Cum-NH-BTD** e **BTD-NH-Cum**). Os ensaios de MTT foram realizados em 5 tipos de linhagens celulares MDA-MB231 (células de câncer de mama), MCF-7 (células de câncer de mama), Caco-2 (células de câncer de colorretal humano), T47D (células de câncer de mama) e HUVEC (células endoteliais de veia umbilical humana). Os ensaios de MTT foram realizados em diferentes tipos de concentração dos dois fluoróforos (10 a 1000  $\mu\text{M}$ ). De modo geral, os estudos de viabilidade celular foram bastante positivos, já que em todas as cinco linhagens e em todas as concentrações observou-se uma viabilidade celular sempre maior que 80%. De forma mais simplificada nenhum dos dois produtos apresentaram efeitos deletérios aos diversos tipos de linhagens celulares testadas.



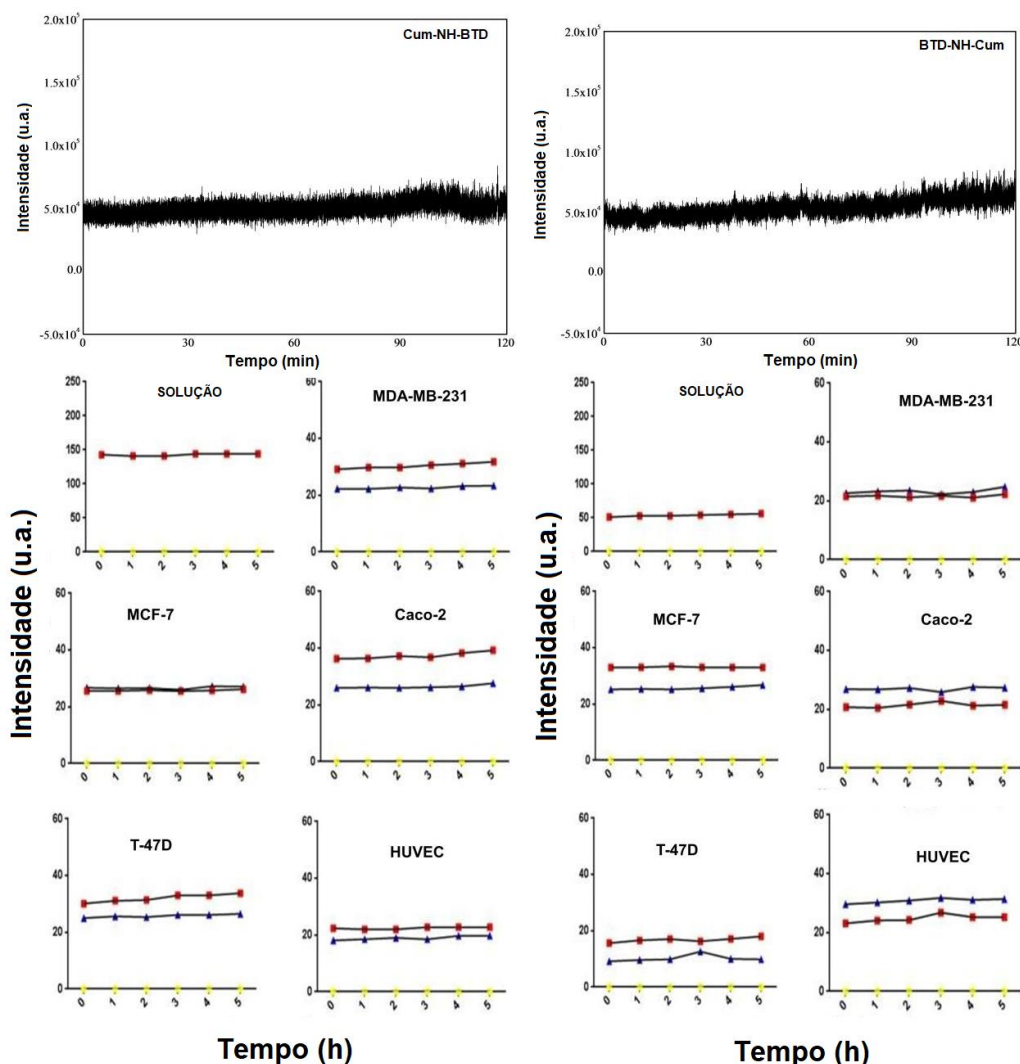
**Figura 48.** Viabilidade celular das linhagens MDAMB-231, MCF-7, Caco-2, T47D e HUVEC, incubadas nas concentrações utilizadas para diluições (100  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  e 1  $\mu\text{M}$ ) dos compostos **Cum-NH-BTD** (esquerda) e **BTD-NH-Cum** (direita), no período de 24 horas.

Experimentos de citometria de fluxo foram importantes para a quantificação de fluorescência dos dois compostos. Os fluoróforos foram incubadas com as cinco linhagens celulares usadas anteriormente para o estudo de viabilidade celular numa concentração de 10  $\mu\text{M}$  por 30 min. A fluorescência apresentada pelas amostras incubadas com os compostos **Cum-NH-BTD** e **BTD-NH-Cum** foi analisada nos canais AmyCian (verde) e Pacific blue (azul). Nota-se, pelos resultados, que o produto **Cum-NH-BTD** tem uma maior intensidade de fluorescência quando comparado ao produto **BTD-NH-Cum**. Além disso, a emissão de fluorescência do produto **Cum-NH-BTD** é mais pronunciada no canal azul. O produto **BTD-NH-Cum** apresentou uma emissão de fluorescência mais baixa, sendo que esta emissão é mais pronunciada no canal verde. A Figura 51 apresenta os gráficos adquiridos no experimento de citometria de fluxo. Sendo os gráficos à esquerda proveniente da incubação de **Cum-NH-BTD** com as linhagens celulares e à direita os gráficos provenientes da incubação de **BTD-NH-Cum**. É importante salientar que ambos os produtos quando incubados em linhagens celulares T47D apresentaram uma maior emissão de fluorescência.



**Figura 49.** Gráficos adquiridos pela citometria de fluxo de **Cum-NH-BTD** (esquerda) e **BTD-NH-Cum** (direita) para a quantificação de fluorescência dos fluoróforos (10  $\mu$ M) em 30 min de análise. As análises se referem a 10 mil eventos por canal usando os padrões Amcyan (canal verde) e Pacific Blue (azul).

Sabe-se que marcadores comerciais exibem fotobranqueamento (perda de intensidade de emissão de fluorescência), que inclusive pode ser vista a olho nu. Experimentos de fotoestabilidade foram realizados com o intuito de comparar a fotoestabilidade dos fluoróforos sintetizados com marcadores comerciais. Ambos os produtos apresentaram excelentes fotoestabilidade tanto em solução quanto no interior das células, sem perda de emissão de fluorescência por mais de cinco horas. Com estas análises é possível concluir que a utilização de ambos os produtos produzidos é muito mais vantajosa, em termos de estabilidade, que os marcadores comerciais (**Figura 50**).

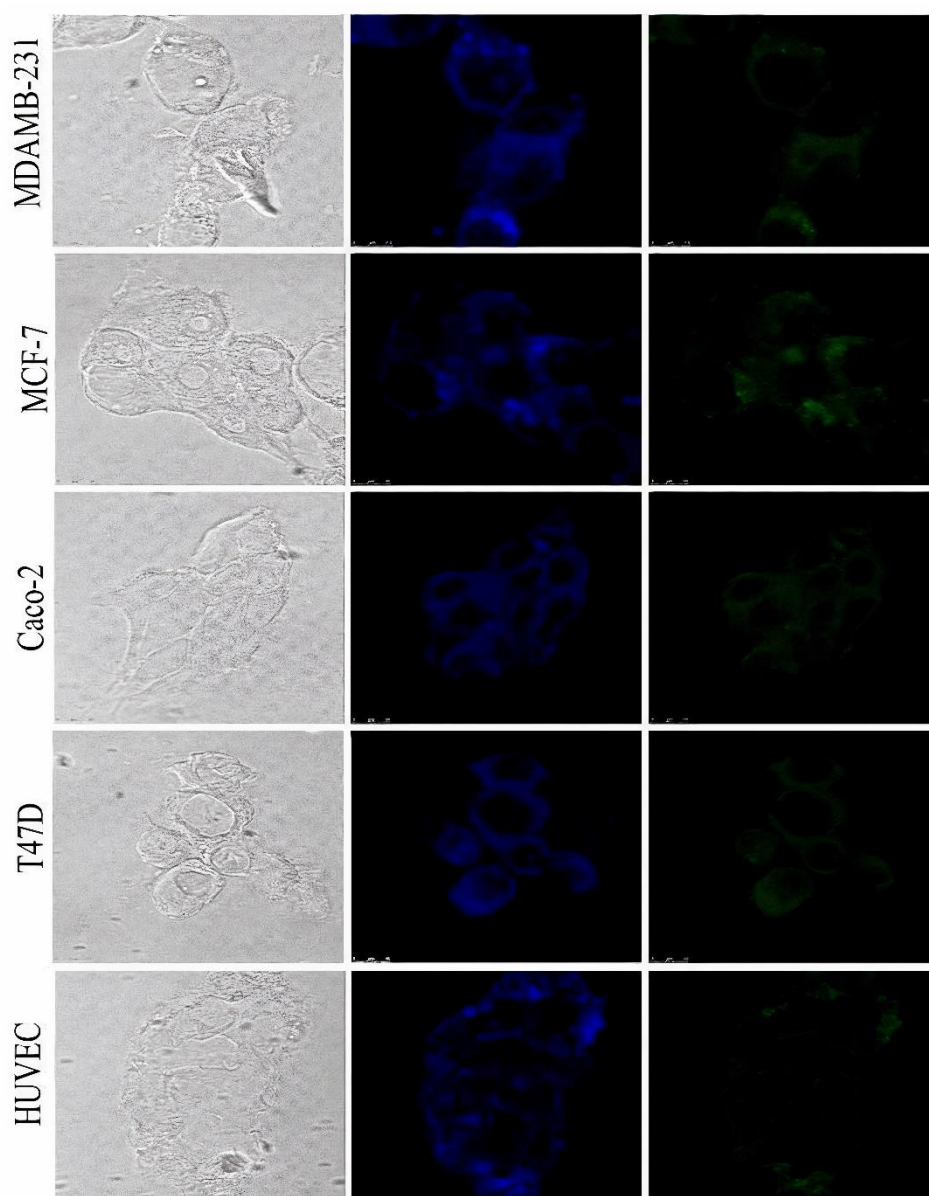


**Figura 50.** Fotoestabilidade de **Cum-NH-BTD** (esquerda) e **BTD-NH-Cum** (direita). Acima a fotoestabilidade dos produtos adquiridos à temperatura ambiente por excitação em seus máximos de absorção enquanto é monitorado os máximos de emissão. A dependência do tempo da intensidade da fotoluminescência foi realizada com uma lâmpada Xe (400 W). Abaixo a emissão de fluorescência no interior das cinco linhagens celulares. Em amarelo a solução de PBS sem os produtos, vermelho é referido como células vivas (exceto para a medição dos gráficos de solução, que é uma solução de PBS contendo corante) e azul é referido como células fixas.

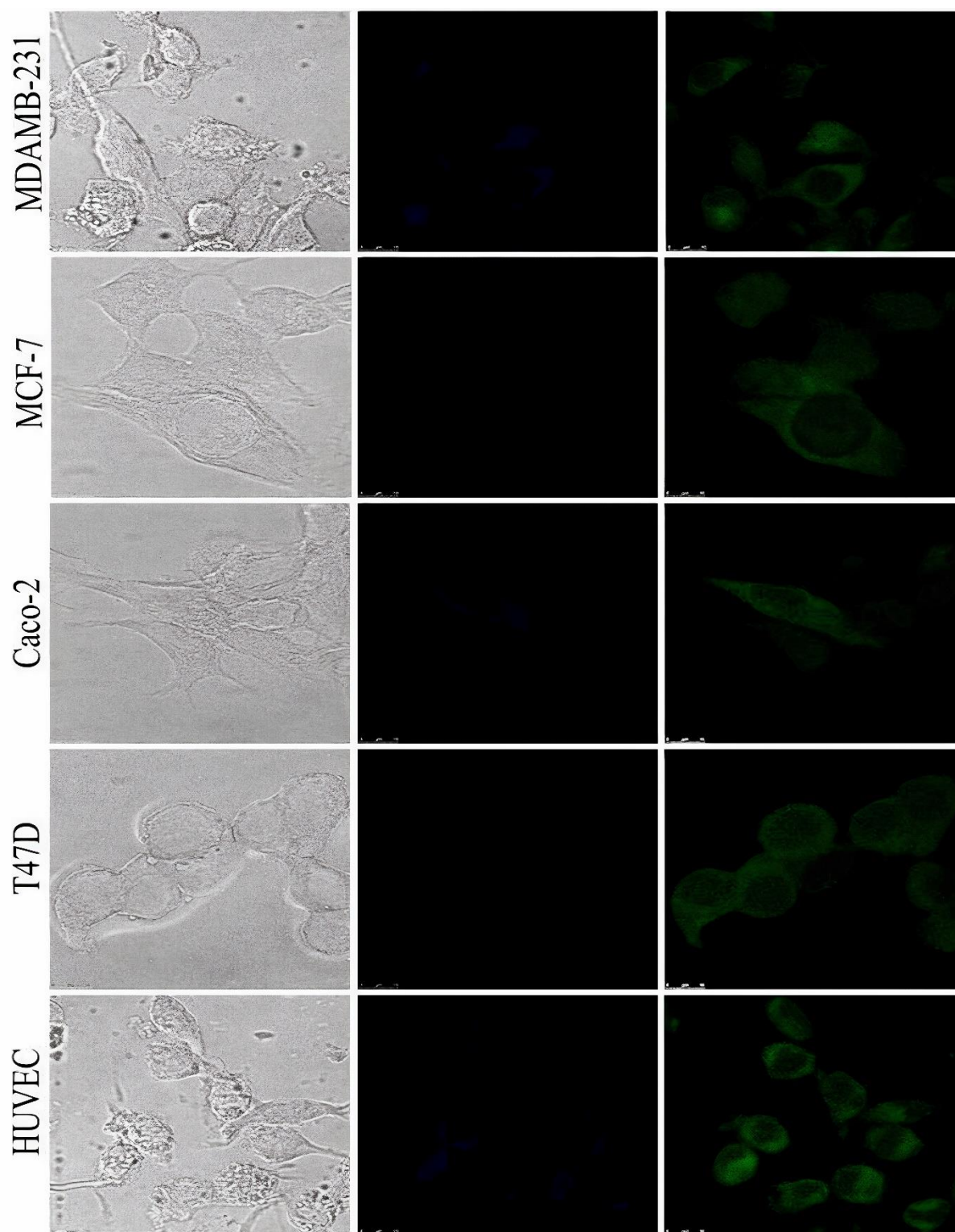
Os experimentos de marcação celular foram fundamentais para entender em que região celular os produtos sintetizados têm preferência em interagir. Os cálculos computacionais realizados anteriormente mostram uma forte lipofilicidade dos dois híbridos e esta conclusão foi confirmada com o estudo de marcação celular. Os fluoróforos se destacaram como excelentes sondas fluorescentes seletivas, pois interagiram preferencialmente com a membrana plasmática das cinco linhagens celulares estudadas, provavelmente interagindo com os glicerofosfolídeos, abundantes nesta região celular. A marcação seletiva na membrana celular é de extrema importância no estudo de bioimageamento e a



membrana plasmática, já discutido anteriormente, é a principal responsável pelo controle de homeostase celular, endocitose, secreção de produtos celulares, síntese proteica e lipídica, entre outras.<sup>106</sup> Além disso, cerca de 70% dos medicamentos interagem com as proteínas presentes nas membranas.<sup>107</sup> Em termos comerciais, existem poucas sondas disponíveis no mercado, a principal sonda seletiva de membrana plasmática é a **CellMask**, mas sua fotoestabilidade dificulta as análises em longos períodos de tempo. Outro fato importante é que estes marcadores comerciais são efetivos apenas em células vivas, em células fixadas este marcador pode permear na membrana e interagir no citoplasma celular. Ambos marcadores sintetizados **Cum-NH-BTD** e **BTD-NH-Cum** são marcadores de membrana plasmática tanto em células vivas quanto em células fixadas.

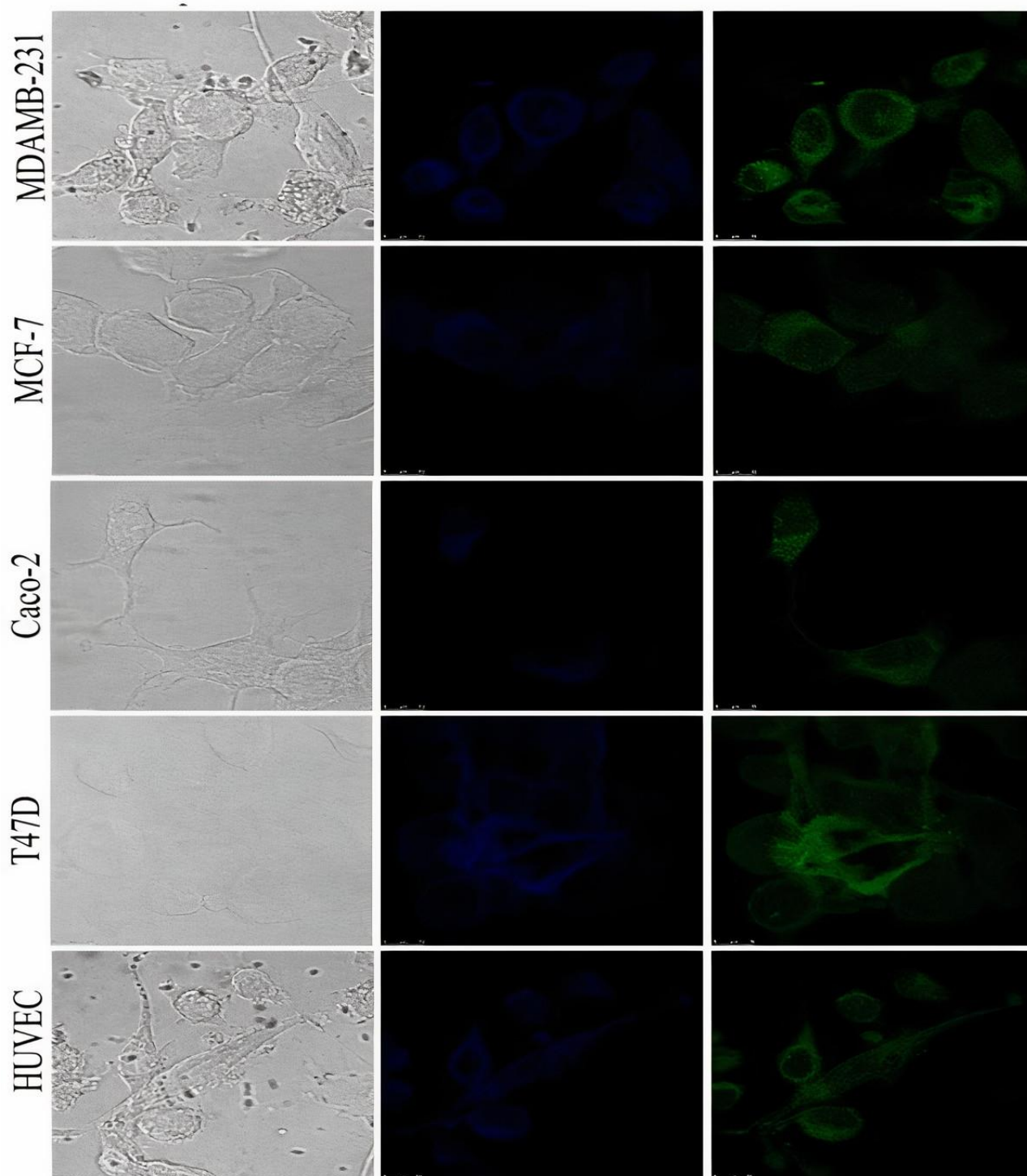


**Figura 51.** Perfil de fluorescência em cinco linhagens celulares vivas diferentes incubadas com **Cum-NH-BTD** (1 μM). Coluna de esquerda para direita: (esquerda) aspectos morfológicos normais da célula. (Centro) emissão no canal azul e (direita) emissão no canal verde. Escala 10 μm.

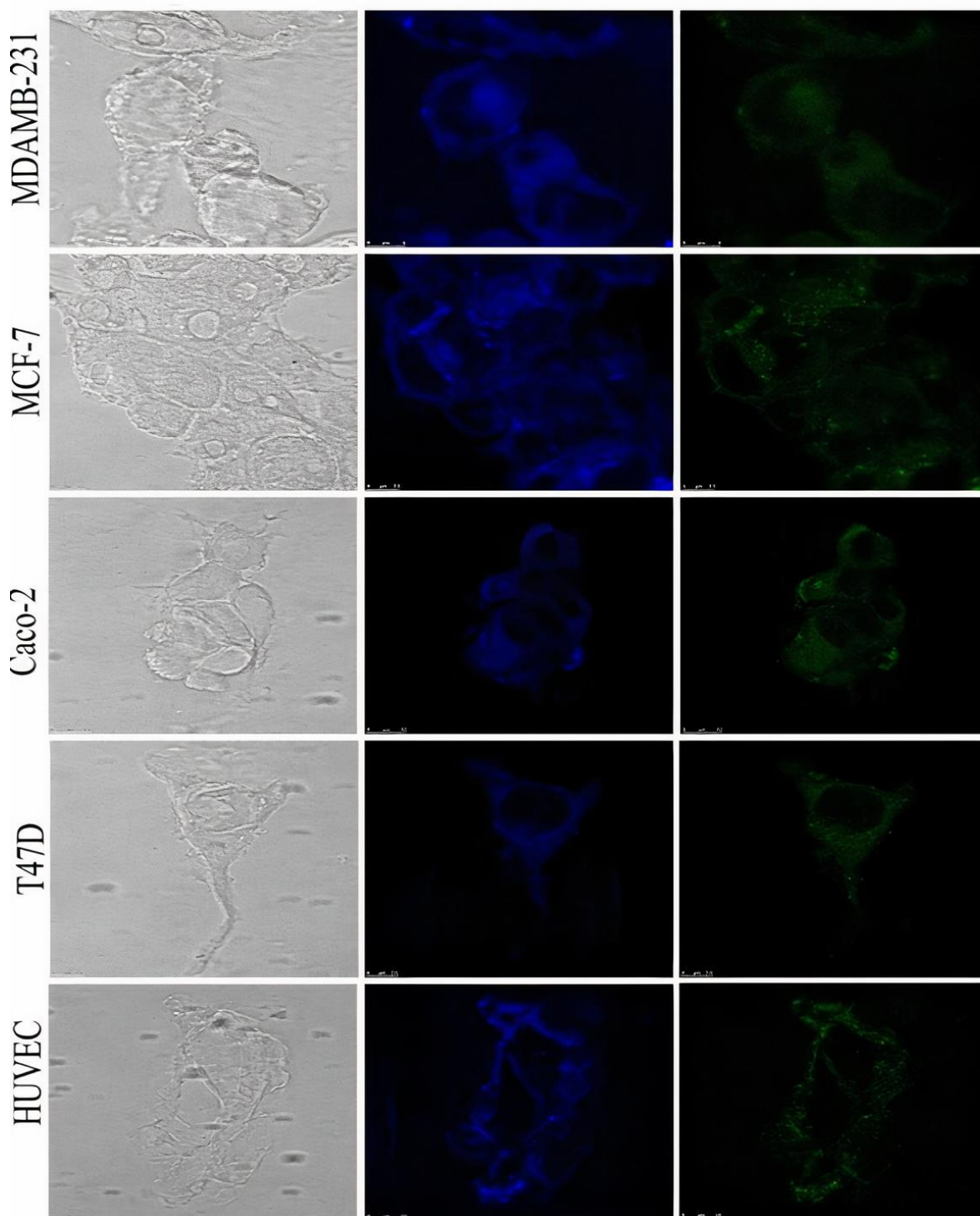


**Figura 52.** Perfil de fluorescência em cinco linhagens celulares vivas diferentes incubadas com **BTD-NH-Cum** (1  $\mu$ M). Coluna de esquerda para direita: (esquerda) aspectos morfológicos normais da célula. (Centro) emissão no canal azul e (direita) emissão no canal verde. Escala 10  $\mu$ m



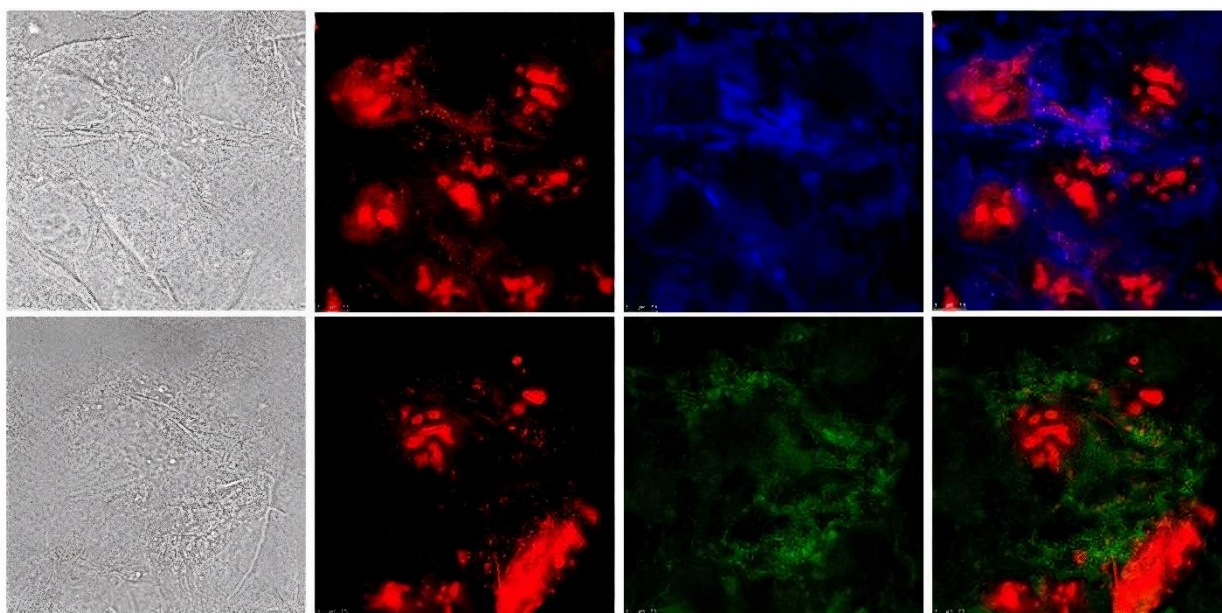


**Figura 53.** Perfil de fluorescência em cinco linhagens celulares pré-fixadas diferentes incubadas com **BTD-NH-Cum** (1  $\mu$ M). Coluna de esquerda para direita: (esquerda) aspectos morfológicos normais da célula. (Centro) emissão no canal azul e (direita) emissão no canal verde. Escala 10  $\mu$ m.



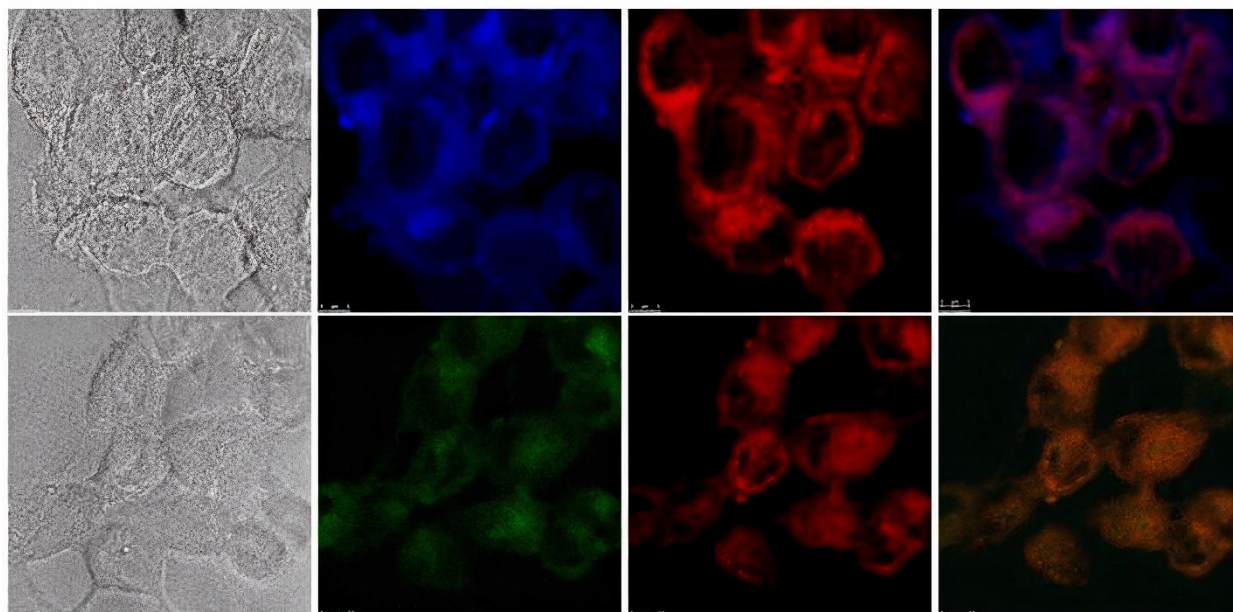
**Figura 54.** Perfil de fluorescência em cinco linhagens celulares pré-fixadas diferentes incubadas com **Cum-NH-BTD** (1  $\mu$ M). Coluna de esquerda para direita: (esquerda) aspectos morfológicos normais da célula. (Centro) emissão no canal azul e (direita) emissão no canal verde. Escala 10  $\mu$ m.

Para não restar dúvidas quanto às seletividades dos híbridos testados foram realizados experimentos de co-marcação celular, na qual resultou em uma combinação quase perfeita das imagens, com coeficientes de correlação de Pearson <sup>108</sup> calculados de 0,94 para **BTD-NH-Cum** e 0,91 para **Cum-NH-BTD** (**Figura 57**). O primeiro experimento foi a marcação celular simultânea dos fluoróforos com iodeto de propídio (PI), um conhecido marcador celular seletivo do canal vermelho que é capaz de adentrar à membrana plasmática e marcar toda a região intracelular (**Figura 55**). No segundo experimento foi realizado a co-marcação com a sonda comercial seletiva para membrana **CellMark**, é possível concluir neste segundo experimento que pela sobreposição das duas imagens (**CellMark** e fluoróforo) a marcação é realmente seletiva na região da membrana plasmática. (**Figura 56**).

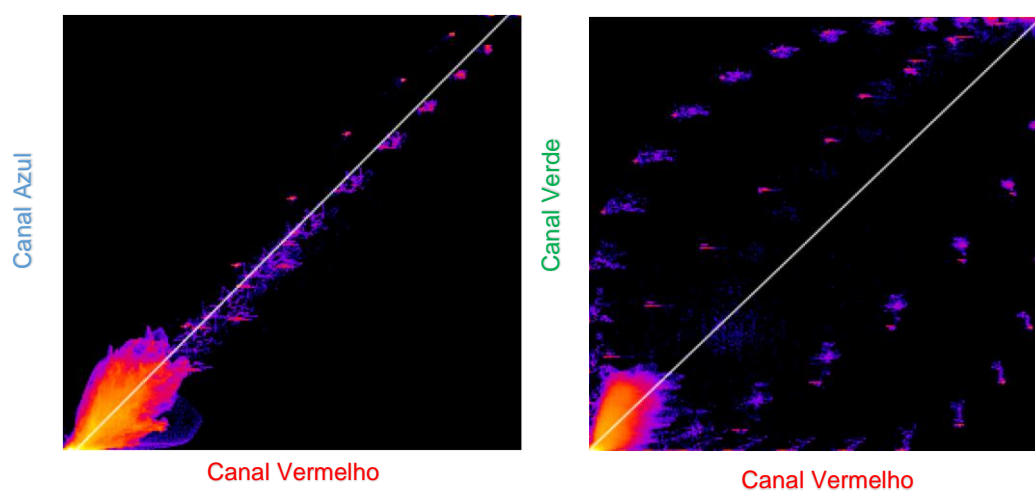


**Figura 55.** Marcação com células MCF-7. Da esquerda para direita: aspectos morfológicos normais das amostras. Marcação intracelular com iodeto de propídio (vermelho), sinal fluorescente das células incubadas com **Cum-NH-BTD** (azul), sinal fluorescente das células incubadas com **BTD-NH-Cum** (verde) e a sobreposição das imagens dos sinais de fluorescência de PI e dos fluoróforos. Escala 10  $\mu$ m.



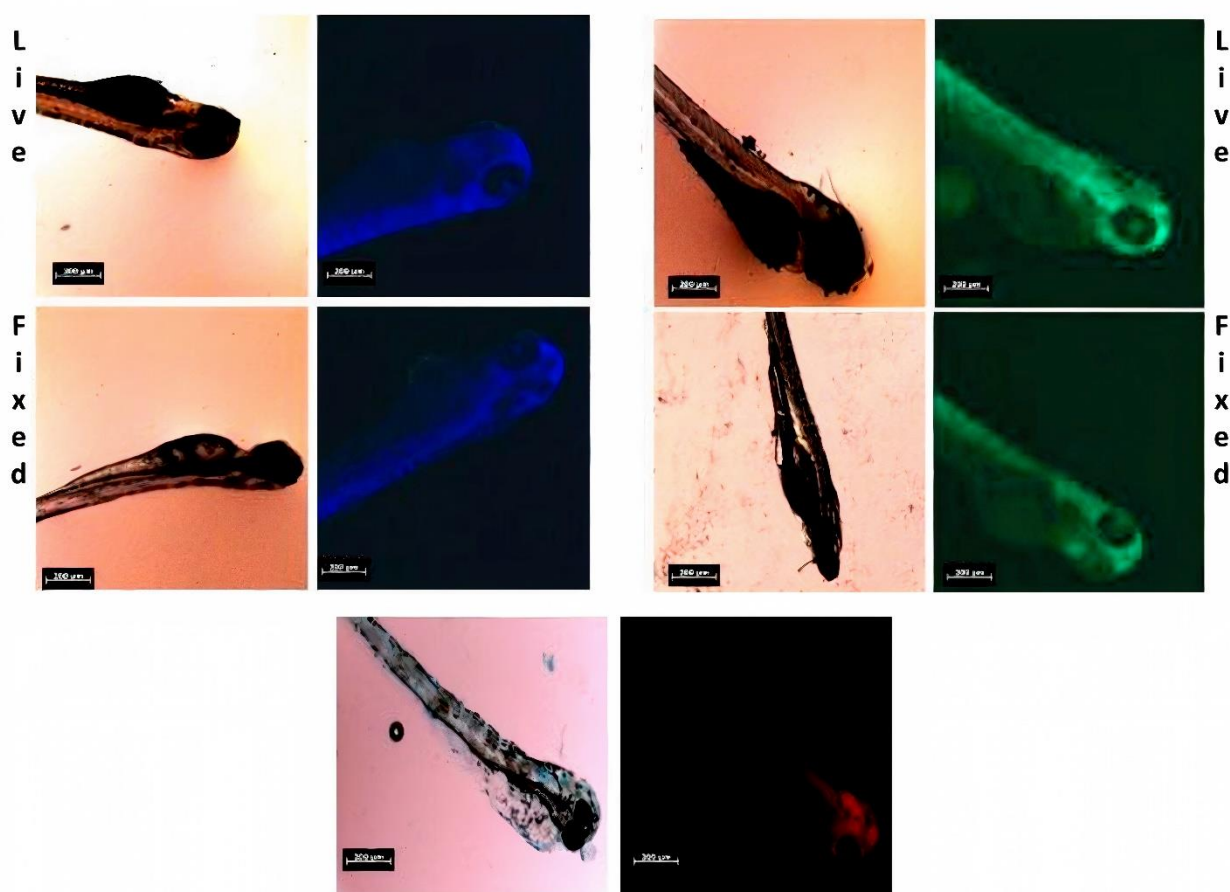


**Figura 56.** Co-marcação em células MCF-7. Da esquerda para direita: aspectos morfológicos normais das amostras. Marcação na região de membrana plasmática com **Cum-NH-BTD** (azul), Marcação na região de membrana plasmática (verde) com **BTD-NH-Cum**. Marcação com a sonda comercial CellMark (vermelho) e a sobreposição das imagens de marcação de CellMark e dos fluoróforos. (roxo e laranja). Escala 10  $\mu\text{m}$ .



**Figura 57.** Coeficientes de correlação de Pearson adquiridos para as estruturas **Cum-NH-BTD** (esquerda) e **BTD-NH-Cum** (direita).

Finalizando os experimentos de bioimageamento os dois fluoróforos foram incubados com embriões de *Zebrafish* (**Figura 58**). É possível notar um acúmulo de marcação na região cerebral e nos sômitos (estruturas epiteliais) dos embriões. Esta marcação pode ser explicada pela quantidade de estruturas lipofílicas presente nestas regiões.<sup>109</sup> Este último experimento finaliza qualquer dúvida quanto à afinidade dos dois compostos nas regiões de membrana plasmática. Com todos estes experimentos de marcação celular foi possível concluir que realmente as duas sondas lipofílicas **Cum-NH-BTD** e **BTD-NH-Cum** são estruturas capazes de realizar uma co-marcação eficiente e seletiva na membrana plasmática de cinco linhagens celulares diferentes, além de testes *in vivo* com os embriões de *Zebrafish* mostrados na **Figura 58**.



**Figura 58.** Embriões de *Zebrafish* vivos e fixados marcados com **Cum-NH-BTD** (esquerda acima), **BTD-NH-Cum** (direita acima) e **CellMask** (abaixo). Escala 200 µm.<sup>3</sup>

<sup>3</sup> Os estudos com embriões de Peixe-Zebra foram realizados em parceria com o professor Dr. César Grisolia (IB-UnB)

## 4. Conclusões e Perspectivas

A partir de um design molecular racional foi possível realizar a síntese de oito novos derivados de cumarinas fluorescentes, através de uma síntese elegante e relativamente simples, obtendo-se rendimentos variados para as moléculas sintetizadas. A primeira etapa do projeto foi a preparação do ácido de Meldrum, reagente precursor do derivado de cumarina. A etapa seguinte foi exatamente a síntese do derivado de cumarina. No passo da preparação dos híbridos fluorescentes problemas ocorreram, já que não foi possível isolar o produto **Cum-NH-BTD** após várias tentativas utilizando o protocolo de preparação de um cloreto de ácido. A solução para este problema foi modificar a metodologia sintética, com a utilização do agente de acoplamento de peptídeo pyBOP. Com esta metodologia foi possível a preparação de sete das oito estruturas preparadas com bons a excelentes rendimentos. Outro tópico importante do trabalho foi a descoberta de uma reação multicomponente inédita na literatura, utilizando o próprio HOBt, proveniente do pyBOP como um dos componentes da reação e conseqüentemente a preparação do produto **Cum-NH-HOBt**. Já a preparação do produto **BTD-NH-Cum** foi realizada de forma totalmente distinta das demais, usando o protocolo de acoplamento de Buchwald-Hartwig catalisada por paládio. As caracterizações foram realizadas por variadas técnicas espectroscópicas e espectrométricas que corroboraram com as estruturas propostas.

Análises fotofísicas foram de extrema importância para a continuação dos estudos, já que com elas foi possível se ter uma ideia de qual mecanismo de dissipação estava ocorrendo no estado excitado das estruturas sintetizadas. Espectros de uv-vis mostraram que existe uma forte banda de absorção HOMO-LUMO, característica de uma transição  $\pi-\pi^*$ . Cálculos de deslocamento de Stokes foram fundamentais para prever a estabilidade das estruturas nos seus estados excitados. Além disso, a realização de experimentos de fluorescência em razão da variação de pH fora necessária para excluir o mecanismo de dissipação ESIPt como sendo o principal mecanismo de estabilização da **Cum-NH-BTD**. A análise fotofísica terminou com experimento de SDS para prever, de forma, qualitativa, a lipofilicidade das duas estruturas.

Cálculos de DFT lançaram luz para entender as propriedades fotofísicas desses derivados e ajudaram a entender o deslocamento de Stokes relativamente baixo e incomum do composto **Cum-NH-BTD** (podendo inclusive ser expandido para os outros derivados não estudados), onde o mecanismo de estabilização do estado excitado não se dá por mecanismo usuais como ICT e ESIPt, mas sim por uma estabilização parcial predominantemente no núcleo cumarínico. Duas destas estruturas foram submetidas à ensaios de viabilidade celular e de bioimageamento e se mostraram excelentes sondas lipofílicas seletivas para membrana plasmática. Ambos os compostos são extremamente estáveis, tendo inclusive uma maior fotoestabilidade que o marcador comercial **CellMask**. Além disso, os dois produtos se mostraram muito mais seletivos que o próprio marcador comercial **CellMask**. Por fim, foram realizados experimentos *in vivo*, usando embriões de peixe-zebra, onde foi possível corroborar a preferência destas moléculas para a membrana plasmática. O desenvolvimento desses novos fluoróforos abre novas

oportunidades para o projeto, síntese e aplicação de derivados de cumarina, não apenas em nível laboratorial, mas também para fins industriais.

Tem-se como perspectiva do trabalho a realização de ensaios de bioimageamento e cálculos teóricos dos demais fluoróforos para os demais produtos sintetizados, para aumentar ainda mais o escopo de estruturas híbridas fluorescentes que podem ter a função de sondas fluorescentes seletivas. Além disso, será necessário a continuação dos estudos da reação multicomponente com pyBOP, expandindo o escopo da reação, bem como a realização de um cuidadoso estudo metodológico e cinético desta reação. Para a elucidação do mecanismo reacional é possível a realização de um estudo mecanístico auxiliado por técnicas de espectrometria de massas.

O trabalho acerca destes híbridos fluorescentes foi publicado recentemente na revista *Dyes and Pigments* em fevereiro de 2021 DOI 10.1016/j.dyepig.2020.109005 e já conta com uma citação

Saulo T.A. Passos, Gisele C. Souza, Douglas C. Brandão, Daniel F.S. Machado, Cesar K. Grisolia, Jose R. Correa, Wender A. da Silva, Brenno A.D. Neto, Plasma membrane staining with fluorescent hybrid benzothiadiazole and coumarin derivatives: Tuning the cellular selection by molecular design, *Dyes and Pigments*, Volume 186, 2021, 109005.

## **5. Materiais e Métodos**

**<sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C RMN.** Os espectros de RMN foram obtidos em espectrômetro Bruker Ascend (600 MHz para <sup>1</sup>H e 150 MHz para <sup>13</sup>C) Foi utilizado TMS (trimetilsilano) como referência interna. As abreviações das multiplicidades dos sinais nos espectros de 1H RMN foram utilizadas segundo a convenção: s (singleto), sl (singleto largo), d (dubleto), t (triplete), q (quadruplete), qt (quintuplete), st (sextuplete), m (multiplete), dd (duplo dubleto), ddd (duplo, duplo dubleto) e tt (triplo triplete).

**Métodos cromatográficos.** Foram utilizadas placas de cromatofolhas de alumínio revestidas com sílica gel 60 F254 Merck, no acompanhamento das reações por cromatografia em camada delgada. Quando necessária a purificação dos compostos, foi utilizada cromatografia de adsorção e coluna, sendo a fase estacionária sílica gel (70- 230 mesh) e a fase móvel descrita posteriormente.

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

**Espectrofotômetro de fluorescência.** Os espectros de emissão foram obtidos em um espectrofluorímetro Horiba Fluorolog. As medidas foram realizadas com fendas de excitação e emissão de 5 nm.

**Rendimento Quântico.** Os rendimentos quânticos foram adquiridos pelo método de comparação em relação ao rendimento quântico do sulfato de quinina (0,53). Para os produtos **Cum-NH-BTD** e **BTD-NH-Cum** foram realizados cálculos de rendimentos quânticos em todos os solventes analisados. Abaixo segue a equação para o cálculo.

$$Q_a = Q_r \left( \frac{I_a A_r}{I_r A_a} \right)$$

Onde  $Q_a$  é o rendimento quântico da amostra;  $Q_r$  o rendimento quântico da referência;  $I_a$  intensidade de absorvância da amostra;  $I_r$  intensidade de absorvância da referência;  $A_r$  a área da emissão de fluorescência da referência e  $A_a$  a área da emissão de fluorescência da amostra.

**Solventes.** Apenas o diclorometano, acetato de etila, hexano e água foram destilados previamente. Outros solventes foram utilizados sem prévio tratamento.

**Reagentes líquidos.** Todos os reagentes líquidos foram destilados antes do uso.



**Análise Fotofísica.** As soluções foram diluídas até que se chegasse numa concentração de 10 µM. Foram utilizados vários tipos de solventes por questão de polaridade.

**Espectrometria de Massas.** Para as análises espectrométricas foi usado um espectrômetro AB Sciex TripleTOF 5600+ com calibração interna. As alíquotas foram preparadas em uma concentração de 1 ppm. Os produtos foram solubilizados em metanol ou acetonitrila (dependendo da solubilidade dos produtos), adicionado 0,1% de ácido fórmico (a utilização de ácidos voláteis favorece a protonação do analito) e colocadas em vials.

**Ensaio de Viabilidade Celular.** A viabilidade das amostras celulares incubadas com os fluoróforos por 24 horas foi determinada pelo ensaio padrão por brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium (MTT) segundo as recomendações do fabricante. Foram semeadas  $3 \times 10^3$  células por poço em placas de 96 poços que foram incubadas overnight a 37 °C com 150 µL/poço de meio de cultivo 44 completo e apropriado. Após este período o meio de cultivo foi removido e as amostras teste foram incubadas com 150 µL de meio de cultivo apropriado para o modelo celular contendo 0,1, 1 e 10 µM do derivado fluorescente. Foram utilizados dois controles negativos: (1) amostras incubadas com meio de cultivo contendo a mesma concentração do diluente. Este teste foi realizado apenas para os derivados que foram solúveis em água ou em DMSO; (2) amostras incubadas apenas com meio de cultivo completo apropriado. Após 24h de incubação, as amostras foram incubadas por 4h, no escuro e à 37°C, com 150 µL da solução de MTT (0,5 mg/mL em meio de cultivo apropriado). Em seguida esta solução foi retirada e 150 µL de DMSO foram adicionados a cada um dos poços para a dissolução dos cristais de formazan. As placas foram lidas no espectrofotômetro Spectramax M5 (Molecular Devices – USA), sendo DMSO o branco. O ensaio de MTT foi realizado em triplicata para cada composto e concentração utilizada e em três experimentos independentes. A viabilidade celular foi calculada de acordo com a seguinte expressão: % células viáveis = [(amostra teste – branco) / (amostra controle – branco)] x 100. Os resultados foram submetidos à análise estatística pelo teste de ANOVA no software GraphPad Prism versão 5.0 para Windows, GraphPad Software (San Diego, CA, USA).

**Ensaio de Marcação Celular.** Para avaliar o perfil das marcações fluorescentes dos compostos,  $3 \times 10^5$  células foram semeadas sobre lamínulas redondas em placas de 24 poços. As células foram incubadas com os híbridos fluorescentes por 30 min na concentração de 0,1, 1 e 10 µM. Em seguida, as células foram lavadas em tampão fosfato salina (PBS) pH 7,4 e fixadas em formaldeído 3,7% por 20 min. As amostras foram novamente lavadas com PBS e as amostras foram montadas com *ProLong Gold Antifade* sobre lâminas, devidamente identificadas. O outro grupo de amostras foi pré-fixado em formaldeído 3,7% por 30 min a temperatura ambiente, lavado três vezes em PBS e incubado com os compostos também na concentração de 0,1, 1 e 10 µM por 30 min a temperatura ambiente. Os poços foram então lavados com PBS e as lâminas foram montadas com *ProLong Gold Antifade*. Todas as amostras foram devidamente identificadas, o ensaio foi feito em triplicata e as lâminas foram analisadas em Microscópio Confocal de Varredura a Laser (Leica TCS SP5).

**Ensaio de co-marcação com CellMask.** Para a avaliação da seletividade dos compostos **Cum-NH-BTD** e **BTD-NH-Cum** para a membrana plasmática foi realizada uma co-marcação das amostras com o marcador comercial de membrana plasmática **CellMask®** (5µg/mL). Foram utilizadas  $3 \times 10^5$  células MCF-7 semeadas sobre lamínulas redondas em placas de 24 poços. Após a adesão, as células foram fixadas em solução de formaldeído 3,7% em seguida as amostras foram lavadas três vezes em PBS à temperatura ambiente. Após a incubação com os compostos **Cum-NH-BTD** e **BTD-NH-Cum** por uma hora na concentração de 10 µM, as amostras foram lavadas três vezes em PBS e incubadas em solução de **CellMask®** por 30 min. As lamínulas foram montadas sobre lâmina de vidro com *ProLong Gold Antifade*. Todas as amostras foram devidamente identificadas, o ensaio foi feito em triplicata e analisadas em Microscópio Confocal de Varredura a Laser (Leica TCS SP5). Em seguida, as imagens foram sobrepostas no **Adobe Photoshop**, para verificar a colocalização

**Ensaio de marcação com Zebrafish.** Os organismos foram mantidos em aquários com osmose reversa e água filtrada em filtros de carbono ativado. Os peixes foram cultivados em um biotério instalado na Universidade de Brasília com fotoperíodo de 12:12 h (luz: escuro). Os ovos de *Zebrafish* foram coletados imediatamente após o acasalamento natural, lavados e verificados em estereomicroscópio (Microscópio de Zoom Estereoscópico - SMZ 1500, Nikon Corporation, Japão). Os embriões não fertilizados, coagulados e aqueles com irregularidades foram descartados. Após a eclosão, as larvas foram colocadas em eppendorf e incubadas com os compostos **Cum-NH-BTD** e **BTD-NH-Cum** na concentração de 10 µM por 3 horas. Outro grupo de larvas foi prefixada em formaldeído à 3,7% por 1 h a temperatura ambiente, lavado três vezes com água de sistema e incubado com os compostos na concentração de 10 µM por 3 horas à temperatura ambiente. Para controle negativo, um grupo de amostras foram incubado somente com a água de sistema. Em seguida foram levadas e analisadas em microscópio. Para análise de marcação de membrana com marcador comercial **CellMask®**, utilizou-se a mesma metodologia de manutenção e coleta citada anteriormente.

**Ensaio de citometria de fluxo.** Para análise quantitativa de intensidade de fluorescência emitida nas linhagens celulares testadas,  $1 \times 10^5$  células foram semeadas em placas de 24 poços. Após a adesão, as células foram incubadas com os derivados fluorescentes por 30 min na concentração de 10 µM. Em seguida, as células foram lavadas em tampão fosfato salino (PBS) pH 7,4 e fixadas em formaldeído 3,7% por 20 min. Outro grupo de amostras foi pré-fixado em formaldeído 3,7% por 30 min a temperatura ambiente, lavado três vezes em PBS e incubado com os compostos também na concentração de 10 µM por 30 min a temperatura ambiente. Em seguida as amostras foram levadas ao citômetro de fluxo BD Fortessa para a quantificação da fluorescência emitida. No citômetro foram coletados dados morfológicos das populações celulares e dentro da faixa mais homogênea destas populações foi quantificada a emissão fluorescente para dez mil eventos (células) em cada condição experimental.

**Ensaio de estabilidade dos fluoróforos.** A estabilidade dos compostos fluorescentes foi realizada em solução e no meio intracelular,  $3 \times 10^3$  células foram semeadas por poço em placas de 96 poços e incubadas *overnight* a  $37^\circ\text{C}$  com 150  $\mu\text{L}$  de meio de cultivo completo e apropriado por poço. Após a adesão, as células foram incubadas com Cum-NH-BTD e BTD-NH-Cum por 30 min na concentração de 10  $\mu\text{M}$ . Em seguida, as células foram lavadas em tampão fosfato salino (PBS) pH 7,4 e fixadas em formaldeído 3,7% por 20 min. Outro grupo de amostras foi pré-fixado em formaldeído 3,7% por 30 min à temperatura ambiente, lavado três vezes em PBS e incubado com os compostos também na concentração de 10  $\mu\text{M}$  por 30 min a temperatura ambiente e os poços foram então lavados com PBS. As placas foram lidas no espectrofotômetro Spectramax M5 por um período de cinco horas.

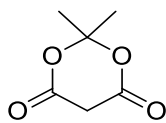
**Cálculos teóricos.** O tratamento teórico da Cum-NH-BTD e BTD-NH-Cum foi realizado usando a abordagem da teoria funcional da densidade (DFT) do conjunto de programas Gaussian 09. A otimização da geometria do estado fundamental em diferentes solventes usando o formalismo IEF-PCM foi conduzida com 6-311 + G (d) conjunto de base de valência dividida de Pople e funcional de troca-correlação híbrida usando o método de atenuação de Coulomb (CAMB3LYP). Cálculos de frequência harmônica foram realizados para verificar a localização de um mínimo de energia. As geometrias otimizadas para o cálculo de TD-DFT de ponto único usando diferentes funcionais de correlação de troca ( $\omega$ B97XD, LC-BLYP, PBE1PBE, M06, M062X, CAM-B3LYP, B3LYP e LC- $\omega$ PBE) em combinação com 6-311 + G (2d,p). A lipofilicidade teórica DFT dos marcadores sintetizados foi avaliada junto com modelos de solvatação contínua para o cálculo do coeficiente de partição octanol / água ( $\log K_{ow}$ ). Diferentes funcionais de correlação de troca foram empregados para prever a afinidade relativa de Cum-NH-BTD e BTD-NH-Cum com fases anfífilas. Empregou-se B3LYP, B97XD, M06-2X, M11, PBE1PBE e  $\omega$ B97XD acoplados com o conjunto de base 6-311 + G (d) e o modelo de solvatação baseado na densidade (SMD) para calcular a energia livre de solvatação  $\Delta G_{solv}$ . O modelo SMD mostra bom desempenho para determinar energias livres de solvatação em várias moléculas.

O logaritmo teórico do coeficiente de partição para a mistura de água / n-octanol a temperatura e pressão constantes foi calculado usando a equação abaixo.

$$\log K_{ow} = \frac{\Delta G_{\text{água}}^{solv} - \Delta G_{\text{n-octanol}}^{solv}}{2,303RT}$$

onde a temperatura de 298K foi selecionada.

- **Procedimento para a síntese do ácido de Meldrum.**

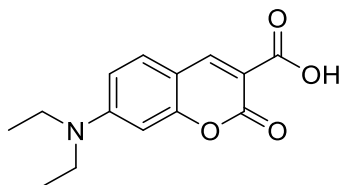


Em um balão de 500 mL foram adicionados 0,5 mol de ácido malônico e 80 mL de anidrido acético. A suspensão foi resfriada a 0 °C e adicionou-se 1,5 mL de ácido sulfúrico sob forte agitação magnética. A temperatura foi elevada para 15 e 17 °C e então foram colocados 38 mL de acetona gota a gota. A mistura foi colocada em repouso no freezer durante 16 h. Os cristais obtidos foram filtrados sob vácuo e lavados com acetona e água gelada. O filtrado foi novamente levado ao freezer durante 8 h e foram tratados com o mesmo procedimento. O produto foi purificado via recristalização em acetona e foram obtidos cristais incolores (p.f.= 92 a 96 °C) em 73% de rendimento.

<sup>1</sup>H RMN (600 MHz; CDCl<sub>3</sub>): δ ppm 3,62 (s, 2H) 1,79 (s, 6H).

<sup>13</sup>C RMN (150 MHz; CDCl<sub>3</sub>): δ ppm 163,12; 106,3; 36,1; 27,5.

- **Procedimento para a síntese de 7-*N,N*-dietilamino-3-ácido carboxílico cumarina.**

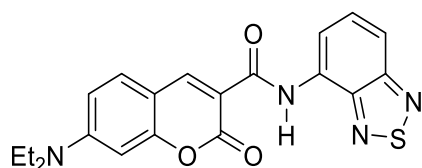


Em um balão de 50 mL contendo uma suspensão de 10 mmol (1,93 g) de 4-(dietilamino) salicilaldeído em 10 mL de metanol foram adicionados 12 mmol (1,73 g) do ácido de Meldrum e 0,20 mmol (15 mg) de acetato de amônio. A mistura foi agitada em temperatura ambiente por 24 h. O precipitado formado foi seco a vácuo e lavado com água e etanol gelado. O sólido laranja foi purificado através de recristalização em metanol para um rendimento de 85% (2,21 g).

<sup>1</sup>H RMN (600 MHz; CDCl<sub>3</sub>): δ ppm 12,24 (sl, 1H); 8,66 (s, 1H); 7,46 (d, 1H, *J*= 9,2 Hz); 6,72 (dd, 1H, *J*= 9,2 e 2,6 Hz); 6,54 (d, 1H, *J*= 2,6 Hz); 3,50 (q, 4H, *J*= 7,1 Hz); 1,28 (t, 6H, *J*= 7,2 Hz).

<sup>13</sup>C RMN (150 MHz; CDCl<sub>3</sub>): δ ppm 165,5; 164,4; 158,0; 153,7; 150,3; 131,9; 110,9; 108,6; 105,7; 96,9; 45,3; 12,4.

• **Procedimento para a síntese do produto Cum-NH-BTD.**

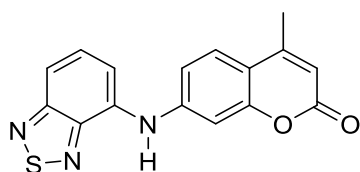


Derivado de cumarina (261 mg, 1,0 mmol), 4-amino-2,1,3-benzotiadiazola (1,0 mmol, 151 mg) e PyBOP (1.0 mmol, 520 mg) foram combinados em 10 mL de DCM. *N,N*-diisopropiletilamina (3,0 mmol, 0,5 mL) foi adicionada à solução. Após 24 h de reação, à temperatura ambiente, a mistura foi lavada com água, seca com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e concentrada. O sólido resultante foi purificado via coluna cromatográfica (20% AcOEt/DCM) para um rendimento de 75% (297 mg). ESI(+)-MS calculado para [C<sub>20</sub>H<sub>18</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>S + H]<sup>+</sup> 395,1172; encontrado 395,1171. Sólido amarelo.

<sup>1</sup>H RMN (600MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 12.14 (s, 1 H), 8.83 (s, 1 H), 8.66 (dd, *J* = 0.9, 7.5 Hz, 1 H), 7.70 (dd, *J* = 0.7, 8.8 Hz, 1 H), 7.63 (dd, *J* = 7.3, 8.8 Hz, 1 H), 7.50 (d, *J* = 8.8 Hz, 1 H), 6.72 (dd, *J* = 2.4, 9.0 Hz, 1 H), 6.60 (d, *J* = 2.6 Hz, 1 H), 3.49 (q, *J* = 7.3 Hz, 4 H), 1.34 - 1.15 (m, 6 H).

<sup>13</sup>C RMN (150MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 162.8, 161.7, 157.9, 154.9, 152.7, 148.7, 148.5, 131.5, 131.0, 130.7, 115.8, 115.6, 110.5, 108.9, 97.2, 45.4, 12.4.

• **Procedimento para a síntese do produto BTD-NH-Cum.**

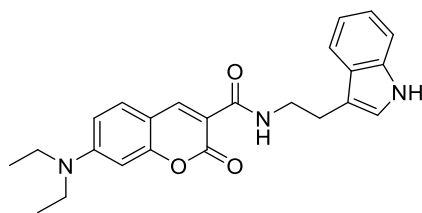


BTD-Br (290 mg, 1,0 mmol), 7-amino-4-metilcumarina (180 mg, 1,0 mmol), Pd(OAc)<sub>2</sub> (11.5 mg, 0,05 mmol), PPh<sub>3</sub> (23 mg, 0.1 mmol), e *t*-BuOK (56 mg, 2.0 mmol) foram misturados em tubo de Schlenk, usando 4 mL de tolueno anidro como solvente da reação. A mistura foi agitada por 72 h em uma temperatura de 100 °C. O produto foi purificado através de coluna cromatográfica. (15% AcOEt/Hex) para um rendimento de 40% (124 mg). ESI(+)-MS calculado para (C<sub>16</sub>H<sub>11</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>S + H)<sup>+</sup>: 310.0645; encontrado: 310.0638. Sólido vermelho.

<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm 7.60 - 7.51 (m, 3 H) 7.44 (s, 1 H) 7.42 - 7.36 (m, 1 H) 7.32 (d, *J*=2.34 Hz, 1 H) 7.17 (dd, *J*=8.50, 2.34 Hz, 1 H) 6.17 (d, *J*=1.47 Hz, 1 H) 2.43 (d, *J*=1.17 Hz, 3 H).

<sup>13</sup>C RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm 161.1, 155.6, 155.2, 152.2, 148.5, 144.5, 133.5, 130.8, 125.8, 114.9, 114.5, 113.2, 112.3, 108.1, 104.6, 18.6.

- **Procedimento para a síntese do produto Cum-NH-TRIP.**

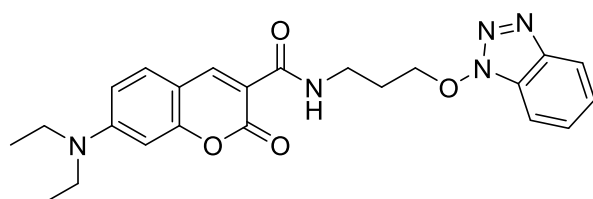


Derivado de cumarina (261 mg, 1,0 mmol), triptamina (1,0 mmol, 160 mg) e pyBOP (1,0 mmol, 520 mg) foram combinados em 10 mL de DCM. *N,N* diisopropiletilamina (3,0 mmol, 0,5 mL) foi adicionada à solução. Após 24 h de reação, à temperatura ambiente, a mistura foi lavada com água, seca com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e concentrada. O sólido resultante foi purificado via coluna cromatográfica (20% AcOEt/DCM) para um rendimento de 92% (375 mg). ESI(+)-MS calculado para [C<sub>24</sub>H<sub>25</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub> + Na]<sup>+</sup> 426,1794; encontrado 426,1820. Sólido amarelo.

<sup>1</sup>H RMN (600MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 8.91 (t, *J* = 5.3 Hz, 1 H), 8.71 (s, 1 H), 8.05 (br. s., 1 H), 7.67 (d, *J* = 7.3 Hz, 1 H), 7.42 (d, *J* = 8.8 Hz, 1 H), 7.37 (d, *J* = 8.1 Hz, 1 H), 7.19 (dt, *J* = 1.1, 7.5 Hz, 1 H), 7.16 - 7.09 (m, 2 H), 6.64 (dd, *J* = 2.6, 8.8 Hz, 1 H), 6.48 (d, *J* = 2.2 Hz, 1 H), 3.81 - 3.74 (m, 2 H), 3.45 (q, *J* = 7.0 Hz, 4 H), 3.09 (t, *J* = 7.0 Hz, 2 H), 1.25 - 1.22 (m, 6 H).

<sup>13</sup>C RMN (150MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 163.0, 157.6, 152.4, 148.0, 136.3, 131.1, 127.4, 122.1, 122.0, 119.3, 118.9, 113.3, 111.1, 109.9, 108.4, 96.6, 45.0, 40.0, 25.4, 12.4.

- **Procedimento para a síntese do produto Cum-NH-HOBT.**



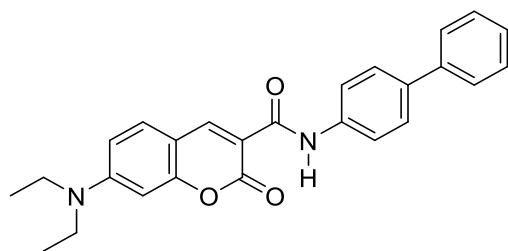
Derivado de cumarina (261 mg, 1,0 mmol), bromopropilamina (1,0 mmol, 218 mg) e pyBOP (1,0 mmol, 520 mg) foram combinados em 10 mL de DCM. *N,N* diisopropiletilamina (3,0 mmol, 0,5 mL) foi adicionada à solução. Após 24 h de reação, à temperatura ambiente, a mistura foi lavada com água, seca com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e concentrada. O sólido resultante foi purificado via coluna cromatográfica (20% AcOEt/DCM) para um rendimento de 52% (226 mg). ESI(+)-MS calculado para [C<sub>23</sub>H<sub>25</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub> + H]<sup>+</sup> 436,1979; encontrado 436,1988. Sólido amarelo.

<sup>1</sup>H RMN (600MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 9.02 (t, *J* = 5.7 Hz, 1 H), 8.71 (s, 1 H), 8.02 - 7.99 (m, 1 H), 7.67 (td, *J* = 0.9, 8.4 Hz, 1 H), 7.54 - 7.50 (m, 1 H), 7.44 (d, *J* = 8.8 Hz, 1 H), 7.38 (ddd, *J* = 0.9, 7.0, 8.3 Hz, 1 H), 6.69 (dd,

$J = 2.6, 9.2$  Hz, 1 H), 6.54 (d,  $J = 2.2$  Hz, 1 H), 4.67 (t,  $J = 6.2$  Hz, 2 H), 3.76 (q,  $J = 6.6$  Hz, 2 H), 3.46 (q,  $J = 7.3$  Hz, 4 H), 2.23 (quin,  $J = 6.5$  Hz, 2 H), 1.24 (t,  $J = 7.2$  Hz, 6 H).

$^{13}\text{C}$  RMN (150MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta = 163.5, 162.7, 157.6, 152.4, 148.1, 143.5, 131.2, 128.0, 127.3, 124.6, 120.2, 110.3, 108.8, 108.7, 97.0, 78.5, 45.3, 36.1, 28.5, 12.3$ .

- **Procedimento para a síntese do produto Cum-NH-BIFENIL.**

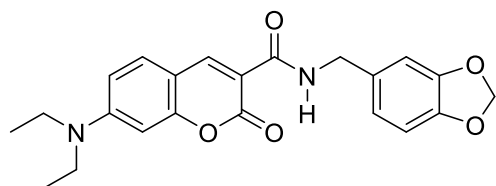


Derivado de cumarina (261 mg, 1,0 mmol), 4-aminobifenil (1,0 mmol, 169 mg) e pyBOP (1,0 mmol, 520 mg) foram combinados em 10 mL de DCM. *N,N* diisopropiletilamina (3,0 mmol, 0,5 mL) foi adicionada à solução. Após 24 h de reação, à temperatura ambiente, a mistura foi lavada com água, seca com  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  e concentrada. O sólido resultante foi purificado via coluna cromatográfica (20% AcOEt/DCM) para um rendimento de 50% (206 mg). ESI(+)-MS calculado para  $[\text{C}_{26}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_3 + \text{Na}]^+$  435,1685; encontrado 435,1707. Sólido amarelo.

$^1\text{H}$  RMN (600MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta = 10.95$  (s, 1 H), 8.81 (s, 1 H), 7.82 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2 H), 7.63 - 7.58 (m, 4 H), 7.55 - 7.52 (m, 2 H), 7.47 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1 H), 7.36 - 7.30 (m, 1 H), 6.67 (dd,  $J = 2.6, 8.8$  Hz, 1 H), 6.54 (d,  $J = 2.6$  Hz, 1 H), 3.47 (q,  $J = 7.3$  Hz, 4 H), 1.25 (t,  $J = 7.2$  Hz, 6 H).

$^{13}\text{C}$  RMN (150MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta = 163.1, 161.1, 157.8, 152.8, 148.5, 140.7, 137.6, 136.9, 131.3, 128.7, 128.6, 128.0, 127.5, 127.0, 126.8, 126.4, 126.2, 120.6, 115.4, 110.2, 108.6, 96.6, 45.1, 12.4$ .

- **Procedimento para a síntese do produto Cum-NH-PIPERONIL.**



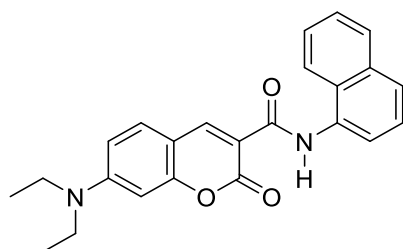
Derivado de cumarina (261 mg, 1,0 mmol), piperonilamina (1,0 mmol, 150 mg) e pyBOP (1,0 mmol, 520 mg) foram combinados em 10 mL de DCM. *N,N* diisopropiletilamina (3,0 mmol, 0,5 mL) foi adicionada à solução. Após 1h de reação, à temperatura ambiente, o produto foi precipitado na mistura reacional. O sólido resultante foi lavado com água não

sendo necessário purificação O produto foi formado com 90% (354 mg). ESI(+)-MS calculado para  $[C_{22}H_{22}N_2O_5 + H]^+$  395,1601; encontrado 395,1625. Sólido amarelo escuro.

$^1H$  RMN (600MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  = 9.12 (br. s., 1 H), 8.72 (s, 1 H), 7.43 (d,  $J$  = 9.2 Hz, 1 H), 6.86 (s, 1 H), 6.82 (d,  $J$  = 7.7 Hz, 1 H), 6.76 (d,  $J$  = 7.7 Hz, 1 H), 6.67 - 6.63 (m, 1 H), 6.49 (br. s., 1 H), 5.95 - 5.91 (m, 2 H), 4.54 (d,  $J$  = 5.5 Hz, 2 H), 3.48 - 3.42 (m, 4 H), 1.27 - 1.21 (m, 6 H).

$^{13}C$  RMN (150MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  = 163.1, 162.7, 157.6, 152.6, 148.3, 147.8, 146.7, 132.4, 131.1, 121.0, 110.0, 109.9, 108.4, 108.4, 108.2, 100.9, 96.5, 45.0, 43.4, 12.4.

- **Procedimento para a síntese do produto Cum-NH-NAFTIL.**



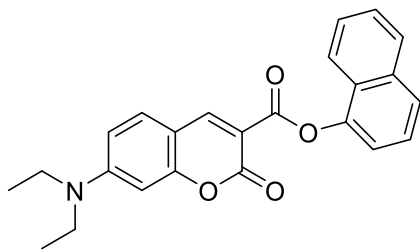
Derivado de cumarina (261 mg, 1,0 mmol), 1-naftilamina (1,0 mmol, 143 mg) e pyBOP (1,0 mmol, 520 mg) foram combinados em 10 mL de DCM. *N,N* diisopropiletilamina (3,0 mmol, 0,5 mL) foi adicionada à solução. Após 24 h de reação, à temperatura ambiente, a mistura foi lavada com água, seca com  $Na_2SO_4$  e concentrada. O sólido resultante foi purificado via coluna cromatográfica (20% AcOEt/DCM) para um rendimento de 66% (255 mg). ESI(+)-MS calculado para  $[C_{24}H_{22}N_2O_3 + Na]^+$  409,1528; encontrado 409,11547. Sólido amarelo.

$^1H$  RMN (600MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  = 11.53 (s, 1 H), 8.87 (s, 1 H), 8.46 - 8.41 (m, 1 H), 8.22 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1 H), 7.87 (d,  $J$  = 8.1 Hz, 1 H), 7.67 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1 H), 7.59 (dt,  $J$  = 1.5, 7.7 Hz, 1 H), 7.55 - 7.47 (m, 3 H), 6.69 (dd,  $J$  = 2.4, 9.0 Hz, 1 H), 6.56 (d,  $J$  = 2.2 Hz, 1 H), 3.49 (q,  $J$  = 7.3 Hz, 4 H), 1.27 (t,  $J$  = 7.2 Hz, 6 H).

$^{13}C$  RMN (150MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  = 163.5, 161.5, 157.8, 152.8, 148.7, 134.0, 133.4, 131.4, 128.6, 126.3, 126.3, 125.9, 125.9, 124.7, 121.1, 118.6, 110.4, 110.2, 108.6, 96.6, 45.1, 12.4.



- **Procedimento para a síntese do produto Cum-O-NAFTOL.**



Derivado de cumarina (261 mg, 1,0 mmol), 1-naftol (1,0 mmol, 144 mg) e pyBOP (1,0 mmol, 520 mg) foram combinados em 10 mL de DCM. *N,N* diisopropiletilamina (3,0 mmol, 0,5 mL) foi adicionada à solução. Após 24 h de reação, à temperatura ambiente, a mistura foi lavada com água, seca com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e concentrada. O sólido resultante foi purificado via coluna cromatográfica (20% AcOEt/DCM) para um rendimento de 82% (317 mg). ESI(+)-MS calculado para [C<sub>24</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>4</sub> + Na]<sup>+</sup> 410,1368; encontrado 410,1388. Sólido amarelo.

<sup>1</sup>H RMN (600MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 7.53 - 7.48 (m, 3 H), 7.45 - 7.40 (m, 2 H), 6.65 (dd, *J* = 2.4, 9.0 Hz, 1 H), 6.53 (d, *J* = 2.6 Hz, 1 H), 3.49 (q, *J* = 7.3 Hz, 4 H), 1.27 (t, *J* = 7.2 Hz, 6 H).

<sup>13</sup>C RMN (150MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 163.0, 158.9, 158.1, 153.4, 150.4, 146.8, 134.7, 131.4, 127.8, 127.1, 126.4, 126.4, 125.9, 125.4, 121.8, 118.3, 109.8, 107.9, 96.8, 45.2, 12.5.

## **6. Referências Bibliográficas**

- (1) Evanko, D. *Nat. Methods* **2005**, *2*, 901.
- (2) Lakowicz, J. R. *Principles of fluorescence spectroscopy*; Springer: Maryland, 2010.
- (3) He, L.; Dong, B.; Liu, Y.; Lin, W. *Chem. Soc. Rev.* **2016**, *45*, 6449.
- (4) Nagano, T. *P. JPN. ACAD. B-PHYS.* **2010**, *86*, 837.
- (5) Diwan, U.; Kumar, V.; Mishra, R. K.; Rana, N. K.; Koch, B.; Upadhyay, K. K. *RSC Adv.* **2016**, *6*, 95722.
- (6) Lavis, L. D.; Raines, R. T. *ACS Chem. Biol.* **2014**, *9*, 855.
- (7) Johnson, I. *Histochem J* **1998**, *30*, 123.
- (8) *Termo Fisher Cientific*, 2021, acessado em 22 de março.  
(<https://www.thermofisher.com/br/en/home/life-science/lab-data-management-analysis-software/lab-apps/cell-staining-tool.html>)
- (9) Chen, D.; Long, Z.; Dang, Y.; Chen, L. *Analyst* **2018**, *143*, 5779.
- (10) Tajiri, K.; Kishi, H.; Ozawa, T.; Sugiyama, T.; Muraguchi, A. *Cytom. A* **2009**, *75*, 282.
- (11) Saxena, S.; Jayakannan, M. *Biomacromolecules* **2017**, *18*, 2594.
- (12) Fu, Y.; Finney, N. S. *RSC Adv.* **2018**, *8*, 29051.
- (13) Chan, J.; Dodani, S. C.; Chang, C. J. *Nat. Chem.* **2012**, *4*, 973.
- (14) Chen, Y.; Qi, J.; Huang, J.; Zhou, X.; Niu, L.; Yan, Z.; Wang, J. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* **2018**, *189*, 634.
- (15) Jun, J. V.; Chenoweth, D. M.; Petersson, E. J. *Org. Biomol. Chem.* **2020**, *18*, 5747.
- (16) Zhao, X. J.; Huang, C. Z.; Huang, C. Z. *TrAC, Trends Anal. Chem.* **2010**, *29*, 354.
- (17) Wang, J.-Y.; Liu, Z.-R.; Ren, M.; Lin, W. *Sci.Rep.* **2017**, *7*, 1530.
- (18) Chen, Z.; Zhong, X.; Qu, W.; Shi, T.; Liu, H.; He, H.; Zhang, X.; Wang, S. *Tetrahedron Lett.* **2017**, *58*, 2596.
- (19) Puliti, D.; Warther, D.; Orange, C.; Specht, A.; Goeldner, M. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 1023.
- (20) Kang, Q.; Xiao, Y.; Hu, W.; Wang, Y. *J. Mat. Chem. C* **2018**, *6*, 12529.
- (21) Yang, T.; Sun, J.; Yao, W.; Gao, F. *Dyes. Pigm.* **2020**, *180*, 108435.
- (22) Yang, M.; Chen, J.; He, C.; Hu, X.; Ding, Y.; Kuang, Y.; Liu, J.; Huang, Q. *J. Org. Chem.* **2020**, *85*, 6498.
- (23) Guo, L.; Tian, M.; Zhang, Z.; Lu, Q.; Liu, Z.; Niu, G.; Yu, X. *J. Am. Chem. Soc.* **2021**, *143*, 3169.
- (24) Butkevich, A. N. *Org. Lett.* **2021**, *23*, 2604.
- (25) Jia, S.; Ramos-Torres, K. M.; Kolemen, S.; Ackerman, C. M.; Chang, C. J. *ACS Chem. Biol.* **2018**, *13*, 1844.
- (26) Lee, S.; Chung, C. Y.-S.; Liu, P.; Craciun, L.; Nishikawa, Y.; Bruemmer, K. J.; Hamachi, I.; Saijo, K.; Miller, E. W.; Chang, C. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142*, 14993.
- (27) Courtis, A. M.; Santos, S. A.; Guan, Y.; Hendricks, J. A.; Ghosh, B.; Szantai-Kis, D. M.; Reis, S. A.; Shah, J. V.; Mazitschek, R. *Bioconjug. Chem.* **2014**, *25*, 1043.
- (28) Zhang, H.; Liu, J.; Sun, Y.-Q.; Liu, M.; Guo, W. *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142*, 17069.

- (29) Havlík, M.; Talianová, V.; Kaplánek, R.; Bříza, T.; Dolenský, B.; Králová, J.; Martásek, P.; Král, V. *Chem. Commun.* **2019**, 55, 2696.
- (30) García-López, V.; Chen, F.; Nilewski, L. G.; Duret, G.; Aliyan, A.; Kolomeisky, A. B.; Robinson, J. T.; Wang, G.; Pal, R.; Tour, J. M. *Nature* **2017**, 548, 567.
- (31) Tan, Y.; Yu, J.; Gao, J.; Cui, Y.; Yang, Y.; Qian, G. *Dyes. Pigm.* **2013**, 99, 966.
- (32) Sakabe, M.; Asanuma, D.; Kamiya, M.; Iwatate, R. J.; Hanaoka, K.; Terai, T.; Nagano, T.; Urano, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, 135, 409.
- (33) Guest, M.; Mir, R.; Foran, G.; Hickson, B.; Necakov, A.; Dudding, T. *J. Org. Chem.* **2020**, 85, 13997.
- (34) dos Santos, F. S.; Dias, G. G.; de Freitas, R. P.; Santos, L. S.; de Lima, G. F.; Duarte, H. A.; de Simone, C. A.; Rezende, L. M. S. L.; Vianna, M. J. X.; Correa, J. R.; Neto, B. A. D.; da Silva Júnior, E. N. *Eur. J. Org. Chem.* **2017**, 2017, 3763.
- (35) Amador-Sánchez, Y. A.; Aguilar-Granda, A.; Flores-Cruz, R.; González-Calderón, D.; Orta, C.; Rodríguez-Molina, B.; Jiménez-Sánchez, A.; Miranda, L. D. *J. Org. Chem.* **2020**, 85, 633.
- (36) Oliveira, G. H. C.; Ramos, L. M.; de Paiva, R. K. C.; Passos, S. T. A.; Simões, M. M.; Machado, F.; Correa, J. R.; Neto, B. A. D. *Org. Biomol. Chem.* **2021**, 19, 1514.
- (37) Zhu, H.; Liu, C.; Liang, C.; Tian, B.; Zhang, H.; Zhang, X.; Sheng, W.; Yu, Y.; Huang, S.; Zhu, B. *Chem. Commun.* **2020**, 56, 4086.
- (38) de Souza, V. P.; Santos, F. S.; Rodembusch, F. S.; Braga, C. B.; Ornelas, C.; Pilli, R. A.; Russowsky, D. *New J. Chem.* **2020**, 44, 12440.
- (39) Jain, P.; Joshi, H. *Coumarin: Chemical and pharmacological profile*, **2012**; Vol. 2.
- (40) Pereira, T. M.; Franco, D. P.; Vitorio, F.; Kummerle, A. E. *Curr. Top. Med. Chem.* **2018**, 18, 124.
- (41) Srikrishna, D.; Godugu, C.; Dubey, P. K. *Mini Rev Med Chem* **2018**, 18, 113.
- (42) Hassan, M. Z.; Osman, H.; Ali, M. A.; Ahsan, M. J. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, 123, 236.
- (43) Torres, R.; Faini, F.; Modak, B.; Urbina, F.; Labbé, C.; Guerrero, J. *Phytochemistry* **2006**, 67, 984.
- (44) Thomas, V.; Giles, D.; Basavarajaswamy, G. P. M.; Das, A. K.; Patel, A. *Anticancer Agents Med Chem* **2017**, 17, 415.
- (45) Jung, Y.; Jung, J.; Huh, Y.; Kim, D. *J. Anal. Methods Chem.* **2018**, 2018, 11.
- (46) Wagner, B. D. *Molecules* **2009**, 14, 210.
- (47) Chen, H.; Walsh, C. T. *Chem Biol* **2001**, 8, 301.
- (48) Kostova, I. *Curr HIV Res* **2006**, 4, 347.
- (49) Wu, Y.-H. *World J. Gastroenterol.* **2016**, 22, 188.
- (50) Hwu, J. R.; Kapoor, M.; Tsay, S. C.; Lin, C. C.; Hwang, K. C.; Horng, J. C.; Chen, I. C.; Shieh, F. K.; Leyssen, P.; Neyts, J. *Antiviral Res* **2015**, 118, 103.
- (51) Şahin Gül, D.; Ogutcu, H.; Hayvalı, Z. *J. Mol. Struct.* **2020**, 1204, 127569.
- (52) Naik, M. D.; Bodke, Y. D.; M, V. K.; Bc, R. *Synth. Commun.* **2020**, 50, 1210.
- (53) Ahmed, E. Y.; Abdel Latif, N. A.; El-Mansy, M. F.; Elserwy, W. S.; Abdelhafez, O. M. *Biorg. Med. Chem.* **2020**, 28, 115328.
- (54) Wang, X.-Q.; Chen, X.-B.; Ye, P.-T.; Yang, Z.-X.; Bai, M.-J.; Duan, S.-Y.; Li, Y.; Yang, X.-D. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2020**, 30, 126896.

- (55) Geetha, B. M.; Brinda, K. N.; Achar, G.; Malecki, J. G.; Alwarsamy, M.; Betageri, V. S.; Budagumpi, S. *J. Mol. Liq.* **2020**, *301*, 112352.
- (56) Yun, Y.; Yang, J.; Miao, Y.; Wang, X.; Sun, J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2020**, *30*, 126900.
- (57) Vogt, T. *Mol. Plant.* **2010**, *3*, 2.
- (58) Stefanachi, A.; Leonetti, F.; Pisani, L.; Catto, M.; Carotti, A. *Molecules* **2018**, *23*.
- (59) Kai, K.; Mizutani, M.; Kawamura, N.; Yamamoto, R.; Tamai, M.; Yamaguchi, H.; Sakata, K.; Shimizu, B. *Plant J* **2008**, *55*, 989.
- (60) Bhatia, R.; Pathania, S.; Singh, V.; Rawal, R. K. *Chem. Heterocycl. Compd.* **2018**, *54*, 280.
- (61) Bose, S.; Rudradas, A. P.; Babu, M. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 9195.
- (62) Olomola, T. O.; Klein, R.; Mautsa, N.; Sayed, Y.; Kaye, P. T. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 1964.
- (63) Vekariya, R. H.; Patel, H. D. *Synth. Commun.* **2014**, *44*, 2756.
- (64) Belavagi, N. S.; Deshapande, N.; Sunagar, M. G.; Khazi, I. A. M. *RSC Adv.* **2014**, *4*, 39667.
- (65) Barancelli, D. A.; Salles, A. G.; Taylor, J. G.; Correia, C. R. D. *Org. Lett.* **2012**, *14*, 6036.
- (66) Al Zaydi, K. *Molecules* **2003**, *8*.
- (67) El-Taweel, F. M. A. A.; Elnagdi, M. H. *J. Heterocycl. Chem.* **2009**, *38*, 981.
- (68) Jung, Y.; Jung, J.; Huh, Y.; Kim, D. *J. Anal. Methods Chem.* **2018**, *2018*, 5249765.
- (69) Calcio Gaudino, E.; Tagliapietra, S.; Martina, K.; Palmisano, G.; Cravotto, G. *RSC Adv.* **2016**, *6*, 46394.
- (70) Wu, J.-S.; Liu, W.-M.; Zhuang, X.-Q.; Wang, F.; Wang, P.-F.; Tao, S.-L.; Zhang, X.-H.; Wu, S.-K.; Lee, S.-T. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 33.
- (71) Jung, H. S.; Kwon, P. S.; Lee, J. W.; Kim, J. I.; Hong, C. S.; Kim, J. W.; Yan, S.; Lee, J. Y.; Lee, J. H.; Joo, T.; Kim, J. S. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 2008.
- (72) Passos, S. T. A.; Correa, J. R.; Soares, S. L. M.; da Silva, W. A.; Neto, B. A. D. *J. Org. Chem.* **2016**, *81*, 2646.
- (73) Neto, B. A. D.; Carvalho, P. H. P. R.; Correa, J. R. *Acc. Chem. Res.* **2015**, *48*, 1560.
- (74) 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.
- (75) Carvalho, P. H.; Correa, J. R.; Guido, B. C.; Gatto, C. C.; De Oliveira, H. C.; Soares, T. A.; Neto, B. A. *Chemistry* **2014**, *20*, 15360.
- (76) Medeiros, G. A.; Correa, J. R.; de Andrade, L. P.; Lopes, T. O.; de Oliveira, H. C. B.; Diniz, A. B.; Menezes, G. B.; Rodrigues, M. O.; Neto, B. A. D. *Sens. Actuators B Chem.* **2021**, *328*, 128998.
- (77) Carvalho, T. O.; Carvalho, P. H. P. R.; Correa, J. R.; Guido, B. C.; Medeiros, G. A.; Eberlin, M. N.; Coelho, S. E.; Domingos, J. B.; Neto, B. A. D. *J. Org. Chem.* **2019**, *84*, 5118.
- (78) Carvalho, P.; Correa, J. R.; Paiva, K. L. R.; Machado, D. F. S.; Scholten, J. D.; Neto, B. A. D. *Beilstein J. Org. Chem.* **2019**, *15*, 2644.
- (79) Carvalho, P. H. P. R.; Correa, J. R.; Paiva, K. L. R.; Baril, M.; Machado, D. F. S.; Scholten, J. D.; de Souza, P. E. N.; Veiga-Souza, F. H.; Spencer, J.; Neto, B. A. D. *Org. Chem. Front.* **2019**, *6*, 2371.

- (80) Souza, V. S.; Corrêa, J. R.; Carvalho, P. H. P. R.; Zanotto, G. M.; Matiello, G. I.; Guido, B. C.; Gatto, C. C.; Ebeling, G.; Gonçalves, P. F. B.; Dupont, J.; Neto, B. A. D. *Sens. Actuators B Chem.* **2020**, *321*, 128530.
- (81) Mota, A. A. R.; Carvalho, P. H. P. R.; Guido, B. C.; de Oliveira, H. C. B.; Soares, T. A.; Corrêa, J. R.; Neto, B. A. D. *Chem. Sci.* **2014**, *5*, 3995.
- (82) Mota, A. A. R.; Correa, J. R.; de Andrade, L. P.; Assumpção, J. A. F.; de Souza Cintra, G. A.; Freitas-Junior, L. H.; da Silva, W. A.; de Oliveira, H. C. B.; Neto, B. A. D. *ACS Omega* **2018**, *3*, 3874.
- (83) Suarez, S. I.; Warner, C. C.; Brown-Harding, H.; Thooft, A. M.; VanVeller, B.; Lukesh, J. C. *Org. Biomol. Chem.* **2020**, *18*, 495.
- (84) Colas, K.; Doloczek, S.; Kesidou, A.; Sainero-Alcolado, L.; Rodriguez-Garcia, A.; Arsenian-Henriksson, M.; Dyrager, C. *ChemPhotoChem*, *n/a*.
- (85) Appelqvist, H.; Stranius, K.; Börjesson, K.; Nilsson, K. P. R.; Dyrager, C. *Bioconjug. Chem.* **2017**, *28*, 1363.
- (86) Li, L.; Li, Y.; Dang, Y.; Chen, T.; Zhang, A.; Ding, C.; Xu, Z. *Talanta* **2020**, *217*, 121066.
- (87) Zhang, J.; Konsmo, A.; Sandberg, A.; Wu, X.; Nyström, S.; Obermüller, U.; Wegenast-Braun, B. M.; Konradsson, P.; Lindgren, M.; Hammarström, P. *J. Med. Chem.* **2019**, *62*, 2038.
- (88) Robb, M. J.; Connal, L. A.; Lee, B. F.; Lynd, N. A.; Hawker, C. J. *Polym. Chem.* **2012**, *3*, 1618.
- (89) Bonifacio, V. *Synlett* **2004**, *9*, 1649.
- (90) Al-Warhi, T. I.; Al-Hazimi, H. M. A.; El-Faham, A. *J. Saudi Chem. Soc.* **2012**, *16*, 97.
- (91) Vrettos, E. I.; Sayyad, N.; Mavrogiannaki, E. M.; Stylos, E.; Kostagianni, A. D.; Papas, S.; Mavromoustakos, T.; Theodorou, V.; Tzakos, A. G. *RSC Adv.* **2017**, *7*, 50519.
- (92) Lopes, T. O.; da Silva Filho, D. A.; Lapis, A. A. M.; de Oliveira, H. C. B.; Neto, B. A. D. *J. Phys. Org. Chem.* **2014**, *27*, 303.
- (93) Lakshman, M.; Singh, M.; Kumar, M.; Chamala, R.; Yedulla, V.; Wagner, D.; Leung, E.; Yang, L.; Matin, A.; Ahmad, S. *Beilstein J. Org. Chem.* **2014**, *10*, 1919.
- (94) Ritonga, M. T. S.; Sakurai, H.; Hirao, T. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 9009.
- (95) Neto, B. A. D.; Carvalho, P. H. P. R.; Santos, D. C. B. D.; Gatto, C. C.; Ramos, L. M.; Vasconcelos, N. M. d.; Corrêa, J. R.; Costa, M. B.; de Oliveira, H. C. B.; Silva, R. G. *RSC Adv.* **2012**, *2*, 1524.
- (96) Sakurai, H.; Ritonga, M. T. S.; Shibatani, H.; Hirao, T. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 2754.
- (97) Dorel, R.; Grugel, C. P.; Haydl, A. M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, *58*, 17118.
- (98) Huang, X.; Anderson, K. W.; Zim, D.; Jiang, L.; Klapars, A.; Buchwald, S. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 6653.
- (99) Reichardt, C. *Chem. Rev.* **1994**, *94*, 2319.
- (100) Sukhikh, T. S.; Khisamov, R. M.; Konchenko, S. N. *Molecules* **2021**, *26*, 2030.
- (101) Ribeiro, R. F.; Marenich, A. V.; Cramer, C. J.; Truhlar, D. G. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, *13*, 10908.
- (102) Marenich, A. V.; Cramer, C. J.; Truhlar, D. G. *J. Phys. Chem. B.* **2009**, *113*, 6378.
- (103) Kumari, S.; Mg, S.; Mayor, S. *Cell Res.* **2010**, *20*, 256.
- (104) Hung, M.-C.; Link, W. *J. Cell Sci.* **2011**, *124*, 3381.

- (105) Harjunpää, H.; Lloret Asens, M.; Guenther, C.; Fagerholm, S. C. *Front. Immunol.* **2019**, *10*.
- (106) Budin, I.; Devaraj, N. K. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 751.
- (107) Ziólkowska, N. E.; Christiano, R.; Walther, T. C. *Trends Cell Biol.* **2012**, *22*, 151.
- (108) Lagache, T.; Sauvonnnet, N.; Danglot, L.; Olivo-Marin, J.-C. *Cytometry Part A* **2015**, *87*, 568.
- (109) Jia, H.-R.; Zhu, Y.-X.; Xu, K.-F.; Pan, G.-Y.; Liu, X.; Qiao, Y.; Wu, F.-G. *Chem. Sci.* **2019**, *10*, 4062.

## 7. Anexos

**Tabela S1.** Coordenadas cartesianas das estruturas otimizadas **Cum-NH-BTD** e **BTD-NH-Cum** no estado

fundamental obtido no nível de teoria CAMB3LYP/6-311+G(d).

Cum-NH-BTD				
Energia: -1615.549138 Eh				
Solvente: acetonitrila				
C	-4.56549400	0.43668200	-0.18147800	
C	-3.32760900	-0.26015900	0.03393600	
C	-2.06279900	0.36806900	-0.23518900	
C	-2.10627400	1.64913000	-0.71635600	
C	-3.34399500	2.33355300	-0.91472600	
C	-4.55807100	1.77429100	-0.66230200	
H	-1.19477100	2.16581400	-0.98132500	
H	-3.29523000	3.34789100	-1.29421400	
H	-5.48686400	2.30643600	-0.82037200	
S	-5.08402500	-1.75922200	0.61537000	
N	-5.62616600	-0.30903400	0.11489600	
N	-3.48373500	-1.49775200	0.47988300	
N	-0.94049800	-0.40643700	-0.01537100	
H	-1.12204000	-1.39735100	0.05425000	
C	0.39334200	-0.02213400	0.05731000	
C	1.36769700	-0.96714600	-0.25366400	
C	0.79261900	1.25385800	0.48907200	
C	2.70472400	-0.63418800	-0.13905800	
H	1.09640300	-1.96007800	-0.59201200	
C	2.13032200	1.56395900	0.58624900	
H	0.05501400	1.98612800	0.78395100	
C	3.12791100	0.63190500	0.27132100	
H	2.41244700	2.55113500	0.93039200	
C	4.95800300	-1.40664900	-0.40159400	
C	4.54982400	0.88952400	0.35209700	
C	5.40597400	-0.10248300	0.02462100	
H	6.47872500	0.03321800	0.06624500	
O	3.60306900	-1.60986300	-0.46149600	
O	5.66785100	-2.33713300	-0.71032900	
C	5.04666700	2.23071500	0.79086000	
H	4.68299400	3.01804800	0.12681900	
H	4.69131100	2.46838500	1.79607000	
H	6.13479300	2.26289200	0.79642500	
Energia: -1615.546398 Eh				

Solvente: diclorometano				
C	-4.56608400	0.43593900	-0.18142500	
C	-3.32756700	-0.25951700	0.03489200	
C	-2.06306300	0.36998200	-0.23268600	
C	-2.10745300	1.65080000	-0.71437600	
C	-3.34588000	2.33373400	-0.91412300	
C	-4.55948400	1.77360300	-0.66230100	
H	-1.19592700	2.16753900	-0.97932100	
H	-3.29813900	3.34792600	-1.29428900	
H	-5.48896800	2.30419100	-0.82117900	
S	-5.08261200	-1.76074000	0.61282000	
N	-5.62607400	-0.31094700	0.11333400	
N	-3.48213700	-1.49773200	0.47922700	
N	-0.94096100	-0.40382000	-0.01145500	
H	-1.12382300	-1.39372700	0.06824400	
C	0.39342900	-0.01980600	0.05959800	
C	1.36676100	-0.96532000	-0.25173400	
C	0.79367000	1.25607600	0.48999500	
C	2.70456700	-0.63423200	-0.13845400	
H	1.09474600	-1.95799500	-0.59024700	
C	2.13194200	1.56493800	0.58574200	
H	0.05633000	1.98830700	0.78578800	
C	3.12847200	0.63213400	0.27082300	
H	2.41542000	2.55202800	0.92931100	
C	4.95732400	-1.40952000	-0.40253800	
C	4.55112800	0.88876300	0.35029200	
C	5.40579700	-0.10361200	0.02301700	
H	6.47880200	0.03049300	0.06351400	
O	3.60059900	-1.61067000	-0.46089500	
O	5.66622200	-2.33859500	-0.71051800	
C	5.04895200	2.23034900	0.78783900	
H	4.68603300	3.01756400	0.12312600	
H	4.69473700	2.46929600	1.79322300	
H	6.13715300	2.26195800	0.79291400	
Energia: -1615.549373 Eh Solvente: DMSO				
C	-4.56544600	0.43674300	-0.18146300	
C	-3.32761000	-0.26021600	0.03384800	
C	-2.06278100	0.36790700	-0.23542900	
C	-2.10618600	1.64899300	-0.71653600	
C	-3.34385100	2.33354500	-0.91475800	
C	-4.55796300	1.77435300	-0.66226800	
H	-1.19469200	2.16567700	-0.98152200	
H	-3.29500300	3.34790100	-1.29417100	
H	-5.48670000	2.30663400	-0.82023700	
S	-5.08413200	-1.75910200	0.61559600	
N	-5.62616900	-0.30886600	0.11509100	
N	-3.48386100	-1.49776900	0.47989600	
N	-0.94045900	-0.40666900	-0.01577400	
H	-1.12189600	-1.39766500	0.05294700	
C	0.39333300	-0.02234600	0.05707800	
C	1.36778600	-0.96731200	-0.25384900	
C	0.79251700	1.25365500	0.48896600	
C	2.70474300	-0.63418600	-0.13911500	
H	1.09657000	-1.96027000	-0.59218100	
C	2.13016900	1.56386900	0.58628200	
H	0.05488500	1.98593000	0.78375400	
C	3.12785800	0.63188700	0.27136100	
H	2.41216600	2.55105600	0.93047200	
C	4.95807500	-1.40639400	-0.40149100	
C	4.54970300	0.88959900	0.35226000	
C	5.40599000	-0.10237300	0.02477800	
H	6.47871800	0.03347200	0.06650600	
O	3.60329400	-1.60979200	-0.46154300	
O	5.66801600	-2.33699400	-0.71027500	
C	5.04645200	2.23076000	0.79112700	
H	4.68270500	3.01810100	0.12714700	
H	4.69099900	2.46831500	1.79632300	
H	6.13457100	2.26299300	0.79673100	
Energia: -1615.548714 Eh Solvente: etanol				



C	-4.56558200	0.43657100	-0.18150000
C	-3.32760400	-0.26005500	0.03409500
C	-2.06283400	0.36836400	-0.23476300
C	-2.10643800	1.64938200	-0.71603000
C	-3.34426200	2.33357300	-0.91465600
C	-4.55827300	1.77418200	-0.66234900
H	-1.19492300	2.16607000	-0.98097400
H	-3.29564900	3.34788100	-1.29427000
H	-5.48716800	2.30608200	-0.82058700
S	-5.08382500	-1.75944500	0.61496000
N	-5.62615900	-0.30933600	0.11457400
N	-3.48350300	-1.49773200	0.47983300
N	-0.94056800	-0.40601900	-0.01466400
H	-1.12230200	-1.39678500	0.05656000
C	0.39335900	-0.02175700	0.05771800
C	1.36753900	-0.96685200	-0.25333300
C	0.79279900	1.25422100	0.48925200
C	2.70469200	-0.63419300	-0.13895700
H	1.09611000	-1.95973700	-0.59170800
C	2.13059400	1.56412000	0.58618300
H	0.05524200	1.98648600	0.78429000
C	3.12800600	0.63194000	0.27124500
H	2.41294700	2.55127900	0.93023800
C	4.95787600	-1.40710800	-0.40176900
C	4.55003800	0.88939200	0.35180100
C	5.40594600	-0.10267800	0.02434300
H	6.47873800	0.03276700	0.06578100
O	3.60266700	-1.60999100	-0.46140600
O	5.66756000	-2.33738100	-0.71040800
C	5.04705000	2.23064000	0.79037500
H	4.68350500	3.01795600	0.12622300
H	4.69187100	2.46851700	1.79561000
H	6.13518700	2.26271600	0.79586700
Energia: -1615.544798 Eh Solvente: acetate de etila			
C	-4.56643800	0.43549800	-0.18130000
C	-3.32753700	-0.25916400	0.03537000
C	-2.06323800	0.37110400	-0.23136400
C	-2.10819100	1.65181200	-0.71325200
C	-3.34705300	2.33388900	-0.91364900
C	-4.56035800	1.77322400	-0.66212600
H	-1.19668900	2.16863000	-0.97821600
H	-3.29991200	3.34803500	-1.29410200
H	-5.49026000	2.30292000	-0.82132700
S	-5.08172100	-1.76165600	0.61136100
N	-5.62600300	-0.31207200	0.11256900
N	-3.48114800	-1.49774900	0.47873000
N	-0.94125000	-0.40236300	-0.00948300
H	-1.12497000	-1.39164100	0.07574700
C	0.39346100	-0.01856200	0.06079500
C	1.36626700	-0.96434000	-0.25067000
C	0.79420500	1.25724200	0.49046900
C	2.70450500	-0.63428300	-0.13811200
H	1.09395800	-1.95691400	-0.58924700
C	2.13279100	1.56544800	0.58543000
H	0.05699800	1.98944200	0.78675500
C	3.12876100	0.63226800	0.27052700
H	2.41697900	2.55251600	0.92863900
C	4.95702900	-1.41112600	-0.40299000
C	4.55183100	0.88839100	0.34925400
C	5.40569500	-0.10417000	0.02214200
H	6.47884200	0.02905900	0.06199900
O	3.59923400	-1.61113700	-0.46052600
O	5.66544700	-2.33935000	-0.71043100
C	5.05015500	2.23023300	0.78606700
H	4.68758300	3.01737100	0.12100600
H	4.69664500	2.46988700	1.79157400
H	6.13839900	2.26157800	0.79079500
Energia: -1615.530347 Eh Solvente: vácuo			

C	-4.56907000	0.43174700	-0.18395800
C	-3.32732700	-0.25554900	0.03930700
C	-2.06429200	0.38089300	-0.21823000
C	-2.11253800	1.66036300	-0.70239200
C	-3.35475700	2.33483000	-0.91154800
C	-4.56609700	1.76956700	-0.66556900
H	-1.20085700	2.17866600	-0.96455900
H	-3.31122300	3.34865900	-1.29402700
H	-5.49914900	2.29172200	-0.82976700
S	-5.07477100	-1.76768200	0.59807200
N	-5.62551800	-0.32119900	0.10085600
N	-3.47305500	-1.49619200	0.47682100
N	-0.94484700	-0.39118400	0.01309600
H	-1.13949000	-1.37357000	0.14149000
C	0.39327600	-0.01098400	0.07635800
C	1.36204800	-0.95850200	-0.23714600
C	0.79794000	1.26403000	0.50014900
C	2.70404500	-0.63612400	-0.13329900
H	1.08905400	-1.95117900	-0.57530700
C	2.13900600	1.56789800	0.58615000
H	0.06183600	1.99550100	0.80170000
C	3.13053200	0.63270900	0.26925900
H	2.42848400	2.55531100	0.92536500
C	4.95557400	-1.42387900	-0.40940300
C	4.55690700	0.88603500	0.33854800
C	5.40442100	-0.10713400	0.01090900
H	6.47883500	0.01984300	0.04282200
O	3.58717900	-1.61548700	-0.45737600
O	5.66053300	-2.34350700	-0.71291200
C	5.05909300	2.23031500	0.76832800
H	4.69643200	3.01720000	0.10241400
H	4.71434200	2.47504500	1.77604300
H	6.14774700	2.26040400	0.76677700
Energia: -1615.536826 Eh Solvente: hexano			
C	-4.56801300	0.43344000	-0.18173600
C	-3.32740600	-0.25733900	0.03749300
C	-2.06394000	0.37639300	-0.22481800
C	-2.11110000	1.65647500	-0.70782600
C	-3.35192700	2.33447500	-0.91205800
C	-4.56397600	1.77134600	-0.66267000
H	-1.19960600	2.17387000	-0.97214300
H	-3.30713400	3.34843000	-1.29373600
H	-5.49575500	2.29686000	-0.82388500
S	-5.07767800	-1.76536300	0.60435900
N	-5.62571000	-0.31717700	0.10757400
N	-3.47651700	-1.49732000	0.47704700
N	-0.94301000	-0.39605100	0.00126800
H	-1.13209700	-1.38177500	0.11158400
C	0.39346000	-0.01383200	0.06792100
C	1.36401300	-0.96057900	-0.24449700
C	0.79634000	1.26151900	0.49449500
C	2.70432800	-0.63500000	-0.13605100
H	1.09110000	-1.95300100	-0.58321200
C	2.13632700	1.56711800	0.58506900
H	0.05964600	1.99329600	0.79352800
C	3.12983500	0.63267200	0.26950400
H	2.42357700	2.55425800	0.92633700
C	4.95616900	-1.41836200	-0.40587100
C	4.55479200	0.88699200	0.34385900
C	5.40509300	-0.10603500	0.01697400
H	6.47892500	0.02346700	0.05314800
O	3.59274400	-1.61338500	-0.45893800
O	5.66261400	-2.34198000	-0.71077600
C	5.05520200	2.23016100	0.77708900
H	4.69325100	3.01710800	0.11112800
H	4.70588600	2.47269800	1.78359100
H	6.14366800	2.26068600	0.77912500
Energia: -1615.538858 Eh Solvente: tolueno			

C	-4.56765100	0.43394000	-0.18140700
C	-3.32743400	-0.25782000	0.03697000
C	-2.06380000	0.37511400	-0.22649400
C	-2.11051400	1.65538900	-0.70913400
C	-3.35088300	2.33439900	-0.91222700
C	-4.56320400	1.77184500	-0.66218500
H	-1.19905300	2.17263500	-0.97374000
H	-3.30560600	3.34841400	-1.29357700
H	-5.49454800	2.29838200	-0.82276800
S	-5.07862100	-1.76460000	0.60604700
N	-5.62577500	-0.31598600	0.10905400
N	-3.47762900	-1.49753800	0.47728100
N	-0.94251000	-0.39749500	-0.00166700
H	-1.13005100	-1.38420000	0.10249600
C	0.39348500	-0.01479800	0.06588900
C	1.36456000	-0.96136300	-0.24620900
C	0.79588300	1.26067900	0.49317000
C	2.70435700	-0.63474100	-0.13663500
H	1.09168500	-1.95378400	-0.58488700
C	2.13553800	1.56684300	0.58492300
H	0.05908400	1.99261000	0.79145300
C	3.12962400	0.63262400	0.26965700
H	2.42208500	2.55394800	0.92667800
C	4.95629800	-1.41665600	-0.40497800
C	4.55412700	0.88729200	0.34522900
C	5.40526500	-0.10570300	0.01842700
H	6.47892700	0.02464400	0.05562600
O	3.59435400	-1.61283500	-0.45926900
O	5.66318400	-2.34152600	-0.71043900
C	5.05406700	2.23013000	0.77931200
H	4.69212100	3.01707300	0.11343100
H	4.70358900	2.47205700	1.78550100
H	6.14247600	2.26079300	0.78216900
Energia: -1615.549681 Eh			
Solvente: água			
C	-4.56538500	0.43682000	-0.18144100
C	-3.32761200	-0.26028900	0.03373300
C	-2.06275700	0.36769800	-0.23574400
C	-2.10607500	1.64881900	-0.71676800
C	-3.34366900	2.33353900	-0.91478700
C	-4.55782400	1.77443400	-0.66221200
H	-1.19459500	2.16550800	-0.98177400
H	-3.29471300	3.34792200	-1.29409500
H	-5.48648900	2.30689500	-0.82004300
S	-5.08426600	-1.75895100	0.61588500
N	-5.62617200	-0.30864500	0.11535900
N	-3.48402200	-1.49779700	0.47989500
N	-0.94040900	-0.40697100	-0.01630700
H	-1.12171100	-1.39807400	0.05122000
C	0.39332000	-0.02262200	0.05677100
C	1.36790300	-0.96752900	-0.25408900
C	0.79238400	1.25339000	0.48882400
C	2.70476800	-0.63418400	-0.13918700
H	1.09679000	-1.96052700	-0.59239400
C	2.12996800	1.56375300	0.58631900
H	0.05471600	1.98567200	0.78348900
C	3.12778700	0.63186400	0.27141100
H	2.41179800	2.55095700	0.93056600
C	4.95817100	-1.40606200	-0.40135000
C	4.54954500	0.88969900	0.35247000
C	5.40601000	-0.10222800	0.02498300
H	6.47870800	0.03380700	0.06684800
O	3.60358800	-1.60970100	-0.46159800
O	5.66823200	-2.33681700	-0.71019300
C	5.04617000	2.23082200	0.79146700
H	4.68232400	3.01817300	0.12756600
H	4.69059100	2.46822900	1.79664500
H	6.13428100	2.26312900	0.79711900

BTD-NH-Cum				
Energia: -1329.014129 E <sub>h</sub> Solvente: acetonitrila				
	C	5.87008900	-0.93221200	0.12371200
	C	4.63539100	-0.19779800	0.09600100
	C	3.37531400	-0.87151000	-0.05776800
	C	3.41443200	-2.23419900	-0.17588900
	C	4.65264300	-2.95009800	-0.14608600
	C	5.86238100	-2.34818400	-0.00253900
	H	2.49607100	-2.78462700	-0.29420000
	H	4.60399700	-4.02853400	-0.24526300
	H	6.79023000	-2.90496200	0.01766000
	S	6.39259400	1.38775000	0.36872600
	N	6.93065900	-0.14419800	0.27280900
	N	4.79608000	1.11142200	0.22438700
	N	2.25347400	-0.04703400	-0.06374800
	H	2.42646800	0.95410000	0.00170900
	C	0.95035400	-0.43195000	-0.21258300
	O	0.64699100	-1.60994600	-0.36450900
	C	-0.07675500	0.65656300	-0.18142100
	C	-1.45545400	0.36165800	-0.12439300
	C	0.34787200	2.01997800	-0.22107500
	C	-2.02693200	-0.94444200	-0.00633300
	C	-2.41414800	1.43279200	-0.15800000
	C	-3.37085000	-1.12379600	0.05699100
	H	-1.37540600	-1.79865300	0.05028400
	C	-3.82841500	1.20937400	-0.12008700
	C	-1.93619600	2.70493700	-0.25130100
	C	-4.33322600	-0.05507700	-0.00843500
	H	-3.73392100	-2.13561300	0.18677100
	H	-4.46781600	2.07790000	-0.19133900
	H	-2.55724100	3.59027600	-0.30416900
	O	1.47874500	2.48041900	-0.21354000
	O	-0.65221600	2.98583900	-0.28238900
	N	-5.68178800	-0.36378200	0.09361800
	C	-6.16304900	-1.57961300	-0.57793800
	H	-7.00957000	-1.30419200	-1.21254100
	H	-5.39497600	-1.93553900	-1.26679400
	C	-6.56810500	-2.70191900	0.36826800
	H	-5.72933200	-3.02209900	0.98980000
	H	-7.37384700	-2.39268600	1.03456000
	H	-6.91422200	-3.56772100	-0.20190700
	C	-6.62558000	0.74622600	0.17167200
	H	-6.18576500	1.51001700	0.81323400
	H	-6.76671100	1.20425000	-0.81933300
	C	-7.97473900	0.36330100	0.75955600
	H	-8.60005800	1.25556400	0.82815200
	H	-8.51329400	-0.36273200	0.14931600
	H	-7.86341000	-0.04828800	1.76437800
Energia: -1329.011808 E <sub>h</sub> Solvente: diclorometano				

C	5.86920900	-0.93471500	0.12258700
C	4.63525600	-0.19865700	0.09571800
C	3.37423700	-0.87030200	-0.05909100
C	3.41111000	-2.23287000	-0.17819600
C	4.64844800	-2.95032900	-0.14901900
C	5.85913600	-2.35058200	-0.00516600
H	2.49158800	-2.78122700	-0.29711400
H	4.59824300	-4.02866700	-0.24925700
H	6.78644000	-2.90826400	0.01438600
S	6.39378900	1.38385200	0.37078800
N	6.93077500	-0.14866300	0.27280800
N	4.79696800	1.10988200	0.22608600
N	2.25386900	-0.04387300	-0.06568600
H	2.42891500	0.95729700	-0.00380400
C	0.95049200	-0.42953000	-0.20916200
O	0.64601200	-1.60760000	-0.35388200
C	-0.07742800	0.65962200	-0.18086100
C	-1.45455600	0.36481700	-0.12383200
C	0.34832700	2.02458600	-0.22249700
C	-2.02567100	-0.94269000	-0.00532100
C	-2.41449200	1.43572100	-0.15814200
C	-3.36870700	-1.12271100	0.05804300
H	-1.37243200	-1.79564300	0.05103800
C	-3.82910600	1.21015200	-0.12025600
C	-1.93725600	2.70735600	-0.25310900
C	-4.33219300	-0.05419100	-0.00814100
H	-3.73162900	-2.13450800	0.18869200
H	-4.46984800	2.07773800	-0.19286600
H	-2.55925700	3.59213200	-0.30677700
O	1.47771300	2.48348900	-0.21521900
O	-0.65353500	2.99008700	-0.28562800
N	-5.68068400	-0.36514400	0.09356800
C	-6.16019800	-1.57941700	-0.58140300
H	-7.00648000	-1.30330500	-1.21632800
H	-5.39112500	-1.93263600	-1.27059200
C	-6.56501500	-2.70483000	0.36128900
H	-5.72679100	-3.02503900	0.98342600
H	-7.37173200	-2.39858300	1.02768500

H	-6.90918400	-3.56992300	-0.21120400
C	-6.62578200	0.74276200	0.17546100
H	-6.18594300	1.50554100	0.81834700
H	-6.76924200	1.20332200	-0.81430700
C	-7.97369400	0.35669100	0.76432600
H	-8.60054500	1.24762600	0.83642400
H	-8.51227200	-0.36843100	0.15296300
H	-7.86003700	-0.05759000	1.76770300

Energia: -1329.014326 Eh  
Solvente: DMSO

C	5.87018700	-0.93199000	0.12374700
C	4.63542400	-0.19772000	0.09597500
C	3.37541700	-0.87162800	-0.05752900
C	3.41472000	-2.23434100	-0.17541800
C	4.65300700	-2.95010300	-0.14557400
C	5.86267300	-2.34798500	-0.00221100
H	2.49645000	-2.78496100	-0.29354500
H	4.60448700	-4.02855900	-0.24453300
H	6.79057100	-2.90468100	0.01803700
S	6.39254200	1.38811700	0.36816200
N	6.93068600	-0.14379200	0.27256300
N	4.79604000	1.11157600	0.22401400
N	2.25344600	-0.04732300	-0.06345900
H	2.42626100	0.95380900	0.00227200
C	0.95034500	-0.43218200	-0.21271300
O	0.64707700	-1.61017500	-0.36520800
C	-0.07669700	0.65627600	-0.18133100
C	-1.45553700	0.36136600	-0.12434400
C	0.34783500	2.01955700	-0.22079900
C	-2.02706000	-0.94461200	-0.00640300
C	-2.41411500	1.43252800	-0.15787000
C	-3.37105900	-1.12390100	0.05686200
H	-1.37568800	-1.79893900	0.05021700
C	-3.82835200	1.20930700	-0.11999700
C	-1.93609600	2.70472100	-0.25096300
C	-4.33332500	-0.05515400	-0.00846800
H	-3.73415800	-2.13572400	0.18649400
H	-4.46762700	2.07792400	-0.19109800
H	-2.55705700	3.59011100	-0.30372800
O	1.47883900	2.48012700	-0.21326500
O	-0.65209500	2.98546000	-0.28190800
N	-5.68190600	-0.36365500	0.09356200
C	-6.16331200	-1.57954900	-0.57783200
H	-7.00980900	-1.30411500	-1.21243600
H	-5.39529300	-1.93567400	-1.26664000
C	-6.56847600	-2.70165600	0.36855800
H	-5.72969600	-3.02191800	0.99005000
H	-7.37415900	-2.39219600	1.03482500
H	-6.91476200	-3.56745700	-0.20150900
C	-6.62556100	0.74655300	0.17132600
H	-6.18576500	1.51035900	0.81287100
H	-6.76642000	1.20445600	-0.81975000
C	-7.97487400	0.36388300	0.75900800
H	-8.60003800	1.25627200	0.82734900
H	-8.51341200	-0.36215400	0.14876200
H	-7.86382000	-0.04757400	1.76392100
Energia: -1329.013772 Eh			
Solvente: etanol			
C	5.86992400	-0.93260800	0.12361000
C	4.63534300	-0.19793800	0.09601800
C	3.37513400	-0.87130400	-0.05813200
C	3.41391500	-2.23395800	-0.17659300
C	4.65198800	-2.95010300	-0.14687300
C	5.86186200	-2.34854600	-0.00308100
H	2.49538500	-2.78404700	-0.29516200
H	4.60311100	-4.02851000	-0.24637300
H	6.78962400	-2.90546900	0.01702400
S	6.39271500	1.38710700	0.36953100
N	6.93063200	-0.14491700	0.27311200
N	4.79617100	1.11115500	0.22493500
N	2.25352900	-0.04652100	-0.06420200
H	2.42684400	0.95461600	0.00073900
C	0.95037100	-0.43154600	-0.21225300
O	0.64683600	-1.60954800	-0.36312200
C	-0.07685900	0.65706700	-0.18150400

C	-1.45530800	0.36217300	-0.12442400
C	0.34794100	2.02072500	-0.22148200
C	-2.02671300	-0.94414500	-0.00619400
C	-2.41420600	1.43326100	-0.15817000
C	-3.37048600	-1.12361200	0.05720400
H	-1.37491300	-1.79815200	0.05040900
C	-3.82852600	1.20949500	-0.12021200
C	-1.93637100	2.70532300	-0.25181100
C	-4.33305300	-0.05493700	-0.00838300
H	-3.73351700	-2.13542000	0.18721200
H	-4.46814800	2.07786300	-0.19172100
H	-2.55756600	3.59057000	-0.30484800
O	1.47858000	2.48093200	-0.21395100
O	-0.65242900	2.98651400	-0.28314100
N	-5.68158800	-0.36400400	0.09368000
C	-6.16258200	-1.57968900	-0.57823000
H	-7.00912400	-1.30425900	-1.21284700
H	-5.39439600	-1.93524200	-1.26716100
C	-6.56748700	-2.70238600	0.36758800
H	-5.72874800	-3.02245700	0.98920200
H	-7.37335000	-2.39357500	1.03391600
H	-6.91329800	-3.56816100	-0.20282200
C	-6.62561600	0.74565200	0.17227100
H	-6.18577700	1.50938200	0.81391000
H	-6.76720100	1.20393800	-0.81859000
C	-7.97452200	0.36226100	0.76046000
H	-8.60011000	1.25430300	0.82953200
H	-8.51310000	-0.36373000	0.15017900
H	-7.86273700	-0.04961400	1.76510100

Energia: -1329.010433 Eh  
Solvente: acetato de etila

C	5.86874900	-0.93624200	0.12189500
C	4.63529100	-0.19913900	0.09547800
C	3.37365000	-0.86958200	-0.05918900
C	3.40907700	-2.23214200	-0.17824700
C	4.64585500	-2.95058200	-0.14944000
C	5.85716900	-2.35209400	-0.00598800
H	2.48879800	-2.77928600	-0.29694400
H	4.59466400	-4.02890700	-0.24973700
H	6.78411200	-2.91037100	0.01326700
S	6.39486400	1.38153600	0.37016300
N	6.93102100	-0.15137400	0.27218600
N	4.79775800	1.10908100	0.22639300
N	2.25409700	-0.04199500	-0.06599500
H	2.43030500	0.95920600	-0.00635900
C	0.95061600	-0.42806800	-0.20677600
O	0.64552000	-1.60613700	-0.34764800
C	-0.07781900	0.66140800	-0.18015200
C	-1.45406400	0.36661300	-0.12326300
C	0.34859000	2.02719300	-0.22300000
C	-2.02493900	-0.94172200	-0.00505000
C	-2.41469100	1.43737800	-0.15762400
C	-3.36750400	-1.12215800	0.05821400
H	-1.37069500	-1.79397600	0.05080200
C	-3.82946200	1.21059500	-0.11976500
C	-1.93787500	2.70879900	-0.25312200
C	-4.33158800	-0.05374000	-0.00787500
H	-3.73032100	-2.13401600	0.18885100
H	-4.47096100	2.07767900	-0.19278900
H	-2.56051600	3.59322600	-0.30683900
O	1.47705600	2.48530100	-0.21623700
O	-0.65440100	2.99262900	-0.28659700
N	-5.68009300	-0.36595800	0.09345100
C	-6.15862700	-1.57888700	-0.58425600
H	-7.00452100	-1.30192700	-1.21949400
H	-5.38882600	-1.93039900	-1.27354500
C	-6.56385600	-2.70645200	0.35574300
H	-5.72613700	-3.02732200	0.97815500
H	-7.37113500	-2.40198300	1.02222900
H	-6.90712200	-3.57070500	-0.21858800
C	-6.62582000	0.74080000	0.17798400
H	-6.18606500	1.50248700	0.82229300
H	-6.77027200	1.20352900	-0.81078400
C	-7.97322600	0.35268300	0.76676700
H	-8.60089000	1.24286500	0.84121900
H	-8.51169300	-0.37150100	0.15417200
H	-7.85858900	-0.06375900	1.76910000
Energia: -1328.997475 Eh			
Solvente: vácuo			



C	5.87214900	-0.94975600	0.08151800
C	4.64374300	-0.20223500	0.05834500
C	3.37174900	-0.86696200	-0.01426000
C	3.38985900	-2.23382500	-0.05901800
C	4.62133000	-2.96174600	-0.03462400
C	5.84201500	-2.37041000	0.03264800
H	2.45959700	-2.77443300	-0.11414500
H	4.55692000	-4.04364200	-0.07326600
H	6.76564900	-2.93408100	0.05004100
S	6.42389500	1.36916900	0.18169900
N	6.94588800	-0.17170700	0.15012500
N	4.81971900	1.10830400	0.11011600
N	2.25941500	-0.02847200	-0.03039500
H	2.44694000	0.97303800	-0.01540900
C	0.95230800	-0.42033800	-0.09243200
O	0.64052000	-1.60148700	-0.14014800
C	-0.08177700	0.67207000	-0.09927900
C	-1.45220900	0.37793500	-0.07181300
C	0.35024900	2.04593400	-0.13955000
C	-2.02590100	-0.93869000	0.00474400
C	-2.41683800	1.44978000	-0.10464900
C	-3.36607200	-1.12095500	0.03659000
H	-1.36468200	-1.78634300	0.05287600
C	-3.83358400	1.21492300	-0.09482500
C	-1.94208200	2.72077000	-0.17107700
C	-4.33091400	-0.04984300	-0.02002200
H	-3.73325400	-2.13534900	0.13419000
H	-4.47881600	2.08043300	-0.16311700
H	-2.56938000	3.60348200	-0.21365900
O	1.47142900	2.49650700	-0.13754800
O	-0.66064100	3.01352500	-0.19196400
N	-5.68346300	-0.37111500	0.05164700
C	-6.14689500	-1.54281800	-0.70139200
H	-6.97441000	-1.23125200	-1.34675500
H	-5.35812600	-1.86097100	-1.38562300
C	-6.58080200	-2.71725500	0.16632800
H	-5.76137900	-3.07001100	0.79542300
H	-7.40481700	-2.44612800	0.82640400
H	-6.90925800	-3.55131500	-0.45939100
C	-6.62930600	0.72805700	0.17715900
H	-6.19620400	1.45579700	0.86455400
H	-6.76272100	1.24242700	-0.78882400
C	-7.98483100	0.31251200	0.72808800
H	-8.61549400	1.19656200	0.84179300
H	-8.51563200	-0.37851400	0.07179800
H	-7.88179500	-0.15671900	1.70791300
Energia: -1329.003386 Eh			
Solvente: hexano			
C	5.86801500	-0.94352400	0.11504500
C	4.63717500	-0.20098400	0.08986100
C	3.37167200	-0.86673000	-0.05232900
C	3.39920700	-2.23018100	-0.15956300
C	4.63315200	-2.95361600	-0.13193100
C	5.84812500	-2.36037000	-0.00104200
H	2.47467100	-2.77238100	-0.26807400
H	4.57622600	-4.03265200	-0.22295800
H	6.77335900	-2.92142800	0.01725200
S	6.40422800	1.37200800	0.34110800
N	6.93480000	-0.16372400	0.25233000
N	4.80486200	1.10686300	0.20920900
N	2.25597200	-0.03350200	-0.06241800
H	2.43784500	0.96778300	-0.01591100
C	0.95162700	-0.42216200	-0.18314400
O	0.64358200	-1.60082700	-0.29735100
C	-0.07989200	0.66874900	-0.16735800
C	-1.45217500	0.37401800	-0.11486300
C	0.34929500	2.03887400	-0.21437500
C	-2.02284900	-0.93857000	-0.00392200
C	-2.41580400	1.44461000	-0.14841500
C	-3.36345900	-1.12056400	0.05493900
H	-1.36402100	-1.78770400	0.04826300

		-3.83143400	1.21246800	-0.11362700
C		-1.94101900	2.71521300	-0.24210200
C		-4.32941200	-0.05182200	-0.00825300
H		-3.72696900	-2.13301800	0.18016500
H		-4.47612400	2.07767600	-0.18614300
H		-2.56676600	3.59805700	-0.29436600
O		1.47343900	2.49308500	-0.21074300
O		-0.65878600	3.00437900	-0.27803400
N		-5.67890100	-0.36964500	0.08917000
C		-6.15318300	-1.56906400	-0.61329400
H		-6.99478300	-1.28125500	-1.25037500
H		-5.37826900	-1.90823800	-1.30317200
C		-6.56514500	-2.71379900	0.30305000
H		-5.73205100	-3.04417000	0.92645500
H		-7.37678700	-2.42201800	0.96971600
H		-6.90369300	-3.56868600	-0.28804300
C		-6.62563300	0.73267900	0.19231900
H		-6.18588900	1.48327300	0.84990900
H		-6.77197000	1.21372800	-0.78819200
C		-7.97260500	0.33291800	0.77472400
H		-8.60271200	1.21986800	0.86606000
H		-8.51046200	-0.38095400	0.14948800
H		-7.85620500	-0.10189100	1.76888600
Energia: -1329.005212 Eh				
Solvente: tolueno				
C		5.86802900	-0.94156300	0.11749700
C		4.63642100	-0.20058000	0.09229300
C		3.37211700	-0.86739900	-0.05539100
C		3.40191200	-2.23045100	-0.16789700
C		4.63666300	-2.95247400	-0.14017700
C		5.85054700	-2.35795400	-0.00410500
H		2.47861400	-2.77382600	-0.28072500
H		4.58144400	-4.03118500	-0.23550300
H		6.77627100	-2.91822300	0.01416800
S		6.40100000	1.37426900	0.35387400
N		6.93342500	-0.16050000	0.26038300
N		4.80240300	1.10718300	0.21708700
N		2.25541500	-0.03566500	-0.06434700
H		2.43584900	0.96560000	-0.01394800
C		0.95137200	-0.42361300	-0.19149300
O		0.64414700	-1.60205900	-0.31378900
C		-0.07933200	0.66696600	-0.17249900
C		-1.45256100	0.37222500	-0.11818200
C		0.34918100	2.03597900	-0.21887900
C		-2.02321800	-0.93920900	-0.00415100
C		-2.41549300	1.44281300	-0.15217200
C		-3.36426700	-1.12081500	0.05658300
H		-1.36556200	-1.78911400	0.04927100
C		-3.83090300	1.21199000	-0.11598600
C		-1.94021300	2.71354600	-0.24732500
C		-4.32987700	-0.05226600	-0.00789000
H		-3.72746000	-2.13302600	0.18425300
H		-4.47484600	2.07759000	-0.18910800
H		-2.56516500	3.59676700	-0.30039900
O		1.47438000	2.49120600	-0.21440800
O		-0.65764800	3.00135600	-0.28312700
N		-5.67897100	-0.36871100	0.09114600
C		-6.15440400	-1.57270600	-0.60311400
H		-6.99752300	-1.28870100	-1.23962100
H		-5.38112400	-1.91571900	-1.29290000
C		-6.56385800	-2.71199400	0.32101400
H		-5.72915600	-3.03904400	0.94407300
H		-7.37398500	-2.41627600	0.98782700
H		-6.90385800	-3.57008200	-0.26453200
C		-6.62572000	0.73461900	0.18867400
H		-6.18587800	1.48902200	0.84171900
H		-6.77221400	1.20967400	-0.79452700
C		-7.97238700	0.33820800	0.77396500
H		-8.60205800	1.22596100	0.86017400
H		-8.51055500	-0.37926500	0.15316900
H		-7.85578300	-0.09057200	1.77074500

Energia: -1329.014584 Eh				
Solvente: água				
C	5.87032400	-0.93169700	0.12376300	
C	4.63547500	-0.19761500	0.09591900	
C	3.37555500	-0.87178900	-0.05717000	
C	3.41509700	-2.23453700	-0.17469800	
C	4.65348500	-2.95011900	-0.14480800	
C	5.86306000	-2.34772800	-0.00175000	
H	2.49694200	-2.78541300	-0.29253300	
H	4.60512600	-4.02860400	-0.24343400	
H	6.79102300	-2.90431600	0.01855700	
S	6.39249200	1.38860900	0.36727100	
N	6.93073500	-0.14325300	0.27214100	
N	4.79600200	1.11178600	0.22343600	
N	2.25341200	-0.04770800	-0.06303400	
H	2.42599200	0.95342400	0.00304000	
C	0.95033400	-0.43249300	-0.21281100	
O	0.64718900	-1.61048800	-0.36601900	
C	-0.07662100	0.65589300	-0.18115200	
C	-1.45564800	0.36097800	-0.12424000	
C	0.34778700	2.01899700	-0.22036800	
C	-2.02723600	-0.94484200	-0.00648300	
C	-2.41407100	1.43218000	-0.15765400	
C	-3.37134400	-1.12404100	0.05668000	
H	-1.37606900	-1.79932100	0.05013400	
C	-3.82827000	1.20922000	-0.11985500	
C	-1.93596200	2.70443600	-0.25044900	
C	-4.33346200	-0.05525400	-0.00851700	
H	-3.73448400	-2.13587400	0.18609100	
H	-4.46737600	2.07796000	-0.19074900	
H	-2.55681200	3.58989600	-0.30306700	
O	1.47896300	2.47973500	-0.21284300	
O	-0.65193300	2.98496000	-0.28119700	
N	-5.68207000	-0.36348500	0.09345700	
C	-6.16366200	-1.57944100	-0.57776700	
H	-7.01011100	-1.30396800	-1.21238500	
H	-5.39570000	-1.93581500	-1.26650200	
C	-6.56899700	-2.70130700	0.36882800	
H	-5.73022200	-3.02170000	0.99027500	
H	-7.37461200	-2.39155900	1.03505400	
H	-6.91550000	-3.56708900	-0.20112700	
C	-6.62553900	0.74699100	0.17085000	
H	-6.18577800	1.51079500	0.81240600	
H	-6.76601500	1.20476600	-0.82030900	
C	-7.97507000	0.36464800	0.75822300	
H	-8.60002500	1.25720500	0.82624400	
H	-8.51357700	-0.36137100	0.14793700	
H	-7.86440400	-0.04666600	1.76324800	

**Tabela S2.** Coordenadas cartesianas das estruturas otimizadas **Cum-NH-BTD** e **BTD-NH-Cum** no primeiro estado excitado obtido no nível de teoria CAMB3LYP/6-311+G(d).

<b>Cum-NH-BTD</b>				
Energia: -1612.096645 Eh				
Solvente: acetonitrile				
C	-5.83403047	0.80607292	0.00635089	
C	-4.58204505	0.12080006	0.05162302	
C	-3.34561274	0.82525581	-0.11925747	
C	-3.42215169	2.17716764	-0.32671466	
C	-4.67365454	2.84191217	-0.36921497	
C	-5.86497004	2.20632424	-0.21120714	
H	-2.51192662	2.73987145	-0.45832339	
H	-4.66353002	3.91356618	-0.53752026	
H	-6.81199125	2.73045121	-0.24702931	
S	-6.27888576	-1.50148998	0.38965558	
N	-6.86268241	-0.00181381	0.18374353	
N	-4.69267529	-1.17259934	0.25974150	
N	-2.21587586	0.04323884	-0.05192732	
H	-2.34942116	-0.96000995	0.10129361	
C	-0.91696614	0.46207153	-0.17931583	
O	-0.65709313	1.64899081	-0.37140331	
C	0.12751867	-0.55801915	-0.06816221	
C	1.53430703	-0.18114509	-0.11141328	
C	-0.22682898	-1.93155273	0.04368826	
C	2.02046992	1.11003063	-0.05290983	
C	2.50058376	-1.24240812	-0.18971475	

nexos

C	3.38507845	1.37966653	-0.15055633
H	1.32616211	1.92916218	0.05256298
C	3.89619312	-0.95408651	-0.24436511
C	2.06302522	-2.52150331	-0.14359703
C	4.33455815	0.33925268	-0.23186283
H	3.70679110	2.41143439	-0.21897874
H	4.59043121	-1.78445305	-0.25121678
H	2.70936468	-3.38893290	-0.18032584
O	-1.34683017	-2.41222249	0.16456142
O	0.77316299	-2.85703745	-0.01455725
N	5.67266089	0.67256446	-0.36217087
C	6.21364149	1.83773099	0.30055646
H	7.26022168	1.91583888	0.00390867
H	5.71944582	2.74000793	-0.07617457
C	6.09774648	1.78262939	1.81463239
H	5.05222176	1.72611898	2.12414033
H	6.62355885	0.91408533	2.21639903
H	6.53451420	2.68378935	2.24973800
C	6.59968857	-0.24016169	-0.98720063
H	6.03771519	-0.87472521	-1.67342113
H	7.29704020	0.35194192	-1.58734616
C	7.38069016	-1.08520973	0.00928928
H	8.04539801	-1.76472395	-0.52833034
H	7.99421053	-0.45721134	0.65916324
H	6.71460946	-1.67891935	0.63856727
<b>BTD-NH-Cum</b>			
Energia: -1612.096645 Eh			
Solvente: acetonitrila			
C	-4.50991004	0.43975109	-0.16153568
C	-3.29805333	-0.26746298	0.03214883
C	-2.06077375	0.36814923	-0.24119963
C	-2.05222453	1.68848396	-0.74958476
C	-3.24093541	2.36667576	-0.92532880
C	-4.46810593	1.76966035	-0.62903299
H	-1.11715279	2.14088549	-1.05720745
H	-3.22166226	3.37342009	-1.32684177
H	-5.39594770	2.31259613	-0.77944728
S	-5.07499613	-1.76897490	0.61549976
N	-5.61455796	-0.26716515	0.13262644
N	-3.42235683	-1.52615070	0.47528373
N	-0.94409834	-0.39695171	-0.07880122
H	-1.14395569	-1.39526194	-0.01308104
C	0.37512804	-0.02852056	0.03885381
C	1.34941280	-0.98446247	-0.25879430
C	0.76122537	1.24630976	0.49325495
C	2.67800691	-0.65073646	-0.14412499
H	1.07437889	-1.97591049	-0.60377269
C	2.09207069	1.55314484	0.59981806
H	0.01084164	1.96008890	0.81023709
C	3.09003337	0.62294888	0.27564907
H	2.37679098	2.53302316	0.96633171
C	4.93032987	-1.40238360	-0.39477204
C	4.49980482	0.88959131	0.36748873
C	5.36090415	-0.09965490	0.03857355
H	6.43441307	0.04589224	0.08544555
O	3.57466092	-1.61531941	-0.46336332
O	5.64676787	-2.32119377	-0.70230068
C	4.98623317	2.22289866	0.81013759
H	4.61230785	3.01332880	0.15160213
H	4.63077620	2.45278465	1.81965854
H	6.07593258	2.26037238	0.81131979

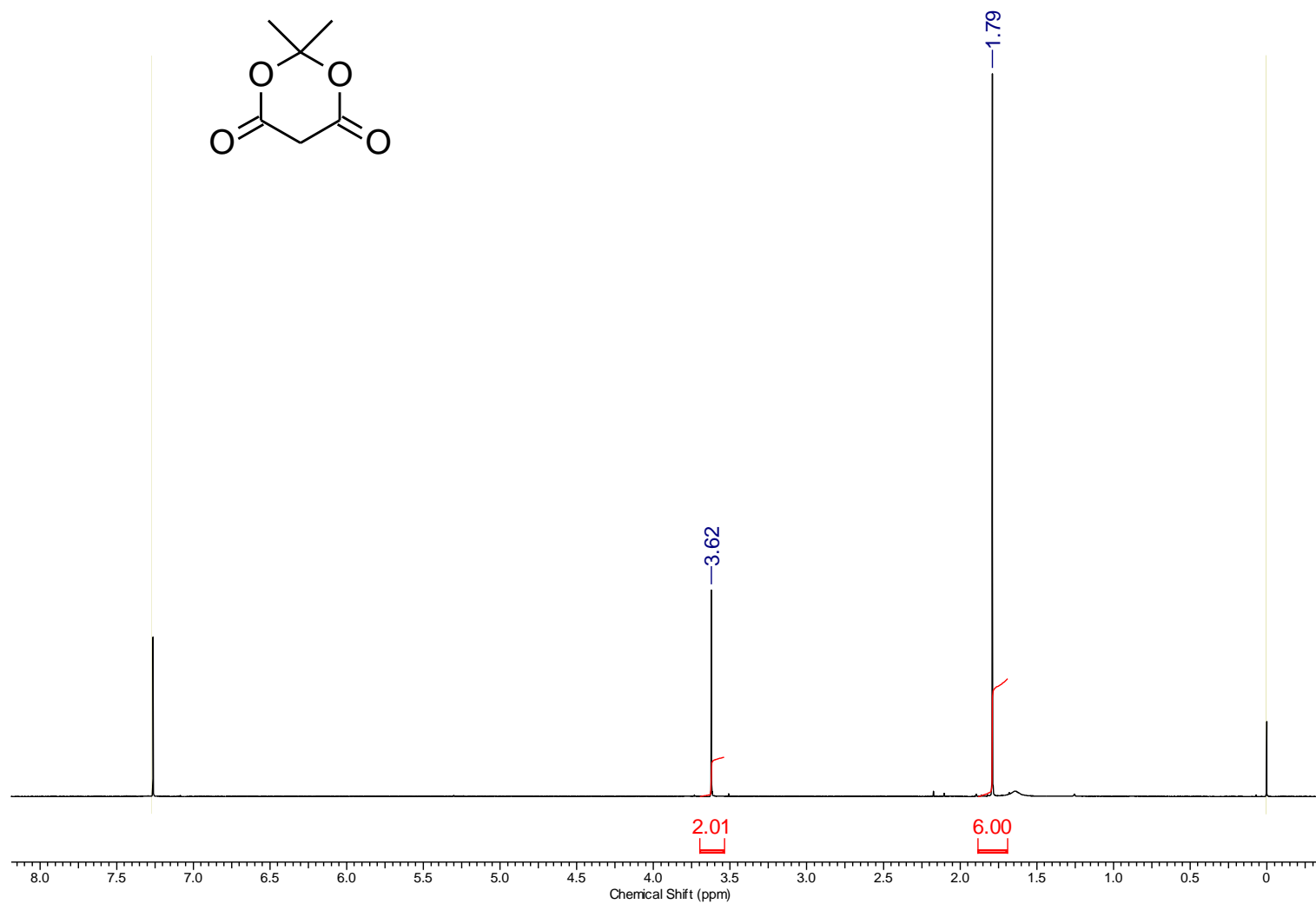


Figura S1. <sup>1</sup>H RMN 600 MHz (CDCl<sub>3</sub>) do ácido de Meldrum.

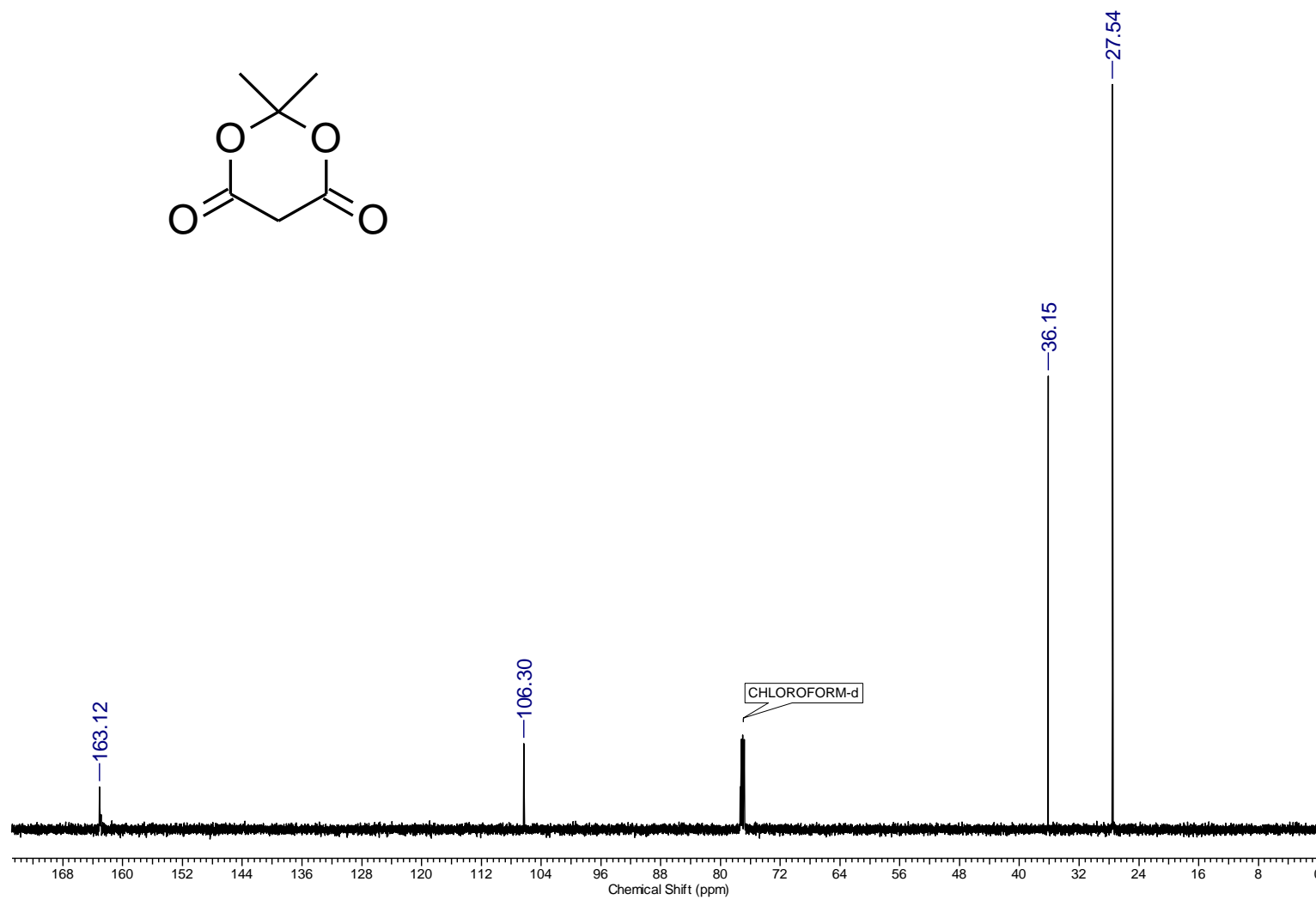


Figura S2.  $^{13}\text{C}$  RMN 151 MHz ( $\text{CDCl}_3$ ) do ácido de Meldrum.

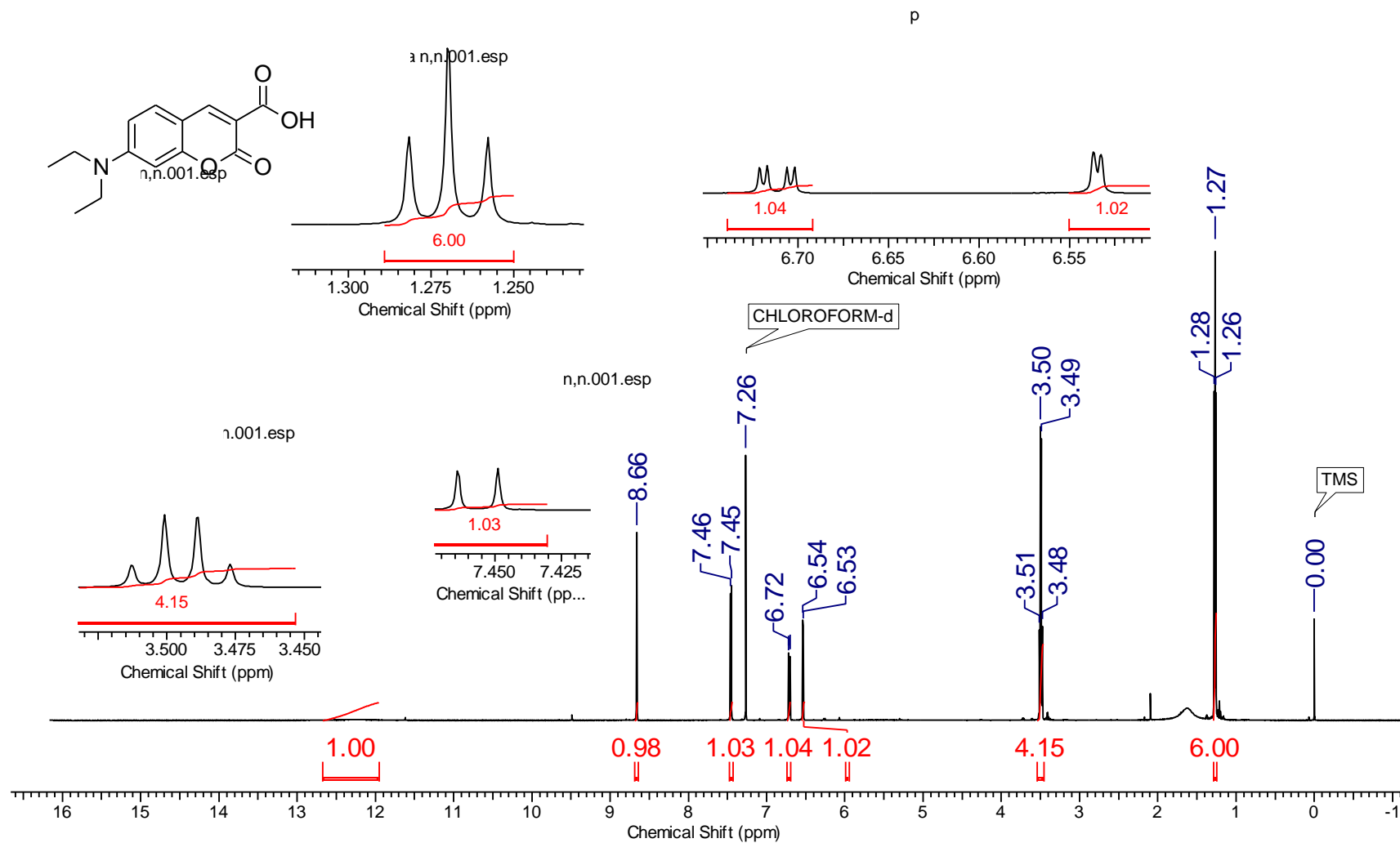


Figura S3. <sup>1</sup>H RMN 600 MHz (CDCl<sub>3</sub>) da *N,N* dietilamino-cumarina 3-ácido carboxílico.



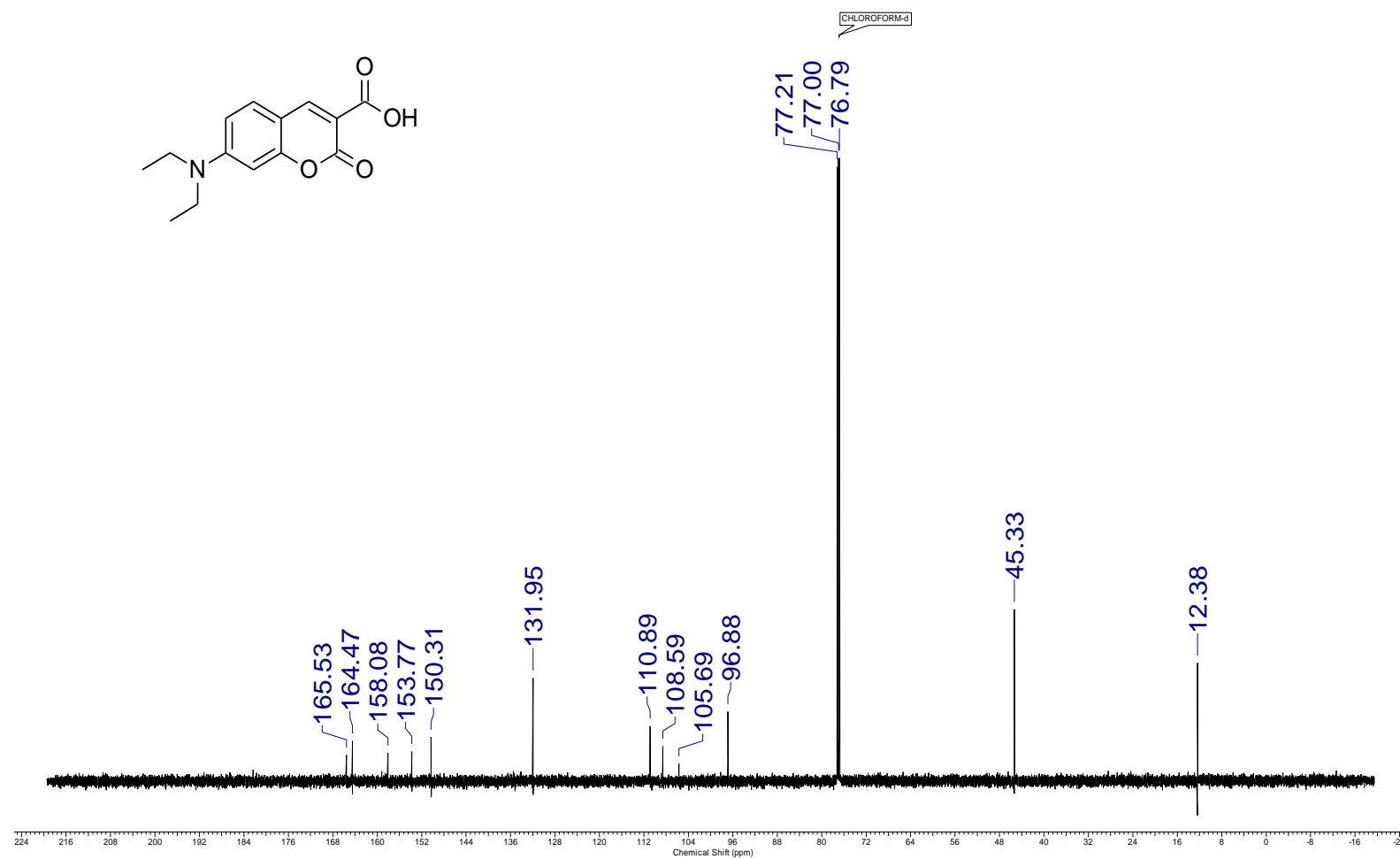
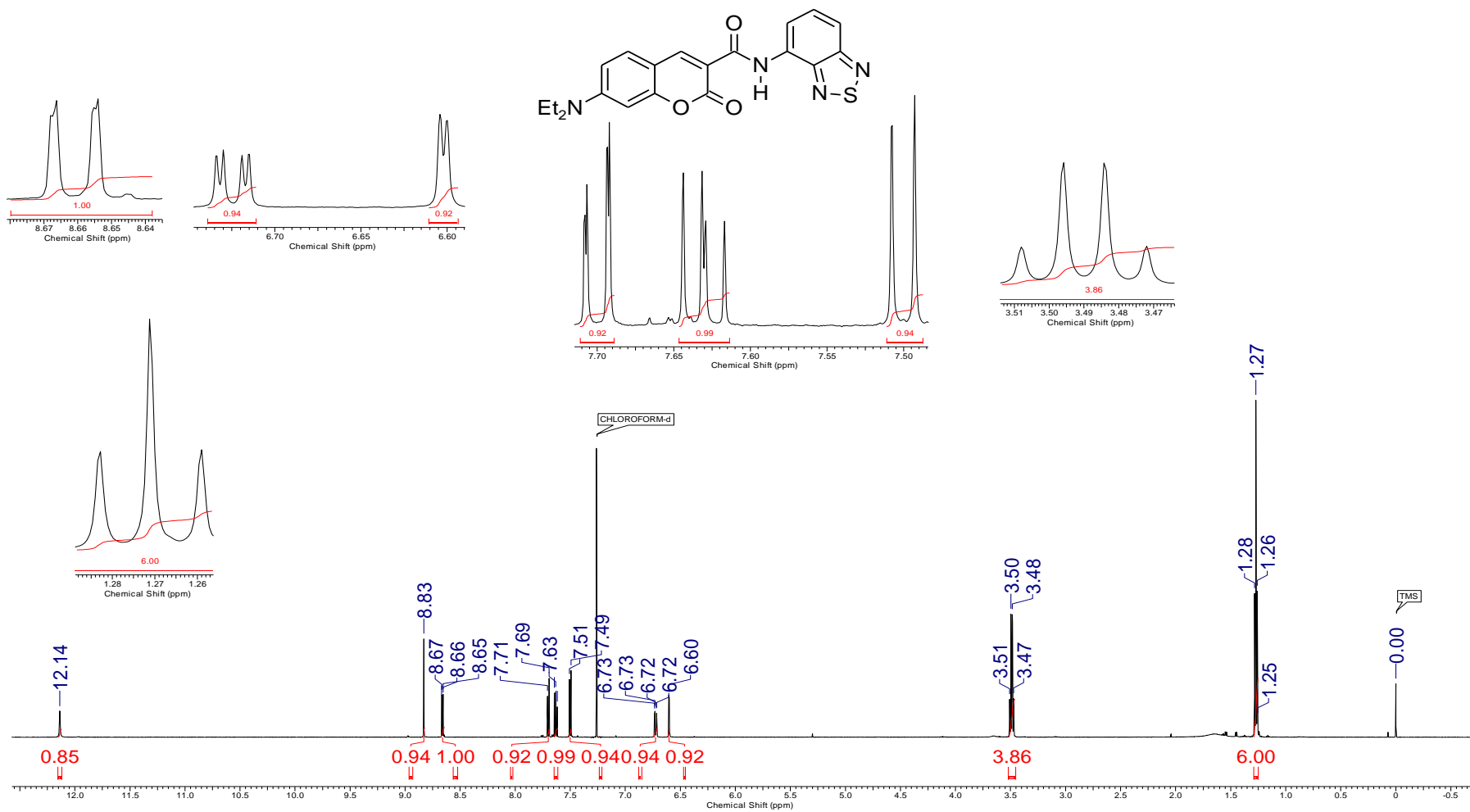


Figura S4. <sup>13</sup>C RMN 151 MHz (CDCl<sub>3</sub>) *N,N* dietilamino-cumarina 3-ácido carboxílico.

Figura S5.  $^1\text{H}$  RMN 600 MHz ( $\text{CDCl}_3$ ) da Cum-NH-BTD.

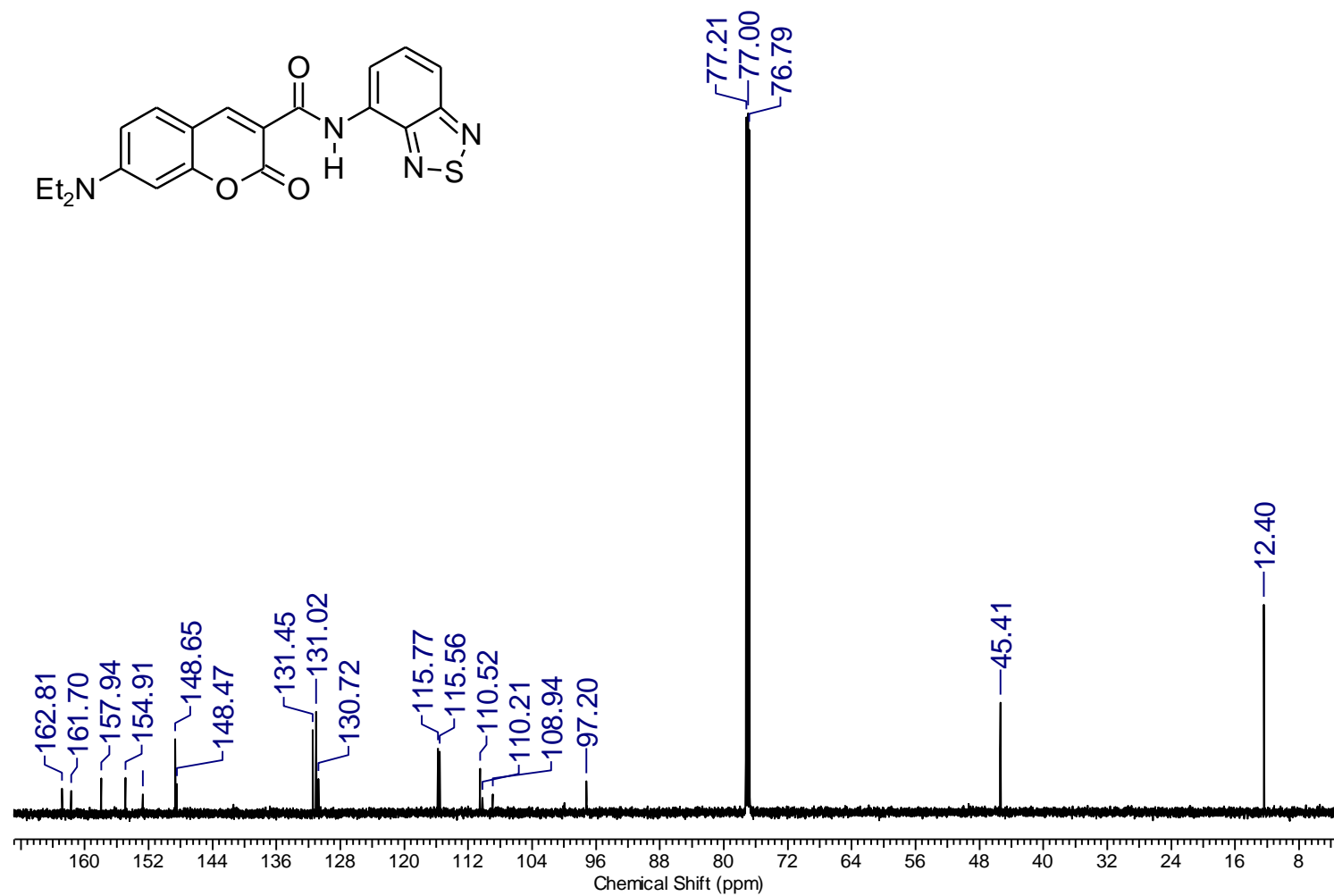


Figura S6. <sup>13</sup>C RMN 150 MHz (CDCl<sub>3</sub>) da Cum-NH-BTD.

CAL

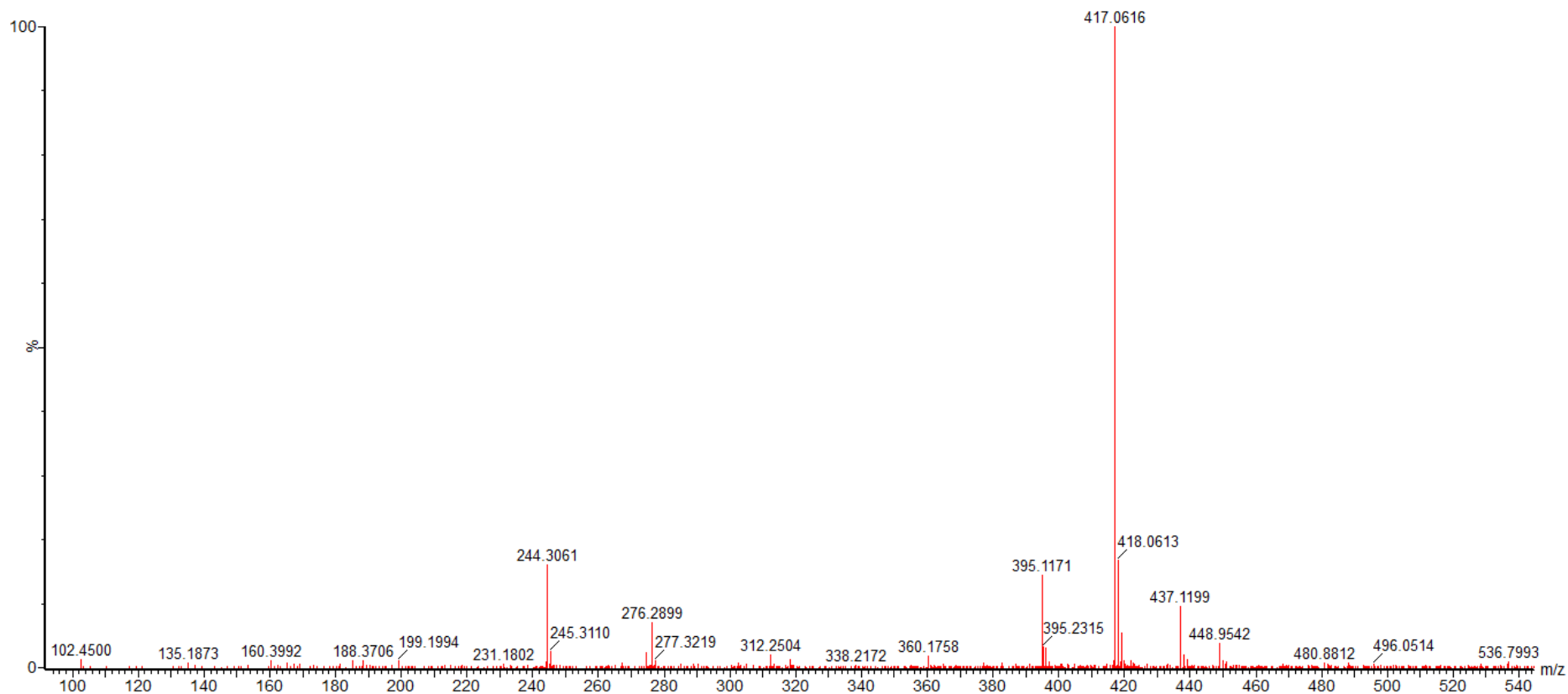


Figura S7. ESI(+)-MS da **Cum-NH-BTD**. Sinais do produto  $[C_{20}H_{18}N_4O_3S + H]^+ = 395,1171$  Da e  $[C_{20}H_{18}N_4O_3S + Na]^+ = 417,0616$  Da.

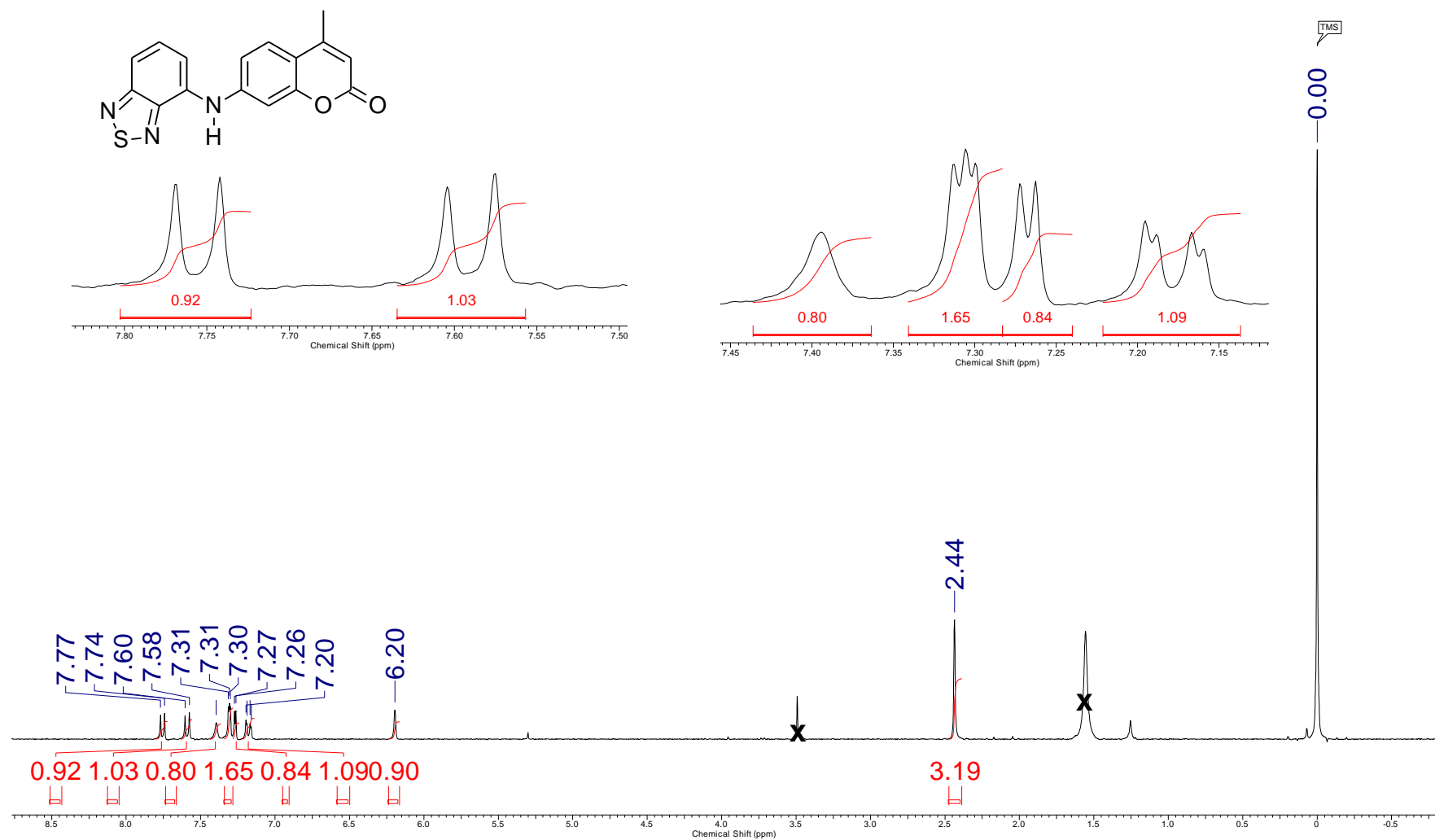


Figura S8.  $^1\text{H}$  RMN 300 MHz ( $\text{CDCl}_3$ ) da BTD-NH-Cum.

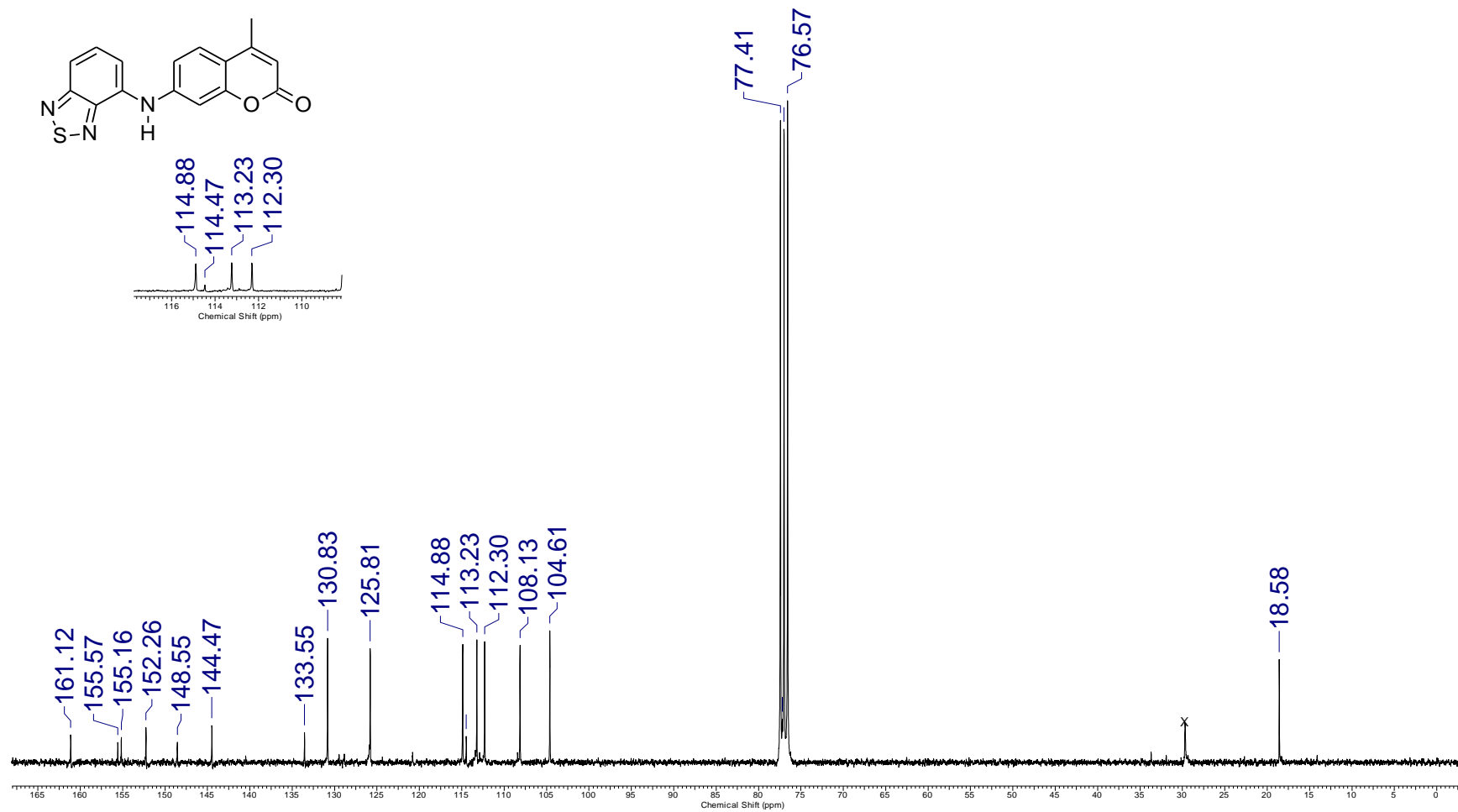


Figura S9. <sup>13</sup>C RMN 75 MHz (CDCl<sub>3</sub>) da BTD-NH-Cum.

CAL

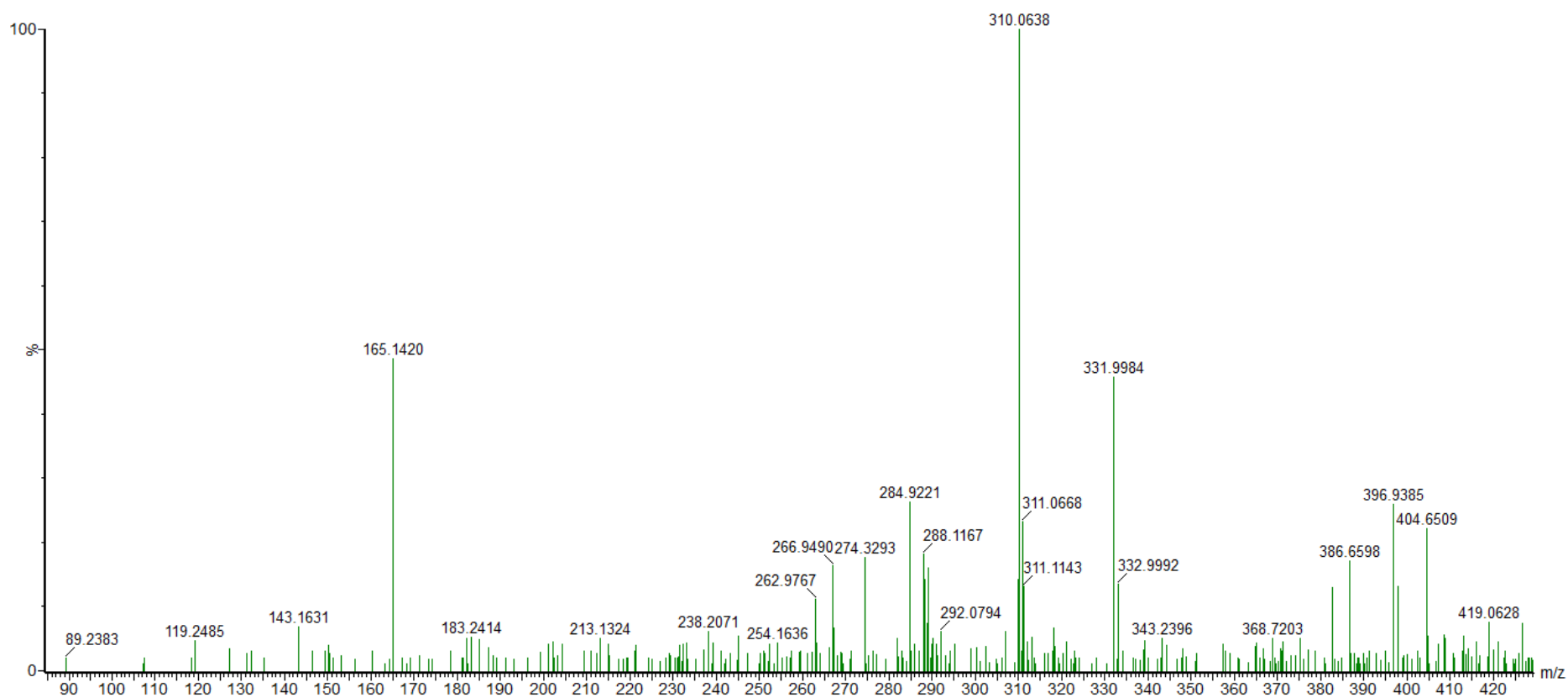


Figura S10. ESI(+)-MS da BTD-NH-Cum. Sinais do produto  $[C_{16}H_{11}N_3O_2S + H]^+$  = 310,0638 Da e  $[C_{16}H_{11}N_3O_2S + Na]^+$  = 331,9984 Da.

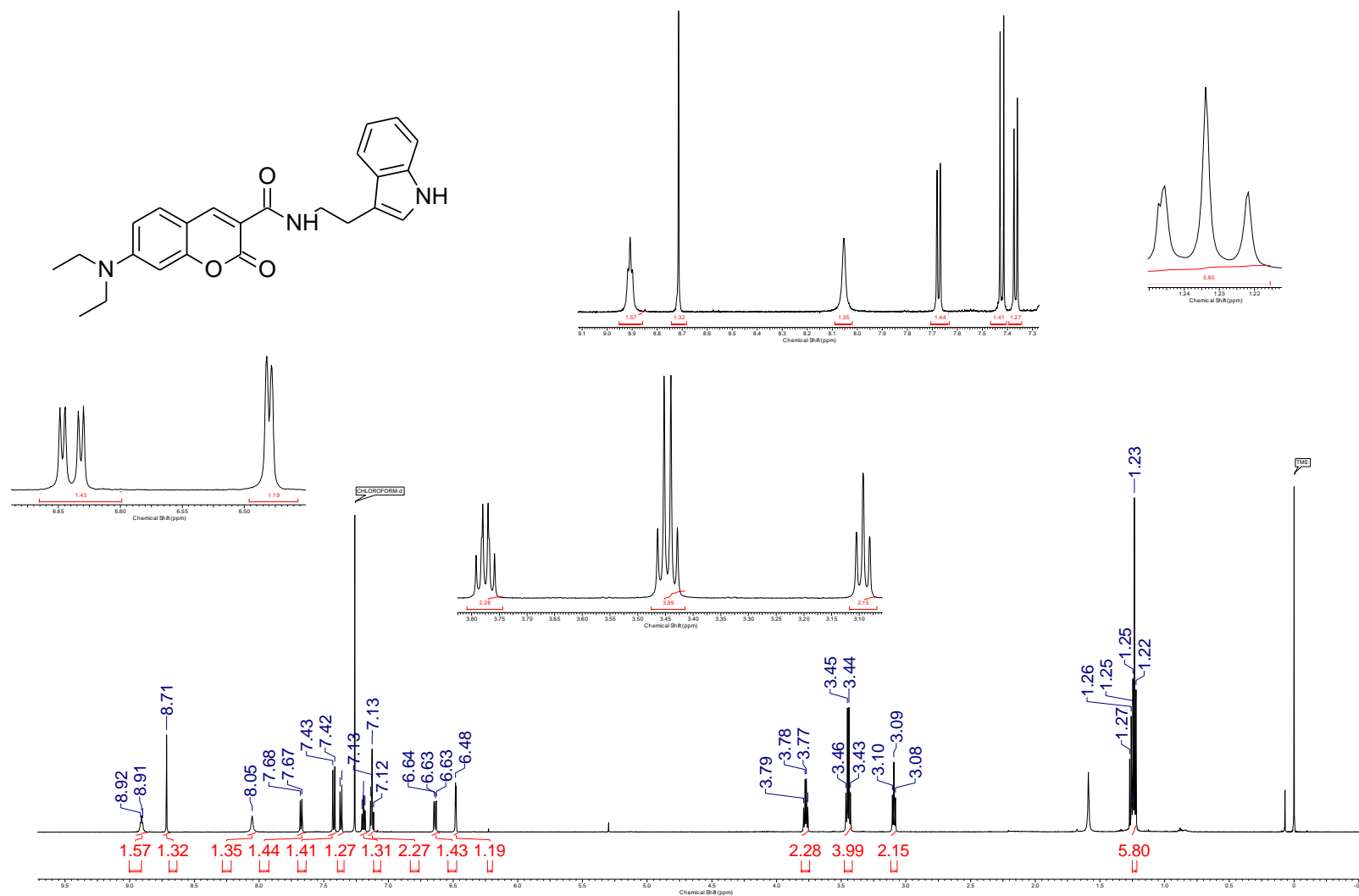


Figura S11. <sup>1</sup>H RMN 600 MHz (CDCl<sub>3</sub>) da Cum-NH-TRIP.



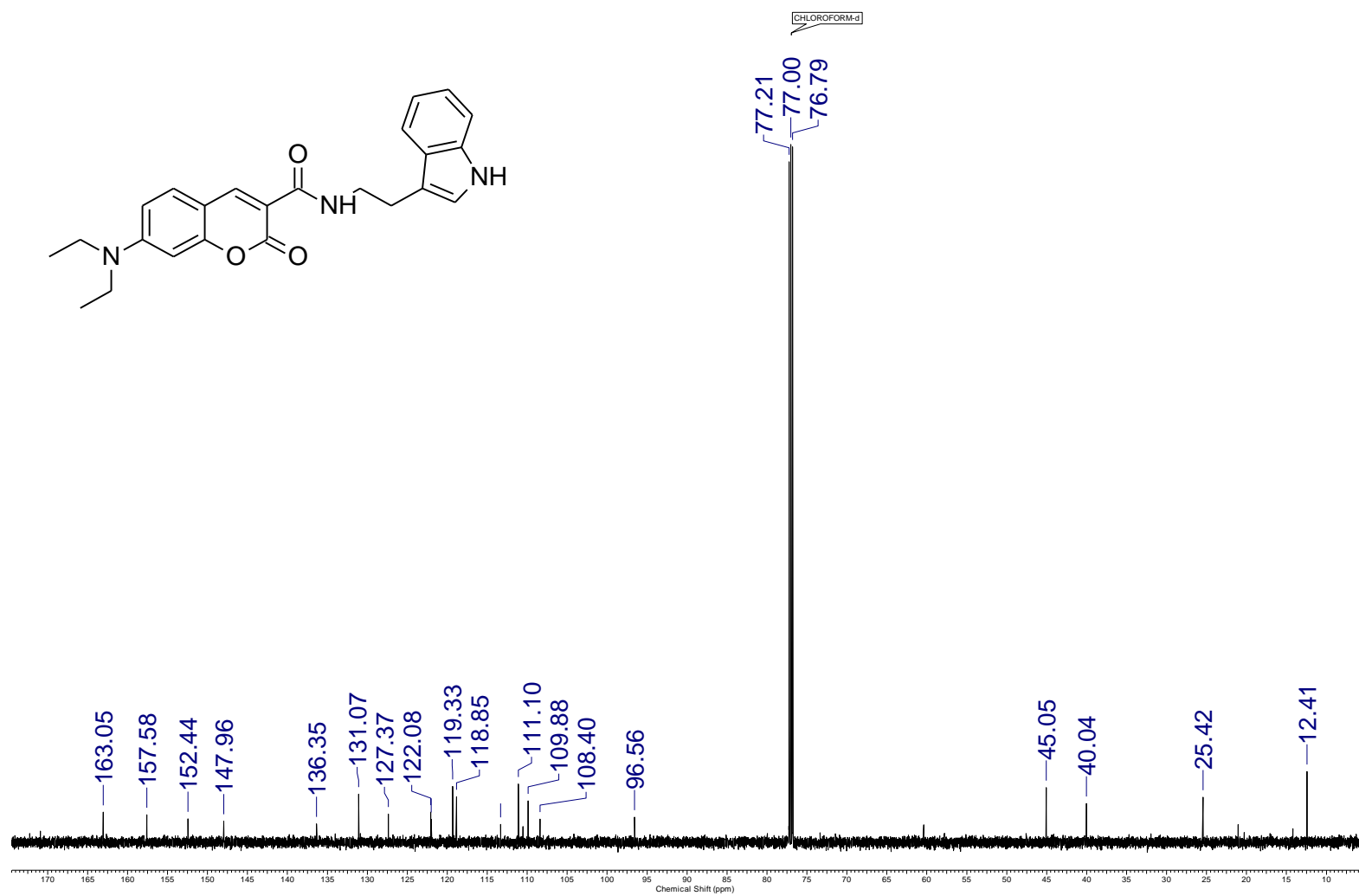
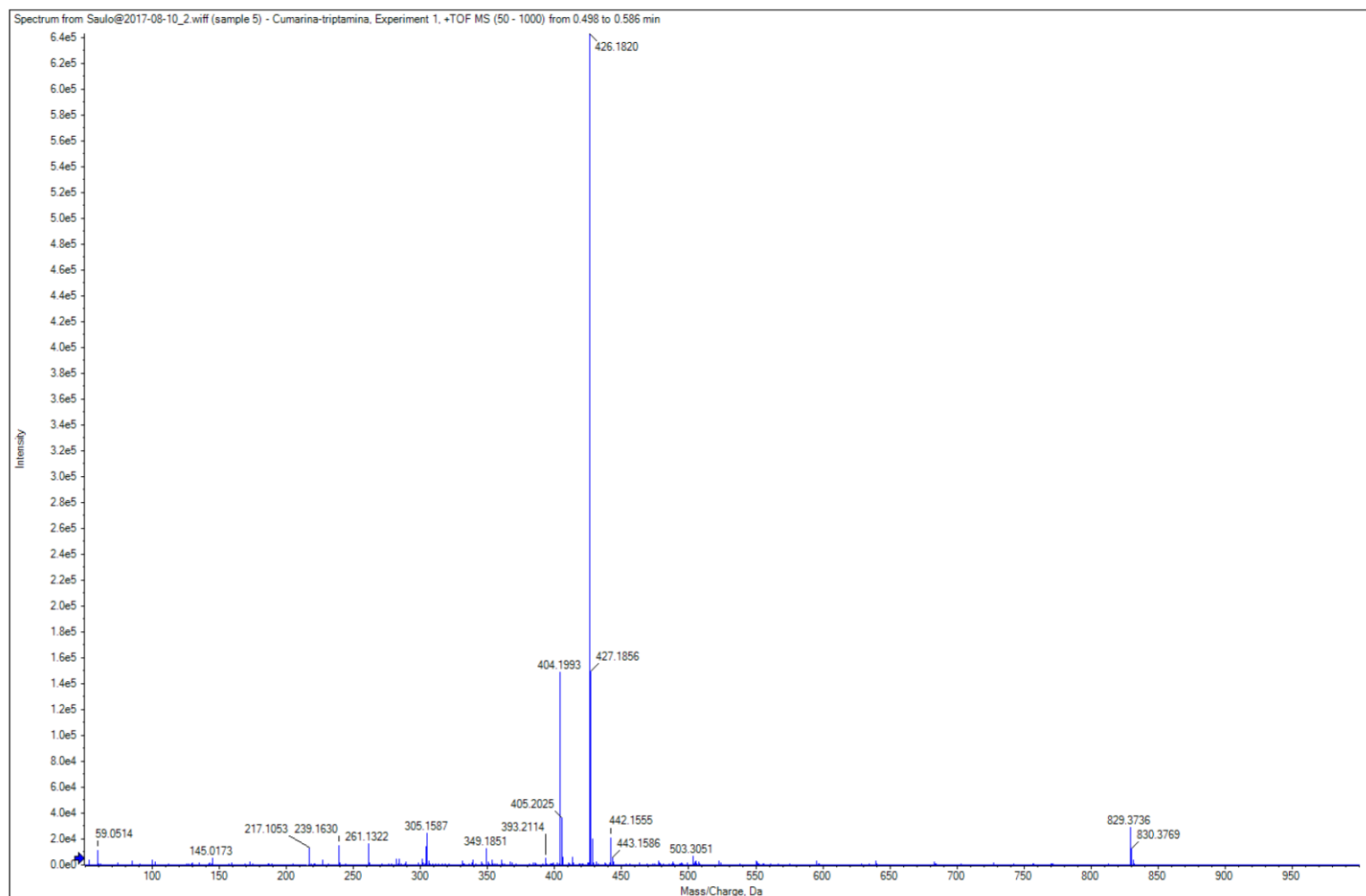


Figura S12. <sup>13</sup>C RMN 150 MHz (CDCl<sub>3</sub>) da Cum-NH-TRIP.



**Figura S13.** ESI(+)-MS da **Cum-NH-TRIP**. Sinais do produto  $[C_{24}H_{25}N_3O_3 + H]^+$  = 404,1993 Da e  $[C_{24}H_{25}N_3O_3 + Na]^+$  = 426,1820 Da.

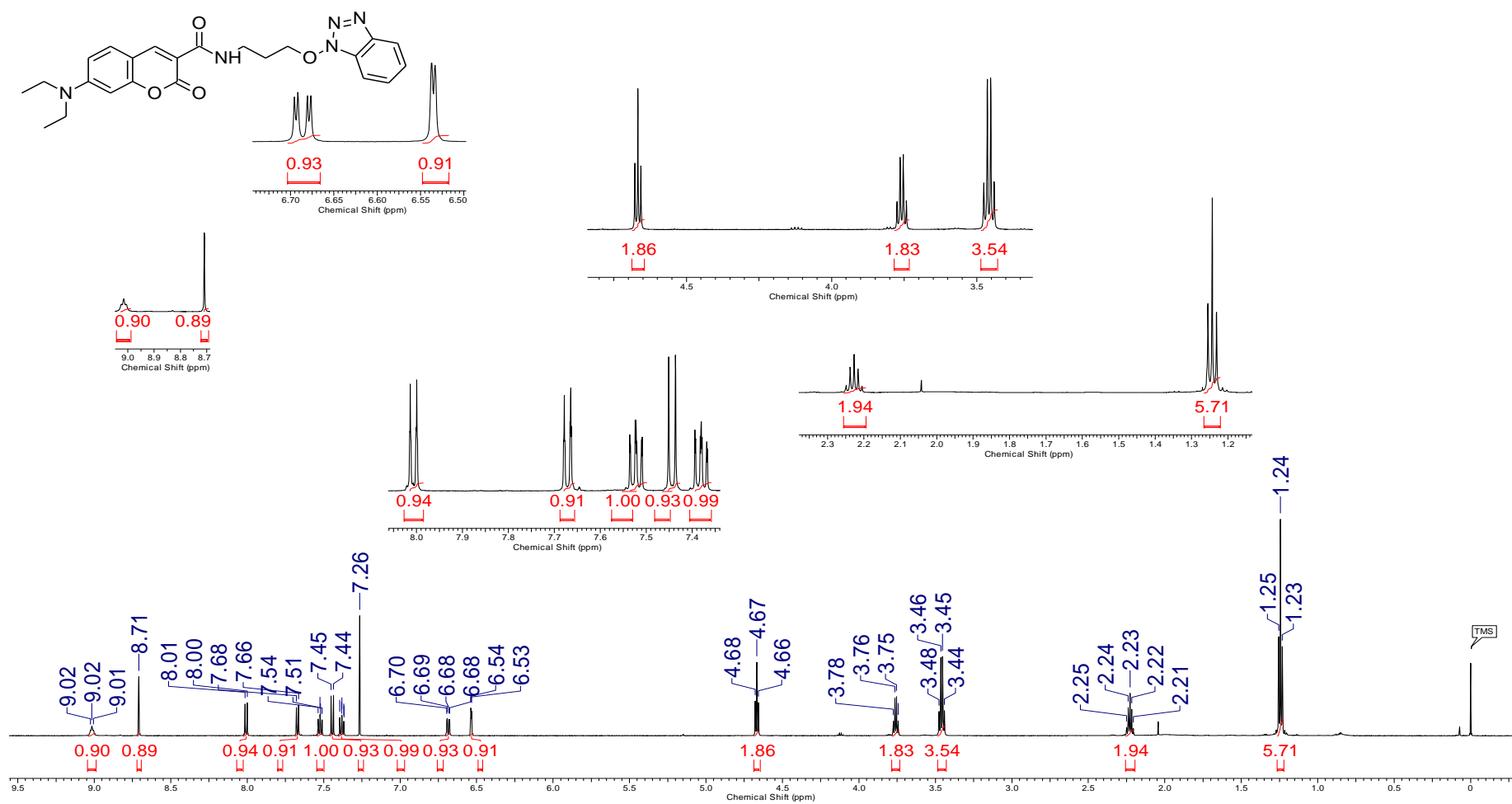


Figura S14.  $^1\text{H}$  RMN 600 MHz ( $\text{CDCl}_3$ ) da Cum-NH-HOBT.

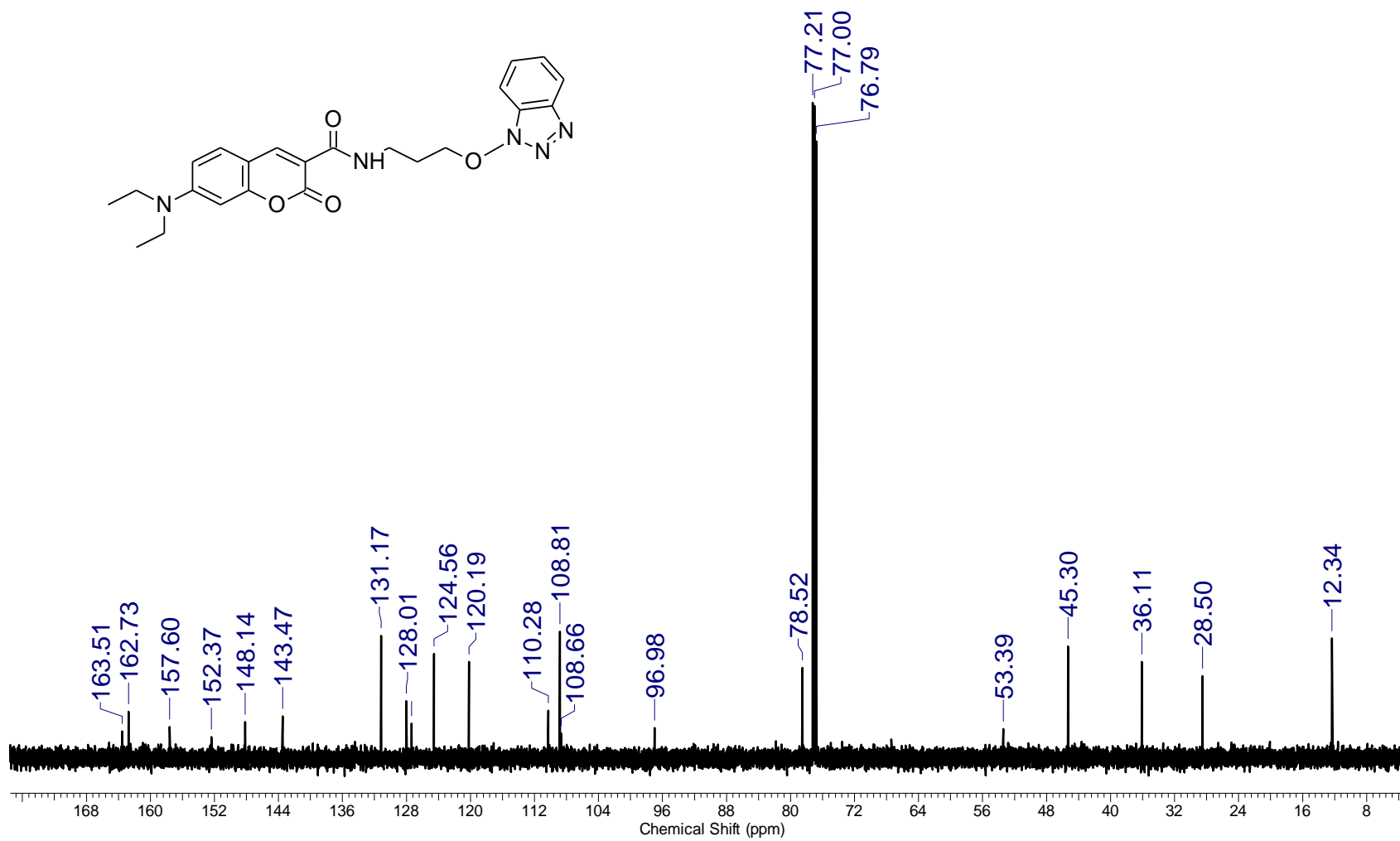


Figura S15. <sup>13</sup>C RMN 150 MHz (CDCl<sub>3</sub>) da Cum-NH-HOBT.

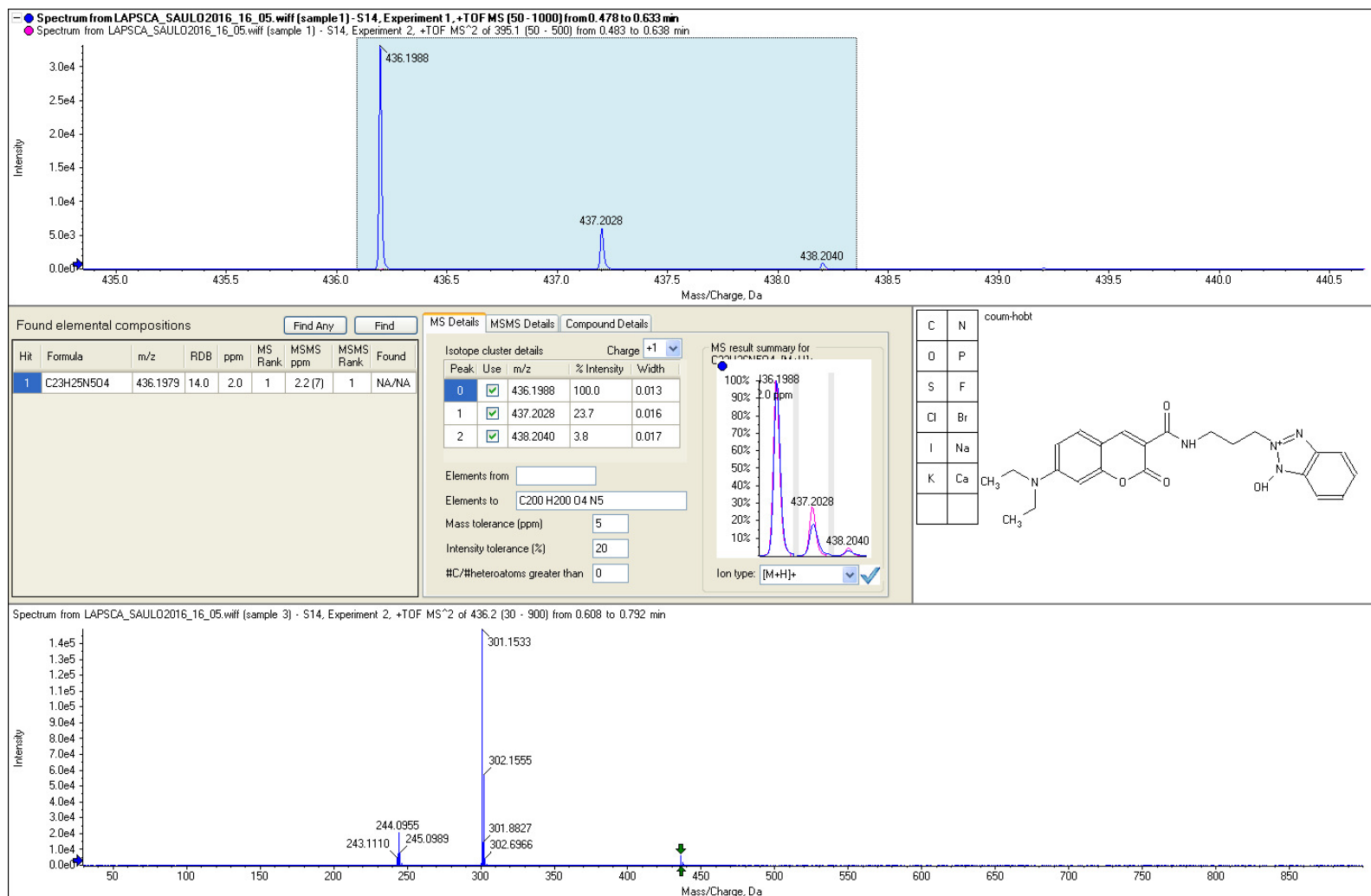


Figura S16. ESI(+)-MS da Cum-NH-HOBT. Sinais do produto  $[C_{23}H_{25}N_5O_4 + H]^+ = 436,1988$  Da.



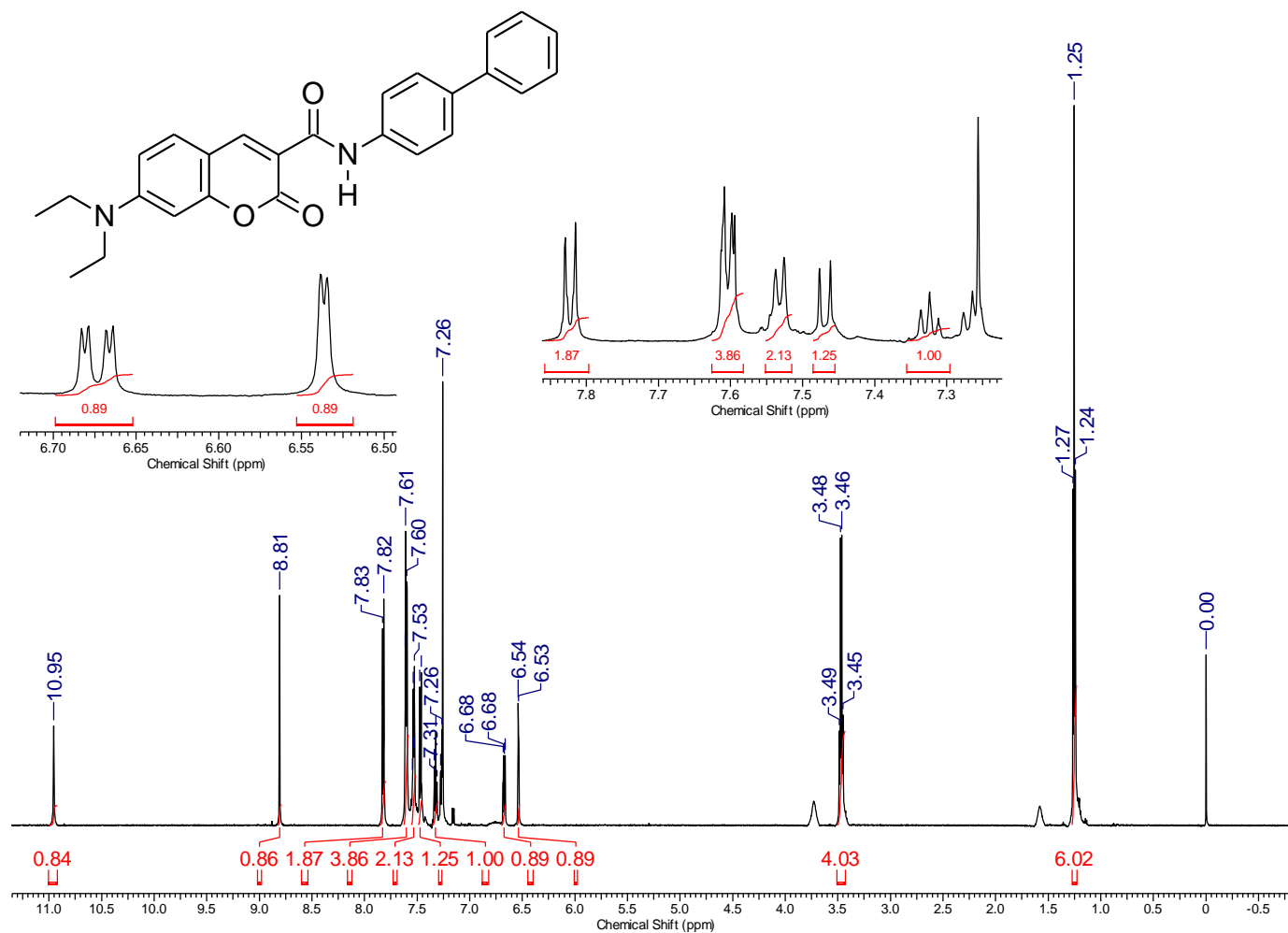


Figura S17. <sup>1</sup>H RMN 600 MHz (CDCl<sub>3</sub>) da Cum-NH-BIFENIL.

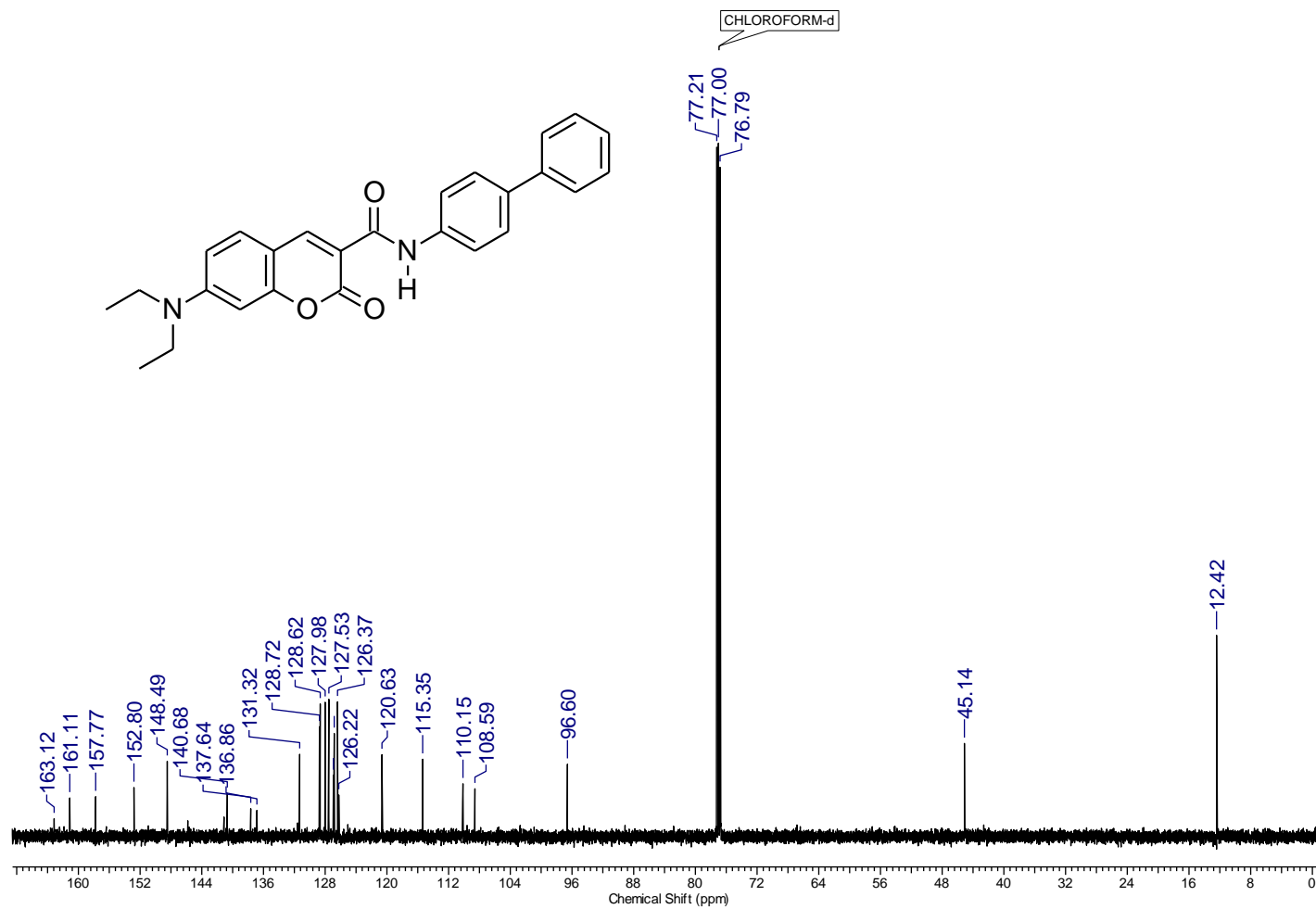
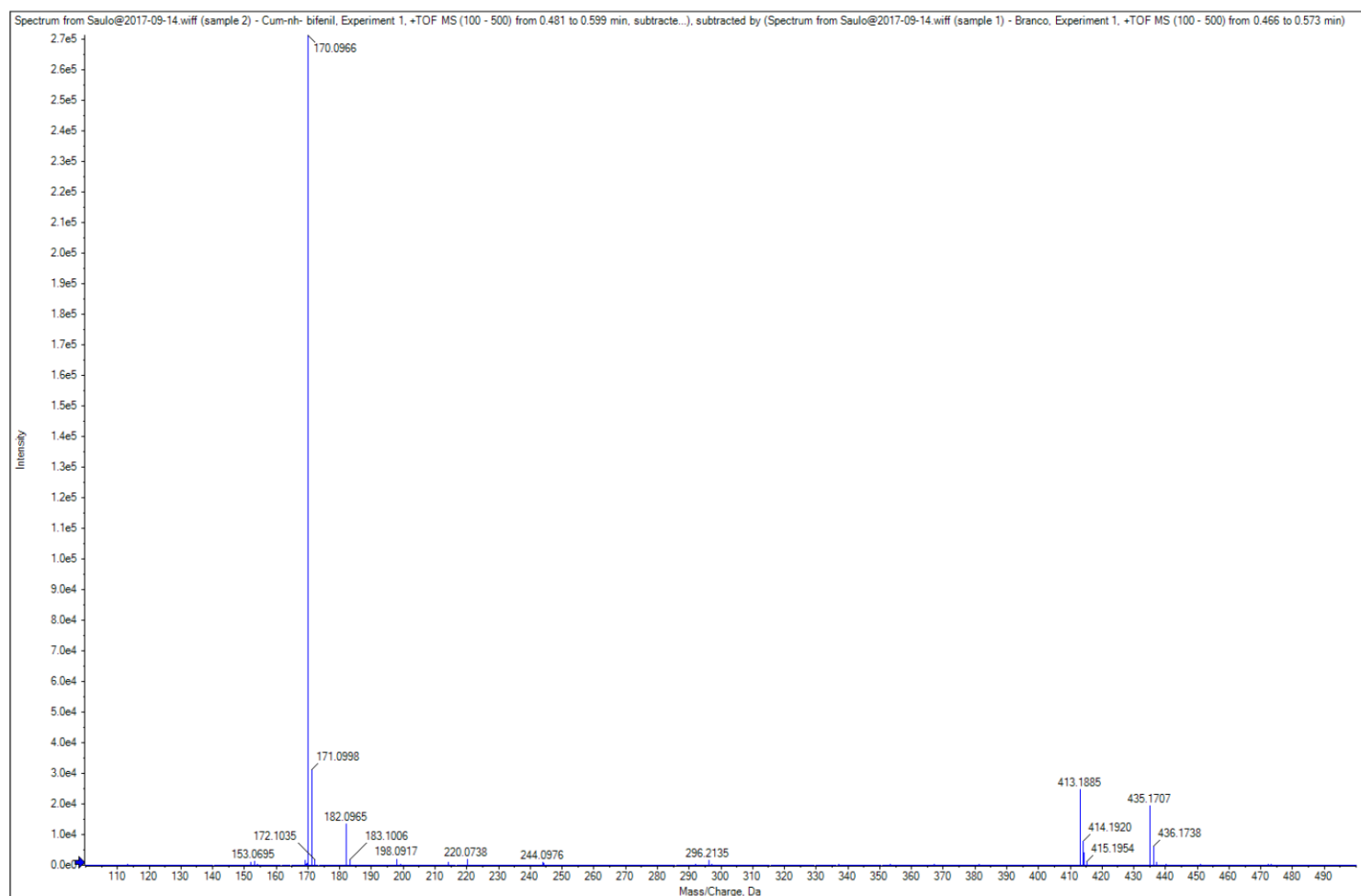


Figura S18.  $^{13}\text{C}$  RMN 150 MHz ( $\text{CDCl}_3$ ) da Cum-NH-BIFENIL.







**Figura S19.** ESI(+)-MS da **Cum-NH-BIFENIL**. Sinais do produto  $[C_{26}H_{24}N_2O_3 + H]^+ = 413,1885$  Da e  $[C_{26}H_{24}N_2O_3 + Na]^+ = 435,1707$  Da.



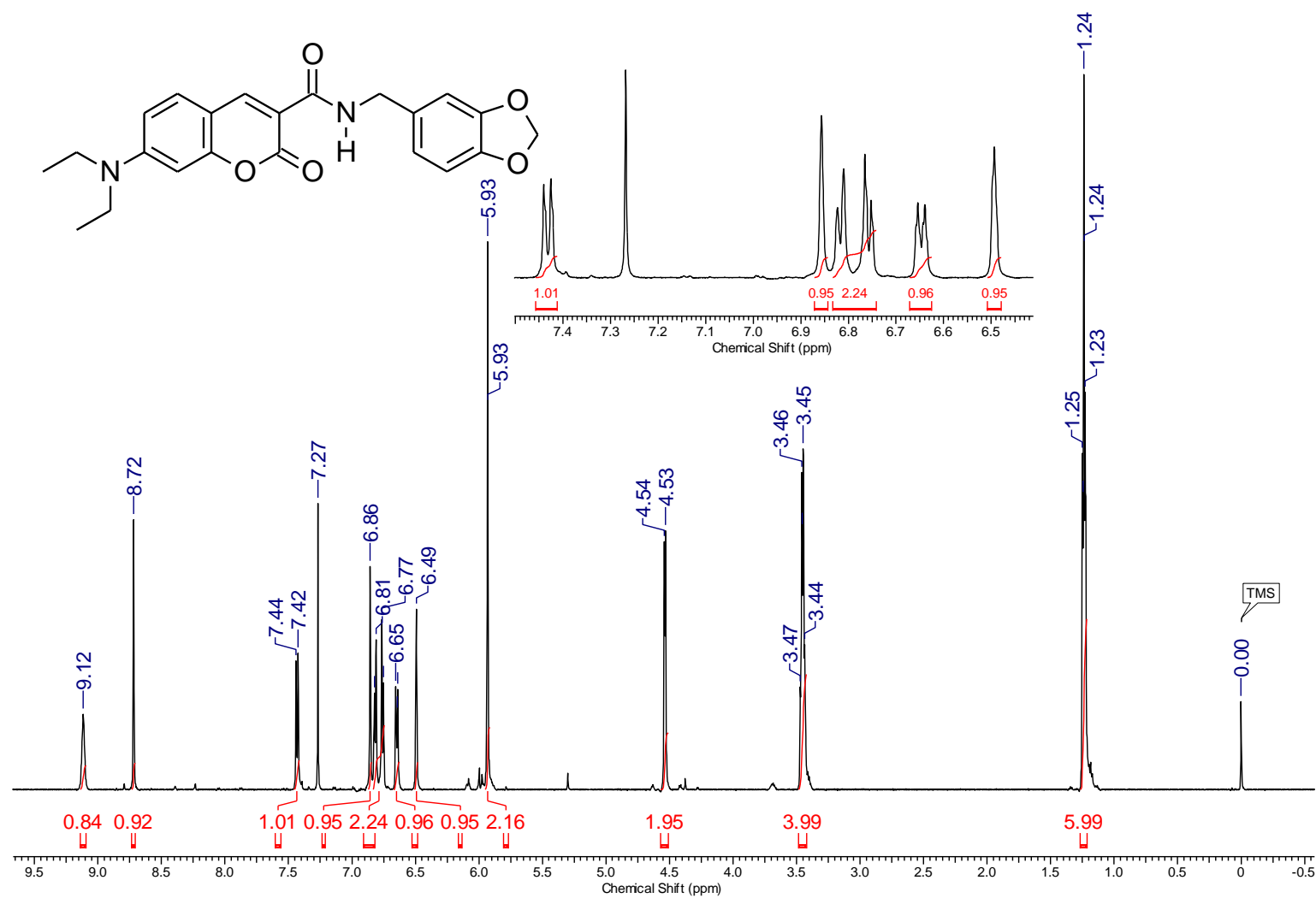


Figura S20. <sup>1</sup>H RMN 600 MHz (CDCl<sub>3</sub>) da Cum-NH-PIPERONIL.

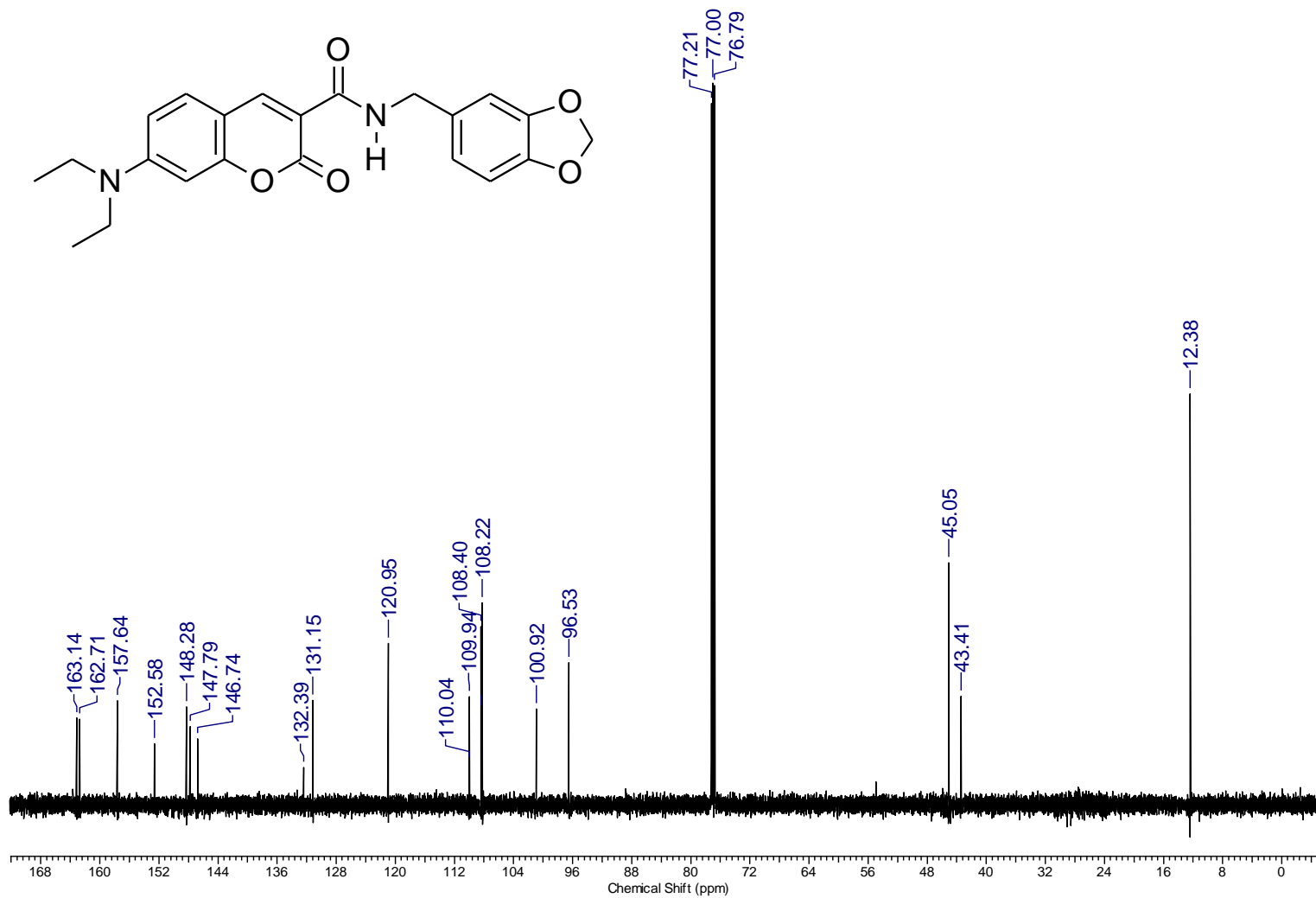
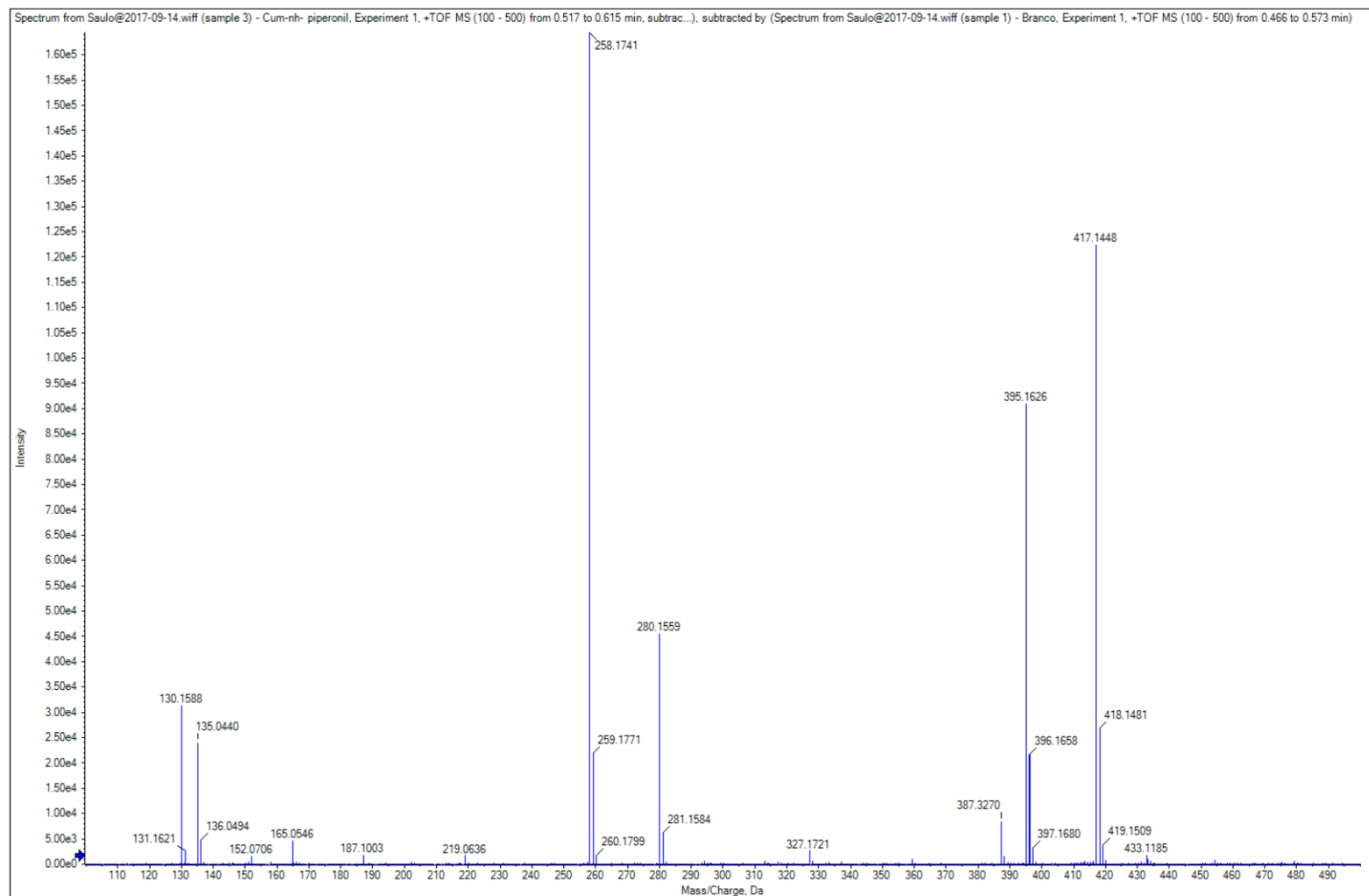


Figura S21. <sup>13</sup>C RMN 150 MHz (CDCl<sub>3</sub>) da Cum-NH-PIPERONIL.



**Figura S22.** ESI(+)-MS da **Cum-NH-PIPERONIL**. Sinais do produto  $[C_{22}H_{22}N_2O_5 + H]^+$  = 395,1626 Da e  $[C_{22}H_{22}N_2O_5 + Na]^+$  = 417,1448 Da.

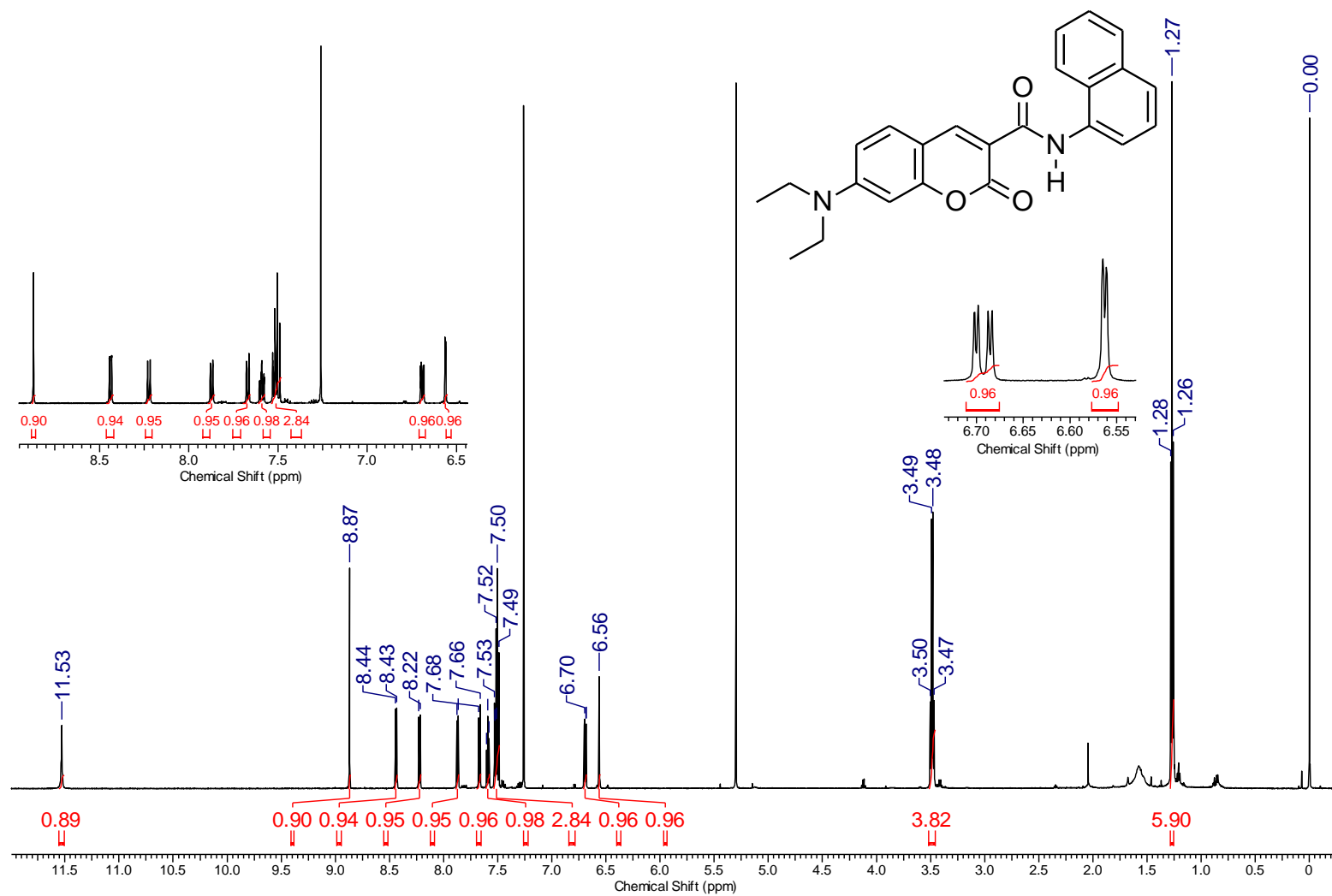


Figura S23. <sup>1</sup>H RMN 600 MHz (CDCl<sub>3</sub>) da Cum-NH-NAFTIL.

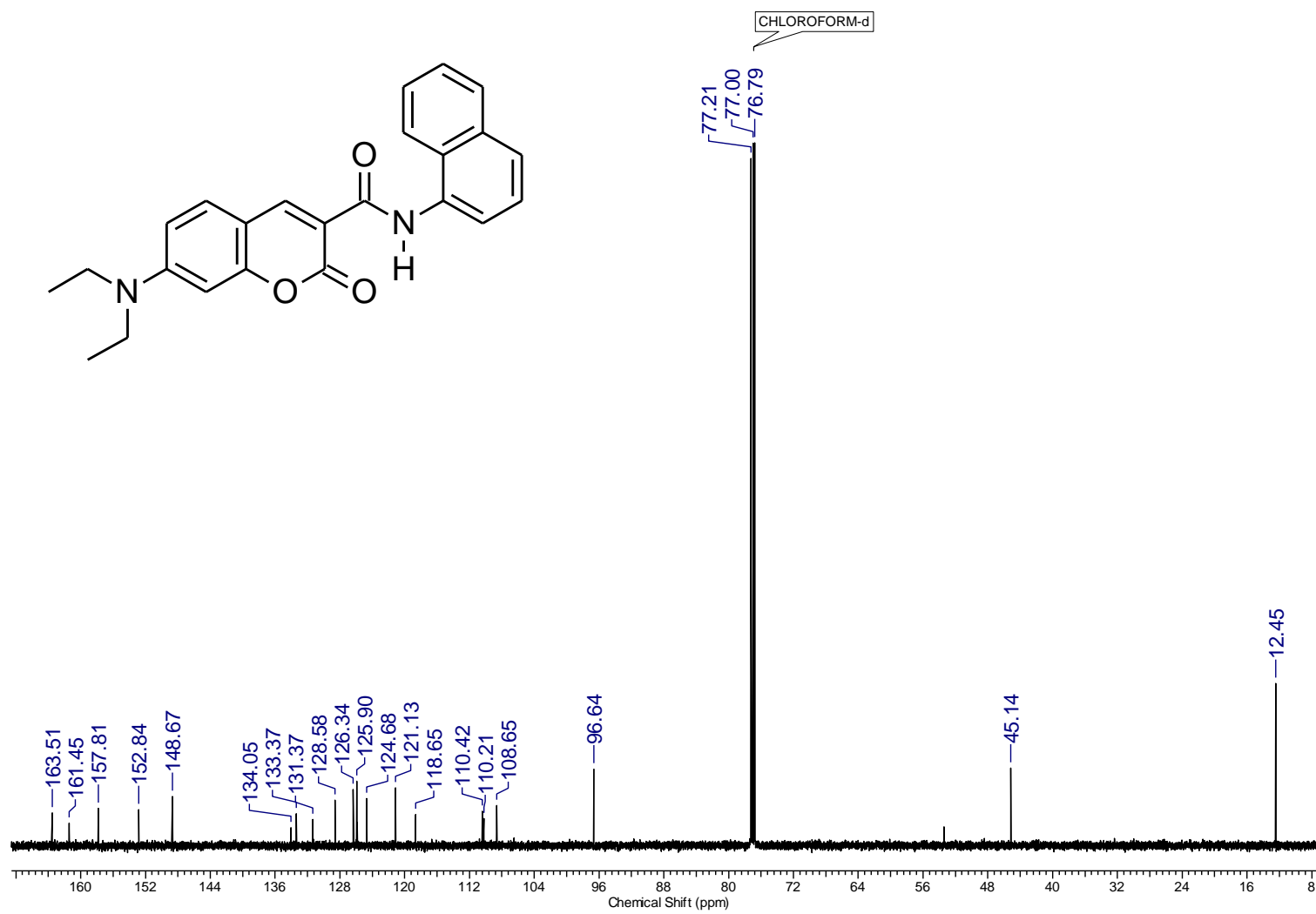
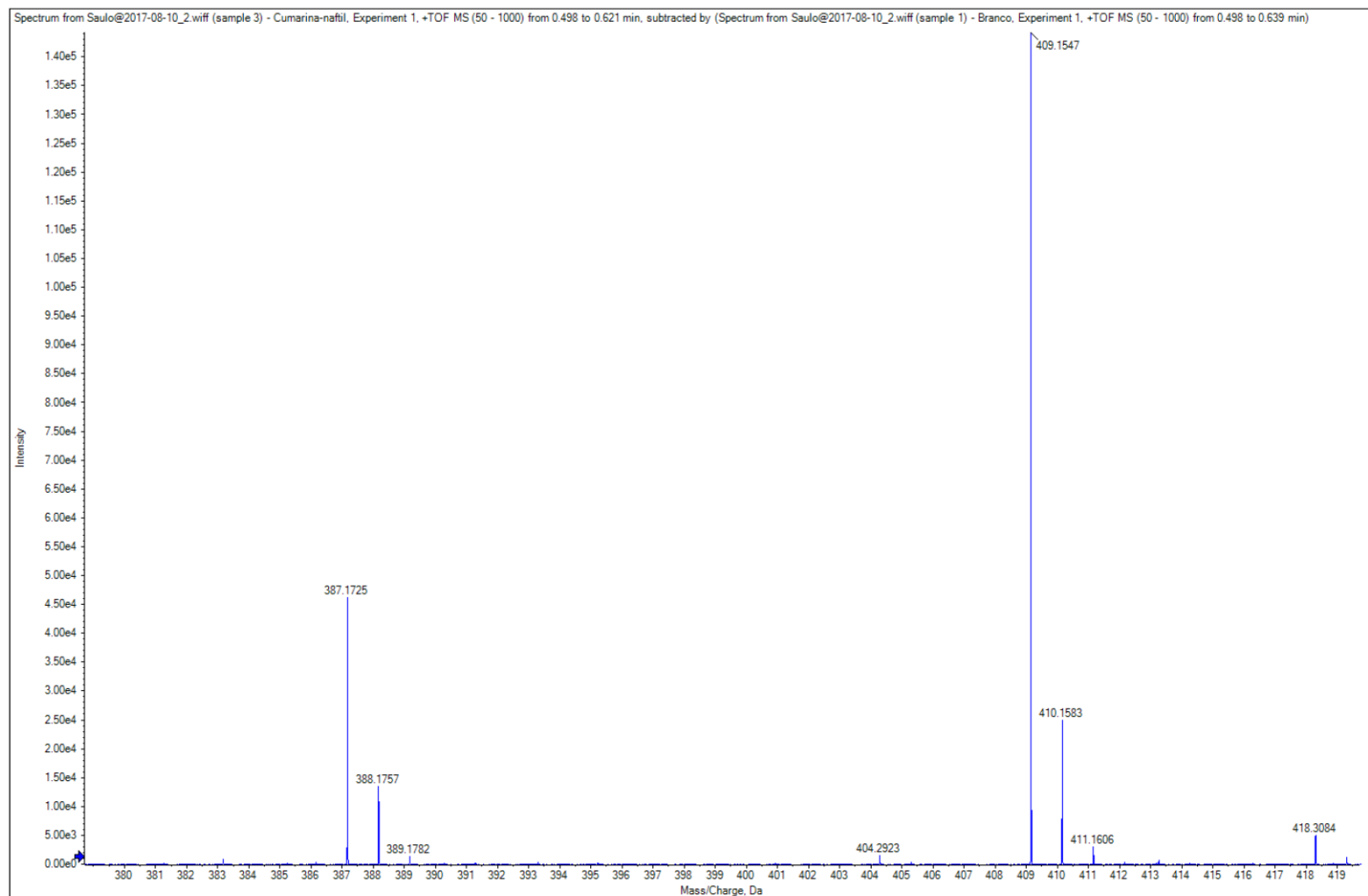


Figura S24. <sup>13</sup>C RMN 150 MHz (CDCl<sub>3</sub>) da Cum-NH-NAFTIL.





**Figura S25.** ESI(+)-MS da **Cum-NH-NAFTIL**. Sinais do produto  $[C_{24}H_{22}N_2O_3 + H]^+ = 387,1630$  Da e  $[C_{24}H_{22}N_2O_3 + Na]^+ = 409,1547$  Da.

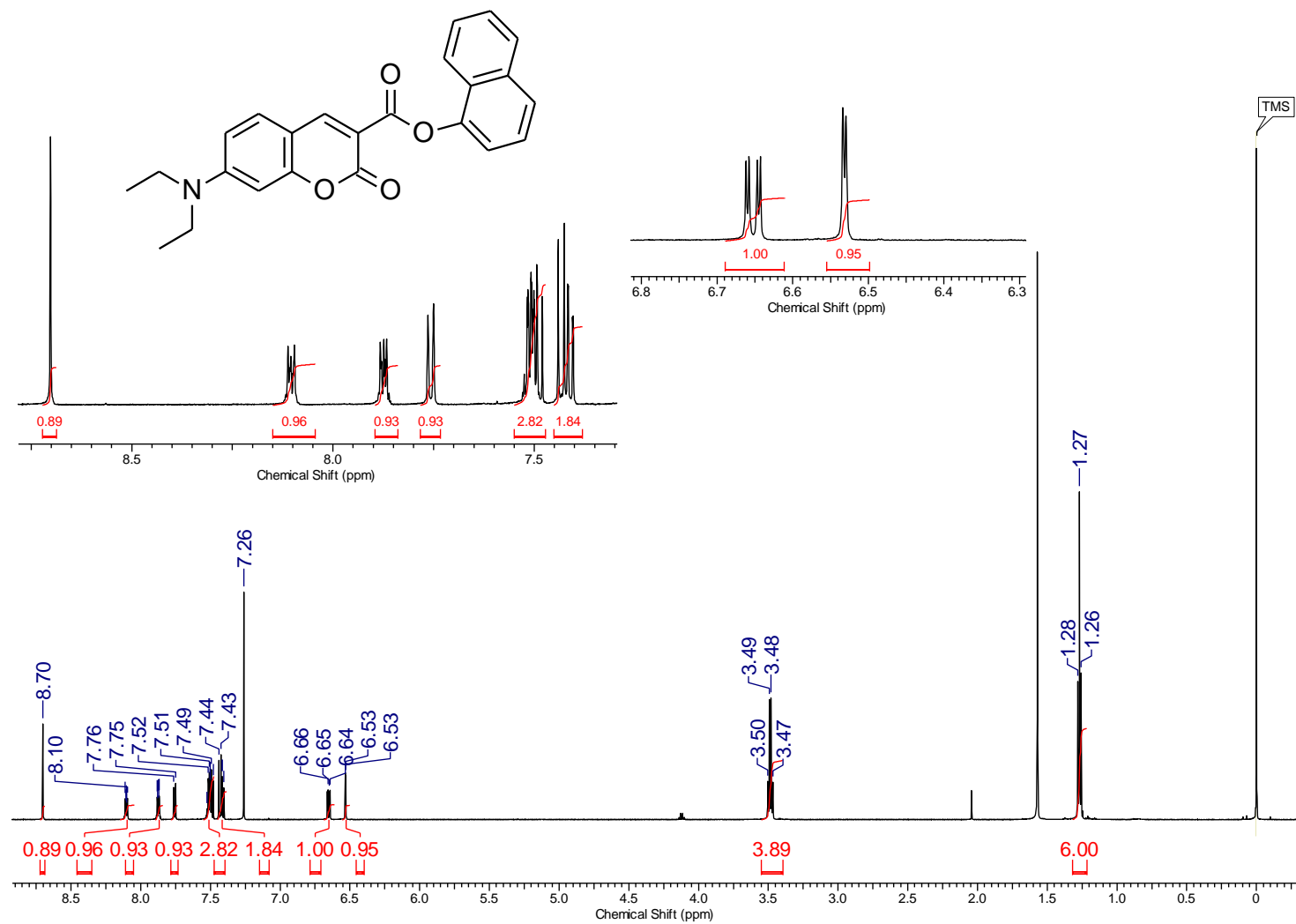


Figura S26. <sup>1</sup>H RMN 600 MHz (CDCl<sub>3</sub>) da Cum-NH-NAFTOL.

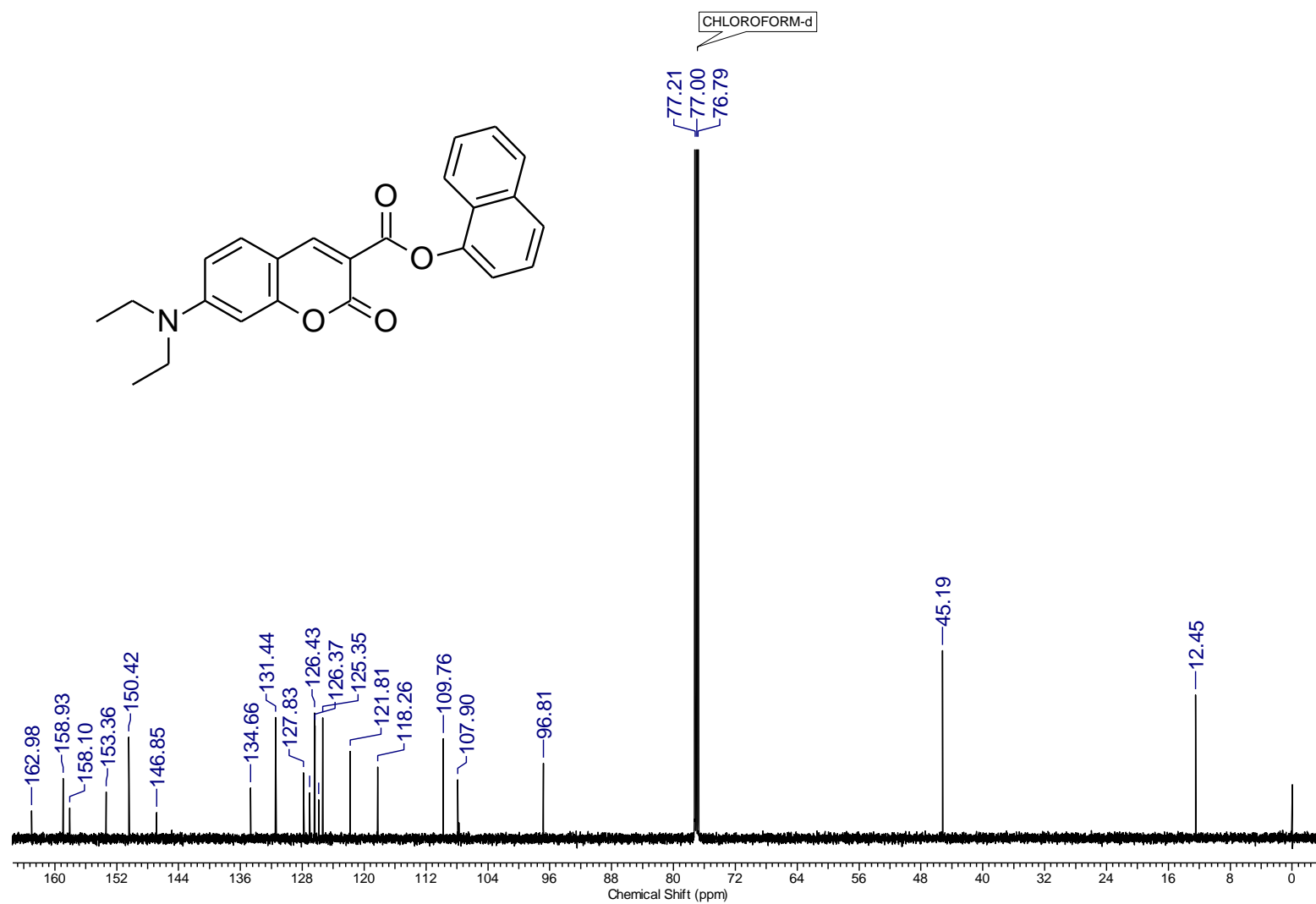
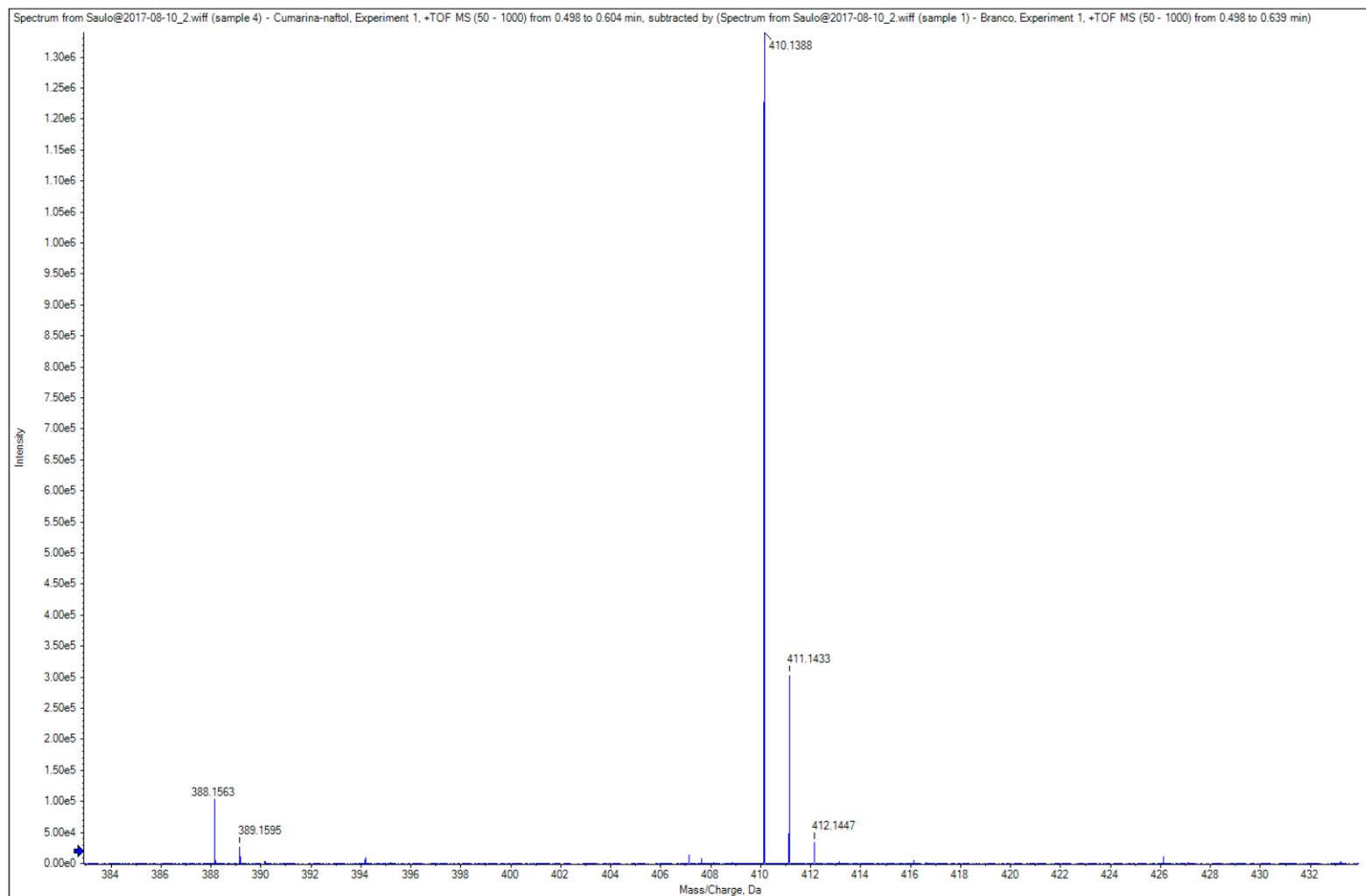



Figura S27. <sup>13</sup>C RMN 150 MHz (CDCl<sub>3</sub>) da Cum-NH-NAFTOL.



**Figura S28.** ESI(+)-MS da **Cum-NH-NAFTOL**. Sinais do produto  $[C_{24}H_{21}NO_4 + H]^+ = 388,1563$  Da e  $[C_{24}H_{21}NO_4 + Na]^+ = 410,1388$  Da.



**Fluorescence Turn On of Coumarin Derivatives by Metal Cations: A New Signaling Mechanism Based on C=N Isomerization**

**Author:** Jia-Sheng Wu, Wei-Min Liu, Xiao-Qing Zhuang, et al  
**Publication:** Organic Letters  
**Publisher:** American Chemical Society  
**Date:** Jan 1, 2007

*Copyright © 2007, American Chemical Society*

**PERMISSION/LICENSE IS GRANTED FOR YOUR ORDER AT NO CHARGE**

This type of permission/license, instead of the standard Terms & Conditions, is sent to you because no fee is being charged for your order. Please note the following:

- Permission is granted for your request in both print and electronic formats, and translations.
- If figures and/or tables were requested, they may be adapted or used in part.
- Please print this page for your records and send a copy of it to your publisher/graduate school.
- Appropriate credit for the requested material should be given as follows: "Reprinted (adapted) with permission from (COMPLETE REFERENCE CITATION). Copyright (YEAR) American Chemical Society." Insert appropriate information in place of the capitalized words.
- One-time permission is granted only for the use specified in your request. No additional uses are granted (such as derivative works or other editions). For any other uses, please submit a new request.

If credit is given to another source for the material you requested, permission must be obtained from that source.

[BACK](#) [CLOSE WINDOW](#)

**Figura S29.** Permissão de uso de figura da referência 70.

**Coumarin-Derived Cu<sup>2+</sup>-Selective Fluorescence Sensor: Synthesis, Mechanisms, and Applications in Living Cells**

**Author:** Hyo Sung Jung, Pil Seung Kwon, Jeong Won Lee, et al  
**Publication:** Journal of the American Chemical Society  
**Publisher:** American Chemical Society  
**Date:** Feb 1, 2009

*Copyright © 2009, American Chemical Society*

**PERMISSION/LICENSE IS GRANTED FOR YOUR ORDER AT NO CHARGE**

This type of permission/license, instead of the standard Terms & Conditions, is sent to you because no fee is being charged for your order. Please note the following:

- Permission is granted for your request in both print and electronic formats, and translations.
- If figures and/or tables were requested, they may be adapted or used in part.
- Please print this page for your records and send a copy of it to your publisher/graduate school.
- Appropriate credit for the requested material should be given as follows: "Reprinted (adapted) with permission from (COMPLETE REFERENCE CITATION). Copyright (YEAR) American Chemical Society." Insert appropriate information in place of the capitalized words.
- One-time permission is granted only for the use specified in your request. No additional uses are granted (such as derivative works or other editions). For any other uses, please submit a new request.

If credit is given to another source for the material you requested, permission must be obtained from that source.

[BACK](#) [CLOSE WINDOW](#)

**Figura S30.** Permissão de uso de figura da referência 71.

**Fluorescent Peptoids as Selective Live Cell Imaging Probes**

Author: Saulo T. A. Passos, José R. Correa, Samira L. M. Soares, et al  
Publication: The Journal of Organic Chemistry  
Publisher: American Chemical Society  
Date: Mar 1, 2016

*Copyright © 2016, American Chemical Society*

**PERMISSION/LICENSE IS GRANTED FOR YOUR ORDER AT NO CHARGE**

This type of permission/license, instead of the standard Terms & Conditions, is sent to you because no fee is being charged for your order. Please note the following:

- Permission is granted for your request in both print and electronic formats, and translations.
- If figures and/or tables were requested, they may be adapted or used in part.
- Please print this page for your records and send a copy of it to your publisher/graduate school.
- Appropriate credit for the requested material should be given as follows: "Reprinted (adapted) with permission from (COMPLETE REFERENCE CITATION). Copyright (YEAR) American Chemical Society." Insert appropriate information in place of the capitalized words.
- One-time permission is granted only for the use specified in your request. No additional uses are granted (such as derivative works or other editions). For any other uses, please submit a new request.

If credit is given to another source for the material you requested, permission must be obtained from that source.

[BACK](#) [CLOSE WINDOW](#)

Figura S31. Permissão de uso de figura da referência 72.

**DECLARAÇÃO DE ORIGINALIDADE DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO OU TESE DE  
DOUTORADO**

Declaro que a presente dissertação/tese é original, elaborada especialmente para este fim, não tendo sido apresentada para obtenção de qualquer título e que identifico e cito devidamente todas as autoras e todos os autores que contribuíram para o trabalho, bem como as contribuições oriundas de outras publicações de minha autoria.

Declaro estar ciente de que a cópia ou o plágio podem gerar responsabilidade civil, criminal e disciplinar, consistindo em grave violação à ética acadêmica.

21/06/21

Brasília, (dia) de (mês) de (ano).

Assinatura do/a discente: Saulo de Tarso Alves dos Passos

Programa: PPGQ UnB

Nome completo: Saulo de Tarso Alves dos Passos

Título do Trabalho: Design Racional de Híbridos Fluorescentes de Cumarinas para Aplicação em Bioimageamento

Nível: ( ) Mestrado (x) Doutorado

Orientador/a: Wender Alves da Silva