



Universidade de Évora - Instituto de Investigação e Formação Avançada

Programa de Doutoramento em Bioquímica

Tese de Doutoramento

Síntese de novos fluoróforos, solúveis em água e reativos ao grupo amino, para marcação de biomoléculas: aplicação ao património cultural

Raquel Cachola Eustáquio

Orientador(es) | António Manuel Pereira
Sílvia Macedo Arantes

Évora 2025



Universidade de Évora - Instituto de Investigação e Formação Avançada

Programa de Doutoramento em Bioquímica

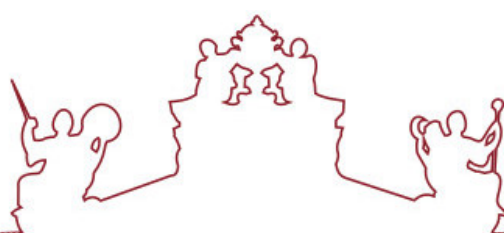
Tese de Doutoramento

Síntese de novos fluoróforos, solúveis em água e reativos ao grupo amino, para marcação de biomoléculas: aplicação ao património cultural

Raquel Cachola Eustáquio

Orientador(es) | António Manuel Pereira
Sílvia Macedo Arantes

Évora 2025



A tese de doutoramento foi objeto de apreciação e discussão pública pelo seguinte júri nomeado pelo Diretor do Instituto de Investigação e Formação Avançada:

Presidente | Ana Teresa Caldeira (Universidade de Évora)

Vogais | Ana Maria dos Santos Rosa da Costa (Universidade do Algarve)
António Manuel Pereira (Universidade de Évora) (Orientador)
Maria Rosário Martins (Universidade de Évora)
Maria da Conceição Fernandes (Centro de Biotecnologia Agrícola e Agro-Alimentar do Alentejo (CEBAL))
Paula Cristina de Sêrio Branco (Universidade Nova de Lisboa - Faculdade de Ciências e Tecnologias)

Agradecimentos

A realização desta tese só foi possível graças ao apoio, orientação e incentivo de muitas pessoas que estiveram ao meu lado ao longo deste percurso. A todas elas, expresso o meu mais sincero agradecimento.

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer ao Professor Doutor António Pereira pela orientação incansável, competência e excelente orientação prestada ao longo desta jornada. A sua confiança no meu trabalho e a sua dedicação foram fundamentais para alcançar esta etapa.

Agradeço à Doutora Sílvia Arantes, pelo apoio na realização dos ensaios da técnica FISH e na revisão final da tese.

Ao Professor Doutor João Paulo Ramalho, pela colaboração nos cálculos DFT e TDDFT.

À Professora Doutora Ana Teresa Caldeira, pela ajuda e disponibilidade com que sempre esclareceu as minhas dúvidas.

Aos colegas de investigação, em especial à Carolina, Elizabete e Sérgio, pelo convívio, pela boa disposição e pelos momentos de descontração.

Às minhas amigas, Maria, Marlène e Vera, pela amizade incondicional e pelos inúmeros momentos de convívio que tornaram esta jornada mais leve e especial.

O meu enorme agradecimento também ao André, por todo o carinho, apoio incondicional e por estar sempre ao meu lado ao longo destes anos.

O meu mais profundo agradecimento aos meus pais, Palmira Eustáquio e António Eustáquio, pelo apoio incondicional, pelo amor e pelo carinho que sempre me ofereceram. Obrigada por acreditarem em mim em todos os momentos, por estarem presentes nos sucessos e, sobretudo, nas dificuldades. Dedico-vos, com todo o coração, esta etapa tão especial da minha vida.

Agradeço também à Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT) e ao laboratório HERCULES pela concessão, e financiamento, da bolsa de doutoramento UI/BD/153584/2022.

A todos, o meu muito obrigada!



Resumo

A preservação do Património Cultural é crucial para toda a sociedade em geral, sendo essencial o desenvolvimento de novas estratégias e metodologias de microanálise sensíveis, que possibilitem o planeamento de ações eficazes de remediação e mitigação. A marcação fluorescente de biomoléculas é atualmente uma das metodologias mais usadas para fins bioanalíticos e, por essa razão, a técnica de Hibridação *in situ* Fluorescente (FISH) é considerada uma ferramenta essencial de análise no campo do Património Cultural.

Neste trabalho, pretendeu-se desenvolver uma estratégia sintética simples e eficiente para produzir novos marcadores fluorescentes, solúveis em água, de baixo custo e reativos ao grupo amino, para marcação de biomoléculas. A referida metodologia permitiu a obtenção de nove novos marcadores fluorescentes, com elevada sensibilidade, para a identificação e deteção de biomoléculas no contexto de micro-amostras do Património Cultural.

A síntese de derivados 2-substituídos da 7-dietilamino-4-metilcoumarina com a inclusão de um grupo 4-estirilo, com o objetivo de expandir a deslocalização eletrónica através de um sistema do tipo Doador de eletrões - ponte π - Aceitador de eletrões, permitiu a obtenção de seis novos promissores marcadores fluorescentes.

Utilizando uma estratégia eficiente e económica, e com um custo inferior aos derivados da 7-dietilamino-4-metilcoumarina, foram sintetizados a partir do 4-dietilaminobenzaldeído três novos marcadores fluorescentes com excelentes propriedades fotofísicas.

As sondas preparadas com os novos marcadores fluorescentes, derivados da 7-dietilamino-4-metilcoumarina e do 4-dietilaminobenzaldeído, apresentaram elevada capacidade para a marcação das células de *S. cerevisiae* e de *Bacillus sp.*, com valores percentuais de células fluorescentes muito semelhantes aos das células hibridadas com a sonda comercial EUK516-Cy3.

Os resultados obtidos através da técnica FISH são de difícil correlação direta com as propriedades fotofísicas dos respetivos marcadores fluorescentes, ou seja, em última análise, o desenvolvimento de sondas fluorescentes depende, em grande medida, de tentativa e erro ou de descoberta fortuita.

Synthesis of new fluorescent water-soluble amine-reactive reagents for biomolecules labeling: application to cultural heritage

Abstract

Preserving Cultural Heritage is crucial for society. Developing innovative strategies and sensitive microanalysis methodologies is essential to effectively plan remediation and mitigation actions. Fluorescent labeling of biomolecules is currently one of the most widely used methodologies for bioanalytical purposes and, for this reason, the Fluorescent *in situ* Hybridization (FISH) technique is considered an essential analytical tool in the field of Cultural Heritage.

The objective of this study was to develop a simple and efficient synthetic strategy to produce new, water-soluble, low-cost, amino group-reactive fluorescent markers for labeling biomolecules. This approach has yielded nine new fluorescent markers that exhibit high sensitivity in identifying and detecting biomolecules in the context of cultural heritage micro-samples.

The synthesis of 2-substituted derivatives of 7-diethylamino-4-methylcoumarin incorporating a 4-styryl group aimed to enhance electronic delocalization via an electron donor - π bridge - electron acceptor system, yielding six new promising fluorescent markers.

Using an efficient and economical strategy, and at a lower cost than derivatives of 7-diethylamino-4-methylcoumarin, three new fluorescent markers with excellent photophysical properties were synthesized from 4-diethyl-aminobenzaldehyde.

The probes prepared with the new fluorescent markers, derived from 7-diethyl-amino-4-methylcoumarin and 4-diethylaminobenzaldehyde, showed high capability for marking *S. cerevisiae* and *Bacillus sp.* cells, with percentage values of fluorescent cells very similar to those of cells hybridized with the commercial probe EUK516-Cy3.

The results obtained through the FISH technique are difficult to correlate directly with the photophysical properties of the respective fluorescent markers, meaning that, ultimately, the development of fluorescent probes depends largely on trial and error or serendipitous discovery.

Abreviaturas e Símbolos

A	Adenina
Abs	Absorvância
AcOEt	Acetato de etilo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNr	Ácido ribonucleico ribossômico
Ag ₂ O	Óxido de prata
BLA	Alternância de comprimento de ligação (do inglês, <i>Bond Length Alternation</i>)
C	Citosina
ccd	Cromatografia em camada delgada
CDCl ₃	Clorofórmio deuterado
CD ₃ OD	Metanol deuterado
(CD ₃) ₂ SO	Dimetilsulfóxido deuterado
CH ₃ OH	Metanol
CH ₃ CN	Acetonitrilo
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
EtOH	Etanol
(CH ₃) ₃ SiCl	Cloreto de trimetilsililo
CH ₃ I	Iodometano
(CH ₃) ₃ COK	<i>t</i> -butóxido de potássio
CH ₂ CHBF ₃ K	Viniltrifluoroborato de potássio
CH ₃ CO ₂ Ag	Acetato de prata
¹³ C-RMN	Ressonância magnética nuclear de carbono 13
Cy	Cianina (do inglês, <i>cyanine</i>)
d	Dupleto
DCC	<i>N,N'</i> - Diciclo-hexilcarbodiimida

D- π -A	Doador de elétrons - ponte π - Aceitador de elétrons
dd	Duplo duplete
DFT	Teoria do funcional da densidade (do inglês, <i>Density functional theory</i>)
TDDFT	Teoria do funcional da densidade dependente do tempo (do inglês, <i>Time-dependent density-functional theory</i>)
DMAP	4-dimetilaminopiridina
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNPH	2,4-dinitrofenil-hidrazina
DSSC	Corantes sensibilizadores de células solares (do inglês, <i>dye-sensitized solar cell</i>)
Em	Emissão
Éster NHS	Éster da <i>N</i> -hidroxisuccinimida (do inglês, <i>N</i> -hydroxysuccinimide ester)
eq	Equivalente
Et ₂ O	Éter etílico
EUB388	Sonda oligonucleotídica universal complementar ao ARN de células procariotas
EUK516	Sonda oligonucleotídica universal complementar ao ARN de células eucariotas
FISH	Hibridação <i>in situ</i> fluorescente (do inglês, <i>fluorescence in situ hybridization</i>)
FITC	Isotiocianato de fluoresceína (do inglês, <i>fluorescein isothiocyanate</i>)
FLUOS	Éster 5(6)-carboxifluoresceína- <i>N</i> -hidroxisuccinimida
FRET	Transferência de energia intramolecular por fluorescência (do inglês, <i>fluorescence resonance energy transfer</i>)
FTMS	Espetrometria de massa com transformada de Fourier (do inglês, <i>Fourier Transform Mass Spectrometry</i>)
FI	Intensidade de fluorescência
FSC	Dispersão frontal, correlaciona-se com o tamanho celular (do inglês, <i>forward scatter</i>)
G	Guanina

h	Hora
HB	Tampão de hibridação (do inglês, <i>hybratization buffer</i>)
HCl	Ácido clorídrico
HMBC	Correlação heteronuclear de múltiplas ligações (do inglês, <i>heteronuclear multiple-bond correlation</i>)
HMQC	Correlação heteronuclear de <i>quantum</i> -múltiplo (do inglês, <i>heteronuclear multiple quantum correlation</i>)
HOMO	Orbital molecular ocupada de mais elevada energia (do inglês, <i>highest occupied molecular orbital</i>)
¹ H-RMN	Ressonância magnética nuclear de próton
HRMS	Espectrometria de massa de alta resolução (do inglês, <i>high resolution mass spectrometry</i>)
Hz	Hertz
ISC	Cruzamentos intersistemas (do inglês, <i>intersystem crossing</i>)
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
J	Constante de acoplamento
K ₂ CO ₃	Carbonato de potássio
KH ₂ PO ₄	Di-hidrogenofosfato de potássio
KCl	Cloreto de potássio
LUMO	Orbital molecular desocupada de mais baixa energia (do inglês, <i>lowest occupied molecular orbital</i>)
m	Multiplete
m/z	Razão massa/carga
mod	Modificado
min	Minutos
ME	Meio líquido
NB	Meio nutriente
NADH	<i>Nicotinamida adenina dinucleotídeo hidreto</i> , forma reduzida do NAD (do inglês, <i>nicotinamide adenine dinucleotide</i>)
NASA	Administração Nacional de Aeronáutica e Espaço dos Estados Unidos da América (do inglês, <i>National Aeronautics and Space Administration</i>)

NHS	<i>N</i> -hidroxisuccinimida
NEt ₃	Trietilamina
NaOH	Hidróxido de sódio
NaH	Hidreto de sódio
NaCl	Cloreto de sódio
NaHCO ₃	Hidrogenocarbonato de sódio
NaH ₂ PO ₄	Di-hidrogenofosfato de sódio
NaO ₂ CCH ₃	Acetato de sódio
<i>n</i> -PrOH	<i>n</i> -propanol
NOESY	Espectroscopia com efeito nuclear Overhauser (do inglês, <i>nuclear overhauser effect spectroscopy</i>)
OLED	Díodos emissores de luz orgânica
POCl ₃	Oxicloreto de fosforo
PBS	Tampão fosfato-salino (do inglês, <i>phosphate buffered saline</i>)
Pd(dppf)Cl ₂ .CH ₂ Cl ₂	[1,1'-bis(difenilfosfina)ferroceno]dicloropaládio (II) complexado com diclorometano
Pd(PPh ₃) ₄	Tetraquistrifenilfosfina de paládio (0)
ppm	Partes por milhão
q	Quadrupeto
MHz	Megahertz
RNase	Ribonuclease
STED	Microscopia de depleção por emissão estimulada (do inglês, <i>Stimulated Emission Depletion Microscopy</i>)
s	Singuleto
sl	Singuleto largo
SC	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SD	Desvio padrão (do inglês, <i>standard deviation</i>)
Sat.	Saturada
STP	4-sulfotetrafluorofenílicos (do inglês, <i>4-sulfotetrafluorophenyl</i>)

t	Tripleto
T	Timina
t.a.	Temperatura ambiente
THF	Tetra-hidrofurano
TRITC	Isotiocianato de tetrametilrodamina (do inglês, <i>tetramethyl rhodamine isothiocyanate</i>)
UNESCO	Organização das Nações Unidas para a Educação, Ciência e Cultura (inglês, <i>United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization</i>)
UV/Vis	Espetroscopia de ultravioleta-visível
YPD-agar	Ágar Dextrose Peptona Extrato de Levedura (do inglês, <i>Yeast Extract Peptone Dextrose Agar</i>)
η	Rendimento reacional
δ	Desvio químico
Φ_F	Rendimento quântico
τ	Tempo de vida da fluorescência
λ	Comprimento de onda
λ^{\max}	Comprimento de onda máximo
λ_{abs}	Comprimento de onda de absorvância
λ_{em}	Comprimento de onda de emissão
ε	Absortividade molar
Δr	Medida do comprimento de transferência interna de carga
E	Energia de transição
f	Força de oscilador
c	Velocidade da luz no vácuo

Índice

Agradecimentos	i
Resumo	iii
Abstract	iv
Abreviaturas e Símbolos	v
Índice de Figuras	xxi
Índice de Esquemas	xxviii
Índice de Tabelas	xxxi
Nota Prévia	xxxii
Prefácio.....	xxxiii
I. INTRODUÇÃO.....	1
I.1. Património Cultural.....	4
I.1.1. Identificação de microrganismos do Património Cultural.....	5
I.2. Moléculas pequenas fluorescentes na marcação de biomoléculas	6
I.2.1. Coumarinas.....	9
I.2.2. Atividade biológica e aplicações industriais	10
I.2.3. Propriedades fotofísicas das coumarinas	12
I.2.4. Coumarinas usadas na marcação de biomoléculas	15
I.3. Fenómeno da fluorescência	19
I.3.1. Breve história da fluorescência	19
I.3.2. Princípios básicos da fluorescência.....	23
I.3.3. Características dos fluoróforos	25
I.3.4. Fatores que influenciam a fluorescência	28
I.4. Marcação fluorescente de biomoléculas	31
I.4.1. Reações de marcação de biomoléculas	33
I.5. Imunofluorescência direta ou indireta	35
I.6. Hibridação <i>in situ</i> Fluorescente	37
I.6.1. Características das sondas usadas na técnica de Hibridação <i>in situ</i> Fluorescente ..	40
I.6.2. Técnica de Hibridação <i>in situ</i> Fluorescente	42

I.7. Reação de Lawesson.....	43
I.7.1. Mecanismo da reação de Lawesson	46
I.7.2. Limitações da reação de Lawesson.....	46
I.8. Condensação aldólica	47
I.9. Reações de acoplamento C-C utilizadas na síntese de derivados de coumarinas	48
I.9.1. Reação de Heck	49
I.9.2. Reação de Suzuki-Miyaura.....	50
I.10. Cálculos da teoria do funcional da densidade (DFT) e da teoria do funcional da densidade dependente do tempo (TDDFT).....	52
II. DISCUSSÃO.....	53
II.1. Derivados da 7-dietilamino-4-metilcoumarina	54
II.1.1. Derivados 2-substituídos da 7-dietilamino-4-metilcoumarina	54
II.1.1.1. Síntese dos derivados do 2-(7-dietilamino-4-metil-2 <i>H</i> -cromen-2-ilideno)malononitrilo (3).....	55
II.1.1.1.1. Propriedades fotofísicas dos derivados 4-estiril do 2-(7-dietil-amino-4-metil-2 <i>H</i> -cromen-2-ilideno)malononitrilo (3)	57
II.1.1.1.2. Cálculos DFT e TDDFT para os derivados 4-estiril do 2-(7-dietilamino-4-metil-2 <i>H</i> -cromen-2-ilideno)malononitrilo (3)	59
II.1.1.2. Síntese dos marcadores fluorescentes para biomoléculas derivados do 2-(7-dietil-amino-4-metil-2 <i>H</i> -cromen-2-ilideno)malononitrilo (3)	62
II.1.1.2.1. Síntese do marcador fluorescente, (<i>E</i>)-2-(4-2-2-(dicianometileno)-7-dietilamino-2 <i>H</i> -cromen-4-il)vinil)fenoxi)hexanoato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo (11)	63
II.1.1.2.2. Síntese do marcador fluorescente, (<i>E</i>)-6-((4-(2-(2-(dicianome-tileno)-7-dietilamino-2 <i>H</i> -cromen-4-il)vinil)fenil)(metil)amino)hexanoato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo (26)	64
II.1.1.2.2.1. Tentativas de síntese e hidrólise do 3-(2-((4-formilfenil)(metil)amino)etoxi)propanoato de metilo (12)	64
II.1.1.2.2.2. Tentativas de síntese do 3-(2-((4-formilfenil)(metil)amino)etoxi)propanoato de metilo (14)	66
II.1.1.2.2.3. Síntese de 4-formilfenil(metil)amino sulfonatos como reagentes passíveis de substituições nucleófilas	67
II.1.1.2.2.4. Síntese do ácido 6-((4-formilfenil)(metil)amino)hexanóico (24)	68
II.1.1.2.3. Síntese do marcador fluorescente, (<i>E</i>)-6-((4-(2-(2-(dicianome-tileno)-7-dietilamino-2 <i>H</i> -cromen-4-il)vinil)fenil)(metil)amino)hexanoato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo (26)	69
II.1.1.2.4. Propriedades fotofísicas dos marcadores fluorescentes, (<i>E</i>)-2-(4-2-2-(dicianome-tileno)-7-(dietilamino)-2 <i>H</i> -cromen-4-il)vinil)fenoxi)-hexanoato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo (11) e (<i>E</i>)-6-((4-(2-(2-(dicianome-tileno)-7-dietilamino-2 <i>H</i> -cromen-4-il)vinil)fenil)(metil)amino)hexanoato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo (26)	70

II.1.1.2.5. Cálculos DFT e TDDFT para os marcadores fluorescentes 11 e 26	72
II.1.1.3. Análise do potencial dos novos marcadores fluorescentes 11 e 26 , através da técnica FISH	75
II.1.1.3.1. Modelo <i>Saccharomyces cerevisiae</i> com as sondas EUK516-(11) e EUK516-(26)	75
II.1.1.3.2. Modelo <i>Bacillus sp.</i> com as sondas EUB338-(11) e EUB338-(26)	78
II.1.1.4. Síntese do 2-(bis(4-nitrofenil)metileno)- <i>N,N</i> -dietil-4-metil-2 <i>H</i> -cromen-7-amino (27) e tentativa de síntese do (<i>E</i>)-2-(7-dietilamino-4-metil-2 <i>H</i> -cromen-2-ilideno)-2-(4-(trifluorometil)fenil)acetonitrilo (28)	82
II.1.1.5. Tentativa de síntese do ácido 2-(7-dietilamino-4-metil-2 <i>H</i> -cromen-2-ilideno)malónico (29)	83
II.1.1.6. Síntese do nitrato de 1-(7-dietilamino-4-metil-2 <i>H</i> -cromen-2-ilideno)-piperidín-1- <i>io</i> (30)	83
II.1.1.6.1. Síntese dos derivados do nitrato de 1-(7-dietilamino-4-metil-2 <i>H</i> -cromen-2-ilideno)-piperidín-1- <i>io</i> (30)	84
II.1.1.6.1.1. Propriedades fotofísicas dos derivados 4-estiril do nitrato de 1-(7-dietilamino-4-metil-2 <i>H</i> -cromen-2-ilideno)piperidín-1- <i>io</i> (30)	86
II.1.1.6.1.2. Cálculos DFT e TDDFT para os derivados 4-estiril do nitrato de 1-(7-dietilamino-4-metil-2 <i>H</i> -cromen-2-ilideno)piperidín-1- <i>io</i> (30)	88
II.1.1.7. Síntese dos marcadores fluorescentes para biomoléculas derivados do nitrato de 1-(7-dietilamino-4-metil-2 <i>H</i> -cromen-2-ilideno)piperidín-1- <i>io</i> (30)	92
II.1.1.7.1. Síntese do marcador fluorescente, nitrato de (<i>E</i>)-1-(7-dietilamino-4-(4-((6-((2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi)-6-oxo-hexil)oxi)estiril)-2 <i>H</i> -cromen-2-ilideno)piperidín-1- <i>io</i> (36)	93
II.1.1.7.2. Síntese do marcador fluorescente, nitrato de (<i>E</i>)-1-(7-dietilamino-4-(4-((6-((2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi)-6-oxo-hexil)(metil)amino)estiril)-2 <i>H</i> -cromen-2-ilideno)piperidín-1- <i>io</i> (38)	94
II.1.1.7.3. Propriedades fotofísicas dos marcadores fluorescentes 36 e 38	95
II.1.1.7.4. Cálculos DFT e TDDFT para os marcadores fluorescentes 36 e 38	97
II.1.1.8. Análise do potencial dos novos marcadores fluorescentes 36 e 38 , através da técnica FISH	100
II.1.1.8.1. Modelo <i>Saccharomyces cerevisiae</i> com as sondas EUK516-(36) e EUK516-(38)	100
II.1.1.8.2. Modelo <i>Bacillus sp.</i> com as sondas EUB338-(36) e EUB338-(38)	104
II.1.1.9. Síntese dos marcadores fluorescentes para biomoléculas derivados do iodeto de (<i>E</i>)-4-(ciano(7-dietilamino-4-metil-2 <i>H</i> -cromen-2-ilideno)metil)-1-metilpiridín-1- <i>io</i> (40)	107
II.1.1.9.1. Síntese do marcador fluorescente, iodeto de 4-(ciano((<i>E</i>)-7-dietilamino-4-((<i>E</i>)-4-((6-((2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi)-6-oxo-hexil)oxi)estiril)-2 <i>H</i> -cromen-2-ilideno)metil)-1-metilpiridín-1- <i>io</i> (42)	108

II.1.1.9.2. Síntese do marcador fluorescente, iodeto de 4-(ciano((<i>E</i>)-7-dietilamino-4-((<i>E</i>)-4-((6-((2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi)-6-oxo-hexil)(metil)amino)-estiril)-2 <i>H</i> -cromen-2-ilideno)metil)-1-metilpiridín-1-io (44).....	109
II.1.1.9.3. Propriedades fotofísicas dos marcadores fluorescentes 42 e 44	110
II.1.1.9.4. Cálculos DFT e TDDFT para os marcadores fluorescentes 42 e 44	112
II.1.1.10. Análise do potencial dos novos marcadores fluorescentes 42 e 44 através da técnica FISH	116
II.1.1.10.1. Modelo <i>Saccharomyces cerevisiae</i> com as sondas EUK516-(42) e EUK516-(44).....	116
II.1.1.10.2. Modelo <i>Bacillus</i> sp. com as sondas EUB338-(42) e EUB338-(44).....	119
II.1.2. Análise comparativa dos seis novos marcadores fluorescentes 11, 26, 36, 38, 42 e 44	122
II.1.2.1. Propriedades fotofísicas dos marcadores fluorescentes 11, 26, 36, 38, 42 e 44	123
II.1.2.2. Análise do potencial dos novos marcadores fluorescentes 11, 26, 36, 38, 42 e 44 através da técnica FISH.....	125
II.1.2.2.1. Modelo <i>Saccharomyces cerevisiae</i> com as sondas EUK516-(11), EUK516-(26), EUK516-(36), EUK516-(38), EUK516-(42) e EUK516-(44)	125
II.1.2.2.2. Modelo <i>Bacillus</i> sp. com as sondas EUB338-(11), EUB338-(26), EUB338-(36), EUB338-(38), EUB338-(42) e EUB338-(44)	126
II.1.3. Derivados 3-substituídos da 7-dietilamino-4-metilcoumarina	128
II.1.3.1. Tentativa de síntese do brometo de 2-((<i>E</i>)-4-((<i>E</i>)-2-(7-dietilamino-4-metil-2-oxo-2 <i>H</i> -cromen-3-il)vinil)estiril)-1-(6-((2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi)-6-oxo-hexil)-3,3-dimetil-3 <i>H</i> -indol-1-io (50) e do brometo de 4-((<i>E</i>)-4-((<i>E</i>)-2-(7-dietilamino-4-metil-2-oxo-2 <i>H</i> -cromen-3-il)vinil)estiril)-1-(6-((2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi)-6-oxo-hexil)piridín-1-io (53)	129
II.1.3.2. Tentativa de síntese do brometo de 1-(5-carboxipentil)-2-((<i>E</i>)-4-((<i>E</i>)-2-(7-dietilamino-4-((<i>E</i>)-4-(dietilamino)estiril)-2-oxo-2 <i>H</i> -cromen-3-il)vinil)estiril)-3,3-dimetil-3 <i>H</i> -indol-1-io (55).....	131
II.2. Outras pequenas moléculas	132
II.2.1. Derivados da 4-dietilaminobenzaldeído (54)	132
II.2.1.1. Propriedades fotofísicas dos marcadores fluorescentes, brometo de (<i>E</i>)-2-(4-(dietilamino)estiril)-1-(6-((2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi)-6-oxo-hexil)-3,3-dimetil-3 <i>H</i> -indol-1-io (58), brometo de (<i>E</i>)-4-(4-(dietilamino)estiril)-1-(6-((2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi)-6-oxo-hexil)piridín-1-io (60) e brometo de (<i>E</i>)-1-(5-carboxipentil)-4-(4-(dietilamino)estiril)-quinolín-1-io (63).....	134
II.2.1.2. Cálculos DFT e TDDFT para os marcadores fluorescentes 58, 60 e 63	136
II.2.1.3. Análise do potencial dos novos marcadores fluorescentes 58, 60 e 63 , através da técnica FISH	138

II.2.1.3.1. Modelo <i>Saccharomyces cerevisiae</i> com as sondas EUK516-(58), EUK516-(60) e EUK516-(63)	138
II.2.1.3.2. Modelo <i>Bacillus</i> sp. com as sondas EUB338-(58), EUB338-(60) e EUB338-(63)	142
II.2.2. Derivados do 4-difenilaminobenzaldeído (64)	145
II.2.2.1. Propriedades fotofísicas do brometo de (<i>E</i>)-1-(5-carboxipentil)-2-(4-(difenilamino)-estiril)-3,3-dimetil-3 <i>H</i> -indol-1-io (65) e do brometo de (<i>E</i>)-1-(5-carboxipentil)-4-(4-(difenilamino)estiril)piridín-1-io (66)	146
II.2.3. Derivados do ferrocenocarboxaldeído (67)	147
II.2.3.1. Propriedades fotofísicas dos marcadores fluorescentes, brometo de (<i>E</i>)-1-(6-((2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi)-6-oxo-hexil)-4-(2-(ferrocenil)vinil)piridín-1-io (69) e brometo de (<i>E</i>)-1-(6-((2,5-dioxociclopentil)oxi)-6-oxo-hexil)-3,3-dimetil-2-(2-(ferrocenil)vinil)-3 <i>H</i> -indol-1-io (71)	148
II.2.3.2. Análise do potencial dos novos marcadores fluorescentes 69 e 71, através da técnica FISH	149
II.2.3.2.1. Modelo <i>Saccharomyces cerevisiae</i> com as sondas EUK516-(69) e EUK516-(71)	149
II.2.3.2.2. Modelo <i>Bacillus</i> sp. com as sondas EUB338-(69) e EUB338-(71)	151
II.2.4. Compostos com mais do que um cromóforo	152
II.2.4.1. Tentativa de síntese do ácido 6-(metil(2,4,6-triformilfenil)amino)hexanóico (72). 153	
II.2.4.2. Tentativa de síntese do brometo de (<i>E</i>)-1-(5-carboxipentil)-4-(2-(dimetilamino)-5-formilestiril)piridín-1-io (75) e do brometo de (<i>E</i>)-1-(5-carboxipentil)-4-(4-(dimetilamino)-3-formilestiril)piridín-1-io (76)	153
II.2.4.3. Tentativa de síntese do 6-(2,4,6-triformilfenoxi)hexanoato de etilo (78)	155
II.2.4.4. Tentativa de síntese do ácido 6-(2,4-diformilfenoxi)hexanóico (81)	155
II.2.4.5. Tentativa de síntese do brometo (iodeto) de 2,2'-((1 <i>E</i> ,1' <i>E</i>)-(((4-((<i>E</i>)-2-(1-(5-carboxipentil)-3,3-dimetil-3 <i>H</i> -indol-1-io-2-il)vinil)fenil)azanedil)bis(4,1-fenileno))bis(eteno-2,1-diil))-bis(1,3,3-trimetil-3 <i>H</i> -indol-1-io) (85)	156
II.2.4.6. Tentativa de síntese do brometo (iodeto) de (<i>E</i>)-4,4'-(((4-2-(1-(5-carboxipentil)piridín-1-io-4-il)vinil)fenil)azanedil)bis(4,1-fenileno))bis(1-metilpiridín-1-io) (87)	157
III. CONCLUSÕES	159
IV. PARTE EXPERIMENTAL	164
IV.1. Síntese de marcadores fluorescentes	165
IV.1.1. Equipamentos e materiais	165
IV.1.2. Reações de síntese	167
IV.1.2.1. Síntese da 7-dietilamino-4-metil-2 <i>H</i> -cromen-2-tiona (2)	167
IV.1.2.2. Síntese do 2-(7-dietilamino-4-metil-2 <i>H</i> -cromen-2-ilideno)malononitrilo (3)	167

IV.1.2.3. Síntese do (<i>E</i>)-4-(2-(2-(dicianometileno)-7-dietilamino-2 <i>H</i> -cromen-4-il) benzoato de metilo (4)	168
IV.1.2.4. Síntese do (<i>E</i>)-2-(7-dietilamino-4-estiril)-2 <i>H</i> -cromen-2-ilideno)malononitrilo (5).169	
IV.1.2.5. Síntese do (<i>E</i>)-2-(7-dietilamino-4-(4-(dimetilamino)estiril)-2 <i>H</i> -cromen-2-ilideno)malononitrilo (6)	170
IV.1.2.6. Síntese da (<i>E</i>)-2-(7-dietilamino-4-(4-metoxiestiril)-2 <i>H</i> -cromen-2-ilideno)malononitrilo (7)	171
IV.1.2.7. Síntese do 6-(4-formilfenoxi)hexanoato de etilo (8).....	172
IV.1.2.8. Síntese do ácido 6-(4-formilfenoxi)hexanóico (9)	172
IV.1.2.9. Síntese do ácido (<i>E</i>)-2-(4-(2-(2-(dicianometileno)-7-dietilamino-2 <i>H</i> -cromen-4-il)vinil)fenoxi)hexanóico (10).....	173
IV.1.2.10. Síntese do (<i>E</i>)-2-(4-2-2-(dicianometileno)-7-dietilamino-2 <i>H</i> -cromen-4-il)vinil)fenoxi)hexanoato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo (11).....	174
IV.1.2.11. Tentativa de síntese do 3-(2-((4-formilfenil)(metil)amino)etoxi)propanoato de metilo (12)	175
IV.1.2.12. Tentativa de síntese do 3-(2-((4-formilfenil)(metil)amino)etoxi)propanoato de metilo (12)	175
IV.1.2.13. Tentativa de síntese do 3-(2-((4-formilfenil)(metil)amino)etoxi)propanoato de metilo (12)	176
IV.1.2.14. Tentativa de síntese do ácido 3-(2-((4-formilfenil)(metil)amino)etoxi)propanóico (13).....	176
IV.1.2.15. Tentativa de síntese do 3-(2-((4-formilfenil)(metil)amino)etoxi)propanoato de metilo (12)	177
IV.1.2.16. Tentativa de síntese do 3-(2-((4-formilfenil)(metil)amino)etoxi)propanoato de metilo (12)	177
IV.1.2.17. Tentativa de síntese do 3-(2-((4-formilfenil)(metil)amino)etoxi)propanoato de metilo (12)	178
IV.1.2.18. Tentativa de síntese do 3-(2-((4-formilfenil)(metil)amino)etoxi)propanoato de metilo (12)	178
IV.1.2.19. Síntese do 3-(2-((4-formilfenil)(metil)amino)etoxi)propanoato de metilo (12) ...	179
IV.1.2.20. Síntese do ácido 3-(2-((4-formilfenil)(metil)amino)etoxi)propanóico (13)	180
IV.1.2.21. Tentativa de síntese do 3-(2-((4-formilfenil)(metil)amino)etoxi)propanoato de metilo (14)	180
IV.1.2.22. Tentativa de síntese do 3-(2-((4-formilfenil)(metil)amino)etoxi)propanoato de metilo (14)	181
IV.1.2.23. Tentativa de síntese do 3-(2-((4-formilfenil)(metil)amino)etoxi)propanoato de metilo (14)	181
IV.1.2.24. Tentativa de síntese do 3-(2-((4-formilfenil)(metil)amino)etoxi)propanoato de metilo (14)	182

IV.1.2.25. Tentativa de síntese do 3-(2-((4-formilfenil)(metil)amino)etoxi)propanoato de metilo (14).....	182
IV.1.2.26. Síntese do 4-metilbenzenossulfonato de 2-((4-formilfenil)(metil)amino)-etilo (15).....	183
IV.1.2.27. Síntese do 4-(metil(2-(propilamino)etil)amino)benzaldeído (16)	184
IV.1.2.28. Síntese do metanossulfonato de 2-((4-formilfenil)(metil)amino)etilo (17).....	184
IV.1.2.29. Tentativa de síntese do 2-((4-formilfenil)(metil)amino)etilglicina (18)	185
IV.1.2.30. Tentativa de síntese do ácido 2-ciano-4-((4-formilfenil)(metil)amino)butanóico (19).....	186
IV.1.2.31. Tentativa de síntese do 2-ciano-4-((4-formilfenil)(metil)amino)butanoato de metilo (20).....	186
IV.1.2.32. Síntese do cloreto de 2-metoxi-2-oxoetan-1-amínio.....	187
IV.1.2.33. Tentativa de síntese do (2-((4-formilfenil)(metil)amino)etil)glicinato de metilo (21).....	187
IV.1.2.34. Tentativa de síntese do (2-((4-formilfenil)(metil)amino)etil)glicinato de metilo (21).....	188
IV.1.2.35. Síntese do 6-(metil(fenil)amino)hexanoato de etilo (22).....	188
IV.1.2.36. Síntese do 6-((4-formilfenil)(metil)amino)hexanoato de etilo (23).....	189
IV.1.2.37. Síntese do ácido 6-((4-formilfenil)(metil)amino)hexanóico (24).....	189
IV.1.2.38. Síntese do ácido (<i>E</i>)-6-((4-(2-(2-(dicianometileno)-7-dietilamino-2 <i>H</i> -cromen-4-il)-vinil)fenil)(metil)amino)hexanóico (25)	190
IV.1.2.39. Síntese do (<i>E</i>)-6-((4-(2-(2-(dicianometileno)-7-dietilamino-2 <i>H</i> -cromen-4-il)vinil)fenil)(metil)amino)hexanoato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo (26).....	191
IV.1.2.40. Síntese do 2-(bis(4-nitrofenil)metileno)- <i>N,N</i> -dietil-4-metil-2 <i>H</i> -cromen-7-amino (27).....	192
IV.1.2.41. Tentativa de síntese do (<i>E</i>)-2-(7-dietilamino-4-metil-2 <i>H</i> -cromen-2-ilideno)-2-(4-(trifluorometil)fenil)acetonitrilo (28).....	193
IV.1.2.42. Tentativa de síntese do (<i>E</i>)-2-(7-dietilamino-4-metil-2 <i>H</i> -cromen-2-ilideno)-2-(4-(trifluorometil)fenil)acetonitrilo (28).....	193
IV.1.2.43. Tentativa de síntese do (<i>E</i>)-2-(7-dietilamino-4-metil-2 <i>H</i> -cromen-2-ilideno)-2-(4-(trifluorometil)fenil)acetonitrilo (28).....	194
IV.1.2.44. Tentativa de síntese do ácido 2-(7-dietilamino-4-metil-2 <i>H</i> -cromen-2-ilideno)malónico (29)	194
IV.1.2.45. Síntese do nitrato de 1-(7-dietilamino-4-metil-2 <i>H</i> -cromen-2-ilideno)piperidín-1-ilo (30)	195
IV.1.2.46. Síntese do nitrato de (<i>E</i>)-1-(7-dietilamino-4-(4-(metoxicarboxil)estiril)-2 <i>H</i> -cromen-2-ilideno)piperidín-1-ilo (31).....	196
IV.1.2.47. Síntese do nitrato de (<i>E</i>)-1-(7-dietilamino-4-estiril-2 <i>H</i> -cromen-2-ilideno)piperidín-1-ilo (32)	197

IV.1.2.48. Síntese de nitrato de (<i>E</i>)-1-(7-dietilamino-4-(4-(dimetilamino)estiril)-2 <i>H</i> -cromen-2-ilideno)piperidín-1-io (33).....	198
IV.1.2.49. Síntese do nitrato de (<i>E</i>)-1-(7-dietilamino-4-(4-(metoxiestiril)-2 <i>H</i> -cromen-2-ilideno)piperidín-1-io (34)	199
IV.1.2.50. Síntese do nitrato de (<i>E</i>)-1-(4-(4-((5-carboxipentil)oxi)estiril)-7-dietilamino-2 <i>H</i> -cromen-2-ilideno)piperidín-1-io (35).....	200
IV.1.2.51. Síntese do nitrato de (<i>E</i>)-1-(7-dietilamino-4-(4-((6-((2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi)-6-oxo-hexil)oxi)estiril)-2 <i>H</i> -cromen-2-ilideno)piperidín-1-io (36)	201
IV.1.2.52. Síntese do nitrato de (<i>E</i>)-1-(4-(4-((5-carboxipentil)(metil)amino)estiril)-7-dietilamino-2 <i>H</i> -cromen-2-ilideno)piperidín-1-io (37).....	202
IV.1.2.53. Síntese do nitrato de (<i>E</i>)-1-(7-dietilamino-4-(4-((6-((2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi)-6-oxo-hexil)(metil)amino)estiril)-2 <i>H</i> -cromen-2-ilideno)piperidín-1-io (38)	203
IV.1.2.54. Síntese do (<i>E</i>)-2-(7-dietilamino-4-metil-2 <i>H</i> -cromen-2-ilideno)-2-(piridín-4-il)acetonitrilo (39).....	204
IV.1.2.55. Síntese do iodeto de (<i>E</i>)-4-(ciano(7-dietilamino-4-metil-2 <i>H</i> -cromen-2-ilideno)metil)-1-metilpiridín-1-io (40).....	204
IV.1.2.56. Síntese do iodeto de 4-(((<i>E</i>)-4-((<i>E</i>)-4-((5-carboxipentil)oxi)estiril)-7-dietilamino-2 <i>H</i> -cromen-2-ilideno)(ciano)metil)-1-metilpiridín-1-io (41).....	205
IV.1.2.57. Síntese do iodeto de 4-(ciano((<i>E</i>)-7-dietilamino-4-((<i>E</i>)-4-((6-((2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi)-6-oxo-hexil)oxi)estiril)-2 <i>H</i> -cromen-2-ilideno)metil)-1-metilpiridín-1-io (42)	206
IV.1.2.58. Síntese do iodeto de 4-(((<i>E</i>)-4-((<i>E</i>)-4-((5-carboxipentil)(metil)amino)estiril)-7-dietilamino-2 <i>H</i> -cromen-2-ilideno)(ciano)metil)-1-metilpiridín-1-io (43)	207
IV.1.2.59. Síntese do iodeto de 4-(ciano((<i>E</i>)-7-dietilamino-4-((<i>E</i>)-4-((6-((2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi)-6-oxo-hexil)(metil)amino)estiril)-2 <i>H</i> -cromen-2-ilideno)metil)-1-metilpiridín-1-io (44)	209
IV.1.2.60. Síntese do 3-bromo-7-dietilamino-4-metilcoumarina (45).....	210
IV.1.2.61. Síntese da 7-dietilamino-4-metil-3-vinilcoumarina (46).....	211
IV.1.2.62. Síntese do (<i>E</i>)-4-(2-(7-dietilamino-4-metilcoumarina-3-il)vinil)benzaldeído (47).....	212
IV.1.2.63. Síntese do brometo de 1-(5-carboxipentil)-2,3,3-trimetil-3 <i>H</i> -indol-1-io (48)	213
IV.1.2.64. Síntese do brometo de 1-(5-carboxipentil)-2-((<i>E</i>)-4-((<i>E</i>)-2-(7-dietilamino-4-metil-2-oxo-2 <i>H</i> -cromen-3-il)vinil)estiril)-3,3-dimetil-3 <i>H</i> -indol-1-io (49).....	214
IV.1.2.65. Tentativa de síntese do brometo de 2-((<i>E</i>)-4-((<i>E</i>)-2-(7-dietilamino-4-metil-2-oxo-2 <i>H</i> -cromen-3-il)vinil)estiril)-1-(6-((2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi)-6-oxo-hexil)-3,3-dimetil-3 <i>H</i> -indol-1-io (50).....	215
IV.1.2.66. Síntese do brometo de 1-(5-carboxipentil)-4-metilpiridín-1-io (51)	215
IV.1.2.67. Síntese do brometo de 1-(5-carboxipentil)-4-((<i>E</i>)-4-((<i>E</i>)-2-(7-dietilamino-4-metil-2-oxo-2 <i>H</i> -cromen-3-il)vinil)estiril)piridín-1-io (52)	216

IV.1.2.68. Tentativa de síntese do brometo de 4-((<i>E</i>)-4-((<i>E</i>)-2-(7-dietilamino-4-metil-2-oxo-2 <i>H</i> -cromen-3-il)vinil)estiril)-1-(6-((2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi)-6-oxo-hexil)piridín-1-io (53)	217
IV.1.2.69. Tentativa de síntese do brometo de 1-(5-carboxipentil)-2-((<i>E</i>)-4-((<i>E</i>)-2-(7-dietilamino-4-((<i>E</i>)-4-(dietilamino)estiril)-2-oxo-2 <i>H</i> -cromen-3-il)vinil)estiril)-3,3-dimetil-3 <i>H</i> -indol-1-io (55).....	218
IV.1.2.70. Síntese do brometo de (<i>E</i>)-1-(5-carboxipentil)-2-(4-(dietilamino)estiril)-3,3-dimetil-3 <i>H</i> -indol-1-io (57).....	219
IV.1.2.71. Síntese do brometo de (<i>E</i>)-2-(4-(dietilamino)estiril)-1-(6-((2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi)-6-oxo-hexil)-3,3-dimetil-3 <i>H</i> -indol-1-io (58)	220
IV.1.2.72. Síntese do brometo de (<i>E</i>)-1-(5-carboxipentil)-4-(4-(dietilamino)estiril)piridín-1-io (59)	221
IV.1.2.73. Síntese do brometo de (<i>E</i>)-4-(4-(dietilamino)estiril)-1-(6-((2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi)-6-oxo-hexil)piridín-1-io (60).....	222
IV.1.2.74. Síntese do brometo de 1-(5-carboxipentil)-4-metilquinolín-1-io (61)	223
IV.1.2.75. Síntese do brometo de (<i>E</i>)-1-(5-carboxipentil)-4-(4-(dietilamino)estiril)quinolín-1-io (62).....	224
IV.1.2.76. Síntese do brometo de (<i>E</i>)-1-(5-carboxipentil)-4-(4-(dietilamino)estiril)quinolín-1-io (63).....	225
IV.1.2.77. Síntese do brometo de (<i>E</i>)-1-(5-carboxipentil)-2-(4-(difenilamino)estiril)-3,3-dimetil-3 <i>H</i> -indol-1-io (65)	226
IV.1.2.78. Síntese do brometo de (<i>E</i>)-1-(5-carboxipentil)-4-(4-(difenilamino)estiril)piridín-1-io (66).....	227
IV.1.2.79. Síntese do brometo (<i>E</i>)-1-(5-carboxipentil)-4-(2-(ferrocenil)vinil)piridín-1-io (68)	228
IV.1.2.80. Síntese do brometo de (<i>E</i>)-1-(6-((2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi)-6-oxo-hexil)-4-(2-(ferrocenil)vinil)piridín-1-io (69)	229
IV.1.2.81. Síntese do brometo (<i>E</i>)-1-(5-carboxipentil)-3,3-dimetil-2-(2-(ferrocenil)vinil)-3 <i>H</i> -indol-1-io (70).....	230
IV.1.2.82. Síntese do brometo (<i>E</i>)-1-(6-((2,5-dioxociclopentil)oxi)-6-oxo-hexil)-3,3-dimetil-2-(2-(ferrocenil)vinil)-3 <i>H</i> -indol-1-io (71).....	231
IV.1.2.83. Tentativa de síntese do ácido 6-(metil(2,4,6-triformilfenil)amino)hexanóico (72).....	232
IV.1.2.84. Síntese do 4-(dimetilamino)isoftalaldeído (74)	232
IV.1.2.85. Síntese do brometo de (<i>E</i>)-1-(5-carboxipentil)-4-(2-(dimetilamino)-5-formilestiril)piridín-1-io (75) e brometo de (<i>E</i>)-1-(5-carboxipentil)-4-(4-(dimetilamino)-3-formilestiril)piridín-1-io (76)	233
IV.1.2.86. Tentativa de síntese do 6-(2,4,6-triformilfenoxi)hexanoato de etilo (78)	234
IV.1.2.87. Síntese do 6-(2,4-diformilfenoxi)hexanoato de etilo (80).....	235
IV.1.2.88. Tentativa de síntese do ácido 6-(2,4-diformilfenoxi)hexanóico (81).....	235

IV.1.2.89. Tentativa de síntese do ácido 6-(2,4-diformilfenoxi)hexanóico (81).....	236
IV.1.2.90. Síntese do iodeto de (<i>E</i>)-2-(4-(bis(4-formilfenil)amino)estiril)-1,3,3-trimetil-3 <i>H</i> -indol-1-io (83) e do iodeto de 2,2'-((1 <i>E</i> ,1' <i>E</i>)-(((4-formilfenil)-azanediil)bis(4,1-fenileno))bis(etén-2,1-diil))bis(1,3,3-trimetil-3 <i>H</i> -indol-1-io) (84).....	237
IV.1.2.91. Síntese do brometo (iodeto) de 2,2'-((1 <i>E</i> ,1' <i>E</i>)-(((4-(<i>E</i>)-2-(1-(5-carboxipentil)-3,3-dimetil-3 <i>H</i> -indol-1-io-2-il)vinil)fenil)azanediil)bis(4,1-fenileno))bis(etén-2,1-diil))bis(1,3,3-trimetil-3 <i>H</i> -indol-1-io) (85).....	238
IV.1.2.92. Síntese do brometo de (<i>E</i>)-4-(4-(bis(4-formilfenil)amino)estiril)-1-(5-carboxipentil)piridín-1-io (86).....	238
IV.1.2.93. Síntese do brometo (iodeto) de (<i>E</i>)-4,4'-(((4-(2-(1-(5-carboxipentil)piridín-1-io-4-il)-vinil)fenil)azanediil)bis(4,1-fenileno))bis(1-metilpiridín-1-io) (87)	239
IV.2. Cálculos DFT e TDDFT	240
IV.3. Técnica de Hibridação <i>in situ</i> fluorescente (FISH)	240
IV.3.1. Sondas oligonucleotídicas	240
IV.3.2. Cultura dos microrganismos envolvidos na técnica FISH.....	243
IV.3.3. Soluções para a técnica de Hibridação <i>in situ</i> Fluorescente	244
IV.3.4. Marcação dos oligonucleótidos com os marcadores fluorescentes	244
IV.3.5. Hibridação <i>in situ</i> Fluorescente.....	245
IV.3.6. Análise por microscopia de epifluorescência e citometria de fluxo.....	246
IV.3.7. Análise estatística da percentagem de células fluorescentes	247
V. BIBLIOGRAFIA.....	248
VI. ANEXOS.....	277

Índice de Figuras

Figura I.1. Exemplo de biodeterioração do Património Cultural: (A) Rosto de pedra gigante Khmer no templo Bayon de Angkor Thom; (B) Paredes exterior do Mosteiro da Batalha; (C) Balaustrada do telhado do Mosteiro da Batalha	5
Figura I.2. Núcleos fluorogénicos comuns por ordem crescente de valores de absorção. Os grupos R indicam os locais das funcionalizações mais comuns.	8
Figura I.3. Núcleo base da coumarina.	9
Figura I.4. Estrutura coumarínica com um sistema do tipo D- π -A.	14
Figura I.5. Marcadores fluorescentes comerciais.	14
Figura I.6. (A) <i>Lignum nephriticum</i> ; (B) Absorção e cores fluorescentes da infusão do <i>Lignum nephriticum</i> á luz do dia; (C) Solução aquosa ligeiramente alcalina à qual foram adicionados pedaços de <i>Lignum nephriticum</i>	19
Figura I.7. Estrutura química da matlalina.	20
Figura I.8. (A) Cristal de fluorite verde iluminado com luz solar; (B) Cristal de fluorite iluminado com luz UV.	20
Figura I.9. Estruturas da fluoresceína e rodamina, respetivamente.	21
Figura I.10. Módulo espacial Gemini IV após a amaragem (1965).	22
Figura I.11. Diagrama de Jablonski.	23
Figura I.12. Desvio de Stokes.	24
Figura I.13. Modelos moleculares de três sistemas eletrónicos do tipo D- π -A.	26
Figura I.14. Propriedades fotofísicas, químicas e físicas dos fluoróforos.	26
Figura I.15. Espectros de absorção e de emissão da fluoresceína em função do pH. .	28
Figura I.16. Formas iónicas da fluoresceína de acordo com o pH e as suas intensidades de fluorescência relativas.	29
Figura I.17. Efeito do sistema conjugado e da presença de heteroátomos nas propriedades fotofísicas de fluoróforos a pH elevado.	30
Figura I.18. Efeito da rigidez estrutural nas propriedades fotofísicas de fluoróforos a pH elevado.	30
Figura I.19. Marcação química do grupo amino usando: (A) ésteres succinimidílicos; (B) ésteres 4-sulfotetrafluorofenílicos; (C) cloretos de sulfonilo; (D) isotiocianatos.	34

Figura I.20. Técnicas de marcação química do grupo tiol usando: (A) maleimidias e (B) iodoacetamidas.	35
Figura I.21. Imunofluorescência direta (A) e indireta (B)	36
Figura I.22. Modelo de uma sonda fluorescente com um fluoróforo ligado diretamente ao oligonucleótido.....	41
Figura I.23. Etapas básicas da técnica FISH.....	42
Figura I.24. Reagente de Lawesson.....	44
Figura II.1. Espectros de absorção da 7-dietilamino-4-metilcoumarina (1) e dos derivados 4-estiril do 2-(7-dietilamino-4-metil-2 <i>H</i> -cromen-2-ilideno)malononitrilo (3) , em CH ₃ CN.	58
Figura II.2. Transições S ₀ →S ₁ e S ₀ →S ₂ de mais baixa energia, respetivos números de onda e forças de oscilador dos derivados 4-estirilo, 4 a 7	60
Figura II.3. Espectros de absorção da 7-dietilamino-4-metilcoumarina (1) e dos marcadores fluorescentes, (<i>E</i>)-2-(4-2-2-(dicianometileno)-7-(dietilamino)-2 <i>H</i> -cromen-4-il)vinil)fenoxi)hexanoato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo (11) e (<i>E</i>)-6-((4-(2-(2-(dicianometileno)-7-dietilamino-2 <i>H</i> -cromen-4-il)vinil)fenil)(metil)amino)hexanoato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo (26) , em CH ₃ CN.	71
Figura II.4. Espectros experimentais (cinzento) comparados com as excitações calculadas (vermelho e azul) e as orbitais moleculares envolvidas nas duas transições eletrónicas de mais baixa energia dos marcadores fluorescentes 11 e 26 , em CH ₃ CN.	72
Figura II.5. Geometrias moleculares otimizadas, calculadas ao nível PBE0/6-31G (d,p), no estado fundamental e no primeiro estado excitado singuleto dos marcadores fluorescentes 11 e 26 , em CH ₃ CN.....	74
Figura II.6. Resultados de citometria de fluxo (intensidade de fluorescência (FI)/difusão direta (FSC)) referentes aos ensaios de hibridação das células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (SC) com as sondas oligonucleotídicas: (A) EUK516-Cy3, (B) EUB338-Cy3, (C) EUK516-(11), (D) EUB338-(11), (E) EUK516-(26) e (F) EUB338-(26).	76
Figura II.7. Percentagem de células fluorescentes das células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (SC) marcadas com as sondas EUK516 e EUB338 com os diferentes marcadores, 11 , 26 e Cy3®, e o controlo negativo. As letras indicam as diferenças estatisticamente significativas ($p < 0.05$).	77

- Figura II.8.** Microfotografias obtidas através de microscopia de epifluorescência com o filtro TRITC referentes aos ensaios de hibridação das células de *Saccharomyces cerevisiae* com as sondas oligonucleotídicas: **(A)** EUK516-Cy3, **(B)** EUB338-Cy3, **(C)** EUK516-(11), **(D)** EUB338-(11), **(E)** EUK516-(26) e **(F)** EUB338-(26). 78
- Figura II.9.** Resultados de citometria de fluxo (intensidade de fluorescência (FI)/difusão direta (FSC)) referentes aos ensaios de hibridação das células de *Bacillus sp.* (BA) com as sondas oligonucleotídicas: **(A)** EUB338-Cy3, **(B)** EUK516-Cy3, **(C)** EUB338-(11), **(D)** EUK516-(11), **(E)** EUB338-(26) e **(F)** EUK516-(26). 79
- Figura II.10.** Percentagem de células fluorescentes das células de *Bacillus sp.* (BA) marcadas com as sondas EUK516 e EUB338 com os diferentes marcadores, 11, 26 e Cy3®, e o controlo negativo. As letras indicam as diferenças estatisticamente significativas ($p < 0.05$). 80
- Figura II.11.** Microfotografias obtidas através de microscopia de epifluorescência com o filtro TRITC referentes aos ensaios de hibridação das células de *Bacillus sp.* com as sondas oligonucleotídicas: **(A)** EUB338-Cy3, **(B)** EUK516-Cy3, **(C)** EUB338-(11), **(D)** EUK516-(11), **(E)** EUB338-(26) e **(F)** EUK516-(26). 81
- Figura II.12.** Nitrato de 1-(7-dietilamino-4-metil-2*H*-cromen-2-ilideno)piperidín-1-io (30) em CH₃CN, a 365 nm. 84
- Figura II.13.** Espectros de absorção da 7-dietilamino-4-metilcoumarina (1) e dos derivados 4-estiril do nitrato de 1-(7-dietilamino-4-metil-2*H*-cromen-2-ilideno)piperidín-1-io (30), em CH₃CN. 87
- Figura II.14.** Espectros experimentais (preto) comparados com os espectros calculados (azul) e orbitais moleculares envolvidas nas duas transições eletrónicas de mais baixa energia dos derivados 4-estiril do nitrato de 1-(7-dietilamino-4-metil-2*H*-cromen-2-ilideno)piperidín-1-io (30), em CH₃CN. 88
- Figura II.15.** Gráficos de contorno da diferença de densidade eletrónica $\Delta\rho(r)$ nas excitações de energia mais baixa para os derivados 4-estiril do nitrato de 1-(7-dietilamino-4-metil-2*H*-cromen-2-ilideno)piperidín-1-io (30). A cor azul indica um aumento da densidade eletrónica aquando da transição, enquanto a cor rosa representa uma diminuição da densidade eletrónica. 90
- Figura II.16.** Espectros de absorção da 7-dietilamino-4-metilcoumarina (1) e dos marcadores fluorescentes, nitrato de (*E*)-1-(7-dietilamino-4-(4-((6-((2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi)-6-oxo-he-xil)oxi)estiril)-2*H*-cromen-2-ilideno)piperidín-1-io (36) e do nitrato de

(*E*)-1-(7-dietilamino-4-(4-((6-((2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi)-6-oxo-hexil)(metil)amino)etil)-2*H*-cromen-2-ilideno)piperidín-1-*io* (**38**), em CH₃CN..... 96

Figura II.17. Espectros experimentais (cinzento) comparados com as excitações calculadas (vermelho e azul) e as orbitais moleculares envolvidas nas duas transições eletrônicas de mais baixa energia dos marcadores fluorescentes **36** e **38**, em CH₃CN..... 97

Figura II.18. Geometrias moleculares otimizadas, calculadas ao nível PBE0/6-31G (d,p), no estado fundamental e no primeiro estado excitado singuleto dos marcadores fluorescentes **36** e **38**, em CH₃CN..... 99

Figura II.19. Resultados de citometria de fluxo (intensidade de fluorescência (FI)/difusão direta (FSC)) referentes aos ensaios de hibridação das células de *Saccharomyces cerevisiae* (SC) com as sondas oligonucleotídicas: **(A)** EUK516-Cy3, **(B)** EUB338-Cy3, **(C)** EUK516-(**36**), **(D)** EUB338-(**36**), **(E)** EUK516-(**38**) e **(F)** EUB338-(**38**). 101

Figura II.20. Percentagem de células fluorescentes das células de *Saccharomyces cerevisiae* (SC) marcadas com as sondas EUK516 e EUB338 com os diferentes marcadores, **36**, **38** e Cy3®, e o controlo negativo. As letras indicam as diferenças estatisticamente significativas ($p < 0.05$). 102

Figura II.21. Microfotografias obtidas através de microscopia de epifluorescência com o filtro TRITC referentes aos ensaios de hibridação das células de *Saccharomyces cerevisiae* com as sondas oligonucleotídicas: **(A)** EUK516-Cy3, **(B)** EUB338-Cy3, **(C)** EUK516-(**36**), **(D)** EUB338-(**36**), **(E)** EUK516-(**38**) e **(F)** EUB338-(**38**). 103

Figura II.22. Resultados de citometria de fluxo (intensidade de fluorescência (FI)/difusão direta (FSC)) referentes aos ensaios de hibridação das células de *Bacillus sp.* (BA) com as sondas oligonucleotídicas: **(A)** EUB338-Cy3, **(B)** EUK516-Cy3, **(C)** EUB338-(**36**), **(D)** EUK516-(**36**), **(E)** EUB338-(**38**) e **(F)** EUK516-(**38**). 104

Figura II.23. Percentagem de células fluorescentes das células de *Bacillus sp.* (BA) marcadas com as sondas EUK516 e EUB338 com os diferentes marcadores, **36**, **38** e Cy3®, e o controlo negativo. As letras indicam as diferenças estatisticamente significativas ($p < 0.05$). 105

Figura II.24. Microfotografias obtidas através de microscopia de epifluorescência com o filtro TRITC referentes aos ensaios de hibridação das células de *Bacillus sp.* com as sondas oligonucleotídicas: **(A)** EUB338-Cy3, **(B)** EUK516-Cy3, **(C)** EUB338-(**36**), **(D)** EUK516-(**36**), **(E)** EUB338-(**38**) e **(F)** EUK516-(**38**). 106

Figura II.25. Espectros de absorção da 7-dietilamino-4-metilcoumarina (1) e dos marcadores fluorescentes, iodeto de 4-(ciano((<i>E</i>)-7-dietilamino-4-((<i>E</i>)-4-((6-((2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi)-6-oxo-hexil)oxi)estiril)-2 <i>H</i> -cromen-2-ilideno)metil)-1-metilpiridín-1-io (42) e do iodeto de 4-(ciano((<i>E</i>)-7-dietilamino-4-((<i>E</i>)-4-((6-((2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi)-6-oxo-hexil)(metil)amino)-estiril)-2 <i>H</i> -cromen-2-ilideno)metil)-1-metilpiridín-1-io (44), em CH ₃ CN.	111
Figura II.26. Espectros experimentais (cinzento) comparados com as excitações calculadas (vermelho e azul) e as orbitais moleculares envolvidas nas duas transições eletrônicas de mais baixa energia dos marcadores fluorescentes 42 e 44 , em CH ₃ CN.	113
Figura II.27. Geometrias moleculares otimizadas, calculadas ao nível PBE0/6-31G (d,p), no estado fundamental e no primeiro estado excitado singuleto dos marcadores fluorescentes 42 e 44 , em CH ₃ CN.	114
Figura II.28. Resultados de citometria de fluxo (intensidade de fluorescência (FI)/difusão direta (FSC)) referentes aos ensaios de hibridação das células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (SC) com as sondas oligonucleotídicas: (A) EUK516-Cy3, (B) EUB338-Cy3, (C) EUK516-(42), (D) EUB338-(42), (E) EUK516-(44) e (F) EUB338-(44).	116
Figura II.29. Percentagem de células fluorescentes das células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (SC) marcadas com as sondas EUK516 e EUB338 com os diferentes marcadores 42 , 44 e Cy3®, e o controlo negativo. As letras indicam as diferenças estatisticamente significativas ($p < 0.05$).	117
Figura II.30. Microfotografias obtidas através de microscopia de epifluorescência com o filtro TRITC referentes aos ensaios de hibridação das células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> com as sondas oligonucleotídicas: (A) EUK516-Cy3, (B) EUB338-Cy3, (C) EUK516-(42), (D) EUB338-(42), (E) EUK516-(44) e (F) EUB338-(44).	118
Figura II.31. Resultados de citometria de fluxo (intensidade de fluorescência (FI)/difusão direta (FSC)) referentes aos ensaios de hibridação das células de <i>Bacillus sp.</i> (BA) com as sondas oligonucleotídicas: (A) EUB338-Cy3, (B) EUK516-Cy3, (C) EUB338-(42), (D) EUK516-(42), (E) EUB338-(44) e (F) EUK516-(44).	119
Figura II.32. Percentagem de células fluorescentes das células de <i>Bacillus sp.</i> (BA) marcadas com as sondas EUK516 e EUB338 com os diferentes marcadores, 42 , 44 e Cy3®, e o controlo negativo. As letras indicam as diferenças estatisticamente significativas ($p < 0.05$).	120

Figura II.33. Microfotografias obtidas através de microscopia de epifluorescência com o filtro TRITC referentes aos ensaios de hibridação das células de <i>Bacillus sp.</i> com as sondas oligonucleotídicas: (A) EUB338-Cy3, (B) EUK516-Cy3, (C) EUB338-(42), (D) EUK516-(42), (E) EUB338-(44) e (F) EUK516-(44).	121
Figura II.34. Marcadores fluorescentes 11 , 26 , 36 , 38 , 42 e 44 , a 365 nm, em CH ₃ CN.	122
Figura II.35. Espectros de absorção da 7-dietilamino-4-metilcoumarina (1) e dos seis novos marcadores fluorescentes 11 , 26 , 36 , 38 , 42 e 44 , em CH ₃ CN.	124
Figura II.36. Percentagem de células fluorescentes das células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (SC) marcadas com as sondas EUK516 e EUB338 com os diferentes marcadores 11 , 26 , 36 , 38 , 42 , 44 e Cy3®, e o controlo negativo. As letras indicam as diferenças estatisticamente significativas ($p < 0.05$).	126
Figura II.37. Percentagem de células fluorescentes das células de <i>Bacillus sp.</i> (BA) marcadas com as sondas EUK516 e EUB338 com os diferentes marcadores 11 , 26 , 36 , 38 , 42 , 44 e Cy3®, e o controlo negativo. As letras indicam as diferenças estatisticamente significativas ($p < 0.05$).	127
Figura II.38. Espectros de absorção dos marcadores fluorescentes, brometo de (<i>E</i>)-2-(4-(dietilamino)estiril)-1-(6-((2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi)-6-oxo-hexil)-3,3-dimetil-3 <i>H</i> -indol-1-io (58), brometo de (<i>E</i>)-4-(4-(dietilamino)estiril)-1-(6-((2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi)-6-oxo-hexil)piridín-1-io (60) e brometo de (<i>E</i>)-1-(5-carboxipentil)-4-(4-(dietilamino)estiril)quinolín-1-io (63).	135
Figura II.39. Espectros experimentais (vermelho) comparados com os espectros calculados (verde) e energias de transição eletrónica (azul-escuro). Gráficos de contorno das orbitais moleculares envolvidas na excitação de mais baixa energia à direita.	136
Figura II.40. Resultados de citometria de fluxo (intensidade de fluorescência (FI)/difusão direta (FSC)) referentes aos ensaios de hibridação das células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (SC) com as sondas oligonucleotídicas: (A) EUK516-Cy3, (B) EUB338-Cy3, (C) EUK516-(58), (D) EUB338-(58), (E) EUK516-(60), (F) EUB338-(60), (G) EUK516-(63) e (H) EUB338-(63).	139
Figura II.41. Percentagem de células fluorescentes das células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (SC) marcadas com as sondas EUK516 e EUB338 com os diferentes marcadores, 58 , 60 , 63 e Cy3®, e o controlo negativo. As letras indicam as diferenças estatisticamente significativas ($p < 0.05$).	140

- Figura II.42.** Microfotografias obtidas através de microscopia de epifluorescência com o filtro TRITC referentes aos ensaios de hibridação das células de *Saccharomyces cerevisiae* com as sondas oligonucleotídicas: **(A)** EUK516-Cy3, **(B)** EUB338-Cy3, **(C)** EUK516-(58), **(D)** EUB338-(58), **(E)** EUK516-(60), **(F)** EUB338-(60), **(G)** EUK516-(63) e **(H)** EUB338-(63). 141
- Figura II.43.** Resultados de citometria de fluxo (intensidade de fluorescência (FI)/difusão direta (FSC)) referentes aos ensaios de hibridação das células de *Bacillus sp.* (BA) com as sondas oligonucleotídicas: **(A)** EUB338-Cy3, **(B)** EUK516-Cy3, **(C)** EUB338-(58), **(D)** EUK516-(58), **(E)** EUB338-(60), **(F)** EUK516-(60), **(E)** EUB338-(63) e **(F)** EUK516-(63). 142
- Figura II.44.** Percentagem de células fluorescentes das células de *Bacillus sp.* (BA) marcadas com as sondas EUK516 e EUB338 com os diferentes marcadores, **58**, **60**, **63** e Cy3®, e o controlo negativo. As letras indicam as diferenças estatisticamente significativas ($p < 0.05$). 143
- Figura II.45.** Microfotografias obtidas através de microscopia de epifluorescência com o filtro TRITC referentes aos ensaios de hibridação das células de *Bacillus sp.* com as sondas oligonucleotídicas: **(A)** EUB338-Cy3, **(B)** EUK516-Cy3, **(C)** EUB338-(58), **(D)** EUK516-(58), **(E)** EUB338-(60), **(F)** EUK516-(60), **(E)** EUB338-(63) e **(F)** EUK516-(63). 144
- Figura II.46.** Espectros de absorção do ferrocenocarboxaldeído (**67**) e dos marcadores fluorescentes, brometo de (*E*)-1-(6-((2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi)-6-oxo-hexil)-4-(2-(ferrocenil)vinil)piridín-1-io (**69**) e brometo (*E*)-1-(6-((2,5-dioxociclopentil)oxi)-6-oxo-hexil)-3,3-dimetil-2-(2-(ferrocenil)vinil)-3*H*-indol-1-io (**71**). 149
- Figura II.47.** Resultados de citometria de fluxo (intensidade de fluorescência (FI)/difusão direta (FSC)) referentes aos ensaios de hibridação das células de *Saccharomyces cerevisiae* (SC) com as sondas oligonucleotídicas: **(A)** EUK516-Cy3, **(B)** EUB338-Cy3, **(C)** EUK516-(69), **(D)** EUB338-(69), **(E)** EUK516-(71) e **(F)** EUB338-(71). 150
- Figura II.48.** Percentagem de células fluorescentes das células de *Saccharomyces cerevisiae* (SC) marcadas com as sondas EUK516 e EUB338 com os diferentes marcadores, **69**, **71** e Cy3®, e o controlo negativo. As letras indicam as diferenças estatisticamente significativas ($p < 0.05$). 150
- Figura II.49.** Resultados de citometria de fluxo (intensidade de fluorescência (FI)/difusão direta (FSC)) referentes aos ensaios de hibridação das células de *Bacillus sp.* (BA) com as sondas oligonucleotídicas: **(A)** EUB338-Cy3, **(B)** EUK516-Cy3, **(C)** EUB338-(69), **(D)** EUK516-(69), **(E)** EUB338-(71) e **(F)** EUK516-(71). 151

Figura II.50. Percentagem de células fluorescentes das células de <i>Bacillus sp.</i> (BA) marcadas com as sondas EUK516 e EUB338 com os diferentes marcadores, 69 , 71 e Cy3®, e o controlo negativo. As letras indicam as diferenças estatisticamente significativas ($p < 0.05$).....	152
Figura IV.1. Sequências de oligonucleótidos amino-modificados 5'-AC6 comerciais EUK516-mod (5'-ACCAGACTTGCCCTCC-3') e EUB338-mod (5'-GCTGCCTCCCGTAGGAGT-3').....	240
Figura IV.2. Sondas oligonucleotídicas fluorescentes: (A) Sondas oligonucleotídicas complementar ao ARN de células eucarióticas; (B) Sondas oligonucleotídicas complementar ao ARN de células procarióticas.....	242
Figura IV.3. Estrutura da cianina Cy3®.....	243
Figura VI.1. Estruturas otimizadas dos compostos 4 a 7 no estado fundamental S_0 e no estado excitado S_1	278
Figura VI.2. Estruturas otimizadas dos compostos no estado fundamental S_0 e no estado excitado S_1 , dos compostos 31 a 34	284
Figura VI.3. Geometria molecular otimizada para os compostos 58 , 60 e 63 em CH_3CN ao nível m06-2x/6-31G(d,p) (esquerda) onde os átomos de oxigénio, carbono, azoto e hidrogénios estão marcados a vermelho, cinzento, azul e branco, respetivamente. Gráficos de contorno da diferença de densidade eletrónica ($\Delta\rho$) da excitação de mais baixa energia para os diferentes compostos, em que a cor magenta indica um aumento da densidade eletrónica, enquanto a cor verde representa uma diminuição da densidade eletrónica.	289

Índice de Esquemas

Esquema I.1. Esquema reacional da síntese da fluoresceína.....	21
Esquema I.2. Reação geral do reagente de Lawesson com cetonas.	45
Esquema I.3. Mecanismo da reação de Lawesson.	46
Esquema I.4. Mecanismo do oxigénio molecular.	47
Esquema I.5. Reação de condensação aldólica.....	47
Esquema I.6. Mecanismo da condensação aldólica: (1) formação do enolato, (2) formação de ligação C-C, (3) equilíbrio de protões, (4) formação do enolato e (5) eliminação e formação de ligação C=C.	48
Esquema I.7. Esquema geral da reação de Heck.	49
Esquema I.8. Esquema geral da reação de acoplamento cruzado de Suzuki-Miyaura.....	50
Esquema I.9. Esquema racional de vinilação com trifluoroboratos de alquenilo.....	51
Esquema II.1. Derivados 2-metilenocromeno da 7-dietilamino-4-metilcoumarina (1)	55
Esquema II.2. Síntese do 2-(7-dietilamino-4-metil-2 <i>H</i> -cromen-2-ilideno)malononitrilo (3)	55
Esquema II.3. Síntese dos derivados 4-estiril do 2-(7-dietilamino-4-metil-2 <i>H</i> -cromen-2-ilideno)malononitrilo (3)	56
Esquema II.4. Estruturas moleculares para marcadores fluorescentes derivados do 2-(7-dietilamino-4-metil-2 <i>H</i> -cromen-2-ilideno)malononitrilo (3)	62
Esquema II.5. Síntese do marcador fluorescente, (<i>E</i>)-2-(4-2-2-(dicianometileno)-7-(di- etilamino)-2 <i>H</i> -cromen-4-il)vinil)fenoxi)hexanoato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo (11)	63
Esquema II.6. Tentativas de síntese e hidrólise do 3-(2-((4-formilfenil)(metil)amino)- etoxi)propanoato de metilo (12)	65
Esquema II.7. Tentativas de síntese do 3-(2-((4-formilfenil)(metil)amino)etoxi)propano- ato de metilo (14)	66
Esquema II.8. Síntese de 4-formilfenil(metil)amino sulfonatos como reagentes passi- veis de substituições nucleófilas.	67
Esquema II.9. Síntese do ácido 6-((4-formilfenil)(metil)amino)hexanóico (24)	68

Esquema II.10. Síntese do marcador fluorescente, (<i>E</i>)-6-((4-(2-(2-(dicianometileno)-7-dietilamino-2 <i>H</i> -cromen-4-il)vinil)fenil)(metil)amino)hexanoato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo (26).....	69
Esquema II.11. Síntese do 2-(bis(4-nitrofenil)metileno)- <i>N,N</i> -dietil-4-metil-2 <i>H</i> -cromen-7-amino (27) e tentativa de síntese do (<i>E</i>)-2-(7-dietilamino-4-metil-2 <i>H</i> -cromen-2-ilideno)-2-(4-(trifluorometil)fenil)acetonitrilo (28).	82
Esquema II.12. Tentativa de síntese do ácido 2-(7-dietilamino-4-metil-2 <i>H</i> -cromen-2-ilideno)malónico (29).....	83
Esquema II.13. Síntese do nitrato de 1-(7-dietilamino-4-metil-2 <i>H</i> -cromen-2-ilideno)piperidín-1-íio (30).	83
Esquema II.14. Síntese dos derivados 4-estiril do nitrato de 1-(7-dietilamino-4-metil-2 <i>H</i> -cromen-2-ilideno)piperidín-1-íio (30).	85
Esquema II.15. Estruturas moleculares para marcadores fluorescentes derivados do nitrato de 1-(7-dietilamino-4-metil-2 <i>H</i> -cromen-2-ilideno)piperidín-1-íio (30).	92
Esquema II.16. Síntese do marcador fluorescente, nitrato de (<i>E</i>)-1-(7-dietilamino-4-(4-((6-((2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi)-6-oxo-hexil)oxi)estiril)-2 <i>H</i> -cromen-2-ilideno)piperidín-1-íio (36).	93
Esquema II.17. Síntese do marcador fluorescente, nitrato de (<i>E</i>)-1-(7-dietilamino-4-(4-((6-((2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi)-6-oxo-hexil)(metil)amino)estiril)-2 <i>H</i> -cromen-2-ilideno)piperidín-1-íio (38).	94
Esquema II.18. Estruturas moleculares para marcadores fluorescentes derivados do iodeto de (<i>E</i>)-4-(ciano(7-dietilamino-4-metil-2 <i>H</i> -cromen-2-ilideno)metil)-1-metilpiperidín-1-íio (40).	107
Esquema II.19. Síntese do marcador fluorescente, iodeto de 4-(ciano((<i>E</i>)-7-dietilamino-4-((<i>E</i>)-4-((6-((2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi)-6-oxo-hexil)oxi)estiril)-2 <i>H</i> -cromen-2-ilideno)-metil)-1-metilpiperidín-1-íio (42).....	108
Esquema II.20. Síntese do marcador fluorescente, iodeto de 4-(ciano((<i>E</i>)-7-dietilamino-4-((<i>E</i>)-4-((6-((2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi)-6-oxo-hexil)(metil)amino)estiril)-2 <i>H</i> -cromen-2-ilideno)metil)-1-metilpiperidín-1-íio (44).....	109

Esquema II.21. Tentativa de síntese dos marcadores fluorescentes, brometo de 2-((<i>E</i>)-4-((<i>E</i>)-2-(7-dietilamino-4-metil-2-oxo-2 <i>H</i> -cromen-3-il)vinil)estiril)-1-(6-((2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi)-6-oxo-hexil)-3,3-dimetil-3 <i>H</i> -indol-1-io (50) e do brometo de 4-((<i>E</i>)-4-((<i>E</i>)-2-(7-dietilamino-4-metil-2-oxo-2 <i>H</i> -cromen-3-il)vinil)estiril)-1-(6-((2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi)-6-oxo-hexil)piridín-1-io (53).	129
Esquema II.22. Tentativa de síntese do brometo de 1-(5-carboxipentil)-2-((<i>E</i>)-4-((<i>E</i>)-2-(7-dietilamino-4-((<i>E</i>)-4-(dietilamino)estiril)-2-oxo-2 <i>H</i> -cromen-3-il)vinil)estiril)-3,3-dimetil-3 <i>H</i> -indol-1-io (55).	131
Esquema II.23. Síntese dos marcadores fluorescentes, brometo de (<i>E</i>)-2-(4-(dietilamino)estiril)-1-(6-((2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi)-6-oxo-hexil)-3,3-dimetil-3 <i>H</i> -indol-1-io (58), brometo de (<i>E</i>)-4-(4-(dietilamino)estiril)-1-(6-((2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi)-6-oxo-hexil)piridín-1-io (60) e brometo de (<i>E</i>)-1-(5-carboxipentil)-4-(4-(dietilamino)estiril)quinolin-1-io (63).	132
Esquema II.24. Síntese do brometo de (<i>E</i>)-1-(5-carboxipentil)-4-(4-(difenilamino)estiril)piridín-1-io (65) e do brometo de (<i>E</i>)-1-(5-carboxipentil)-2-(4-(difenilamino)estiril)-3,3-dimetil-3 <i>H</i> -indol-1-io (66).	145
Esquema II.25. Síntese dos marcadores fluorescentes, brometo de (<i>E</i>)-1-(6-((2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi)-6-oxo-hexil)-4-(2-(ferrocenil)vinil)piridín-1-io (69) e brometo de (<i>E</i>)-1-(6-((2,5-di-oxociclopentil)oxi)-6-oxo-hexil)-3,3-dimetil-2-(2-(ferrocenil)vinil)-3 <i>H</i> -indol-1-io (71).	147
Esquema II.26. Tentativa de síntese do ácido 6-(metil(2,4,6-triformilfenil)amino)hexanóico (72).	153
Esquema II.27. Tentativa de síntese do brometo de (<i>E</i>)-1-(5-carboxipentil)-4-(2-(dimetilamino)-5-formilestiril)piridín-1-io (75) e do brometo de (<i>E</i>)-1-(5-carboxipentil)-4-(4-(dimetilamino)-3-formilestiril)piridín-1-io (76).	154
Esquema II.28. Tentativa de síntese do 6-(2,4,6-triformilfenoxi)hexanoato de etilo (78).	155
Esquema II.29. Tentativa de síntese do ácido 6-(2,4-diformilfenoxi)hexanóico (81).	156
Esquema II.30. Tentativa de síntese do brometo (iodeto) de 2,2'-((1 <i>E</i> ,1' <i>E</i>)-(((4-((<i>E</i>)-2-(1-(5-carboxipentil)-3,3-dimetil-3 <i>H</i> -indol-1-io-2-il)vinil)fenil)azanedil)bis(4,1-fenileno))bis(etene-2,1-diil))bis(1,3,3-trimetil-3 <i>H</i> -indol-1-io) (85).	157
Esquema II.31. Tentativa de síntese do brometo (iodeto) de (<i>E</i>)-4,4'-(((4-(2-(1-(5-carboxipentil)piridín-1-io-4-il)vinil)fenil)azanedil)bis(4,1-fenileno))bis(1-metilpiridín-1-io) (87).	158

Índice de Tabelas

Tabela I.1. Exemplos de coumarinas utilizadas para atividades farmacológicas.	11
Tabela I.2. Exemplos de coumarinas usadas na marcação de biomoléculas.	15
Tabela II.1. Propriedades fotofísicas dos derivados 4-estiril do 2-(7-dietilamino-4-metil-2 <i>H</i> -cromen-2-ilideno)malononitrilo (3).	57
Tabela II.2. Propriedades fotofísicas dos marcadores fluorescentes, (<i>E</i>)-2-(4-2-2-(dicianometileno)-7-(dietilamino)-2 <i>H</i> -cromen-4-il)vinil)fenoxi)hexanoato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo (11) e (<i>E</i>)-6-((4-(2-(2-(dicianometileno)-7-dietilamino-2 <i>H</i> -cromen-4-il)vinil)fenil)(metil)amino)hexanoato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo (26).	70
Tabela II.3. Propriedades fotofísicas dos derivados 4-estiril do nitrato de 1-(7-dietilamino-4-metil-2 <i>H</i> -cromen-2-ilideno)piperidín-1-ilo (30).	86
Tabela II.4. Propriedades fotofísicas dos marcadores fluorescentes, nitrato de (<i>E</i>)-1-(7-dietilamino-4-(4-((6-((2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi)-6-oxo-hexil)oxi)estiril)-2 <i>H</i> -cromen-2-ilideno)piperidín-1-ilo (36) e do nitrato de (<i>E</i>)-1-(7-dietilamino-4-(4-((6-((2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi)-6-oxo-hexil)(metil)amino)estiril)-2 <i>H</i> -cromen-2-ilideno)piperidín-1-ilo (38).	95
Tabela II.5. Propriedades fotofísicas dos derivados do iodeto de (<i>E</i>)-4-(ciano(7-dietilamino-4-metil-2 <i>H</i> -cromen-2-ilideno)metil)-1-metilpiridín-1-ilo (40).	110
Tabela II.6. Propriedades fotofísicas dos marcadores fluorescentes 11 , 26 , 36 , 38 , 42 e 44	123
Tabela II.7. Propriedades fotofísicas dos derivados do 4-dietilaminobenzaldeído (54).	134
Tabela II.8. Propriedades fotofísicas dos derivados do 4-difenilaminobenzaldeído (63).	146
Tabela II.9. Propriedades fotofísicas dos derivados do ferrocenocarboxaldeído (67).	148

Nota Prévia

Os resultados experimentais discutidos, e correlacionados, nesta dissertação foram previamente publicados, sendo parte integrante desta tese. As referidas publicações no formato de artigos científicos com revisão por pares, foram citados na bibliografia.

[82] **Eustáquio, R.**; Ramalho, J.P.P.; Caldeira, A.T.; Pereira, A. Rational Design of Cost-Effective 4-Styrylcoumarin Fluorescent Derivatives for Biomolecule Labeling. *Molecules*. **2023**, 28, 6822. (DOI:10.3390/molecules28196822).
<https://www.mdpi.com/1420-3049/28/19/6822>

[83] **Eustáquio, R.**; Ramalho, J.P.P.; Caldeira, A.T.; Pereira, A. Development of new 2-piperidinium-4-styrylcoumarin derivatives with large Stokes shifts as potential fluorescent labels for biomolecules. *RSC Advances*. **2022**, 12, 8477-8484. (DOI:10.1039/d2ra00716a).
<https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2022/ra/d2ra00716a>

[84] **Eustáquio, R.**; Ramalho, J.P.P.; Caldeira, A.T.; Pereira, A. New Red-Shifted 4-Styrylcoumarin Derivatives as Potential Fluorescent Labels for Biomolecules. *Molecules*. **2022**, 27, 1461. (DOI:10.3390/molecules27051461).
<https://www.mdpi.com/1420-3049/27/5/1461>

[224] **Eustáquio, R.**; Caldeira, A.T.; Arantes, S.; Candeias, A.; Pereira, A. New 4-styrylcoumarin derivatives as potentials fluorescent labels for biomolecules: application in RNA-FISH probes. *Applied Biochemistry and Microbiology*, **2024**, 60, 1118-1130. (DOI:10.1134/S000368382360286X).
<https://link.springer.com/article/10.1134/S000368382360286X?fromPaywallRec=true>

[226] **Eustáquio, R.**; Ramalho, J.P.P.; Arantes, S.; Candeias, A.; Caldeira, A.T.; Pereira, A. Affordable Small Molecules as Promising Fluorescent Labels for Biomolecules. *Molecules*. **2024**, 29, 5237. (DOI:10.3390/molecules29225237).
<https://www.mdpi.com/1420-3049/29/22/5237>

Prefácio

Com este trabalho pretendeu-se efetuar a síntese de novos fluoróforos, solúveis em água e reativos ao grupo amino, através de uma estratégia sintética simples e de baixo custo, para marcação de biomoléculas no contexto do Património Cultural.

No capítulo I desta dissertação, é descrito o estado da arte das principais áreas que se relacionam com os objetivos desta tese, proporcionando uma melhor compreensão de alguns tópicos abordados posteriormente na interpretação dos resultados obtidos e respetiva discussão. De uma forma concisa, são apresentados alguns dos problemas relacionados com a biodeterioração/biodegradação de bens do Património Cultural, assim como possíveis abordagens para o planeamento de estratégias eficazes para a sua remediação e mitigação. Considerando a síntese de novos fluoróforos para a marcação de biomoléculas presentes nos referidos bens, são igualmente abordados temas relacionados com moléculas pequenas fluorescentes, com a marcação de biomoléculas e respetivos conceitos de fluorescência. Na última parte deste capítulo, são descritas as principais reações envolvidas na síntese dos marcadores fluorescentes de biomoléculas solúveis em água e reativos ao grupo amino.

No capítulo II é efetuada a análise e discussão dos resultados experimentais relacionados com as estratégias sintéticas adotadas para a obtenção dos marcadores fluorescentes. As propriedades fotofísicas dos referidos marcadores serão avaliadas, e também interpretadas à luz dos cálculos da teoria do funcional da densidade (DFT) e da teoria do funcional da densidade dependente do tempo (TDDFT). Neste capítulo é igualmente avaliado e discutido o potencial dos novos marcadores fluorescentes nas sondas oligonucleotídicas através da técnica FISH, em dois modelos biológicos, ou seja, em células de leveduras e bactérias, nomeadamente *Saccharomyces cerevisiae* e *Bacillus sp.*.

No capítulo III, são apresentadas as principais conclusões de todo o trabalho realizado.

O capítulo IV abrange a metodologia experimental, detalhando os equipamentos, materiais e métodos utilizados, as condições reacionais, assim como as características físicas e espectroscópicas dos compostos sintetizados.

No final da dissertação, é apresentada a bibliografia nela referida e os respetivos anexos.

I. INTRODUÇÃO

O Património Cultural, o legado que recebemos do Passado, que sentimos no Presente e que transmitimos às Gerações Futuras, representa a herança cultural de toda uma nação. A sua preservação deve ser considerada uma prioridade, pois contribui para o desenvolvimento sociocultural de toda uma sociedade.^[1]

Os objetos de interesse histórico e cultural, com uma composição material por vezes muito complexa, estão sujeitos ao longo do tempo a processos contínuos de degradação química, física e biológica, devendo os processos inerentes à sua degradação ser minimizados.^[2]

Os microrganismos, como as leveduras, bactérias, algas e fungos, são os principais agentes biológicos responsáveis pelos processos de biodeterioração/biodegradação do Património Cultural.^[3] A interação destes microrganismos com os materiais é fundamental para compreender a biodeterioração a longo prazo, devido à capacidade que estes têm de extrair elementos essenciais para o seu metabolismo, como o cálcio, o ferro, o alumínio, o silício e o potássio através da biossolubilização dos materiais.^[4] O tipo de deterioração causada por esses microrganismos varia desde danos estéticos visíveis, à degradação lenta e não visível, como a corrosão e a degradação enzimática, dependendo do substrato afetado.^[5]

O Património Cultural é também afetado pela falta de manutenção e por processos inadequados de preservação. O desenvolvimento de novas estratégias e metodologias sensíveis de microanálise é crucial para identificar a presença de microrganismos e planear estratégias eficazes de remediação e mitigação.^[6-9]

A utilização de sondas fluorescentes, em análises biológicas, é uma metodologia cada vez mais comum em numerosos protocolos laboratoriais. As técnicas de deteção baseadas no fenómeno da fluorescência têm evoluído significativamente, tanto no que respeita ao desenvolvimento de equipamentos específicos, assim como na síntese de novos fluoróforos.^[10] A técnica FISH destaca-se como uma ferramenta extremamente vantajosa nesse contexto, pois é rápida e não depende da cultura dos microrganismos, e a sua principal vantagem consiste na capacidade de identificar *in situ* células microbianas individuais.^[11-17]

Por outro lado, os materiais à base de proteínas eram amplamente usados em obras de arte como aglutinantes de pinturas, adesivos para dourados ou incluídas em argamassas e bases de pinturas. Identificar esses materiais biológicos, especialmente à base de proteínas, é fundamental para compreender o processo de fabrico, a técnica

utilizada e para fornecer informações essenciais para os procedimentos adequados de restauro e conservação.^[18-21]

A marcação fluorescente direta de proteínas, juntamente com os métodos de imunofluorescência direta ou indireta, possibilita a identificação de proteínas em amostras complexas e de pequenas dimensões. Estas técnicas são, portanto, ferramentas indispensáveis para a análise no campo do Património Cultural.^[22]

Atualmente, os marcadores fluorescentes disponíveis no mercado apresentam valores de aquisição muito elevados, valores estes que para análises de rotina se tornam obviamente proibitivos.^[23]

Neste trabalho, pretendeu-se desenvolver uma estratégia sintética simples, eficiente e de baixo custo, para produzir novos marcadores fluorescentes de biomoléculas, solúveis em água e reativos ao grupo amino. A utilização dos novos marcadores sintetizados para a marcação de biomoléculas permitirá a identificação de microrganismos em micro-amostras de bens do Património Cultural através de múltiplas análises de rotina.

I.1. Património Cultural

O Património Cultural é a herança do nosso passado, que vivenciamos no presente e que transmitimos às gerações futuras, contribuindo para a construção de uma nação mais forte e justa, definindo a nossa própria identidade.^[24-26] Segundo a UNESCO, o Património Cultural pode ser classificado em duas categorias principais: tangível e intangível.^[27] O Património Cultural tangível, abrange edifícios, monumentos, paisagens, livros, têxteis, pinturas ou artefactos arqueológicos, enquanto o Património Cultural intangível abrange folclore, tradições, língua ou artes performativas que são herdados do passado por grupos ou sociedades e conservados para as gerações futuras devido ao seu valor artístico, cultural ou histórico.^[25, 28, 29, 30, 31-35]

Atualmente, o Património Cultural representa uma das indústrias globais mais importantes, proporcionando um benefício económico substancial para os países de acolhimento, as regiões e as comunidades locais. De acordo com os últimos estudos realizados pelo Conselho Mundial de Viagens e Turismo, em 2019, o turismo cultural representou 40% de todo o turismo europeu, gerando 319 milhões de empregos e produzindo mais de 30 mil milhões de euros em receitas todos os anos.^[30, 36]

Em 1972, a Convenção da UNESCO definiu o Património Cultural e Natural como algo a ser identificado, protegido, conservado e valorizado, com o objetivo de o transmitir às gerações futuras. Em 2015, o Conselho da Europa estabeleceu uma estratégia para o Património Cultural Europeu no século XXI, delineada na Declaração de Namur. Esta iniciativa visa delinear as políticas patrimoniais dos países europeus e promover a cooperação entre os diferentes estados.^[29, 37, 38]

A Conservação do Património tem como objetivo principal implementar medidas para retardar os processos naturais de deterioração dos bens tangíveis, a fim de assegurar a continuidade dos seus valores e mensagens culturais para as futuras gerações.^[31] A preservação pode manifestar-se de várias formas, incluindo o restauro, a reabilitação e a reutilização adaptativa, podendo envolver interações físicas, como reparos, manutenção ou reconstrução, bem como medidas não físicas, como a sensibilização e a educação.^[39]

I.1.1. Identificação de microrganismos do Património Cultural

A biodeterioração/biodegradação do Património Cultural é um fenómeno natural que ocorre devido ao crescimento microbiano em superfícies, causando danos estéticos e estruturais aos objetos culturais.^[40-42] A atividade biológica dos organismos, como bactérias, fungos, algas e líquenes, contribui para a degradação dos bens culturais, mas os fatores bióticos e abióticos como variações de temperatura, a presença de água, a poluição, a radiação da luz natural ou artificial e as características do material, como a porosidade, também são aspetos cruciais a considerar.^[4, 40, 43-45]

Dessa forma, os bens culturais estão constantemente sujeitos à degradação química, física e biológica, sendo que os microrganismos desempenham um papel significativo como os agentes biológicos que mais contribuem para essa deterioração, desde a descoloração e manchas até à deterioração estrutural e à completa degradação, levando a uma perda considerável do seu valor histórico e estético (Figura I.1).^[33, 46-48]



Figura I.1. Exemplo de biodeterioração do Património Cultural: **(A)** Rosto de pedra gigante Khmer no templo Bayon de Angkor Thom; **(B)** Paredes exterior do Mosteiro do Batalha; **(C)** Balaustrada do telhado do Mosteiro da Batalha.^[46, 49]

A biodeterioração dos objetos feitos de materiais orgânicos, como papel, madeira, têxteis, couro, pergaminho e outros, é causada por microrganismos heterotróficos. Estes microrganismos têm a capacidade de degradar enzimaticamente as macromoléculas que compõem esses materiais, utilizando-as como fonte de carbono e energia. No que diz respeito aos objetos de origem inorgânica, como esculturas ao ar livre, cerâmicas, pedras, metais e vidros, a deterioração é causada por musgos e microrganismos autotróficos. Esses microrganismos possuem capacidades metabólicas específicas para realizar certas reações. Em alguns casos, podem ocorrer interações

entre diferentes grupos de organismos, das quais resultam processos de biodeterioração mais complexos.^[50, 51]

A ação dos microrganismos nas obras de arte tem desencadeado uma série de estudos para identificar os principais agentes de deterioração biológica.^[52] O estudo dos fenómenos de biodegradação tem ampliado o entendimento dos fatores que causam danos aos bens do Património Cultural, dando-se especial destaque aos agentes biológicos. Bactérias, leveduras, algas e fungos são os principais microrganismos associados à deterioração das obras de arte, cujos crescimento e atividade metabólica estão intimamente correlacionados com o estado de degradação dos seus materiais.^[53]

Portanto, identificar os microrganismos responsáveis pela biodeterioração dos materiais e entender as suas causas específicas desempenha um papel crucial no desenvolvimento de novos métodos sustentáveis de conservação e restauro, bem como na prevenção da biodeterioração.^[5]

Neste contexto, a Hibridação *in situ* Fluorescente é uma técnica que possibilita a identificação, visualização, enumeração e localização simultânea de células microbianas individuais. Além disso, facilita igualmente a deteção de microrganismos cultiváveis, mas também de organismos que ainda não foram cultivados, auxiliando assim na compreensão de comunidades microbianas complexas. A técnica FISH utiliza uma sonda fluorescente que se liga especificamente a sequências complementares de RNA ribossomal dos microrganismos alvo, permitindo a deteção *in situ* de ácidos nucleicos no interior das células.^[54]

I.2. Moléculas pequenas fluorescentes na marcação de biomoléculas

A classe de sondas fluorescentes mais utilizada baseia-se em fluoróforos orgânicos de moléculas pequenas, cuja massa molar é inferior a 1000 g/mol.^[55-57] Estas sondas apresentam numerosas vantagens, tais como a interferência mínima com as funções nativas do alvo e uma grande flexibilidade tanto na conceção molecular como na sua aplicação, sendo que as suas propriedades fotofísicas são geralmente mais estáveis do que outro tipo de sondas. A natureza das moléculas pequenas permite a presença de uma maior quantidade de fluoróforos num espaço mais limitado, ou seja, uma maior densidade de fluorescência, o que contribui em larga escala para aumentar a resolução espacial. Este facto é especialmente relevante em técnicas de microscopia

de alta resolução, onde a precisão e a clareza das imagens são extremamente importantes.^[58, 59]

As moléculas pequenas orgânicas fluorescentes apresentam uma ampla aplicabilidade e são indispensáveis em várias aplicações científicas avançadas, incluindo microscopia de fluorescência, histoquímica, rastreio celular, citometria de fluxo, estudos de ligação de recetores, imunoquímica direta e indireta e Hibridação *in situ* Fluorescente (FISH).^[60-63] Este facto torna-as particularmente apelativas para os químicos orgânicos, dadas as suas numerosas vantagens em relação a outros sistemas de imagiologia, tais como o seu tamanho reduzido, simplicidade na alteração das suas propriedades químicas, facilidade de utilização e a sua obtenção através de estratégias sintéticas simples.^[58, 64-67]

Os pequenos marcadores fluorescentes oferecem também vantagens práticas significativas, permitindo a otimização dos sinais de fluorescência através da ligação de múltiplos fluoróforos a uma única biomolécula.^[66, 68] Neste contexto, a biologia química destaca-se como um campo em rápido crescimento, utilizando técnicas químicas para revelar e controlar processos biológicos naturais com uma notável precisão.^[64, 69-71] Por meio de colaborações interdisciplinares na interseção entre a química e a biologia, surgiram tecnologias inovadoras que possibilitam a investigação de sistemas biológicos e a aplicação da biologia sintética em avanços de múltiplas áreas do conhecimento. Estes avanços dependem frequentemente de metodologias de imagem baseadas em fluorescência, que permitem identificar, observar e analisar os aspetos morfológicos e dinâmicos da biologia a nível molecular através de abordagens multidimensionais.^[70, 71]

Devido à sua rápida resposta e elevada sensibilidade, as sondas fluorescentes apresentam diversas vantagens para a visualização de alterações espaço-temporais em sistemas biológicos e, por isso, tornaram-se ferramentas indispensáveis no campo da biologia molecular e da medicina, demonstrando utilidade diagnóstica e clínica.^[72-78]

Normalmente, uma estrutura elementar do tipo Doador de eletrões - ponte π - Aceitador de eletrões (D- π -A) é a base responsável para conferir fluorescência a moléculas pequenas orgânicas.^[79-81] Os avanços das últimas décadas demonstraram que a disposição e as características dos substituintes numa estrutura do tipo D- π -A promovem a deslocalização do sistema de eletrões π conjugados, produzindo derivados com excelentes propriedades fotofísicas e espectroscópicas. Os efeitos eletrónicos *push-pull* reforçados neste tipo de moléculas, cuja excitação envolve transferência de carga intramolecular (ICT), conduzem a desvios batocrómicos (zona do vermelho) nos seus espectros de absorção e emissão UV/Vis.^[66, 82-84] Os marcadores fluorescentes reativos ao grupo amino são amplamente utilizados em diversas aplicações biológicas

devido à sua afinidade com esses grupos e por isso, à sua fácil incorporação em biomoléculas.^[85, 86]

Atualmente, como já foi referido, os marcadores fluorescentes disponíveis apresentam um custo bastante elevado para uma utilização regular em aplicações de rotina, além de que a maioria destes marcadores apresentam pequenos desvios de Stokes, inferiores a 30 nm, como são os casos da fluoresceína, da rodamina, da oxazina e da cianina.^[83]

Existe uma vasta quantidade de fluoróforos de moléculas pequenas gerados a partir de um conjunto de estruturas com um núcleo principal. Estes núcleos fluorogénicos comuns, amplamente derivatizados para produzir marcadores fluorescentes com propriedades químicas e fotofísicas aprimoradas, e muitos deles disponíveis comercialmente, estão representados na Figura I.2.^[66]

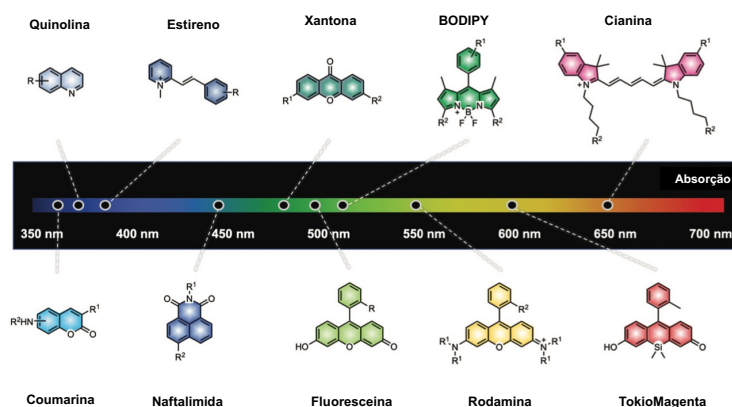


Figura I.2. Núcleos fluorogénicos comuns por ordem crescente de valores de absorção. Os grupos R indicam os locais das funcionalizações mais comuns.^[66]

As coumarinas são facilmente funcionalizáveis, o que permite a introdução de grupos funcionais específicos que permitem ajustar as propriedades de absorção e emissão, otimizando-as para aplicações específicas. Neste contexto, o trabalho incidirá principalmente na derivatização da 7-dietilamino-4-metilcoumarina, uma vez que esta coumarina tem um reduzido custo e apresenta propriedades únicas e muito interessantes do ponto de vista da síntese orgânica.

I.2.1. Coumarinas

As coumarinas pertencem a uma extensa classe de substâncias fenólicas biossintetizadas pelas plantas, que tem sido objeto de estudo há mais de 200 anos, e podem ser encontradas em várias famílias de plantas, nomeadamente, Rutaceae, Umbelliferae, Asteraceae, Fabaceae, Rosaceae, Solanaceae e Moraceae, em óleos essenciais e em microrganismos como bactérias e fungos.^[87, 88] Estes metabolitos secundários assumem funções proeminentes na fisiologia das plantas, na defesa química e nas interações entre plantas e o seu ambiente.^[89, 90] Em 1820, Vogel, isolou a primeira coumarina a partir do feijão de tonka. O seu nome teve origem na palavra francesa *Coumarouna odorata* ou *Dipteryx odorata*, nome vernacular do feijão de *tonka*.

As coumarinas apresentam um anel benzénico ligado a uma α -pirona, ou seja, são benzo- α -pironas (Figura I.3) e podem ser encontrados na natureza na sua forma livre ou combinados com açúcares, na forma de glicósidos.^[81-98]

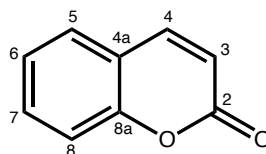


Figura I.3. Núcleo base da coumarina.

As coumarinas naturais podem ser divididas em seis grupos básicos: coumarinas simples, furanocoumarinas, piranocoumarinas (tipo linear e tipo angular), di-hidrofurano-coumarinas, fenilcoumarinas e bicoumarinas.^[93]

Além das inúmeras coumarinas isoladas de origem natural, os seus derivados sintéticos têm aumentado exponencialmente o número de coumarinas atualmente conhecidas.^[96]

Em 1868, foi descrita a primeira síntese química da coumarina por Willian Henry Perkins, o que levou que a mesma passasse a ser utilizada na indústria de perfumes a partir de 1882. Paul Parquet desenvolveu uma fragrância à base de óleo de bergamota e de coumarinas sintéticas, que foi muito utilizada na produção de perfumes e sabonetes. Esta formulação foi considerada um êxito histórico na indústria da perfumaria, pois até essa data nunca tinham sido utilizados aromatizantes sintéticos.^[99]

Entretanto, apenas no século XX começaram a ser publicados estudos sobre o potencial terapêutico dos compostos coumarínicos. Von Werder, foi um desses cientistas que mencionou pela primeira vez o seu potencial terapêutico em 1936.^[100]

As coumarinas presentes em várias espécies de plantas e frequentemente classificadas como corantes fluorescentes clássicos, são facilmente derivatizadas para obter marcadores fluorescentes sintéticos com propriedades óticas facilmente ajustáveis, devido às suas excelentes propriedades fotofísicas, elevada permeabilidade à membrana celular, ausência de toxicidade e principalmente pela excelente relação de custo-benefício.^[82, 101] As coumarinas apresentam ainda outras características muito atrativas do ponto de vista sintético, como as suas estrutura simples, de baixo peso molecular, e a elevada solubilidade na generalidade dos solventes orgânicos. Estas características, combinadas com as suas diversas atividades biológicas, garantem um papel proeminente e de liderança na pesquisa e desenvolvimento de medicamentos.^[95]

Tanto as coumarinas naturais como as sintéticas têm despertado o interesse da comunidade científica ao longo do tempo, levando ao desenvolvimento de diversos estudos sobre as suas propriedades e potenciais aplicações.^[102]

1.2.2. Atividade biológica e aplicações industriais

As coumarinas desde sempre atraíram o interesse da comunidade científica devido à sua ampla gama de atividades farmacológicas e terapêuticas, além das suas aplicações nos setores industrial e agroalimentar.^[103] Estes compostos apresentam uma versatilidade excecional e desempenham um papel fundamental em diversas aplicações.^[96, 104]

As coumarinas, e seus derivados, apresentam diversas atividades biológicas consoante o seu padrão de substituição, que tem um impacto nas suas propriedades físico-químicas e na sua aplicação farmacológica.^[82] Nos últimos anos, houve um crescimento exponencial na investigação de propriedades farmacológicas de derivados de coumarinas, nomeadamente na atividade anti-HIV, antimicrobiana, antitumoral, antioxidante, anti-Alzheimer, anti-inflamatória, antiasmática, anti-hipertensiva, antidiabética, anticoagulante, antiviral, antituberculose, anticonvulsiva e antiproliferativa, com resultados muito promissores.^[95, 105, 106]

Na Tabela I.1 estão representados alguns exemplos de coumarinas usadas com fins farmacológicos.

Tabela I.1. Exemplos de coumarinas utilizadas para atividades farmacológicas.^[96]

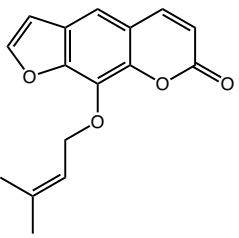
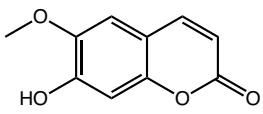
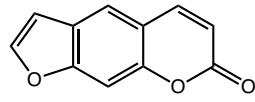
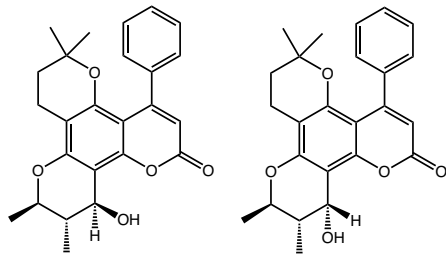
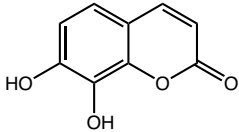
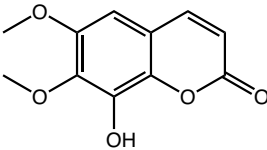
Coumarina	Atividade farmacológica
 <p>9-((3-metilbut-2-en-1-il)oxi)-7<i>H</i>-furo-[3,2-<i>g</i>]cromen-7-one (Imperatorina)</p>	anti-inflamatória
 <p>7-hidroxi-6-metoxicoumarina (Escopoletina)</p>	anti-hipertensiva
 <p>7<i>H</i>-furo[3,2-<i>g</i>]cromen-7-one (Psoraleno)</p>	antifúngica
 <p>(10<i>R</i>,11<i>S</i>,12(<i>S</i> e <i>R</i>))-12-hidroxi-6,6,10,11-tetrametil-4-fenil-7,8,11,12-tetra-hidro-2<i>H</i>,6<i>H</i>,10<i>H</i>-dipirano[2,3-<i>f</i>:2',3'-<i>h</i>]cromen-2-ona (Inófilos B e P)</p>	antiviral

Tabela I.1 (cont.). Exemplos de coumarinas utilizadas para atividades farmacológicas.^[96]

Coumarina	Atividade farmacológica
 <p>7,8-di-hidroxicoumarina (Dafnetina)</p>	anti-Alzheimer
 <p>8-hidroxi-6,7-dimetoxicoumarina (Fraxidina)</p>	anti-hiperglicêmica

As coumarinas também apresentam uma ampla gama de aplicações na indústria, incluindo o uso de aditivos para melhorar e estabilizar fragâncias de cosméticos e produtos de limpeza, para estabilizar o odor e o sabor do tabaco, para melhorar a qualidade de óleos naturais como a lavanda, para camuflar odores em tintas e borrachas, e também como aditivo alimentar. O seu odor doce e aromático, semelhante ao da baunilha despertou interesse na indústria alimentar que passou a utilizar como aromatizantes em diversos tipos de produtos alimentares e bebidas alcoólicas.^[94, 101] As coumarinas são uma classe de compostos que apresentam uma ampla gama de atividades biológicas com excelentes propriedades quelantes, tornando-as candidatas ideais para a síntese de novos complexos com potencial utilidade terapêutica.^[107]

I.2.3. Propriedades fotofísicas das coumarinas

As coumarinas são bastante utilizadas como sondas fluorescentes, devido às suas excelentes propriedades fotofísicas.^[108] Fazem parte da maior classe de corantes fluorescentes, e são amplamente usados como díodos emissores de luz orgânica (OLED), células solares sensibilizadas com corantes (DSSC), branqueadores fluorescentes, branqueadores óticos, cromóforos óticos não-lineares, assim como marcadores e sondas fluorescentes usadas em análises nas áreas do ambiente, medicina, ciências farmacêuticas e biologia celular.^[109-112]

Os avanços dos últimos anos demonstraram que a natureza dos substituintes e o seu padrão de substituição nos anéis coumarínicos afetam pronunciadamente a deslocalização do sistema de elétrons π conjugado.^[83, 113] Do ponto de vista da engenharia molecular, a estrutura da coumarina é um sistema constituído por dois anéis, um grupo fenil fundido com um anel de α -pirona, com seis hidrogénios periféricos, um grupo carbonilo e um grupo vinilo rígido. A ligação dupla apresenta isomeria Z, evitando a isomerização E/Z, que ocorre frequentemente nas ligações duplas de compostos vinílicos, contribuindo assim para a excelente emissão de fluorescência e elevada fotoestabilidade das coumarinas.

É interessante referir que quase todas as coumarinas naturais apresentam um substituinte oxigenado na posição 7, enquanto as coumarinas sintéticas fluorescentes mais relevantes apresentam um substituinte amino ou hidroxilo na mesma posição.^[94]

No sistema dos anéis coumarínicos, a subunidade benzénica apresenta menos reatividade quando comparada com um derivado comum do benzeno, enquanto a ligação dupla, entre C-3 e C-4, é muito reativa.^[94]

Embora todas as posições dos anéis ser funcionalizadas, as posições 6 ou 7 do anel benzénico e as posições 3 ou 4 do grupo vinilo são as mais acessíveis e atraentes do ponto de vista da síntese química, nomeadamente: grupos doadores de elétrons na posição 6 e grupos aceptadores de elétrons na posição 3, influenciam a emissão do fluoróforo; grupos doadores de elétrons na posição 7 e grupos aceptadores de elétrons na posição 2 influenciam a intensidade de fluorescência; substituintes aceptadores de elétrons na posição 4 causam deslocamentos batocrómicos.^[108, 114, 115] De referir que as suas propriedades fotofísicas também podem ser facilmente modificadas pela introdução de outros sistemas aromáticos, dando origem a coumarinas com o sistema π expandido.^[116]

Coumarinas substituídas por grupos doadores de elétrons na posição 7 e por grupos aceptadores de elétrons na posição 3 são conhecidas por apresentarem propriedades fluorescentes únicas.^[108] Este tipo de coumarinas geralmente apresenta desvios de Stokes e rendimentos quânticos de fluorescência elevados, com mínima degradação qualitativa do fluoróforo, resultando numa ampla utilização como sondas e marcadores fluorescentes.^[110, 117]

Estudos recentes demonstraram que a introdução específica do grupo dietil-amino na posição 7 da coumarina como doador de elétrons, promove um superior desvio batocrómico no espectro de absorção, quando comparado com os congéneres grupos alcóxi. Esta substituição melhora substancialmente as propriedades fotofísicas dos respetivos derivados fluorescentes das coumarinas no que concerne ao brilho, fotoestabilidade e rendimento quântico.^[118]

Em 1985, Jones e os seus colaboradores investigaram as propriedades fotofísicas de derivados de coumarinas com diferentes grupos doadores e aceptadores de elétrões. No entanto, a modificação do doador e do aceitador por si só não é suficiente para fazer com que a coumarina consiga emitir a um comprimento de onda superior a 600 nm. Portanto, para desenvolver novas coumarinas fluorescentes são essenciais estruturas moleculares do tipo D- π -A, para permitir que ocorra um processo mais eficiente de transferência de carga intramolecular. Este processo promove propriedades fotofísicas excepcionais nos derivados de coumarinas, com bandas de absorção e emissão a comprimentos de onda mais elevados, nomeadamente emissões na região do vermelho (600-700 nm) e do infravermelho próximo (700-1700 nm) com maior intensidade, ou seja, com um comportamento fluorescente mais promissor (Figura I.4).^[83, 119, 120]

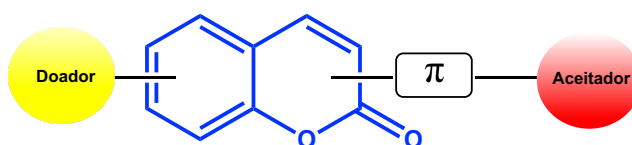


Figura I.4. Estrutura coumarínica com um sistema do tipo D- π -A.

Neste contexto a 7-dietilamino-4-metilcoumarina é uma coumarina de fácil síntese, de baixo custo e que permite diversas modificações estruturais para a inclusão de uma ponte π .^[119]

Os derivados das coumarinas encontram-se atualmente entre os marcadores fluorescentes comerciais mais usados, além das rodaminas e das cianinas. Na Figura I.5 podem observar-se as bandas da emissão de fluorescência de alguns marcadores comerciais.^[121]

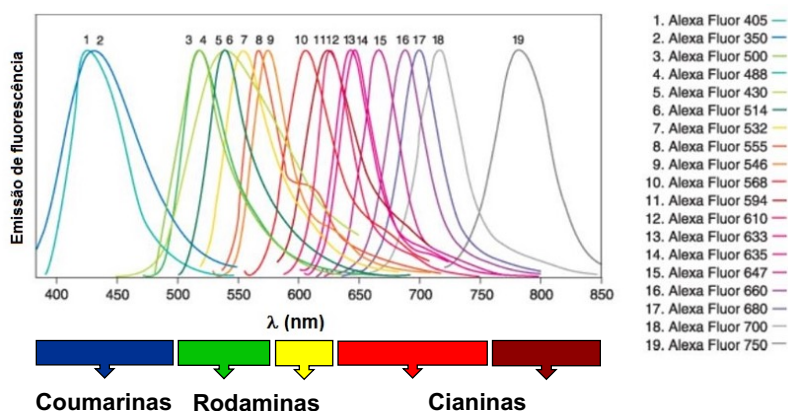


Figura I.5. Marcadores fluorescentes comerciais.

I.2.4. Coumarinas usadas na marcação de biomoléculas

As coumarinas destacam-se como uma das classes mais relevantes de fluoróforos orgânicos. O desenvolvimento contínuo de novos derivados fluorescentes à base de coumarinas tem impulsionado a sua aplicação como marcadores fluorescentes de diversas biomoléculas, incluindo, proteínas, peptídeos, oligonucleótidos, hidratos de carbono e ácidos nucleicos.^[122] Estes marcadores fluorescentes são utilizados em técnicas analíticas muito sensíveis para detetar e rastrear biomoléculas em áreas muito importantes, nomeadamente nas áreas do ambiente, medicina, ciências farmacêuticas e biologia celular.^[123, 124]

Na Tabela I.2 estão representados alguns exemplos de coumarinas usadas na marcação de biomoléculas sob a forma de ésteres succinimidílicos (os mais utilizados para marcação de biomoléculas), ésteres 4-sulfotetrafluorofenílicos, cloretos de sulfonilo, maleimidas, isotiocianatos e grupos carboxílicos. São igualmente apresentados os valores dos comprimentos de onda de excitação/emissão, assim como as suas características físico-químicas e respetivas aplicações biológicas.^[114, 117, 122, 125]

Tabela I.2. Exemplos de coumarinas usadas na marcação de biomoléculas.^[114, 117, 122, 125]

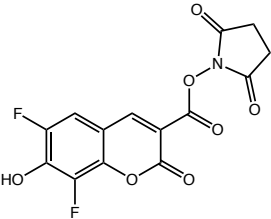
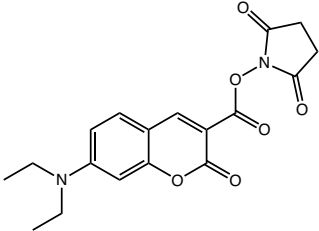
Coumarina	Ex/Em (nm)	Características físico-químicas e aplicações biológicas
 <p>2,5-dioxypirrolidin-1-il 6,8-difluoro-7-hidroxicoumarin-3-carboxilato (Pacific Blue™ SE)</p>	410/455	Bioconjugados muito fluorescentes, mesmo a valores de pH neutro. Adequado para excitação laser de diódo violeta a 405 nm no citómetro Applied Biosystems®.
 <p>2,5-dioxypirrolidin-1-ilo 7-dietilaminocoumarin-3-carboxilato</p>	432/472	Bioconjugados fluorescentes de cor azul forte. Corante fluorescente hidrofóbico, usando para marcar células <i>in vivo</i> .

Tabela I.2 (cont.). Exemplos de coumarinas usadas na marcação de biomoléculas.^[114, 117, 122, 125]

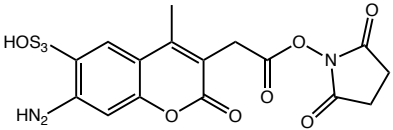
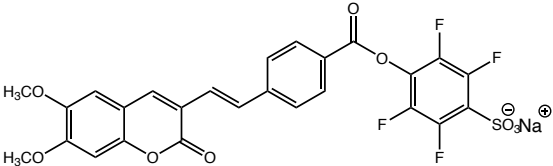
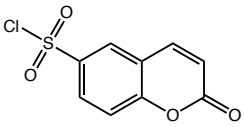
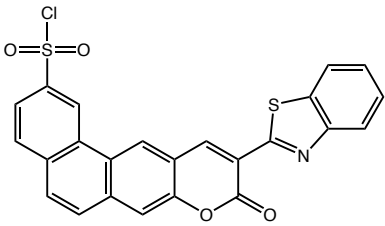
Coumarina	Ex/Em (nm)	Características físico-químicas e aplicações biológicas
 ácido 7-amino-3-(2-((2,5-dioxo- pirrolidin-1-il)-oxi)-2-oxoetil)- 4-metilcoumarin-6-sulfônico (Alexa Fluor™ 350 SE)	346/442	Corante fluorescente azul, insensível ao pH e solúvel em água, utilizado para geração de sinais estáveis de imagiologia e citometria de fluxo.
 (<i>E</i>)-4-((4-(2-(6,7-dimetoxicoumarin-3- -il)vinil)benzoi)-oxi)-2,3,5,6-tetra- fluorobenzenossulfonato de sódio	392/490	Corante fluorescente azul, insensível ao pH e solúvel em água, com excelente fotoestabilidade. Utilizado para marcar proteínas e núcleotídeos com fluorescência de cor azul forte.
 cloreto de coumarina-6-sulfonilo	360/460	Usado para a marcação de aminoácidos, aminas e fenóis. A fluorescência ocorre em solução alcalina ou na presença de β-ciclodextrinas.
 cloreto de 10-(benzo[d]tiazol-2-il)- -3-oxo-3 <i>H</i> -benzo[f]cromeno-9-sulfonilo	405/435	Biossensor sensível a alterações de polaridade em ambientes biológicos.

Tabela I.2 (cont.). Exemplos de coumarinas usadas na marcação de biomoléculas.^[114, 117, 122, 125]

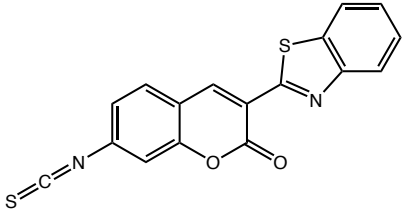
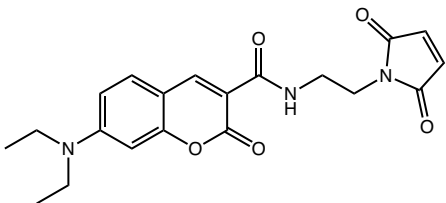
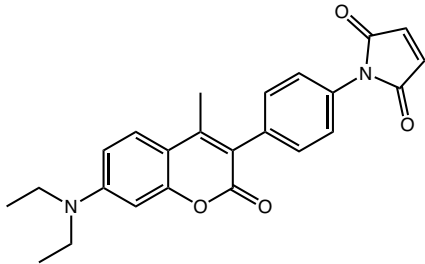
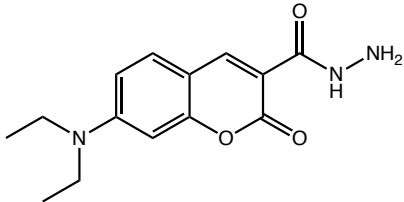
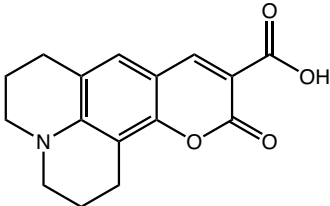
Coumarina	Ex/Em (nm)	Características físico-químicas e aplicações biológicas
 <p>3-(benzo[d]thiazol-2-il)-7-isotiocianatocoumarina</p>	485/535	Bioconjugado utilizado na determinação seletiva do antígeno da gripe.
 <p>7-diethylamino-N-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etil)coumarin-3-carboxamida</p>	419/467	Utilizado como dispositivo de detecção biológica fluorescente e para medições de libertação de fosfatos inorgânicos em reações enzimáticas, em tempo real. Também é usado para experiências de transferência de energia de fluorescência intramolecular (FRET).
 <p>1-(4-(7-(diethylamino)-4-metilcoumarin-3-il)-fenil)-1H-pirrol-2,5-diona</p>	391/472	Utilizado para a marcação do grupos tiol em proteínas de tecidos. Sonda fluorescente para a marcação celular da glutathione.

Tabela I.2 (cont.). Exemplos de coumarinas usadas na marcação de biomoléculas.^[114, 117, 122, 125]

Coumarina	Ex/Em (nm)	Características físico-químicas e aplicações biológicas
 <p>7-diethylamino-coumarin- -3-carbohidrazida</p>	450/468	Marcação de proteínas e lipídios carbonilados.
 <p>ácido 11-oxo-2,3,6,7-tetra-hidro- 1<i>H</i>,5<i>H</i>,11<i>H</i>-pirano[2,3-<i>f</i>]pirido-[3,2,1- <i>ij</i>]quinolina-10-carboxílico (Coumarina 343)</p>	443/461	Marcadores para laser e usados como sensibilizadores orgânicos em células solares (DSSC's).

I.3. Fenómeno da fluorescência

I.3.1. Breve história da fluorescência

O fenómeno da fluorescência foi descrito pela primeira vez em 1565, pelo médico e botânico espanhol Nicolás Monardes ao observar uma cor azul incomum na infusão da madeira de *Pterocarpus indicus*. Esta madeira foi muito usada na Europa nos séculos XVI e XVII, devido às suas propriedades medicinais no tratamento de doenças hepáticas e renais.^[126] Os extratos desta madeira foram posteriormente investigados por Newton e Boyle, entre outros, contudo o fenómeno físico não foi compreendido na altura.^[127]

O composto químico responsável pela intensa fluorescência azul foi igualmente detetado numa infusão de *Lignum nephriticum* (*Eysenhardtia polystachya*) (Figura I.6).^[127, 128]

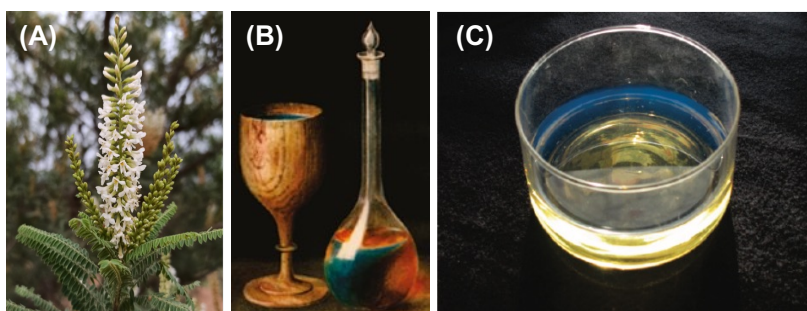


Figura I.6. (A) *Lignum nephriticum*; (B) Absorção e cores fluorescentes da infusão do *Lignum nephriticum* á luz do dia; (C) Solução aquosa ligeiramente alcalina à qual foram adicionados pedaços de *Lignum nephriticum*.^[127]

O composto que causa a referida fluorescência foi identificado como matlalina (Figura I.7), nome que deriva de *Matlali*, uma palavra asteca que significa azul. Este composto não está presente na planta, mas resulta de uma oxidação espontânea de um dos flavonoides extraídos.^[129, 130]

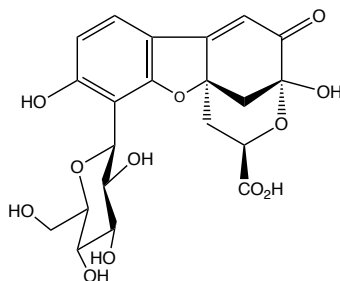


Figura I.7. Estrutura química da matlalina.

Em 1819, Edward D. Clarke, professor de Mineralogia da Universidade de Cambridge, observou uma propriedade peculiar de alguns cristais de fluorite de Weardale, Durham, Inglaterra. Estes cristais finos e perfeitamente transparentes, tinham uma natureza dicróica, ou seja, a luz refletida era azul-safira, enquanto a luz transmitida era de um verde intenso. Naquele momento, Edward Clarke não ofereceu qualquer explicação para as observações que apresentou.^[128] O mineralogista francês René-Just Haüy, em 1822, mencionou o dicroísmo de alguns cristais de fluorite. Enquanto a cor observada na luz transmitida permanecia verde, a cor da luz refletida era violeta (Figura I.8). Haüy, associou o fenômeno à opalescência, embora esta avaliação estivesse incorreta. No entanto, as visões de Clarke e Haüy, que combinam fluorite e opalescência, tiveram um papel relevante na compreensão e denominação do efeito de fluorescência.^[127, 128]

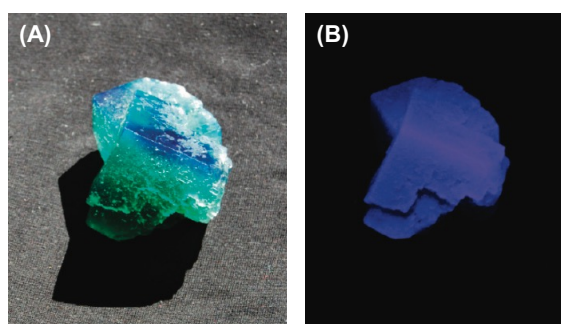


Figura I.8. (A) Cristal de fluorite verde iluminado com luz solar; (B) Cristal de fluorite iluminado com luz UV.^[128]

Em 1845, Sir John Herschel, após minuciosos estudos, testemunhou o fenómeno da fluorescência ao expor uma solução de quinino (sulfato de quinina) à luz solar. Ao observar uma solução transparente e incolor de quinino, Herschel verificou que esta adquiria uma tonalidade azul vívida quando exposta sob a luz solar.^[127, 130] Sir George Gabriel Stokes, em 1852, aprofundou o estudo sobre as soluções de quinino, utilizando um vidro azul de uma janela de uma igreja, como filtro de excitação ultravioleta (< 400 nm), e um copo de vinho amarelo, como filtro de emissão (> 400 nm), o que lhe permitiu observar a luz emitida a 450 nm. O termo fluorescência foi então introduzido por Sir George Gabriel Stokes para explicar o fenómeno observado.^[66, 131, 132]

É interessante destacar que o quinino, como o primeiro fluoróforo conhecido, desempenhou um papel fundamental no estímulo ao desenvolvimento dos primeiros espectrofluorómetros que surgiram na década de 1950. Muitos outros fluoróforos fazem parte do nosso quotidiano, como por exemplo o brilho verde ou rosa do anticongelante, que se deve a quantidades vestigiais de fluoresceína ou rodamina, respetivamente.

A diferença estrutural da rodamina e da fluoresceína baseia-se na substituição dos átomos de oxigénios por átomos de nitrogénio no sistema xanteno (Figura I.9).^[60, 131]

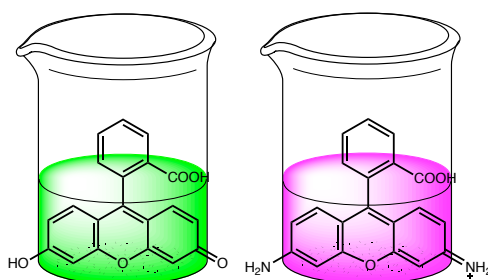
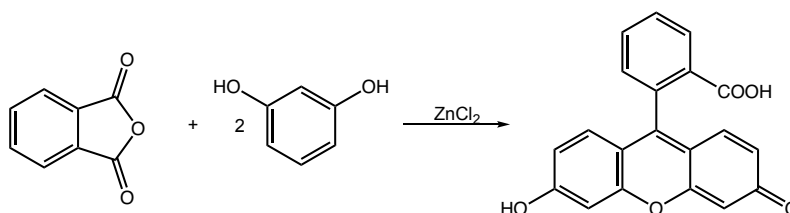


Figura I.9. Estruturas da fluoresceína e rodamina, respetivamente.

A fluoresceína foi o primeiro fluoróforo com aplicação industrial, e foi sintetizado pela primeira vez em 1871 por Adolf Von Baeyer. Este composto foi produzido através de uma acilação de Friedel-Crafts a partir do anidrido ftálico e do resorcinol, na presença de cloreto de zinco (Esquema I.1).^[133]



Esquema I.1. Esquema reacional da síntese da fluoresceína.

A fluoresceína apresenta valores de absortividade molar relativamente elevados, excelentes rendimentos quânticos de fluorescência e relativa solubilidade em água, com absorção máxima na faixa de 480-600 nm e com emissão entre 510-610 nm, o que torna um fluoróforo importante para diferentes aplicações, como a microscopia confocal de varrimento a laser e citometria de fluxo. No entanto, a fluoresceína e os seus derivados apresentam algumas desvantagens como a elevada fotodegradação, a fluorescência sensível ao pH e um espectro de emissão de fluorescência relativamente amplo, limitando a sua eficiência em aplicações multicoloridas.^[10, 134, 135]

A fotodegradação e a sensibilidade da fluoresceína ao pH dificultam a análise quantitativa com este fluoróforo. Especificamente, a fotodegradação limita a sensibilidade, o que é desfavorável em aplicações que requerem uma deteção ultrasensível, como a sequenciação de ADN e a Hibridação *in situ* Fluorescente.^[10] Estas limitações incentivaram o desenvolvimento de derivados da fluoresceína com propriedades de estabilidade aprimoradas.

De referir que fluoresceína foi utilizada como marcador marítimo para a recuperação de cápsulas espaciais pela NASA, durante as suas missões Apollo. Após a amarração do módulo espacial Gemini IV, foi possível observar a utilidade da fluoresceína para a localização da referida cápsula em todo o processo de resgate (Figura I.10). A fluoresceína também foi o primeiro marcador de anticorpos usado na microscopia de imunofluorescência.^[64]



Figura I.10. Módulo espacial Gemini IV após a amarração (1965).

A fluoresceína apresenta duas estruturas características únicas: uma forma de lactona espirocíclica (sistema xanteno) e uma forma de ácido carboxílico. O sistema xanteno promove uma maior deslocalização dos eletrões π , responsável pela fluorescência. A molécula de fluoresceína apresenta diversas potenciais zonas reativas disponíveis para modificações na sua estrutura, por meio de reações simples de síntese orgânica.^[134]

I.3.2. Princípios básicos da fluorescência

A fotoluminescência, a emissão de luz decorrente de estados eletrônicos excitados após a absorção de luz, é importante em muitas áreas científicas e tecnológicas, como a biologia, a química, a medicina, a física, a nanotecnologia e as ciências de materiais. Ao longo do tempo, foram desenvolvidas inúmeras aplicações importantes baseadas na fotoluminescência, incluindo a microscopia de fluorescência, dispositivos como tubos e lâmpadas fluorescentes, iluminadores óticos, telas de plasma, tintas fluorescentes e fosforescentes, marcadores fosforescentes, sinais de segurança e detecção de falsificações (notas bancárias, documentos de segurança, obras de arte, etc.).^[127] A fotoluminescência compreende duas formas principais: a fluorescência e a fosforescência. Ambos os processos envolvem a absorção de fótons, resultando na excitação de elétrons do estado fundamental para o estado excitado.

Em 1933, Jablonski propõe um diagrama de níveis energéticos conhecido até hoje como diagramas de Jablonski (Figura I.11). Esse tipo de diagrama é utilizado como modelo para explicar os processos físicos que ocorrem no fenômeno de fotoluminescência.^[66]

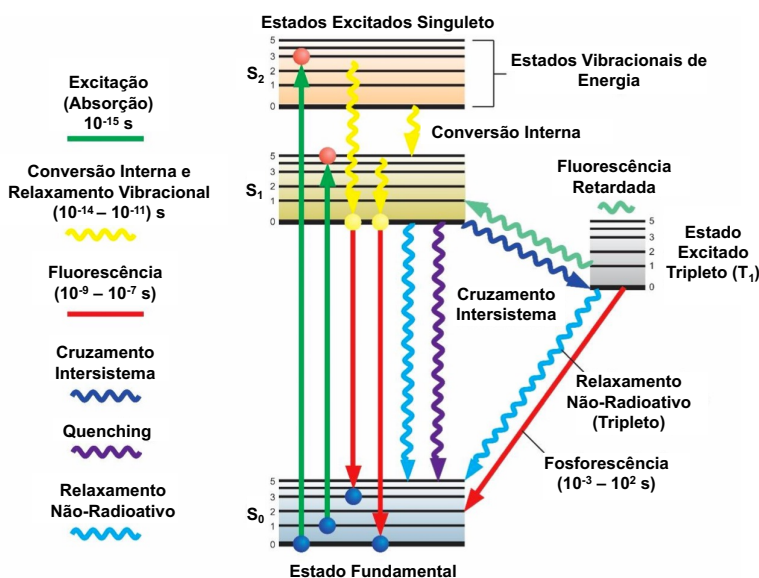


Figura I.11. Diagrama de Jablonski.

Após a absorção de luz no seu comprimento de onda máximo de absorção (λ_{abs}), a molécula atinge inicialmente um estado excitado de singuleto (S₁, S₂, etc.). Normalmente, uma molécula excitada perde energia rapidamente devido à reorganização do solvente em torno do dipolo distorcido do estado excitado e irá relaxar para o primeiro estado excitado singuleto (S₁).^[66, 127]

Do estado S_1 , uma molécula relaxa e volta ao estado fundamental (S_0) e emite um fóton de comprimento de onda λ_{em} num processo conhecido como emissão de fluorescência, sendo que esta diferença entre λ_{abs} e λ_{em} denominada como desvio de Stokes, em sua honra. (Figura I.12).

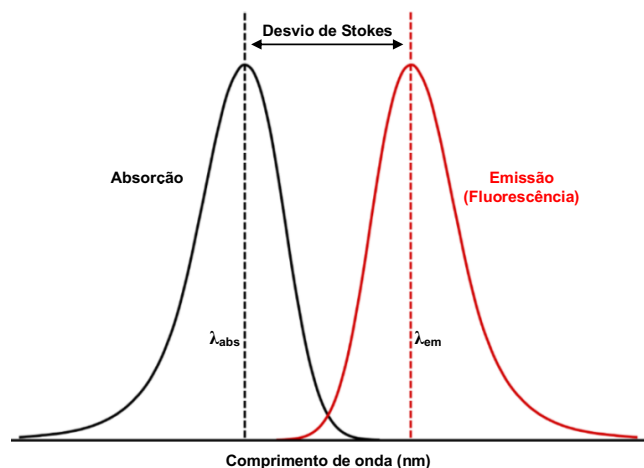


Figura I.12. Desvio de Stokes.

Devido à perda de energia resultante da relaxação para S_1 e da reorganização do solvente, o λ_{em} é geralmente maior que λ_{abs} . No entanto, pode ocorrer $\lambda_{abs} > \lambda_{em}$ durante a excitação multifotônica, em que dois ou mais fótons são absorvidos simultaneamente para obter o estado excitado singuleto. Em alternativa, o cruzamento intersistemas (ISC) ocorre do estado S_1 para o estado T_1 , demonstrada pelas setas de cor azul-escuro na Figura I.11, sendo uma transição não-radiativa entre dois níveis vibracionais com a mesma energia pertencentes a estados eletrônicos de multiplicidade de spin diferentes. Após a travessia do intersistema, a molécula sofre imediatamente uma relaxação vibracional até ao nível vibracional fundamental de T_1 . A emissão de fótons da transição T_1 para o estado S_0 é conhecida como fosforescência. Os processos fosforescentes geralmente têm vidas significativamente mais longas e comprimentos de onda de emissão mais longos do que os fluorescentes. O cruzamento intersistemas pode ser encontrado em fluoróforos que contêm iodo ou bromo, e até mesmo em fluoróforos na presença de espécies paramagnéticas em solução.^[66, 68, 127]

De uma forma simplista a fluorescência, é então um fenómeno fotofísico originado pela rápida libertação da energia fotónica de eletrões excitados através da luz, à medida que estes relaxam do estado excitado para o estado fundamental, e é tipicamente observado em compostos orgânicos com grandes estruturas conjugadas.^[136]

A espectrofluorometria é uma técnica espectroscópica amplamente utilizada em diversas áreas devido à sua elevada sensibilidade e seletividade, resposta rápida e de resultados fáceis de analisar. A sua natureza multiparamétrica, resolução espacial e temporal, capacidade de sensoriamento remoto por fibra ótica, permite detetar vários sinais simultaneamente, rastrear moléculas individuais *in vivo*, entre outros. Devido à sua elevada sensibilidade, a fluorescência pode detetar até uma única molécula fluorescente. Sendo uma técnica não-invasiva, a fluorescência pode ser utilizada com segurança em células vivas, em comparação com as técnicas baseadas na radioatividade.^[66, 137, 138]

I.3.3. Características dos fluoróforos

Os fluoróforos são moléculas orgânicas que absorvem luz a um determinado comprimento de onda e que em seguida o emitem num comprimento de onda mais longo. A absorção da energia a determinados comprimentos de onda, a eficiência da transferência de energia e o intervalo de tempo antes da emissão dependem tanto da estrutura intrínseca do fluoróforo, como das características do seu ambiente químico, uma vez que a molécula quando está no seu estado excitado, interage com as moléculas envolventes.^[139]

Os fluoróforos podem ser classificados em duas categorias principais: intrínsecos e extrínsecos. Os fluoróforos intrínsecos são aqueles que ocorrem naturalmente e incluem NADH, flavinas, aminoácidos aromáticos e a clorofila. Por outro lado, os fluoróforos extrínsecos são adicionados à amostra para proporcionar fluorescência ou modificar as suas propriedades espetrais (exemplo: fluoresceína, rodamina, entre outros).^[140]

Em geral, e como já foi referido, as moléculas com um sistema eletrónico do tipo D- π -A (Figura I.13) apresentam fluorescência, mas esta não é uma condição universal para que tal aconteça.^[66, 118]

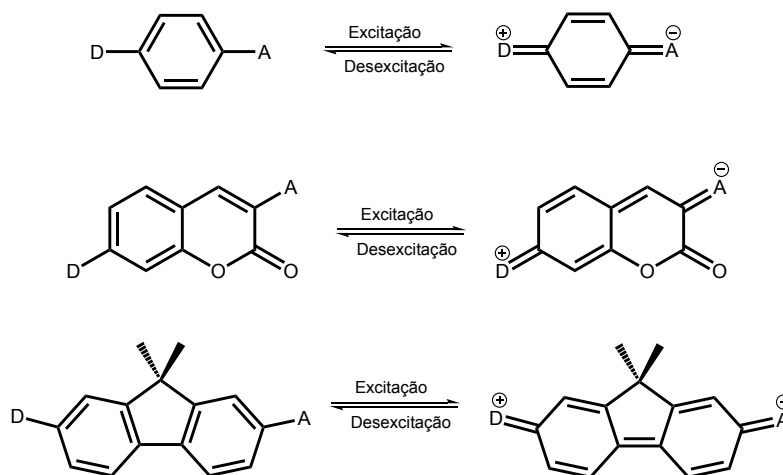


Figura I.13. Modelos moleculares de três sistemas eletrónicos do tipo D- π -A.^[66]

Existem propriedades fotofísicas, químicas e físicas importantes (Figura I.14), que devem ser avaliadas durante o planeamento e a síntese de um marcador fluorescente considerado ideal para uma determinada aplicação.

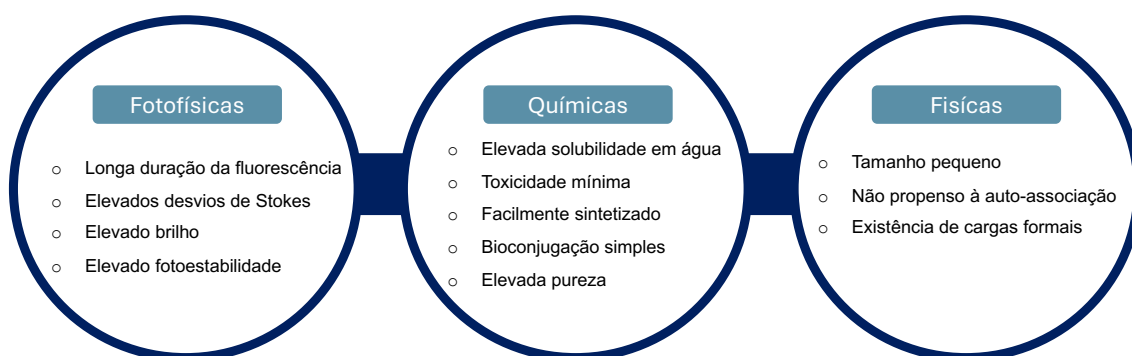


Figura I.14. Propriedades fotofísicas, químicas e físicas dos fluoróforos.

Os marcadores fluorescentes devem ter um tempo de vida de fluorescência no estado excitado tão longo quanto possível (τ_s de várias centenas de ns a alguns μ s) para experiências resolvidas no tempo, embora tempos de vida mais curtos sejam úteis graças aos avanços da instrumentação ótica. Devem igualmente apresentar desvios de Stokes suficientemente elevados (> 80 nm) para evitar a indesejável sobreposição dos espectros de absorção e de emissão.^[141] A referida sobreposição promove o processo de

extinção de fluorescência e diminui a relação sinal-ruído da imagem o que limita a aplicação desses fluoróforos em técnicas de bioimagem complexa, nomeadamente em imagens multicoloridas de excitação única.^[139]

Para além disso, devem ter um brilho elevado (produto do coeficiente de extinção molar pelo rendimento quântico) para maximizar a relação sinal-ruído,^[142] e devem ter uma elevada fotoestabilidade, ou seja, não deve ocorrer degradação na presença de luz.^[141] Os fluoróforos devem ser relativamente simples de sintetizar, reativos aos grupos presentes nas biomoléculas para os quais foram idealizados, e das menores dimensões possíveis de modo a minimizar os obstáculos estereoquímicos e evitar interferências com a função biológica da biomolécula alvo.^[141] Outro fator a considerar é a carga dos fluoróforos, que juntamente com a estrutura e a hidrofiliidade do marcador, pode influenciar as interações marcador-marcador e marcador-biomolécula. Por último, os fluoróforos devem de ter uma baixa tendência para a auto-associação, ou seja, o fenómeno no qual as moléculas do fluoróforo interagem entre si para formar agregados ou complexos. Esta interação pode ocorrer devido a forças como ligações hidrofóbicas, ligações de hidrogénio ou interações electroestáticas. A auto-associação pode afetar as propriedades óticas do fluoróforo, incluindo a sua fluorescência. Por exemplo, a formação de agregados pode levar a mudanças na emissão de luz, na eficiência de transferência de energia ou na extensão da fluorescência.^[141]

Atualmente, tem-se verificado um elevado interesse no desenvolvimento da próxima geração de sondas fluorescentes com tempos de vida de fluorescência mais longos, superiores desvios de Stokes, maior brilho e elevada fotoestabilidade. Os fluoróforos podem ser modificados quimicamente por meio de métodos padrão de síntese orgânica, o que permite o desenvolvimento de sondas com uma ampla gama de propriedades.^[61, 119, 141] Estes desempenham um papel fundamental em diversas aplicações biológicas, ou seja, são utilizados como indicadores para quantificar concentrações moleculares, como sondas para avaliar parâmetros físicos e estruturais e como marcadores para visualizar e localizar biomoléculas em vários bioensaios.^[143]

Os derivados das coumarinas, rodaminas e cianinas fazem parte dos fluoróforos mais utilizados para a marcação de biomoléculas como ácidos nucleicos, peptídeos anticorpos e outras proteínas.^[122]

I.3.4. Fatores que influenciam a fluorescência

As propriedades espectrais de absorção e fluorescência de uma molécula, incluindo comprimentos de onda, intensidades e larguras de banda, são muito dependentes da sua conformação molecular em solução. A forma molecular é influenciada não apenas pela natureza intrínseca da molécula, mas também pelo solvente e pelo pH da solução. O ambiente químico em redor da molécula pode modificar a sua estrutura e gerar interações intermoleculares, afetando assim as suas propriedades espectrais, ou seja, mudanças no pH podem alterar a ionização de grupos funcionais da molécula, afetando a sua estrutura tridimensional e, por conseguinte, as suas características espectrais. Da mesma forma, diferentes solventes podem interagir de uma única forma com a molécula, alterando as bandas de absorção e emissão. Essa dependência da forma molecular em relação ao ambiente envolvente é fundamental para compreender e controlar as propriedades óticas de fluoróforos para as suas diversas aplicações.^[61, 144]

A fluoresceína, por exemplo, é um fluoróforo muito utilizado como sonda biológica devido à sua capacidade de fluorescência e à sua sensibilidade ao pH (Figura I.15).

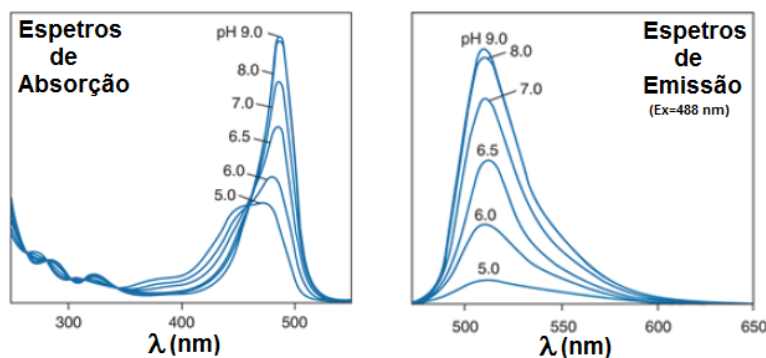


Figura I.15. Espetros de absorção e de emissão da fluoresceína em função do pH.^[61]

Em solução aquosa, a fluoresceína pode existir em várias formas iônicas, ou seja, como catião, monoânion, dianion e forma neutra, dependendo do pH do meio (Figura I.16).

Essas diferentes formas iônicas têm diferentes espectros de absorção e emissão, o que permite a sua aplicação numa variedade de estudos biológicos e bioquímicos, incluindo marcação de células, rastreamento de proteínas e determinação de valores de pH intracelular.^[135, 144]

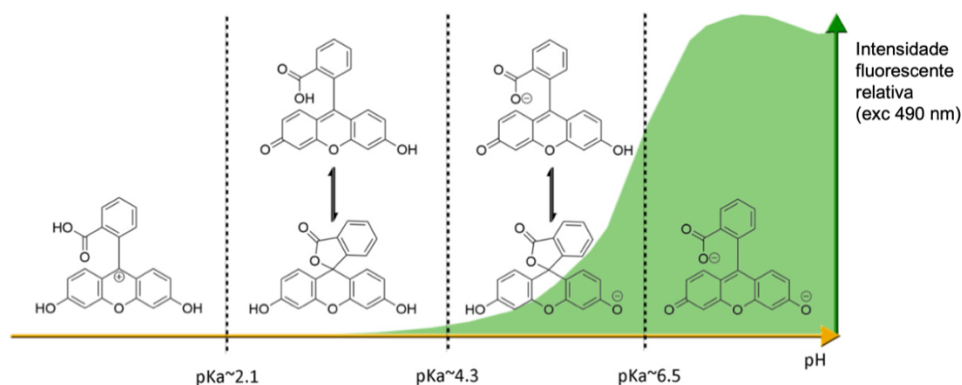


Figura I.16. Formas iônicas da fluoresceína de acordo com o pH e as suas intensidades de fluorescência relativas.^[135]

A estrutura dos fluoróforos também influencia a sua fluorescência, no caso da fluoresceína, esta apresenta um sistema de ligações conjugadas conhecido como sistema xanteno, do qual resulta uma redução de energia entre as orbitais HOMO e LUMO, responsável pelo fenómeno da fluorescência.^[145]

Ao desenvolver novos fluoróforos, é fundamental realizar uma seleção racional dos substituintes e das suas posições de derivatização para proporcionar uma diminuição adicional de energia entre as orbitais HOMO e as LUMO, permitindo bandas de absorção a maiores comprimentos de onda e com maior intensidade.

A presença de heteroátomos nos sistemas conjugados e a aumento desses sistemas provocam alterações evidentes nas propriedades fotofísicas dos fluoróforos (Figura I.17). O aumento do sistema conjugado na molécula de 7-hidroxi-4-metil-coumarina, provoca um significativo aumento nos máximos de absorção e de emissão quando comparada com a sua congénere fluoresceína.

Em relação à presença de heteroátomos, ao comparar a resorufina com a fluoresceína, observa-se que a substituição de um átomo de carbono por um de nitrogênio, promove um considerável aumento dos respectivos máximos de absorção e emissão.

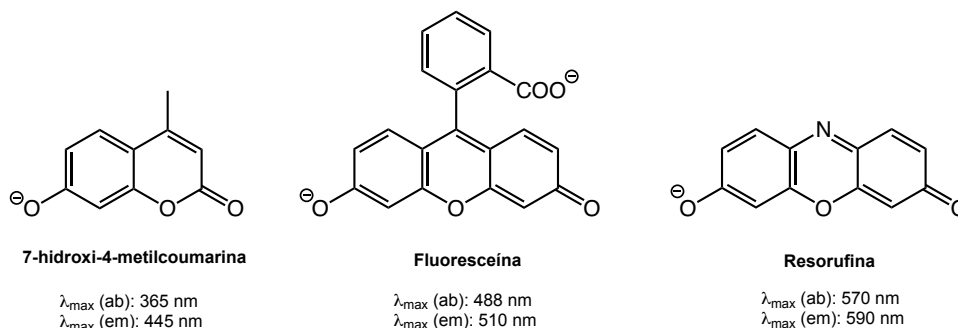


Figura I.17. Efeito do sistema conjugado e da presença de heteroátomos nas propriedades fotofísicas de fluoróforos a pH elevado.

A rigidez estrutural das moléculas é outro aspeto fundamental que afeta a fluorescência, pois o sistema π conjugado rígido de um fluoróforo impede movimentos rotacionais, evitando assim a perda de energia das orbitais LUMO por processos não-radiativos e a consequente diminuição da fluorescência da molécula.^[145] A ausência de rigidez estrutural da fenolftaleína, quando compara com a fluoresceína, impede que esta apresente fluorescência (Figura I.18).

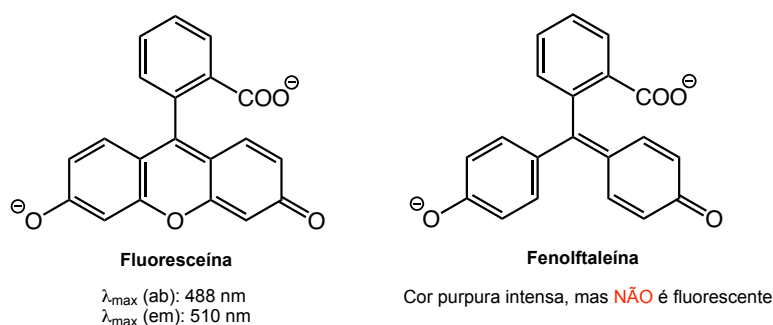


Figura I.18. Efeito da rigidez estrutural nas propriedades fotofísicas de fluoróforos a pH elevado.

As propriedades dos solventes, como a polaridade, a viscosidade e o pH, podem afetar a estrutura molecular do fluoróforo e, consequentemente, as suas propriedades de emissão de luz. A polaridade do solvente provoca alterações nos desvios de Stokes, uma das principais propriedades associadas ao fenómeno da fluorescência. Os solventes polares têm a capacidade de estabilizar cargas elétricas parciais e interagir

com grupos funcionais polares do fluoróforo, o que pode afetar a transição eletrônica responsável pela fluorescência, alterando a energia de excitação. Em geral, solventes polares tendem a causar um deslocamento para o vermelho na emissão de fluorescência, enquanto solventes apolares podem causar um deslocamento para o azul.^[60, 145]

A viscosidade do solvente pode influenciar a taxa de relaxamento vibracional e rotacional do fluoróforo, afetando a emissão de fluorescência, causando um deslocamento para o vermelho.^[146] A acidez ou basicidade do solvente pode afetar a protonação ou desprotonação de grupos funcionais do fluoróforo, alterando assim as suas propriedades de fluorescência. Fluoróforos sensíveis ao pH podem apresentar mudanças significativas na sua fluorescência em diferentes solventes.

A temperatura também altera as propriedades dos fluoróforos, ou seja, o rendimento quântico de fluorescência diminui com o aumento da temperatura, já que a com o aumento da frequência de colisões moleculares, podem aumentar as taxas de desativação não radiante da molécula excitada, reduzindo assim a eficiência da fluorescência. Neste contexto as moléculas do fluoróforo tendem a vibrar com maior amplitude, o que pode resultar em dissipação de energia não radiante, como o calor, em vez de emissão de fluorescência.

A fluorescência de uma molécula diminui quando o solvente contém átomos mais pesados, como o tetrabrometo de carbono e o iodeto de etilo, ou quando há substituição de átomos pesados no fluoróforo, devido ao aumento da taxa de formação de estados excitados tripleto (Diagrama de Jablonski, Figura I.11). Os átomos pesados são geralmente incorporados no solvente para aumentar a fosforescência.^[146]

I.4. Marcação fluorescente de biomoléculas

A detecção de aminoácidos, peptídeos, anticorpos e outro tipo de proteínas, requer técnicas analíticas altamente sensíveis para detetar e localizar este tipo de biomoléculas. Existem diversos métodos disponíveis para essa finalidade, incluindo marcadores isotópicos, marcadores radioativos, biossensores colorimétricos, biomateriais fotossensíveis, sensores eletroquímicos e marcadores fluorescentes.^[86]

Entre os métodos de marcação, a marcação fluorescente apresenta vantagens significativas devido à sua natureza não invasiva, à sua elevada sensibilidade e seletividade, ao seu baixo custo, à sua resolução espacial-temporal e a uma taxa de resposta rápida e de fácil visualização.^[122, 147, 148] Esta também apresenta uma natureza

não destrutiva, permitindo o uso de pequenas quantidades de amostra e dos seus marcadores fluorescentes.^[149, 150]

A maioria das sondas podem ser planeadas para incluir um grupo reativo capaz de se ligar aos grupos funcionais das biomoléculas.^[60]

Os fluoróforos orgânicos têm a capacidade de estabelecer ligações covalentes ou não covalentes com a amostra em análise, resultando em bioconjugados que podem emitir fluorescência numa ampla gama de comprimentos de onda, dependendo do marcador utilizado.^[122]

As proteínas, os ácidos nucleicos e outras moléculas podem ser marcadas com sondas fluorescentes para gerar reagentes altamente sensíveis para numerosos ensaios *in vitro*. Por exemplo, anticorpos marcados com fluorescência podem ser utilizados para marcar células e tecidos para detetar a presença de antígenos específicos e, em seguida, serem detetados através de técnicas de microscopia de fluorescência. Uma vez que cada sonda apresenta o seu carácter de emissão de fluorescência, podem ser utilizadas mais do que uma molécula marcada (cada uma marcada com um fluoróforo diferente) ao mesmo tempo para detetar duas ou mais moléculas alvo.^[60, 151]

A técnica de bioconjugação é fundamentada por duas perspetivas químicas inter-relacionadas, ou seja, a natureza dos grupos funcionais presentes nas biomoléculas alvo a serem marcadas e a funcionalidade reativa presente no marcador fluorescente. O conhecimento dos mecanismos básicos pelos quais os grupos reativos se ligam às diversas funcionalidades alvo é essencial para determinar a estratégia de bioconjugação mais adequada e fornecer os meios para projetá-la de forma inteligente. Portanto, a base para uma marcação bem-sucedida implica selecionar o marcador fluorescente correto para reagir com os grupos químicos presentes nas biomoléculas alvo.^[122]

A seleção de um bom marcador fluorescente e da respetiva estratégia de marcação, envolvem determinados requisitos, como: o marcador fluorescente deve ser de pequena dimensão e quimicamente estável, com uma interferência mínima na estrutura e funções biológicas das biomoléculas alvo; a reação de marcação deve ser eficiente, estabelecendo de preferência uma ligação covalente entre o marcador fluorescente e o resíduo na biomolécula a marcar.^[86]

As reações ideais ocorrem em condições fisiológicas similares às das proteínas, utilizando água como solvente, pH neutro e temperatura ambiente, entre outros. Além disso, a compatibilidade do grupo funcional, a seletividade, os rendimentos reacionais, a baixa concentração de reagentes e a utilização de reagentes não tóxicos são também essenciais. Métodos que cumpram estes requisitos podem ser considerados ideais para análises *in vivo*.^[122]

Os bioconjugados derivados de oligonucleótidos (ácidos nucleicos) com marcadores fluorescentes podem ser utilizados em ensaios de hibridação para detecção e quantificação de sequências de ADN ou ARN em alvos específicos. Os ARNr's (ARN ribossômico) são frequentemente as moléculas-alvo principais, uma vez que são universalmente encontrados em todos os organismos vivos, possuem relativa estabilidade e existem em grande quantidade nas células.

I.4.1. Reações de marcação de biomoléculas

Apesar da existência de diversas técnicas de marcação fluorescente, a marcação química é particularmente importante devido à sua capacidade de viabilizar novos tipos de experiências que incluem fluoróforos com uma variedade mais ampla de funcionalidades.^[86] No contexto da marcação química, uma das vantagens das ligações covalentes entre o fluoróforo e os grupos reativos em biomoléculas é a formação de um produto resultante por meio de um processo irreversível, em comparação com a ligação não covalente.^[122]

Devido à sua natureza e estratégia, os métodos de marcação química são extremamente eficientes, pois permitem a conjugação covalente de uma ampla variedade de fluoróforos à molécula alvo, produzindo bioconjugados muito estáveis e fáceis de manusear. Os métodos de marcação química são mais adequados para estudos *in vitro* do que *in vivo*.^[61, 86]

A marcação fluorescente do grupo amino das biomoléculas é o método mais utilizado para marcar este tipo de moléculas. A referida reação de marcação ocorre através de reações de acilação ou alquilação, e a maioria destas reações ocorre de forma rápida e com elevado rendimento, resultando numa ligação estável com a formação de uma amida ou de uma amina secundária, respetivamente.^[61, 86]

A utilização do éster da *N*-hidroxisuccinimida (éster NHS) como grupo funcional reativo é talvez a química de ativação mais comum para a criação de agentes de acilação ativos, com o intuito de se ligarem aos grupos amino. Nas proteínas o reativo éster NHS conjuga-se principalmente com o grupo amino das cadeias laterais da lisina ou com os grupos amino *N*-terminais de outras biomoléculas numa gama de pH entre 7 e 8.^[86, 152] Alguns dos ésteres succinimidílicos têm um espaçador, amino-hexanóico, de seis átomos entre o fluoróforo e o grupo reativo, proporcionando uma melhor solubilidade e separação espacial entre o fluoróforo e a molécula alvo a marcar. Esta separação reduz potencialmente o efeito do processo de extinção de fluorescência que

normalmente ocorre após a conjugação e torna o marcador mais disponível para reconhecimento por reagentes de detecção secundários.^[122]

Os ésteres NHS podem também reagir com grupos hidroxilos presentes nas biomoléculas, mas a reação não produz um conjugado estável, uma vez que este sofre hidrólise em meio aquoso. A histidina, apesar de ter um grupo amino, não forma uma conjugação estável e, em vez disso, apresenta uma marcação negativa em relação ao grupo amino.

Para além do grupo éster NHS, existem mais três principais classes de reagentes fluorescentes reativos com o grupo amino para marcar biomoléculas, nomeadamente os ésteres 4-sulfotetrafluorofenílicos, os cloretos de sulfonilo e os isotiocianatos (Figura I.19).

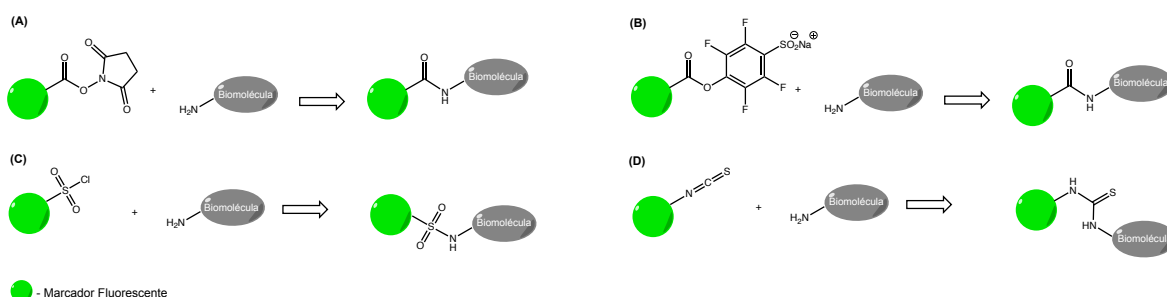


Figura I.19. Marcação química do grupo amino usando: **(A)** ésteres succinimidílicos; **(B)** ésteres 4-sulfotetrafluorofenílicos; **(C)** cloretos de sulfonilo; **(D)** isotiocianatos.

A marcação direta de proteínas é uma técnica que envolve a ligação direta de um marcador fluorescente ou outro tipo de molécula de interesse a uma proteína específica. Esta abordagem permite a marcação de proteínas alvo sem a necessidade de anticorpos ou outras sondas intermediárias. A marcação fluorescente dos grupos amino das proteínas não é específica, uma vez que quase todas as proteínas apresentam múltiplos grupos amino, e muitos deles não são reativos por questões estereoquímicas.^[61, 86] Para investigar determinadas estruturas, interações e funções específicas de proteínas, a cisteína é, em comparação com a lisina, um aminoácido presente em muito menor quantidade do que a lisina e, por esta razão, a reatividade do grupo tiol da cisteína é utilizada para marcar seletivamente proteínas. As reações com o grupo tiol são estáveis em ambientes aquosos, rápidas e com elevados rendimentos, dando origem a ligações estáveis de tioéteres ou dissulfetos.^[86, 141, 153]

As maleimidas, através de uma reação de adição de Michael e as iodoacetamidas, através de uma reação de substituição nucleófila, são os principais grupos reativos para o grupo tiol da cisteína formar uma ligação tioéter estável (Figura

I.20). Apesar do grupo maleimida e iodoacetamida apresentarem muitas semelhanças na sua seletividade e reatividade em relação às moléculas reativas ao grupo tiol, as maleimidas apresentam vantagens devido à sua elevada estabilidade, solubilidade em misturas simples de solventes e à sua elevada reatividade a pH neutro.^[61, 86, 141]

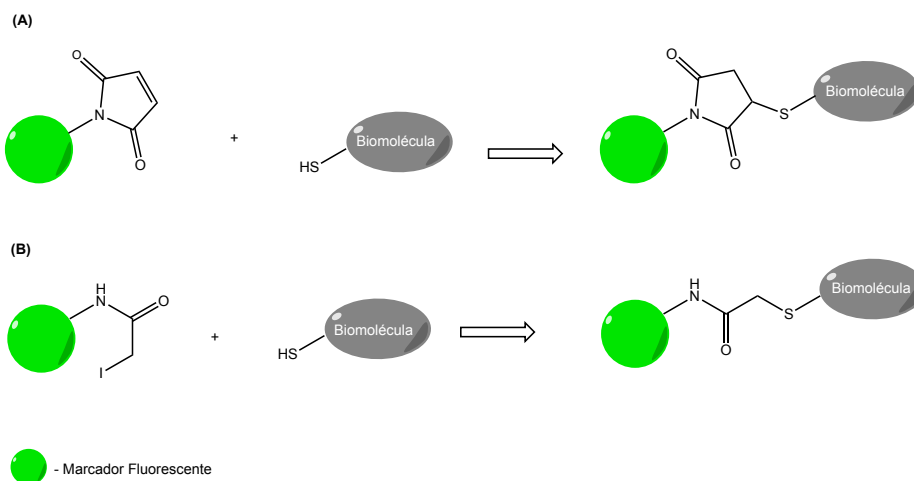


Figura I.20. Técnicas de marcação química do grupo tiol usando: **(A)** maleimidas e **(B)** iodoacetamidas.

A marcação fluorescente efetiva de biomoléculas é um passo fundamental para as técnicas de imunofluorescência direta e indireta e na técnica FISH.^[61, 136]

I.5. Imunofluorescência direta ou indireta

A imunofluorescência é uma técnica que permite a ampla visualização de múltiplos componentes em células ou em tecidos através de combinações de anticorpos específicos marcados com fluoróforos. Esta técnica apresenta uma excelente sensibilidade e permite uma grande amplificação do sinal.^[154]

A imunofluorescência pode ser dividida em direta ou indireta, dependendo se é usado apenas um único anticorpo ou dois anticorpos (primário e secundário) para a marcação de fluoróforos do antígeno de interesse. Na imunofluorescência direta, os anticorpos primários específicos são diretamente marcados com um fluoróforo, permitindo a sua ligação direta ao antígeno (proteína) (Figura I.21 **(A)**). Na imunofluorescência indireta os anticorpos primários não marcados, irão ligar-se ao antígeno (proteína) e posteriormente será ligado a este último um anticorpo secundário marcado que reconhece especificamente o anticorpo (Figura I.21 **(B)**).^[22, 154, 155]

A escolha entre a imunofluorescência direta e indireta depende das características da amostra e da sensibilidade necessária para a detecção da proteína de interesse.

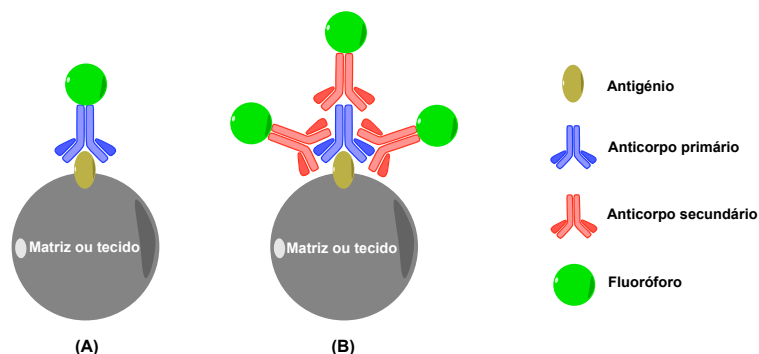


Figura I.21. Imunofluorescência direta (A) e indireta (B).

O método de imunofluorescência direta apresenta a vantagem de a marcação ser efetuada numa única etapa, envolve um procedimento mais simples para a marcação de múltiplos antígenos, bem como o tempo de incubação mais curtos. Além disso, apresenta disponibilidade para anticorpos do mesmo hospedeiro. Por outro lado, não há amplificação do sinal e, conseqüentemente, a intensidade da coloração pode ser baixa se o antígeno de interesse for expresso em baixa abundância. Além disso, as experiências podem ser limitadas, com base na disponibilidade e no custo dos anticorpos conjugados com fluoróforos.^[155]

No método de imunofluorescência indireta, uma vez que múltiplos anticorpos secundários se ligam ao anticorpo primário, esta resulta numa amplificação do sinal, o que é extremamente útil para a detecção de alvos de baixa abundância. Os anticorpos secundários produzidos comercialmente são de qualidade controlada e estão disponíveis numa elevada gama de cores. A imunofluorescência indireta é mais flexível e rentável, uma vez que os anticorpos secundários podem reconhecer todos os anticorpos primários devido à espécie hospedeira. No entanto, esta apresenta sensibilidade à interferência, devido ao uso de anticorpos secundários pode haver risco de reatividade cruzada ou interferência com as proteínas presentes na amostra. Apresenta um potencial *background* elevado, ou seja, a ligação não específica dos anticorpos secundários pode resultar num aumento do ruído de fundo, reduzindo a especificidade da detecção.^[154, 155]

A elevada especificidade e sensibilidade da técnica de imunofluorescência, combinada com a precisão da microscopia, está a tornar-se uma ferramenta cada vez mais utilizada em estudos do Património Cultural.

I.6. Hibridação *in situ* Fluorescente

Na década de 1960, antes do aparecimento da técnica FISH, a imunocitoquímica era metodologia usada na deteção e localização de moléculas intracelulares específicas, baseada na hibridação *in situ* com sondas radio-marcadas e na interação antigénio-anticorpo com imunoglobulinas marcadas com fluoresceína.^[156]

Em 1969, John Cairns utilizou sondas radioativas para detetar sequências de ADN no genoma bacteriano, tendo sido uma das primeiras aplicações da hibridação *in situ*.^[157] Esta técnica envolvia a hibridação de sondas de ADN ou ARN marcadas com radioisótopos tendo como alvos ADN ou ARN em tecidos ou cromossomas fixados. No entanto, a utilização de sondas radioativas suscitou preocupações quanto à segurança dos investigadores e até à precisão da deteção, levando ao desenvolvimento de sondas não radioativas para a técnica FISH.^[158] Em 1980, Bauman *et al.* aplicaram pela primeira vez sondas de ARN marcadas com fluoróforos ligados covalentemente na deteção de sequências específicas de ADN.^[156] Durante os anos seguintes, a técnica FISH sofreu várias modificações e passou a ser utilizada numa ampla gama de estudos cromossómicos.^[159]

Em 1988, Giovannoni *et al.* foi o primeiro a utilizar sondas de oligonucleótidos dirigidas a ARN ribossómico marcadas com isótopos radioativos para a deteção microscópica de bactérias. O desenvolvimento dos marcadores fluorescentes permitiu a substituição progressiva dos indesejáveis marcadores radioativos por marcadores não isotópicos. Em 1989, DeLong utilizou pela primeira vez oligonucleótidos marcados com sondas fluorescentes para a deteção de células microbianas individuais. Em comparação com as sondas radioativas, as sondas fluorescentes são mais seguras, oferecem uma melhor resolução e não necessitam de etapas de deteção adicionais.^{[158,}

159, 160]

A Hibridação *in situ* Fluorescente é uma técnica citogenética que permite a deteção, quantificação e localização de pequenos segmentos de ADN ou ARN a partir de sondas específicas.^[160-163]

A sonda é constituída por sequências de ácidos nucleicos complementares desenvolvidas a partir de segmentos conhecidos do ADN ou ARN que se pretendem

identificar, ligados a um fluoróforo, que por sua vez vai penetrar no núcleo celular onde hibrida especificamente com a sequência alvo complementar de ADN ou ARN permitindo detetar sequências de ácidos nucleicos no interior das células.^[160]

A Hibridação *in situ* Fluorescente com sondas dirigidas para ARN ribossômico (ARNr), é uma técnica que permite a identificação filogenética de microrganismos independente da cultura através de microscopia de varrimento a laser de epifluorescência e confocal ou por citometria de fluxo.^[164] As aplicações da técnica FISH tem como o seu alvo maioritário o ARNr, por ser encontrado em todos os organismos vivos, ser relativamente estável e existir em grande número nas células.^[165, 166]

Uma das principais vantagens da técnica FISH, é que esta permite revelar a localização dos microrganismos alvo em ambientes complexos, como os biofilmes e os seus padrões de co-localização em relação a outros organismos. Além disso, esta técnica possibilita a análise da viabilidade, morfologia e distribuição tridimensional desses microrganismos em matrizes complexas.^[166]

As abordagens baseadas na técnica FISH, referem-se a métodos que utilizam esta técnica para analisar características como a abundância, a distribuição espacial e a fisiologia dos microrganismos, e que possuiriam vantagens adicionais se múltiplos alvos pudessem ser visualizados na mesma experiência. Quantos mais organismos se puderem detetar simultaneamente, menos tempo e material da amostra será necessário para realizar a hibridação *in situ*, adquirir imagens de fluorescência e realizar análises adicionais, como imagens químicas. No entanto, as aplicações normais da técnica FISH permitem a utilização de até três fluoróforos diferentes, cada um marcado uma sonda oligonucleotídica específica. Isto limita a deteção simultânea de apenas três microrganismos alvo filogeneticamente muito afastados.^[166]

Os fluoróforos com diferentes máximos de excitação e de emissão permitem a deteção simultânea de dois ou mais microrganismos, e quando combinados devem ter sinais de emissão nítidos para evitar a sobreposição espectral entre sondas. O marcador mais brilhante e fotoestável deve ser utilizado para alvos de baixa taxa de absorção.^[159]

Na técnica FISH existem diversas situações que podem provocar falsos positivos ou falsos negativos. Os falsos positivos são provocados pela autofluorescência que os microrganismos poderão apresentar e que pode ser confundida com sinais de hibridação ou com a autofluorescência do material envolvente. Para resolver este problema existe a possibilidade da utilização de fluoróforos que emitam fluorescência a um comprimento de onda distinto da autofluorescência ou que apresentem mais energia e sinais de hibridação mais fortes, difíceis de confundir.^[157, 167, 168] Os falsos negativos, estão associados geralmente a: permeabilização insuficiente da parede celular; inacessibilidade das sondas à região-alvo; utilização de condições de hibridação não

otimizadas, de sondas com uma sequência incorreta ou fluoróforos não eficazes; baixo conteúdo celular em ARNr, pois nos meios naturais as células podem encontrar-se num estado de latência ou com um crescimento limitado pela falta de nutrientes, resultando num conteúdo celular reduzido de ribossomas e ARN ribossómico; possibilidade de as sondas apresentarem sinais de fluorescência muito fracos.^[166, 168]

Apesar destas limitações, a técnica FISH tornou-se uma ferramenta extremamente útil, pois é uma técnica rápida e independente de cultura. A sua principal vantagem consiste na identificação específica *in situ* de células microbianas individuais. Atualmente a técnica FISH é muito aplicada em diversas áreas de investigação biológica e médica, incluindo a genética clínica, a neurociência, a medicina reprodutiva, a toxicologia, a genómica celular, a ecologia microbiana, a biologia cromossómica e a biologia evolutiva.^[169, 170]

A evolução do protocolo original da técnica FISH para uma variedade de procedimentos notáveis, desenvolvidos ao longo dos anos, foi motivada pela continua investigação baseada na superior sensibilidade, especificidade e resolução da técnica. A evolução dos procedimentos da técnica FISH, juntamente com os avanços na microscopia de fluorescência e na imagiologia digital, ajudaram a compreender melhor as propriedades químicas e físicas dos ácidos nucleicos e da cromatina.^[169]

Na medicina, a técnica FISH pode ser utilizada para o diagnóstico, avaliação do prognóstico e avaliação da remissão de doenças como o cancro. A técnica FISH pode ser utilizada para detetar células doentes com mais facilidade do que os métodos citogenéticos padrões. O mapeamento FISH de alta resolução e a ordenação das sondas entre si, pode ser efetuado em fibras de cromatina libertadas que são designadas por Fibra-FISH. Esta técnica é especialmente útil para o mapeamento de rearranjos cromossómicos, análise de replicação do ADN e estudo da estrutura e organização do genoma.^[169]

A técnica FISH oferece uma vantagem significativa sobre os métodos tradicionais de biologia molecular ao fornecer informações moleculares dentro do contexto da morfologia celular. Por exemplo, a identificação do ARN nuclear e dos genes correspondentes dentro das células ou até mesmo num único alelo, pode fornecer informações importantes sobre a expressão genética, a produção e o transporte de transcrições em células normais e mutantes. A utilização da técnica FISH para estudar a localização intracelular do ARN tem contribuído para uma compreensão mais profunda das características físicas *in situ* da transcrição do ADN e do transporte da transcrição do ARN. Da mesma forma, a técnica FISH pode ser utilizada para examinar muitas questões biológicas interessantes sobre a organização nuclear. A técnica FISH tridimensional do ADN nuclear pode fornecer informações de alta resolução sobre os

domínios sub-cromossômicos, a posição dos genes e a relação entre os genes e as suas transcrições em diferentes células e durante diferentes fases do ciclo celular. A análise exata da FISH tridimensional é altamente dependente da excelente qualidade da microscopia confocal e dos procedimentos de análise de imagem.^[169]

A técnica FISH é regularmente utilizada em estudos histopatológicos, sendo amplamente reconhecida como método de referência em citologia e genómica para a detecção de anomalias genéticas que resultam em doenças como o cancro do pulmão, o cancro da mama, os carcinomas uroteliais e numerosas formas de leucemia.^[170-172] A citogenética do cancro tem beneficiado muito com a tecnologia FISH, uma vez que é rápida e pode ser realizada em tecidos, preparações tácteis ou culturas celulares. Uma vez que é normalmente difícil obter alguma disseminação cromossómica de células tumorais, a utilização da FISH interfásica diretamente em amostras tumorais (biópsias) permite a determinação de anomalias cromossómicas sem a necessidade de preparações cromossómicas interfásicas.^[169, 170]

O desenvolvimento dos marcadores fluorescentes e da imagiologia tornou a técnica FISH ainda mais poderosa, em que a utilização simultânea de várias sondas fornece informações adicionais importantes que podem ser obtidas para uma única amostra utilizando técnicas FISH multicoloridas.^[169, 173] No contexto do Património Cultural, muitos dos materiais usados contêm matrizes complexas de microrganismos, por vezes em quantidades muito pequenas, mas com elevada importância de serem detetados e identificados. A detecção precoce de microrganismos biodeteriogénicos, facultada pela técnica FISH, pode orientar estratégias eficazes de mitigação e preservação.

1.6.1. Características das sondas usadas na técnica de Hibridação *in situ* Fluorescente

De um modo geral, uma sonda fluorescente útil, e efetiva, é aquela que se associa especificamente à estrutura de interesse, fornece um sinal intenso, é fotoestável e não apresenta toxicidade.^[159, 174]

As sondas são sequências de ácidos nucleicos compostas por ADN ou ARN, que podem ser de cadeia simples ou dupla e apresentar comprimentos que variam de 20 a mais de 1.500 bases. Independentemente do tipo de sonda utilizada, é essencial que a sequência das sondas seja complementar à sequência alvo, de modo a assegurar uma correta hibridação. Existem duas abordagens comuns para marcar as sondas na técnica FISH. Na primeira o fluoróforo é diretamente ligado à sonda (marcação direta),

permitindo que as sondas marcadas se liguem especificamente às sequências alvo de ADN ou ARN na amostra e poderem ser detetáveis por microscopia de fluorescência. Na segunda os fluoróforos podem ser ligados covalentemente a um anticorpo que se liga a um antígeno incorporado na sonda (marcação indireta).^[160, 161]

A marcação fluorescente direta é a mais utilizada, por ser mais rápida, mais económica e mais simples, uma vez que não requer quaisquer outras etapas de deteção após a hibridação. Os marcadores fluorescentes são diretamente ligados ao oligonucleótido, durante a síntese, usando um ligante com um grupo amino posicionado na extremidade 5' da sonda, ou enzimaticamente, utilizando uma transferase terminal para ligar nucleotídeos marcados com fluorescência na extremidade 3', ou ainda em ambas as extremidades.^[159, 161]

O outro tipo de sonda é a sonda oligonucleotídica, ou seja, sondas sintéticas curtas de ADN ou ARN de cadeia simples que têm a dimensão da sequência alvo. Cada sonda de oligonucleótido tem entre 15 e 30 pares de bases de comprimento e é gerada num sintetizador automático (Figura I.22). As sondas curtas permitem um acesso mais fácil ao seu alvo, mas podem conter menos marcadores.^[159]

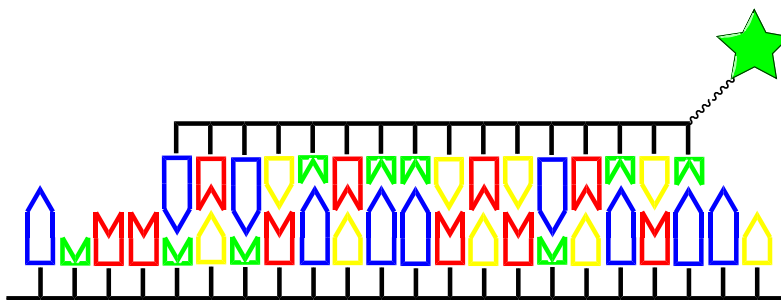


Figura I.22. Modelo de uma sonda fluorescente com um fluoróforo ligado diretamente ao oligonucleótido.

A incorporação de espaçadores de carbono para ligar os fluoróforos aos oligonucleótidos pode resultar num aumento na intensidade do sinal de fluorescência em comparação com o obtido quando se utiliza uma sonda diretamente conjugada.^[161]

As sondas oligonucleotídicas podem ser vantajosas em tecidos particularmente difíceis, uma vez que as sondas pequenas podem entrar no tecido de forma mais eficiente. Além disso, à medida que cada sonda oligonucleotídica se liga ao alvo, a transcrição relaxa e facilita a hibridação de moléculas de sondas adicionais. Os oligonucleótidos apresentam uma superior especificidade em comparação com sondas mais longas, uma vez que os oligonucleótidos têm menos bases, há menos oportunidades para que ocorra emparelhamento não específico com sequências não

complementares na amostra.^[158, 161] Essa superior especificidade torna os oligonucleótidos uma escolha preferencial em diversas aplicações, como na técnica FISH, onde a precisão na detecção de alvos específicos é fundamental. Contudo, o nível de dificuldade e elevado custo associado à produção de sondas oligonucleotídicas dificulta a sua utilização.^[161]

Atualmente, existe uma vasta seleção de fluoróforos disponíveis comercialmente, mas a maioria com custos de aquisição muito elevados. Na técnica FISH são habitualmente utilizados os derivados da fluoresceína (isotiocianato de fluoresceína (FITC®), éster de 5(6)-carboxifluoresceína-*N*-hidroxisuccinimida (FLUOS®),...) e os derivados da rodamina (isotiocianato de tetrametil-rodamina (TRITC®), vermelho Texas,...), e os mais recentes derivados de cianina, o Cy3® e o Cy5®. Estes últimos demonstraram ter superiores propriedades fotofísicas em relação aos marcadores clássicos, uma vez que proporcionam uma coloração significativamente mais brilhante e são muito estáveis à fotodegradação.^[159, 161]

I.6.2. Técnica de Hibridação *in situ* Fluorescente

O procedimento da técnica FISH inclui cinco passos (Figura I.23): (1) fixação da amostra; (2) permeabilização da amostra; (3) hibridação com as respetivas sondas para detetar as respetivas sequências alvo; (4) lavagem para remoção das sondas não ligadas; (5) montagem, visualização e registo dos resultados.^[159, 175]

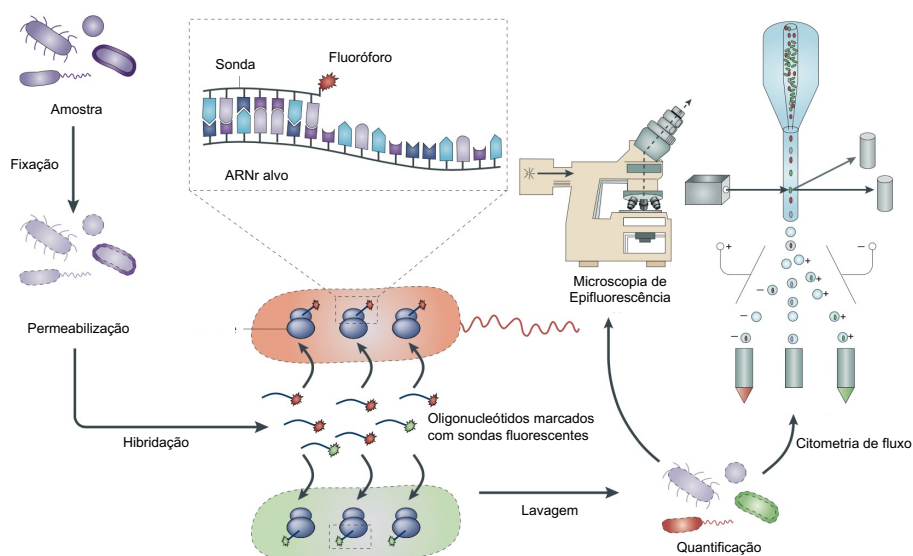


Figura I.23. Etapas básicas da técnica FISH.^[175]

Na preparação da amostra, as células são fixadas e permeabilizadas, permitindo a penetração das sondas fluorescentes até o local onde se encontra o ácido nucleico alvo. Além disso, esta etapa visa proteger o ARN da degradação e fixar o conteúdo celular. Uma fixação eficaz resulta numa boa penetração da sonda, garantindo a retenção máxima do ARN alvo e a manutenção da integridade celular. As condições de fixação variam dependendo do organismo e do tipo de sonda utilizada. No entanto, os fixadores mais comuns incluem álcoois (EtOH e MeOH) ou aldeídos (paraformaldeído), sendo utilizados tanto para estirpes bacterianas quanto para estirpes de leveduras. O tempo de fixação pode variar entre 3 minutos a 16 horas.^[160, 175-177]

Após a permeabilização das células, é aplicado um tampão de hibridação (HB) e a sonda FISH complementar ao ARN alvo. A sonda é adicionada em excesso para maximizar a eficiência da hibridação ao ácido nucleico alvo.^[176] A etapa de lavagem tem como objetivo eliminar as sondas não ligadas e assegurar a especificidade do sinal detetado, diminuindo ou removendo a fluorescência de fundo e melhorando a qualidade da imagem. Por último, as amostras são analisadas por citometria de fluxo (análise quantitativa das células fluorescentes em suspensão) e por microscopia de epifluorescência (análise qualitativa).^[160]

Estes processos são fundamentais para um protocolo eficaz da técnica FISH, em que cada um desses passos requer reagentes específicos para garantir a sua eficácia. É importante referir que o *design* e a síntese das sondas são fases críticas em qualquer experiência de hibridação *in situ* (ISH). No entanto, a propensão das sondas para formarem estruturas secundárias, o seu comprimento e especificidade global, assim como a sua quantidade e qualidade, devem ser considerados durante todo o processo.^[161]

As sondas sintéticas oferecem ao utilizador um maior controlo sobre os fatores que afetam a hibridação, além de dispensarem a prática padrão de clonagem do gene alvo, a qual pode atrasar o processo da técnica FISH.^[161]

I.7. Reação de Lawesson

A conversão do grupo carbonilo num grupo tiocarbonilo sempre foi considerada uma reação muito importante para os químicos orgânicos. Embora o pentassulfeto de fósforo (P₄S₁₀) tenha sido o reagente mais utilizado desde o início do século XX, o reagente de Lawesson ganhou destaque com aplicações essenciais na química orgânica sintética.^[178, 179]

O pentassulfureto de fósforo (P_4S_{10}), como agente de tionação, foi divulgado pela primeira vez, em 1869, por Henry e Wislicenus. O procedimento geral para a tionação via P_4S_{10} envolve a ebulição em solventes de hidrocarbonetos cancerígenos como o tolueno, o xileno e a piridina, utilizando um excesso de reagente e com tempos reacionais longos e com baixos rendimentos. Muitos grupos de investigação tentaram, sem sucesso, encontrar reagentes de tionação alternativos para substituir o pentassulfureto de fósforo.^[180] O reagente de Lawesson, o 2,4-bis(4-metoxifenil)-1,3,2,4-ditiadifosfetano-2,4-dissulfureto, foi sintetizado em 1956 (Figura I.24). É um composto amarelado, com um ponto de fusão entre 228 e 231°C e é insolúvel em água.^[178] Este reagente foi estudado sistematicamente pela primeira vez por Lawesson e colaboradores em 1978, principalmente para a transição de grupos carbonilo para tiocarbonilo.^[178]

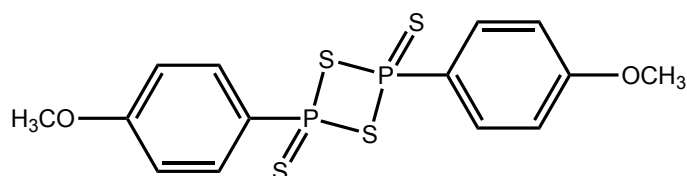
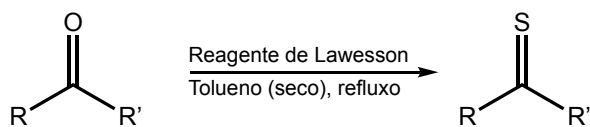


Figura I.24. Reagente de Lawesson.

A principal vantagem do reagente de Lawesson em relação ao pentassulfeto de fósforo é a sua simplicidade de utilização, disponibilidade comercial, condições de reação suaves com rendimentos elevados e tempos de reação mais curtos, principalmente se as reações forem realizadas utilizando técnicas de irradiação por micro-ondas.^[178, 180]

O reagente de Lawesson é amplamente utilizado para a tionação de compostos carbonílicos (cetonas, ésteres, amidas, anidridos, etc.) e álcoois.^[180, 181] A reatividade dos grupos hidroxilo e carboxilo em relação ao reagente de Lawesson foi relatada por Nishio *et al.*, que descreveram que os grupos hidroxilos são mais reativos, enquanto os ésteres são os menos reativos.^[178] As séries de reatividade apresentam a seguinte ordem: Hidroxilo > Amida > Cetona > Éster

O reagente de Lawesson converte efetivamente os grupos oxo de cetonas em tionas (Esquema I.2), mesmo na presença de vários outros grupos funcionais, como anéis aromáticos, compostos heterocíclicos e halogenados, ésteres, grupos nitro, nitrilo, alquilo e alquilamina.^[182]

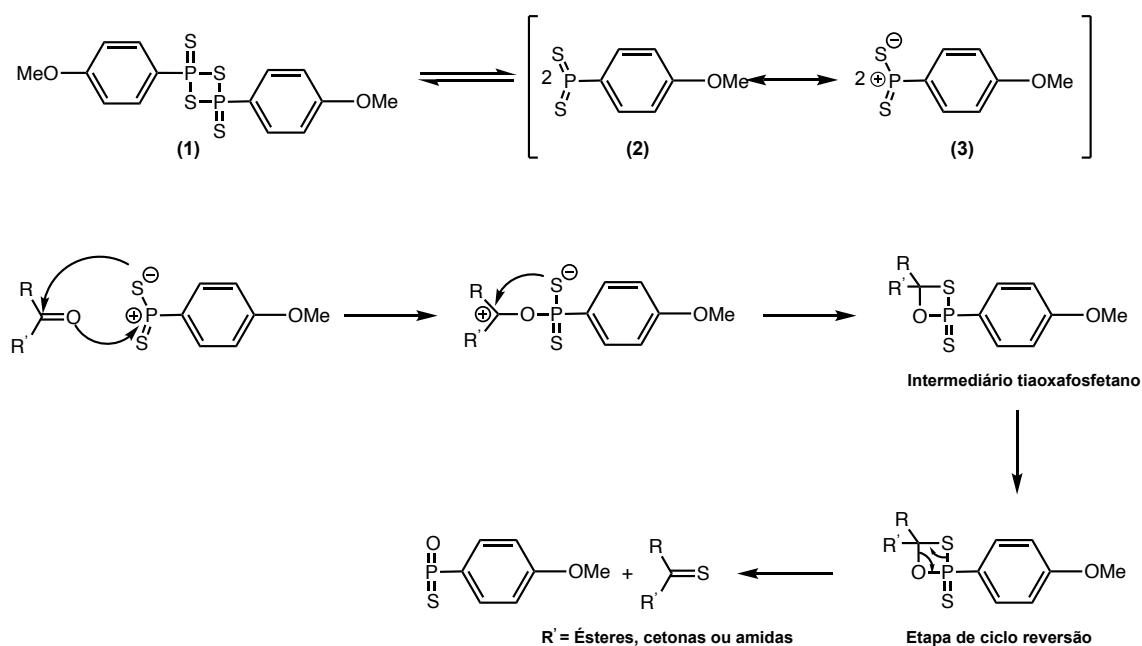


Esquema I.2. Reação geral do reagente de Lawesson com cetonas.

O tolueno é o solvente mais usado, embora existam outros solventes que podem ser igualmente utilizados como benzeno, piridina, THF, dimetoxietano, CH₂Cl₂ e CS₂. A reação é geralmente realizada à temperatura de refluxo dos solventes, em condições de atmosfera inerte.^[182]

I.7.1. Mecanismo da reação de Lawesson

O reagente de Lawesson em solução está em equilíbrio com os intermediários iletos de ditiofosfina mais reativos **2** e **3**, que podem reagir facilmente com o grupo carbonilo para gerar o intermediário tiaoxafosfetano. A força motriz desta reação é causada pela formação de ligações P=O estáveis numa etapa de ciclo de reversão semelhante aos mecanismos conhecidos para a reação de Witting, sendo a ligação P=O mais forte que a ligação P=S (Esquema I.3).^[178, 183]



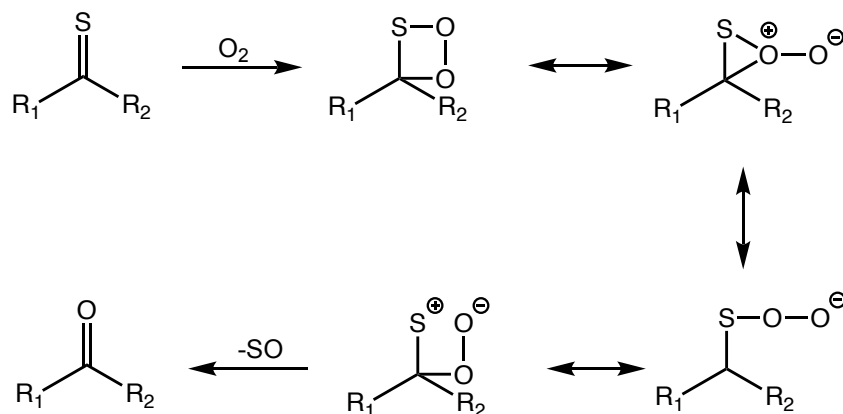
Esquema I.3. Mecanismo da reação de Lawesson.

I.7.2. Limitações da reação de Lawesson

A reação de Lawesson torna-se instável a temperaturas acima de 110 °C e o produto decompõe-se ou polimeriza lentamente.^[178]

Outro problema está relacionado com o oxigênio molecular, pois este é considerado um bom eletrófilo capaz de promover a indesejada conversão de compostos com o grupo tiona em compostos com o grupo carbonilo.^[184]

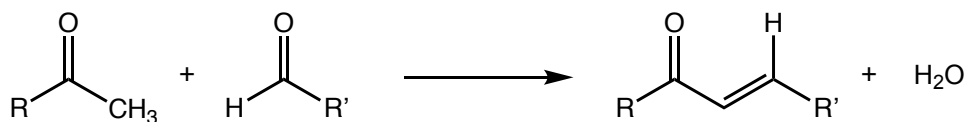
No Esquema I.4, está representado um mecanismo proposto para este processo, no qual o oxigênio reage com o grupo tiona, gerando intermediários que podem apresentar estruturas alternativas.^[184]



Esquema I.4. Mecanismo do oxigênio molecular.

I.8. Condensação aldólica

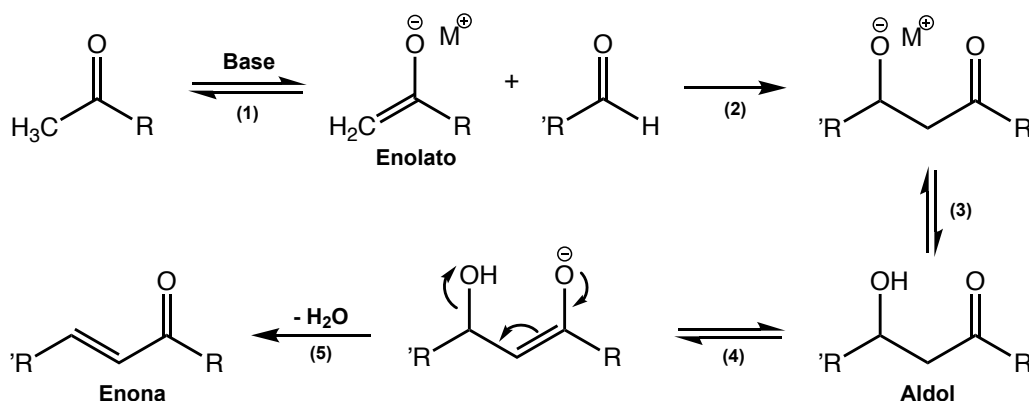
A reação de condensação aldólica desempenha um papel fundamental na síntese orgânica, oferecendo uma estratégia eficaz para a formação de ligações C-C, em que um enol ou um ião enolato reage com um composto carbonílico na presença de um catalisador ácido ou básico, para formar um β -hidroxialdeído ou uma β -hidroxicetona, seguido de desidratação (eliminação) para originar uma enona conjugada (Esquema I.5).^[185, 186]



Esquema I.5. Reação de condensação aldólica.

No Esquema I.6 está representado o mecanismo reacional da condensação aldólica com um aldeído. A cetona ou aldeído pode ser convertido num enolato por catálise básica. Através de uma adição nucleofílica do enolato com um aldeído, ocorre a protonação do alcóxido pela troca de próton com a base que origina um aldol.^[186, 187]

A primeira etapa é uma reação de adição para formar um produto com geometria tetraédrica, com a subsequente desidratação para originar um aldeído α,β -insaturado.^[186, 187]



Esquema I.6. Mecanismo da condensação aldólica: (1) formação do enolato, (2) formação de ligação C-C, (3) equilíbrio de prótons, (4) formação do enolato e (5) eliminação e formação de ligação C=C.

As condensações aldólicas são fundamentais na síntese de moléculas complexas, incluindo produtos farmacêuticos, fragrâncias e polímeros.^[188]

I.9. Reações de acoplamento C-C utilizadas na síntese de derivados de coumarinas

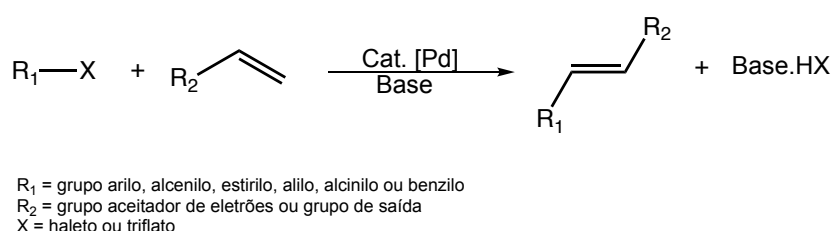
As reações de acoplamento cruzado catalisadas por metais de transição tornaram-se uma ferramenta extremamente versátil na química orgânica, permitindo a formação eficiente de ligações C-C (carbono-carbono).^[189-191] Estas reações apresentam grandes vantagens devido às suas condições reacionais suaves, eficiência e tolerância a muitos grupos funcionais. Como resultado, são frequentemente usadas na síntese de diversos produtos farmacêuticos e agroquímicos.^[189-191]

O paládio é um elemento de transição amplamente utilizado como catalisador em reações de acoplamento C-C, devido à sua superior atividade em comparação com outros metais.^[191, 192] Entre as suas principais vantagens estão a elevada taxa de conversão catalítica e a reatividade eficiente em temperaturas relativamente baixas.^[191, 192]

I.9.1. Reação de Heck

A reação de Heck ou de arilação/vinilação de alcenos catalisada por paládio (Pd), foi inicialmente descrita por dois grupos de investigadores independentes, o grupo de Mizoroki em 1971 e o grupo de Heck em 1972, baseando-se em trabalhos realizados no final dos anos 60.^[191, 193]

Esta reação envolve um acoplamento cruzado C-C catalisado por paládio (Pd) entre um carbono sp^2 de um alceno e um carbono sp^2 de um vinilo (ou triflato) ou haleto arilo, na presença de uma base (Esquema I.7). Esta reação resulta na substituição de um átomo de hidrogénio do alceno, formando novos produtos.^[193-197]



Esquema I.7. Esquema geral da reação de Heck.

Apesar das inúmeras vantagens frequentemente associadas às reações mediadas por paládio, o interesse na reação de Heck foi esporádico, devido aos seus problemas de regiosseletividade com substratos de alcenos assimétricos e ao incompleto conhecimento do seu mecanismo reacional.^[198, 199] Um avanço significativo na reação de Heck ocorreu em 1974, quando Dieck e Heck introduziram o uso de fosfinas.^[200] Constatou-se que as fosfinas estabilizavam as espécies de Pd(0) e Pd(II) e facilitavam a redução de Pd(OAc)₂, resultando em melhores rendimentos reacionais. Atualmente os ligandos à base de triarilfosfinas são amplamente utilizados na reação de Heck, visando prolongar a vida útil do catalisador.^[194]

A reação de Heck, como uma metodologia versátil para gerar novas ligações C-C, passou a ser amplamente utilizada devido à sua elevada aplicabilidade numa vasta gama de espécies arilo Ar-X, onde X pode ser Cl, Br, I, OTf (triflato), OTs (tosilato) e N₂⁺.

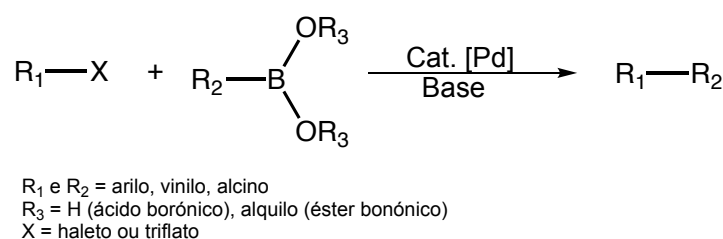
A etapa mais extensivamente investigada na reação de Heck é a adição oxidativa de Ar-X para formar o intermediário de paládio (0), que serve como ponto de partida comum para diversas reações catalisadas por esse metal, envolvendo uma variedade de substratos de haletos de arilo. A força de ligação dos referidos haletos segue a ordem das suas energias de dissociação da ligação Ar-X de 96, 81 e 65 kcal/mol, ou seja, Ar-Cl > Ar-Br > Ar-I, respetivamente.^[196, 201] Esta tendência também se manifesta na

capacidade dos haletos de arilo de sofrerem reações de adição oxidativa com complexos de paládio (0), seguindo a ordem, $\text{ArCl} < \text{ArBr} \ll \text{ArI}$.^[194, 196] Portanto, é compreensível que as condições reacionais desenvolvidas para as reações de Heck valorizem o uso de iodetos de arilo como substratos, mas existem muitas vantagens em direcionar esforços para o melhoramento de metodologias que visem maximizar a eficiência no uso de brometos e cloretos de arilo.^[196, 197] Os iodetos de arilo tendem a ser mais dispendiosos em comparação com seus equivalentes de bromo e cloro, além de serem menos utilizados em termos de economia de átomos. Por outro lado, os cloretos de arilo são mais robustos e estão mais disponíveis, sendo capazes de tolerar uma ampla gama de protocolos reacionais.^[196, 201]

A seleção cuidadosa dos alcenos, substratos, ligandos, bases, contra-íões, temperatura e solventes, desempenha um papel crucial na determinação da seletividade e velocidade das reações de Heck, para a obtenção do produto desejado.^[196, 201]

1.9.2. Reação de Suzuki-Miyaura

A reação de Suzuki-Miyaura é um exemplo de acoplamento cruzado C-C, catalisado por um complexo de paládio (0), envolvendo um carbono sp^2 de um organo-haleto ou haleto de vinilo e um carbono sp^2 de um ácido borónico ou éster de borónico, na presença de uma base (Esquema 1.8).^[202, 203] Esta importante reação foi descrita em 1979 por Suzuki e Miyaura, utilizando boronatos de alquilo e haletos de alquilo, na presença do catalisador de paládio, $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$.^[204-206] No entanto, a versão clássica da reação de Suzuki-Miyaura, envolvendo o ácido fenil borónico e haletos de arilo, foi relatada posteriormente, em 1981.^[206, 207] Atualmente, esta reação de acoplamento é amplamente utilizada na síntese de compostos biarílicos.^[202, 203]

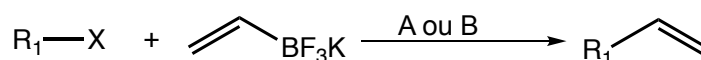


Esquema 1.8. Esquema geral da reação de acoplamento cruzado de Suzuki-Miyaura.

Ao longo dos anos, a reação de Suzuki-Miyaura tem sido objeto de numerosos avanços, tornando-se numa reação de grande relevância na síntese química, tanto na comunidade acadêmica como na indústria.^[206, 208] No entanto, os desenvolvimentos mais recentes nesse campo, especificamente em relação aos sistemas catalíticos, têm-se concentrado principalmente em melhorar o acoplamento cruzado e ampliar a sua eficiência, em vez de simplesmente expandir a variedade de reagentes organoborados disponíveis para tal acoplamento.^[209-211]

Os organotrifluoroboratos representam uma classe de reagentes organoborados desenvolvidos como alternativas aos derivados do ácido borônico para uso em reações de acoplamento cruzado.^[209] Em 1995, Vedejs *et al.* relataram a primeira síntese de organotrifluoroboratos de potássio, que podem ser facilmente obtidos pela adição de KHF_2 a ácidos arilborônicos.^[212] Esses trifluoroboratos são sólidos cristalinos monoméricos, de fácil isolamento e muito estáveis, quando expostos ao ar.^[210, 211, 213]

Molander *et al.* alcançaram resultados notáveis em reações de acoplamento cruzado de Suzuki-Miyaura utilizando trifluoroboratos de alquenilo e haletos de arilo ou triflatos, na presença do catalisador $\text{PdCl}_2(\text{dppf}) \cdot \text{CH}_2\text{Cl}_2$ em solventes como THF/ H_2O ou *n*-PrOH, usando Cs_2CO_3 ou NEt_3 como base (Esquema I.9).^[214, 215]



R_1 = alquenilo ou arilo

X = haleto

A = $\text{PdCl}_2(\text{dppf}) \cdot \text{CH}_2\text{Cl}_2$ (2%), Et_3N , *n*-PrOH

B = $\text{PdCl}_2(\text{dppf}) \cdot \text{CH}_2\text{Cl}_2$ (9%), Cs_2CO_3 , THF- H_2O

Esquema I.9. Esquema racional de vinilação com trifluoroboratos de alquenilo.

I.10. Cálculos da teoria do funcional da densidade (DFT) e da teoria do funcional da densidade dependente do tempo (TDDFT)

Os cálculos de DFT e TDDFT fornecem informações complementares essenciais para a interpretação de determinados resultados experimentais, nomeadamente no que diz respeito às propriedades fotofísicas das moléculas.

A DFT é um método computacional de modelação de mecânica quântica utilizado para avaliar a estrutura eletrónica de moléculas no estado fundamental. Nos cálculos teóricos da DFT, a estrutura eletrónica de um sistema (átomos, moléculas ou sólidos) é aproximada utilizando funcionais (expressões matemáticas) que dependem da densidade eletrónica, em vez da função de onda dos eletrões. A TDDFT é uma extensão da DFT, utilizada para descrever a estrutura eletrónica de sistemas sob a influência de campos externos dependentes do tempo, como a luz ou potenciais oscilantes, ou seja, é utilizada para calcular as propriedades dos estados excitados e estudar a dinâmica dos sistemas eletrónicos.

II. DISCUSSÃO

Este trabalho teve como finalidade o desenvolvimento de novos marcadores fluorescentes de biomoléculas, solúveis em água e reativos ao grupo amino, usando uma estratégia sintética simples, eficiente e com materiais de partida de baixo custo, como a 7-dietilamino-4-metilcoumarina, o 4-dietilaminobenzaldeído, o ferroceno-carboxaldeído, entre outros. Os novos marcadores fluorescentes permitiram a síntese de sondas oligonucleotídicas que foram testados em modelos biológicos, de leveduras e bactérias, para identificação e detecção de microrganismos no contexto de microamostras do Património Cultural.

Neste capítulo serão discutidas as estratégias sintéticas seguidas na preparação dos vários precursores para a síntese dos marcadores fluorescentes, e avaliadas as suas propriedades fotofísicas, que serão igualmente interpretadas à luz dos cálculos da teoria do funcional da densidade (DFT) e da teoria do funcional da densidade dependente do tempo (TDDFT). O potencial das novas sondas oligonucleotídicas fluorescentes foi avaliado através da técnica FISH, por análise dos resultados de citometria de fluxo e de microscopia de epifluorescência, em dois modelos biológicos, nomeadamente em células de *Saccharomyces cerevisiae* e de *Bacillus sp.*.

II.1. Derivados da 7-dietilamino-4-metilcoumarina

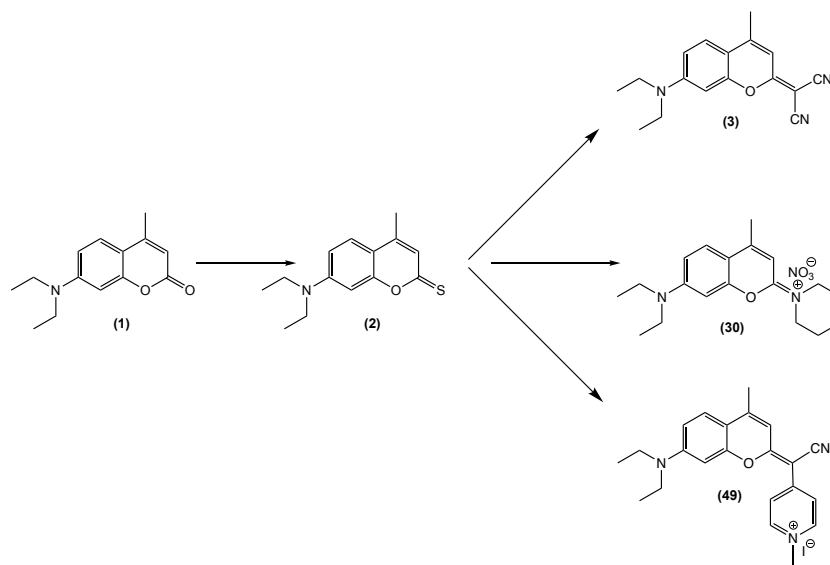
Neste trabalho foram realizadas derivatizações a partir da posição 2 e da posição 3 da 7-dietilamino-4-metilcoumarina, com o objetivo de obter marcadores fluorescentes, com excelentes propriedades fotofísicas, para a marcação de biomoléculas. De referir que as posições 2 e 3 são consideradas as mais favoráveis para a expansão do sistema π deslocalizado na 7-dietilamino-4-metilcoumarina.

II.1.1. Derivados 2-substituídos da 7-dietilamino-4-metilcoumarina

A extensão da conjugação na posição 2 eliminará o indesejável efeito aceitador de eletrões do grupo carbonilo, com a inevitável partilha de eletrões π ao longo da deslocalização na posição 3, em coumarinas 3-substituídas. O aumento da extensão da conjugação na posição 2, permitiu sintetizar um elevado número de novos derivados fluorescentes com o grupo 2-metilenocromeno, com propriedades fotofísicas

aprimoradas, tais como superior brilho, elevados desvios de Stokes e consideráveis rendimentos quânticos.

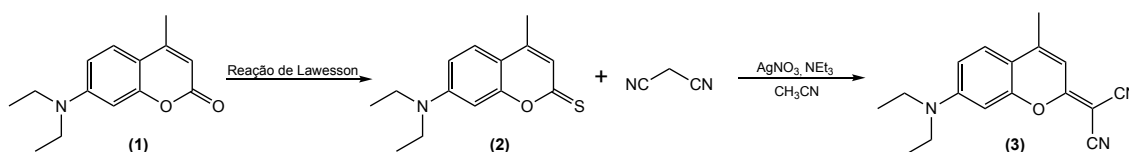
A tionação do grupo carbonilo da 7-dietilamino-4-metilcoumarina (**1**), com o reagente de Lawesson, foi utilizada como uma estratégia sintética útil para promover reações de condensação na posição 2. A utilização da referida coumarina como material de partida para a síntese de derivados 2-metilenocromeno, com a incorporação dos grupos diciano, piperidina e 2-(piridín-4-il)acetonitrilo está representada no Esquema II.1.



Esquema II.1. Derivados 2-metilenocromeno da 7-dietilamino-4-metilcoumarina (**1**).

II.1.1.1. Síntese dos derivados do 2-(7-dietilamino-4-metil-2H-cromen-2-ilideno)malononitrilo (**3**)

A síntese de derivados 2-substituídos da 7-dietilamino-4-metil-2H-cromen-2-iona (**2**), foi delineada considerando que a forte coordenação entre a prata e o enxofre diminui a ordem de ligação entre o enxofre e o C-2, tornando este último mais reativo a espécies nucleófilas (Esquema II.2).



Esquema II.2. Síntese do 2-(7-dietilamino-4-metil-2H-cromen-2-ilideno)malononitrilo (**3**).

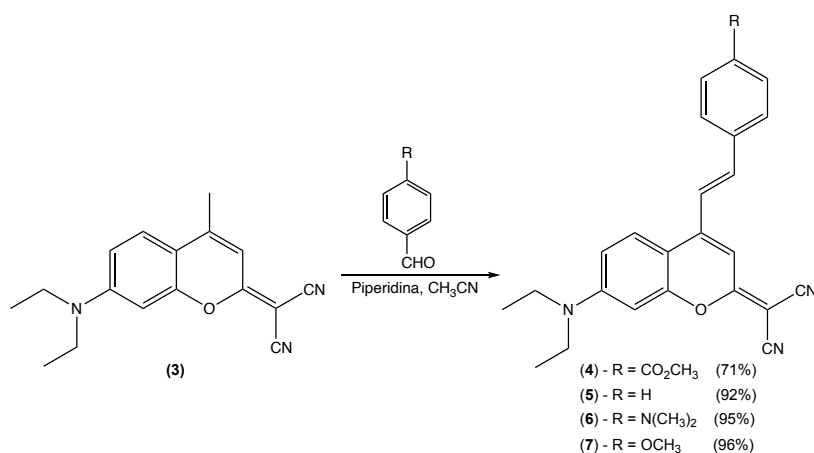
A incorporação de um grupo malononitrilo na posição 2 (Esquema II.2), após a tionação da 7-dietilamino-4-metilcoumarina (**1**), promoveu um desvio batocrômico superior a 100 nm no 2-(7-dietilamino-4-metil-2*H*-cromen-2-ilideno)malononitrilo (**3**) quando comparado com o seu precursor **1**, resultado da superior deslocalização eletrónica induzida.^[118, 216]

A incorporação de um substituinte 4-estirilo com grupos doadores ou aceitadores de elétrons na posição *para* poderia originar uma superior deslocalização de elétrons π e o respetivo carácter *push-pull* do cromóforo. Estas modificações podem promover superiores desvios batocrômicos nas bandas de absorção e emissão, e melhorar outras propriedades fotofísicas.

A principal estratégia sintética para a obtenção de derivados 4-estiril do 2-(7-dietilamino-4-metil-2*H*-cromen-2-ilideno)malononitrilo (**3**) baseou-se na elevada acidez dos prótons do grupo metilo presentes na posição 4, que permitem reações de condensação aldólica.

Para avaliar o efeito dos grupos doadores e aceitadores de elétrons nas propriedades fotofísicas dos novos cromóforos, sintetizaram-se e caracterizaram-se espectralmente uma pequena biblioteca de derivados 4-estiril do 2-(7-dietilamino-4-metil-2*H*-cromen-2-ilideno)malononitrilo (**3**).

A reação de condensação aldólica, estereosseletiva e altamente eficiente, entre o intermediário (**3**) e os aldeídos aromáticos, 4-formilbenzoato de metilo, benzaldeído, 4-metoxibenzaldeído e 4-dimetilaminobenzaldeído, permitiu obter os derivados 4-estirilo, **4** a **7**, com rendimentos considerados de muito bons a elevados (Esquema II.3).^[84]



Esquema II.3. Síntese dos derivados 4-estiril do 2-(7-dietilamino-4-metil-2*H*-cromen-2-ilideno)-malononitrilo (**3**).

Inesperadamente, apesar de necessitarem de condições de reação mais vigorosas, os aldeídos que contêm grupos doadores de elétrons apresentaram melhores rendimentos do que aquele com um grupo aceitador de elétrons na posição *para*. Este facto pode ser devido à superior estabilização do álcool intermediário, pelos grupos doadores de elétrons, neste tipo de molécula. Os novos derivados do 2-(7-dietilamino-4-metil-2*H*-cromen-2-ilideno)malononitrilo (**3**), com o sistema π mais deslocalizado, são facilmente isolados após cromatografia em coluna de sílica. Todos os dados espectrais são consistentes com as estruturas propostas (Reações IV.1.2.3 a IV.1.2.6).

II.1.1.1.1. Propriedades fotofísicas dos derivados 4-estiril do 2-(7-dietilamino-4-metil-2*H*-cromen-2-ilideno)malononitrilo (**3**)

As propriedades fotofísicas dos derivados 4-estiril do 2-(7-dietilamino-4-metil-2*H*-cromen-2-ilideno)malononitrilo (**3**), nomeadamente as suas propriedades de absorção e emissão, assim como os rendimentos quânticos de fluorescência, foram avaliadas e estão registadas na Tabela II.1.

Tabela II.1. Propriedades fotofísicas dos derivados 4-estiril do 2-(7-dietilamino-4-metil-2*H*-cromen-2-ilideno)malononitrilo (**3**).^[84]

Composto	λ_{abs}^a (nm)	λ_{em}^b (nm)	Desvio de Stokes (nm, cm^{-1})	ϵ^c ($\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$)	Φ_F^d
1	371	434	63, 3913	22910	0.73
3	477	519	42, 1697	38000	0.05
4	520	620	100, 3102	19000	0.04
5	516	603	87, 2796	17000	0.16
6	496	597	101, 3411	34000	0.95
7	522	602	80, 2546	24000	0.20

^aMáximos de absorção em CH_3CN . ^bMáximos de emissão em CH_3CN . ^cAbsortividade molar na transição de comprimento de onda mais longo. ^dRendimento quântico de fluorescência em EtOH, determinado utilizando 7-dietilamino-4-metil-coumarina ($\Phi_F = 0.73$ em EtOH) como padrão.^[216]

Os espectros de absorção dos referidos novos derivados 4-estirilo, **4** a **7**, são apresentados na Figura II.1. Todos os referidos derivados apresentam máximos de absorção e emissão a comprimentos de onda mais longos, quando comparados com o seu precursor **3**, devido ao efeito de transferência de carga intramolecular, pela conjugação do grupo dietilamino, doador de eletrões, e dos grupos estirilo na posição 4 com o grupo dicianometileno como aceitador de eletrões na posição 2.

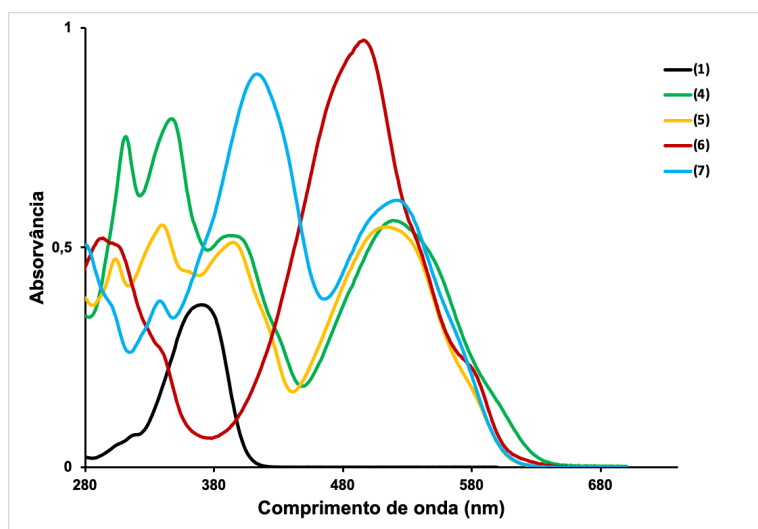


Figura II.1. Espectros de absorção da 7-dietilamino-4-metilcoumarina (**1**) e dos derivados 4-estiril do 2-(7-dietilamino-4-metil-2*H*-cromen-2-ilideno)malononitrilo (**3**), em CH₃CN.

Geralmente, a presença de grupos aceptadores de eletrões na posição 4 das coumarinas promove desvios batocrómicos mais elevados do que os grupos doadores de eletrões,^[90] mas este efeito não é significativamente pronunciado nos derivados 4-estirilo, **4** a **7**, possivelmente devido ao forte efeito aceitador de eletrões do grupo dicianometileno na posição 2. Por outro lado, as absortividades molares foram fortemente afetadas pela natureza dos grupos doadores de eletrões ou aceptadores de eletrões na posição *para* do substituinte 4-estirilo. A análise da Tabela II.1 permite verificar que, no caso dos derivados 4-estirilo, **4** a **7**, os grupos doadores de eletrões promovem elevadas absortividades molares (ex., ϵ (**6**) = 34000 cm⁻¹M⁻¹ vs. ϵ (**4**) = 19000 cm⁻¹M⁻¹) e também elevados rendimentos quânticos de fluorescência (ex., Φ_F (**6**) = 0.95 vs. Φ_F (**4**) = 0.04).^[84]

Todos os derivados 4-estirilo, **4** a **7**, apresentam elevados desvios de Stokes devido à extensão do sistema π conjugado na molécula, que é essencial para o processo eficaz de transferência de carga intramolecular do estado excitado emissivo. O composto **6** apresenta o rendimento quântico de fluorescência mais elevado,

possivelmente devido à presença de um forte substituinte doador de elétrons, o grupo dimetilamino. A diminuição observada no composto **7** pode ser atribuída a uma redução substancial da densidade eletrônica do átomo de oxigénio, do grupo metoxi, na presença do substituinte aceitador de elétrons dicianometileno.^[68]

Os desvios batocrómicos sofreram um aumento muito mais pronunciado com a inclusão do substituinte 4-estirilo contendo doadores de elétrons na posição *para*, como os grupos dimetilamino ou metoxi. Como era de esperar, o grupo dimetilamino, quando comparado com o grupo metoxi, promoveu desvios batocrómicos mais elevados, de aproximadamente 40%, devido ao superior carácter doador de elétrons, por efeito mesómero, deste substituinte.

II.1.1.1.2. Cálculos DFT e TDDFT para os derivados 4-estiril do 2-(7-dietil-amino-4-metil-2*H*-cromen-2-ilideno)malononitrilo (**3**)

A geometria molecular otimizada dos derivados 4-estirilo, **4** a **7**, tanto no estado fundamental como no primeiro estado excitado singuleto, calculada ao nível PBE0/6-31G(d,p) em CH₃CN, está representada na Figura VI.1 (Anexos) e detalhada na Tabela VI.1 (Anexos). No estado eletrónico fundamental, todos os compostos apresentam um desvio da planaridade entre o plano médio dos anéis fundidos e o plano do substituinte 4-estirilo, restringindo a conjugação π da ligação entre os grupos doadores e aceitadores nas moléculas. A ponte de etileno permanece quase no plano do anel benzénico e a torção ocorre na ligação com os anéis fundidos. Este ângulo diedro é menor para os compostos **6** (11.9°) e **7** (19.8°), e apresenta valores mais elevados para os compostos **4** (24.5°) e **5** (23.0°). No entanto, para o estado excitado S₁, a situação é completamente diferente, com todas as moléculas a tornarem-se quase planares, com um desvio máximo de -0.9° para o composto **4** e um desvio mínimo da planaridade de -0.3° para o composto **6**.^[84]

Outra propriedade geométrica importante, que é pertinente para aceder à deslocalização eletrónica ao longo da estrutura π conjugada, é a diferença média de comprimento entre uma ligação simples e uma ligação dupla adjacente (BLA, *Bond Length Alternation*). Enquanto a alternância de comprimento de ligação calculada BLA dos compostos varia entre 0.08 Å (composto **6**) e 0.11 Å (compostos **4** e **5**) no estado fundamental S₀, reduz-se consideravelmente para 0.04 Å para todos os compostos no estado excitado S₁. Estas diferenças significativas na geometria entre os estados S₀ e S₁, que contribuem para um aumento da deslocalização eletrónica e uma diminuição do

intervalo de energia HOMO-LUMO no estado excitado S_1 , podem justificar um elevado desvio de Stokes, em que, após uma excitação vertical se segue um relaxamento estrutural significativo do estado excitado antes da emissão.^[217, 218]

Os comprimentos de onda de absorção, e a força de oscilador (f) das transições de mais baixa energia dos compostos foram calculados por métodos da teoria do funcional da densidade dependente do tempo (Figura II.2 e Tabela VI.2 (Anexos)). Os estados excitados de mais baixa energia S_1 e S_2 , apesar de apresentarem diferentes forças de oscilador, partilham a mesma composição para todos os compostos e são principalmente de carácter HOMO→LUMO e HOMO-1→LUMO, respetivamente (mais de 98% em todos os casos).

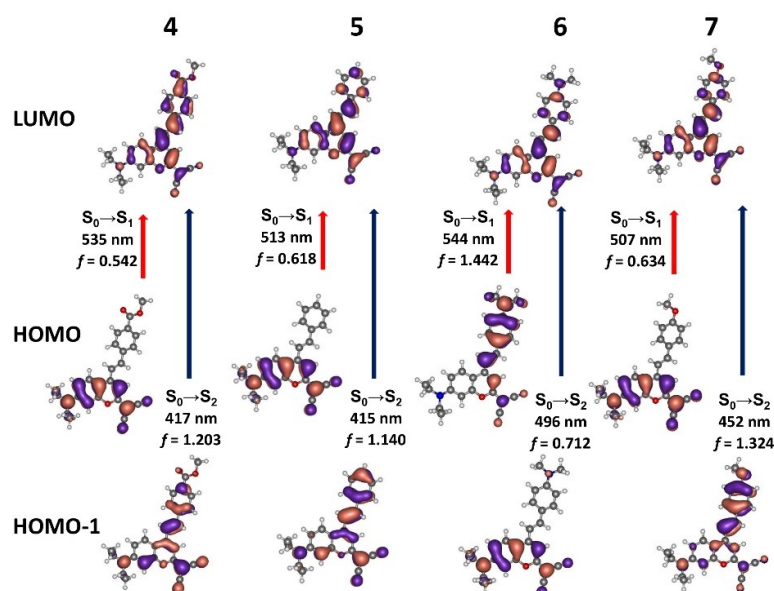


Figura II.2. Transições $S_0 \rightarrow S_1$ e $S_0 \rightarrow S_2$ de mais baixa energia, respetivos números de onda e forças de oscilador dos derivados 4-estirilo, **4** a **7**.

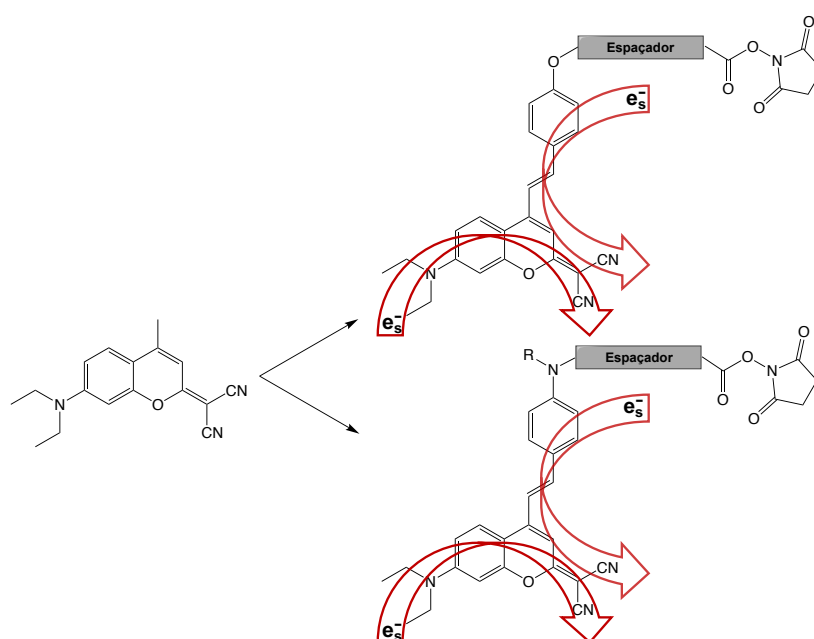
A forma e a localização espacial dos estados são, no entanto, muito diferentes, o que implica características diferentes da transferência de carga intramolecular que ocorre aquando da excitação. Na maioria dos casos, a HOMO e a HOMO-1 estão mais localizadas nos anéis fundidos ou no substituinte 4-estirilo, enquanto a LUMO está menos localizada estendendo-se sobre a zona de ligação, o que facilita as absorções de transferência de carga interna de baixa energia.^[219] As excitações de mais baixa energia para o composto **6**, que apresenta as transições com maior força de oscilador, correspondem a transferências de carga do substituinte 4-estirilo para os anéis, refletindo a forte capacidade doadora do grupo amino ligado ao substituinte 4-estirilo.

Para os outros compostos, a excitação $S_0 \rightarrow S_1$ corresponde a transferências de carga opostas, com o estado HOMO localizado principalmente nos anéis e a LUMO a espalhar-se para o substituinte 4-estirilo. No entanto, para estes compostos, esta não é a excitação mais intensa, apresentando a transição $S_0 \rightarrow S_2$ valores de f muito mais elevados e dominando assim os espectros de absorção. O carácter doador dos grupos presentes no composto **7** é evidenciado por esta transição que ocorre entre o estado HOMO-1, maioritariamente localizado no substituinte 4-estirilo, e a LUMO, maioritariamente localizado nos grupos nitrilo.

Para a maioria dos compostos, as transições de mais baixa energia calculadas apresentam uma boa concordância com os máximos de absorção experimentais dos derivados 4-estirilo, **4** a **7**, (Tabelas II.1 e Tabela VI.2 (Anexos)), à exceção do composto **6**. Para este composto, o máximo experimental a 496 nm pode ser atribuído à transição $S_0 \rightarrow S_2$, enquanto a transição $S_0 \rightarrow S_1$ de mais baixa energia corresponde a um ombro visível localizado em torno de 536 nm.

II.1.1.2. Síntese dos marcadores fluorescentes para biomoléculas derivados do 2-(7-dietilamino-4-metil-2H-cromen-2-ilideno)malononitrilo (3)

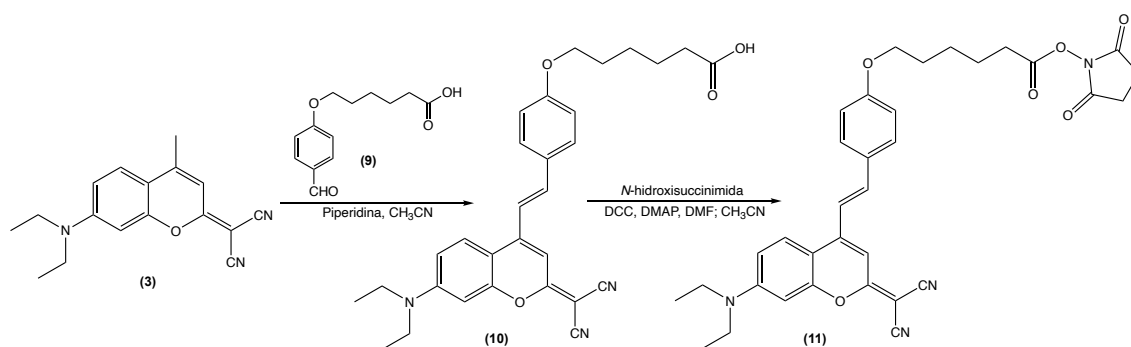
De acordo com as propriedades fotofísicas dos derivados 4-estirilo, **4** a **7**, e respectivos cálculos DFT e TDDFT, os candidatos mais promissores para futuros marcadores fluorescentes serão aqueles que apresentam doadores na posição *para* no substituinte 4-estirilo. Considerando esta premissa e também a de que os marcadores fluorescentes devem conter um espaçador e um grupo reativo ao grupo amino, neste caso um éster succinimidílico, idealizaram-se as estruturas moleculares apresentadas no Esquema II.4.



Esquema II.4. Estruturas moleculares para marcadores fluorescentes derivados do 2-(7-dietil-amino-4-metil-2H-cromen-2-ilideno)malononitrilo (**3**).

II.1.1.2.1. Síntese do marcador fluorescente, (*E*)-2-(4-2-2-(dicianometileno)-7-dietilamino-2*H*-cromen-4-il)vinil)fenoxi)hexanoato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo (**11**)

A estratégia de síntese de um marcador fluorescente, como anteriormente referido, o (*E*)-2-(4-2-2-(dicianometileno)-7-(dietilamino)-2*H*-cromen-4-il)vinil)fenoxi)hexanoato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo (**11**), foi delineada usando o ácido (*E*)-2-(4-(2-(2-(dicianometileno)-7-(dietilamino)-2*H*-cromen-4-il)vinil)fenoxi)hexanóico (**10**), como precursor (Esquema II.5). De referir que o ácido 6-(4-formilfenoxi)hexanóico (**9**) foi obtido através da hidrólise do produto da reação entre o 4-hidroxibenzaldeído e do 6-bromo-hexanoato de etilo (**8**), compostos acessíveis e de baixo custo (Reações IV.1.2.7 a IV.1.2.8).



Esquema II.5. Síntese do marcador fluorescente, (*E*)-2-(4-2-2-(dicianometileno)-7-(dietilamino)-2*H*-cromen-4-il)vinil)fenoxi)hexanoato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo (**11**).^[84]

O ácido (*E*)-2-(4-(2-(2-(dicianometileno)-7-dietilamino-2*H*-cromen-4-il)vinil)fenoxi)hexanóico (**10**), foi sintetizado através de uma reação de condensação aldólica entre o 2-(7-dietilamino-4-metil-2*H*-cromen-2-ilideno)malononitrilo (**3**) e o ácido 6-(4-formilfenoxi)hexanóico (**9**) (Reação IV.1.2.9). A síntese do marcador fluorescente (*E*)-2-(4-2-2-(dicianometileno)-7-dietilamino-2*H*-cromen-4-il)vinil)fenoxi)hexanoato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo (**11**), funcionalizado com um éster succinimídico está descrita na reação IV.1.2.10.

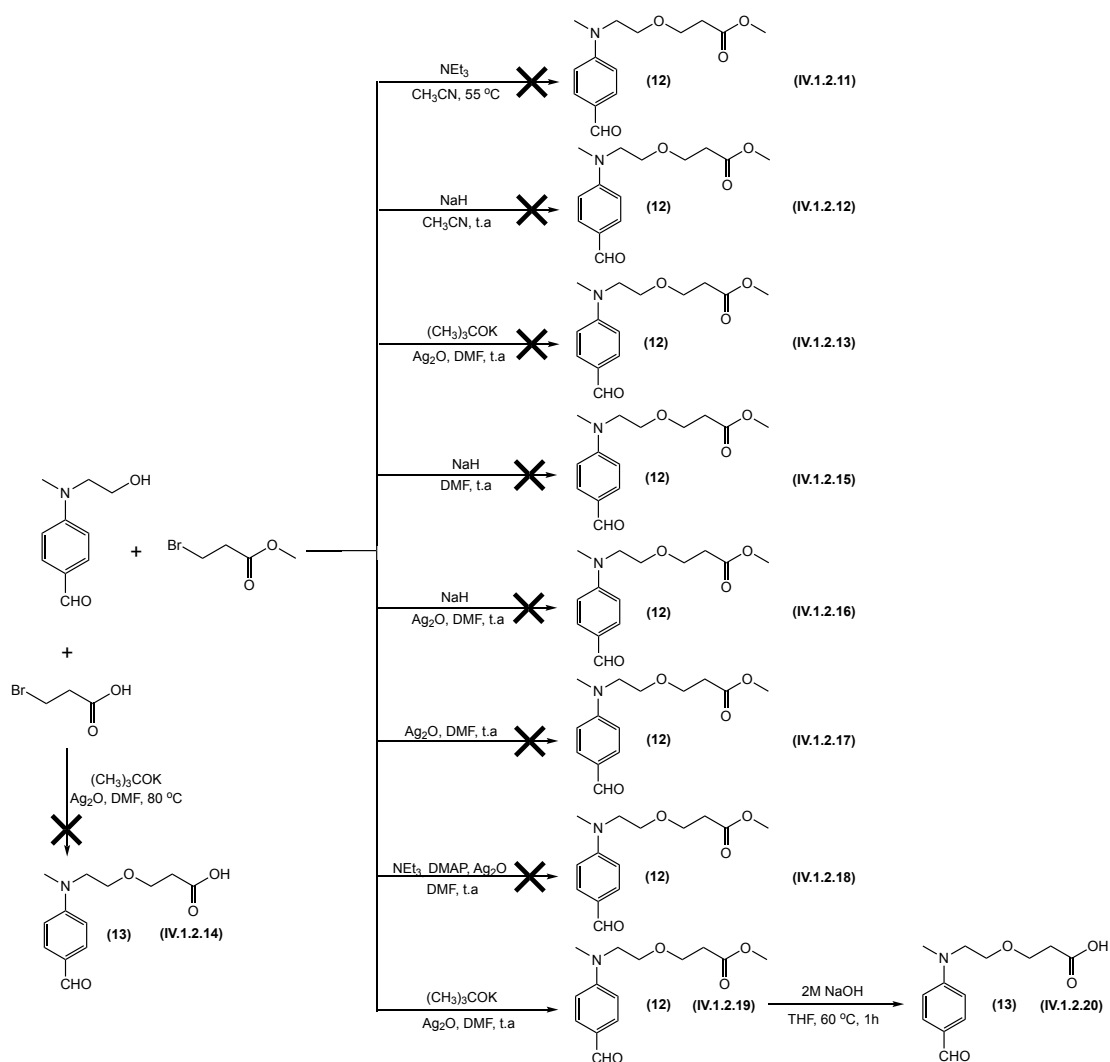
O espectro de ¹H RMN apresenta um singuleto a 2.85 ppm, característico dos quatros prótons dos dois grupos metileno do grupo succinimida e o espectro de ¹³C RMN apresenta um sinal a 169.3 ppm, característico dos grupos carbonilo do referido grupo, o que comprova a sua presença no produto final. Os valores de massa exata são concordantes com a estrutura proposta. De referir que este marcador foi obtido com um rendimento global de 56%.

II.1.1.2.2. Síntese do marcador fluorescente, (*E*)-6-((4-(2-(2-(dicianometileno)-7-dietilamino-2*H*-cromen-4-il)vinil)fenil)(metil)amino)hexanoato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo (26)

Para a síntese de um marcador fluorescente com o grupo amino na posição *para* no substituinte 4-estirilo, foram idealizadas e efetuadas diversas tentativas de síntese de um aldeído com as referidas características e que possuísse um espaçador com um grupo carboxilo.

II.1.1.2.2.1. Tentativas de síntese e hidrólise do 3-(2-((4-formilfenil)(metil)amino)etoxi)propanoato de metilo (12)

Foram realizadas várias tentativas de síntese (Reações IV.1.2.11 a IV.1.2.19), do 3-(2-((4-formilfenil)(metil)amino)etoxi)propanoato de metilo (**12**), usando diferentes condições reacionais, no que concerne à ordem de adição de reagentes, bases e solventes (Esquema II.6).

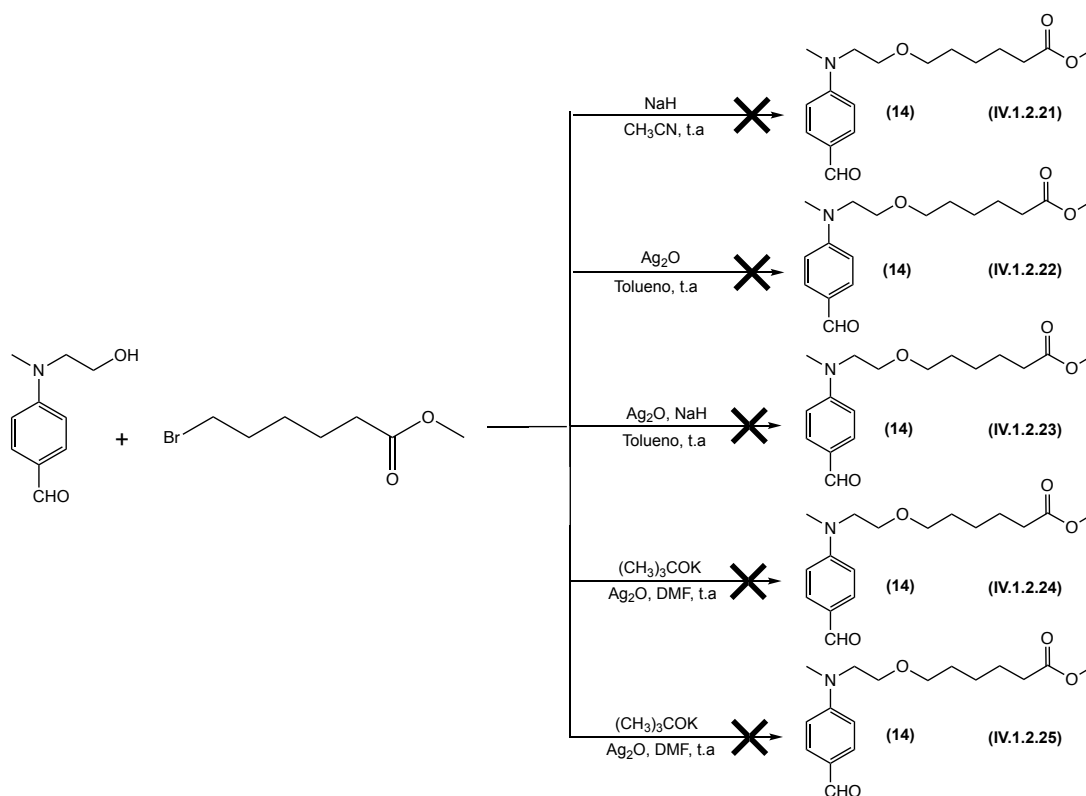


Esquema II.6. Tentativas de síntese e hidrólise do 3-(2-((4-formilfenil)(metil)amino)etoxi)propanoato de metilo (**12**).

Nas tentativas de síntese das reações IV.1.2.11 a IV.1.2.18 não houve formação do 3-(2-((4-formilfenil)(metil)amino)etoxi)propanoato de metilo (**12**), ou seja, estes resultados sugerem que a acidez dos prótons β do 3-bromopropanoato de metilo pode levar à formação de acrilato de metilo. Na reação IV.1.2.19 em que foram usados os mesmos reagentes da reação IV.1.2.13, mas com uma diferente ordem de adição, foi obtido o composto **12** com um rendimento de 40%, o que confirma o que foi anteriormente sugerido. A hidrólise efetuada na reação IV.1.2.19 produziu o ácido 3-(2-((4-formilfenil)(metil)amino)etoxi)propanóico (**13**) com um rendimento muito baixo (16%), o que inviabilizou a sua utilização de acordo com os objetivos deste trabalho.

II.1.1.2.2.2. Tentativas de síntese do 3-(2-((4-formilfenil)(metil)amino)etoxi)propanoato de metilo (**14**)

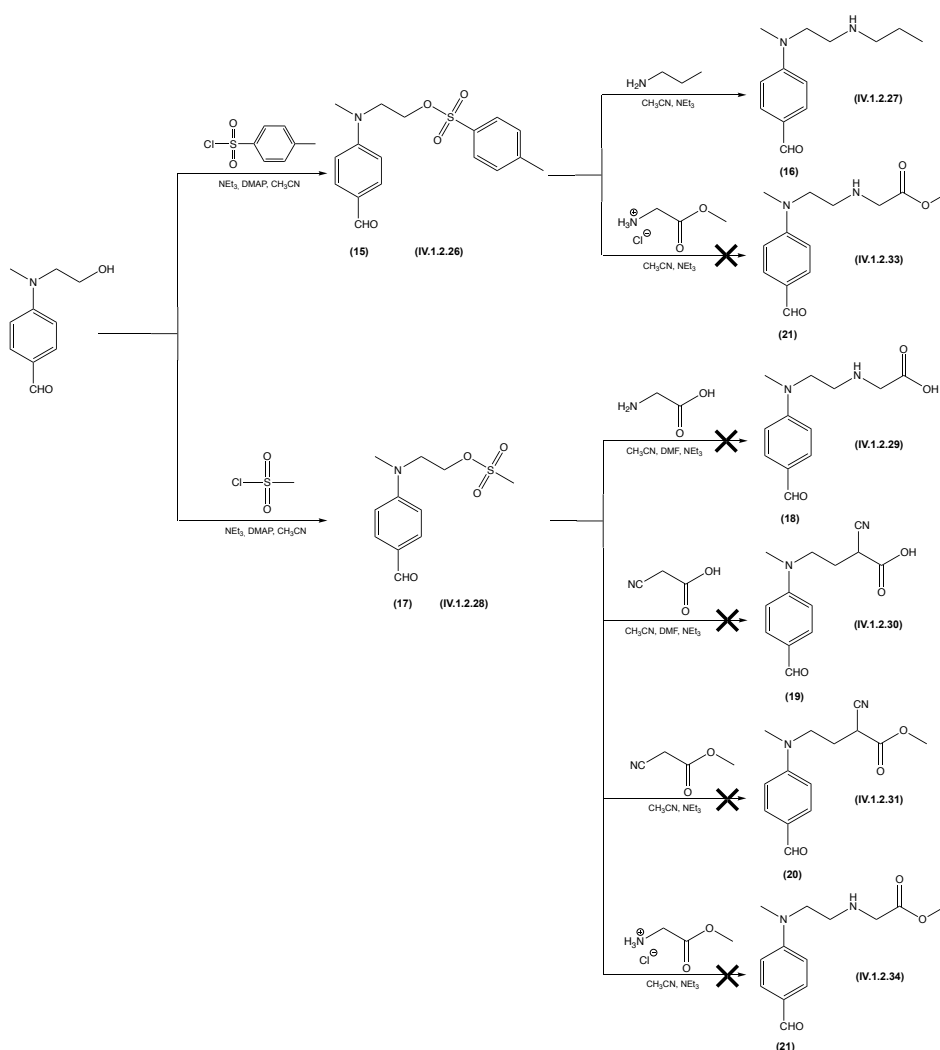
Com o intuito de verificar se os resultados anteriormente obtidos se deviam à formação do acrilato de metilo por um processo de eliminação, usou-se um reagente de alquilação com uma cadeia metilénica superior, o 3-bromo-hexanoato de metilo. Nas tentativas de síntese das reações IV.1.2.21 a IV.1.2.25 houve formação de múltiplos produtos secundários, sem a obtenção do desejado 3-(2-((4-formilfenil)(metil)amino)etoxi)propanoato de metilo (**14**) (Esquema II.7).



Esquema II.7. Tentativas de síntese do 3-(2-((4-formilfenil)(metil)amino)etoxi)propanoato de metilo (**14**).

II.1.1.2.2.3. Síntese de 4-formilfenil(metil)amino sulfonatos como reagentes passíveis de substituições nucleófilas

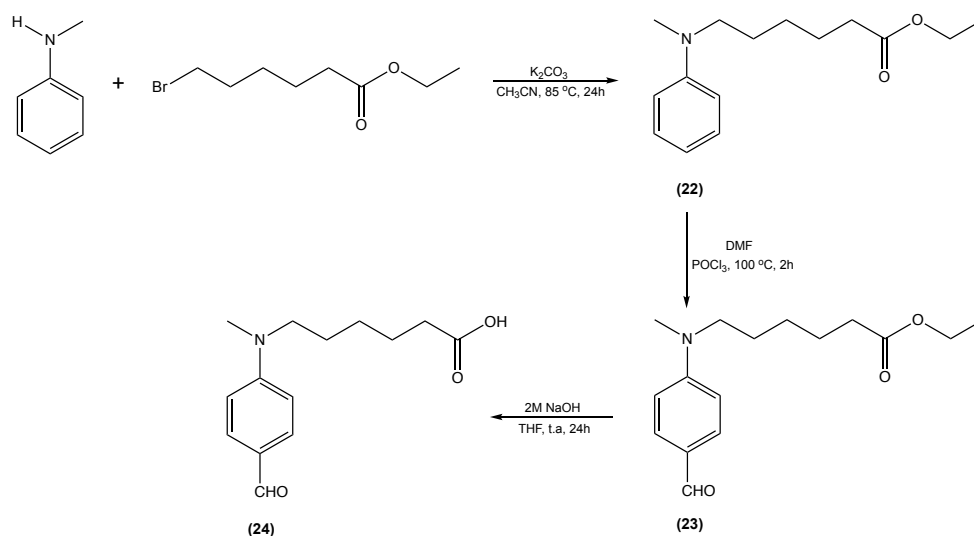
Numa outra tentativa para sintetizar um aldeído, com um grupo amino na posição *para* e com um espaçador que incluísse um grupo carboxilo, sintetizaram-se dois 4-formilfenil(metil)amino sulfonatos, **15** e **17**, como reagentes passíveis de substituições nucleófilas. Num primeiro ensaio (reação IV.1.2.27), entre o 4-metilbenzenossulfonato de 2-((4-formilfenil)(metil)amino)etilo (**15**) e a propilamina obteve-se o 4-(metil(2-(propil-amino)etil)amino)benzaldeído (**16**), com um rendimento de 50%. Este rendimento mediano perspetivava a possibilidade de obtenção de uma outra tipologia de aldeídos, o que não veio a ocorrer (Esquema II.8). Estes e os anteriores resultados negativos, conjugados com a ausência do sinal característico do grupo formilo nos espetros de ^1H e ^{13}C -RMN dos produtos secundários, sugerem que este grupo deverá ser bastante reativo, não permitindo a obtenção dos produtos desejados.



Esquema II.8. Síntese de 4-formilfenil(metil)amino sulfonatos como reagentes passíveis de substituições nucleófilas.

II.1.1.2.2.4. Síntese do ácido 6-((4-formilfenil)(metil)amino)hexanóico (24)

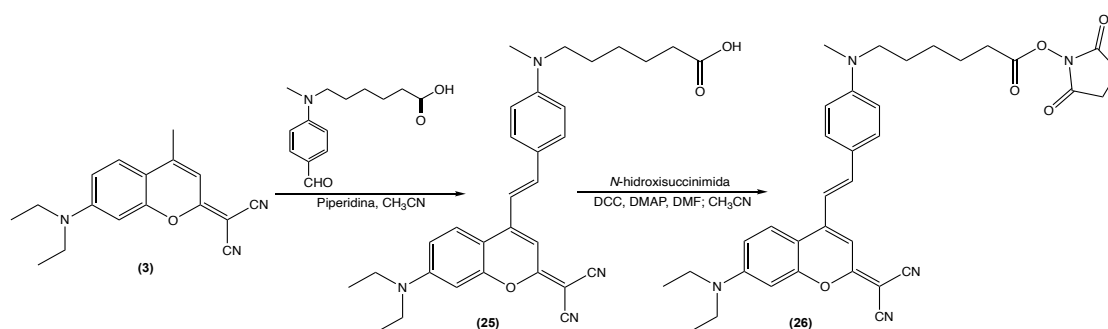
Para contornar a possível reatividade do grupo formilo, idealizou-se a sua introdução no final do processo sintético, através de uma reação de formilação de Vilsmeier-Haack (Esquema II.9). De referir que o ácido 6-((4-formilfenil)(metil)amino)hexanóico (**24**) foi obtido a partir da *N*-metilanilina e do 6-bromo-hexanoato de etilo, compostos acessíveis e de baixo custo (Reações IV.1.2.35 a IV.1.2.37).



Esquema II.9. Síntese do ácido 6-((4-formilfenil)(metil)amino)hexanóico (**24**).

II.1.1.2.3. Síntese do marcador fluorescente, (*E*)-6-((4-(2-(2-(dicianometileno)-7-dietilamino-2*H*-cromen-4-il)vinil)fenil)(metil)amino)hexanoato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo (**26**)

A estratégia de síntese do marcador fluorescente (*E*)-6-((4-(2-(2-(dicianometileno)-7-dietilamino-2*H*-cromen-4-il)vinil)fenil)(metil)amino)hexanoato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo (**26**), foi delineada usando o ácido (*E*)-6-((4-(2-(2-(dicianometileno)-7-dietilamino-2*H*-cromen-4-il)vinil)fenil)(metil)amino)hexanóico (**25**), como precursor (Esquema II.10).



Esquema II.10. Síntese do marcador fluorescente, (*E*)-6-((4-(2-(2-(dicianometileno)-7-dietilamino-2*H*-cromen-4-il)vinil)fenil)(metil)amino)hexanoato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo (**26**).^[82]

O ácido (*E*)-6-((4-(2-(2-(dicianometileno)-7-dietilamino-2*H*-cromen-4-il)vinil)fenil)(metil)amino)hexanóico (**25**), foi sintetizado através de uma reação de condensação aldólica entre o 2-(7-dietilamino-4-metil-2*H*-cromen-2-ilideno)malononitrilo (**3**) e o ácido 6-((4-formilfenil)(metil)amino)hexanóico (**24**), descrita na reação IV.1.2.38. A síntese do marcador fluorescente (*E*)-6-((4-(2-(2-(dicianometileno)-7-dietilamino-2*H*-cromen-4-il)vinil)fenil)(metil)amino)hexanoato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo (**26**), funcionalizado com um éster succinimidílico está descrita na reação IV.1.2.39.

O espectro de ¹H RMN apresenta um singuleto a 2.85 ppm, característico dos quatros prótons dos dois grupos metileno do grupo succinimida e o espectro de ¹³C RMN apresenta um sinal a 169.3 ppm, característico dos grupos carbonilo do referido grupo, o que comprova a sua presença no produto final. Os valores de massa exata são concordantes com a estrutura proposta. De referir que este marcador foi obtido com um rendimento global de 61%.

II.1.1.2.4. Propriedades fotofísicas dos marcadores fluorescentes, (E)-2-(4-2-2-(dicianometileno)-7-(dietilamino)-2H-cromen-4-il)vinil)fenoxi)-hexanoato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo (11) e (E)-6-((4-(2-(2-(dicianometileno)-7-dietilamino-2H-cromen-4-il)vinil)fenil)(metil)amino)hexanoato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo (26)

As propriedades fotofísicas dos novos marcadores fluorescentes **11** e **26**, nomeadamente as suas propriedades de absorção e emissão, desvio de Stokes, absorvidade molar e rendimento quântico de fluorescência, foram avaliadas e estão registadas na Tabela II.2.

Tabela II.2. Propriedades fotofísicas dos marcadores fluorescentes, (E)-2-(4-2-2-(dicianometileno)-7-(dietilamino)-2H-cromen-4-il)vinil)fenoxi)hexanoato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo (**11**) e (E)-6-((4-(2-(2-(dicianometileno)-7-dietilamino-2H-cromen-4-il)vinil)fenil)(metil)amino)hexanoato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo (**26**).^[82]

Composto	λ_{abs}^a (nm)	λ_{em}^b (nm)	Desvio de Stokes (nm, cm^{-1})	ϵ^c ($\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$)	Φ_F^d
10	519	596	77, 2489	24000	0.28
11	523	597	74, 2370	24000	0.29
25	500 (578) ^e	628	128, 4076	59000	0.27
26	498 (576) ^e	624	126, 4055	59000	0.27

^aMáximos de absorção em CH_3CN . ^bMáximos de emissão em CH_3CN . ^cAbsortividade molar na transição de comprimento de onda mais longo. ^dRendimento quântico de fluorescência em EtOH, determinado utilizando 7-dietilamino-4-metil-coumarina ($\Phi_F = 0.73$ em EtOH) como padrão. ^eOmbro.^[118]

Na Figura II.3 estão representados os espectros de absorção dos marcadores fluorescentes derivados do 2-(7-dietilamino-4-metil-2*H*-cromen-2-ilideno)malononitrilo (**3**).

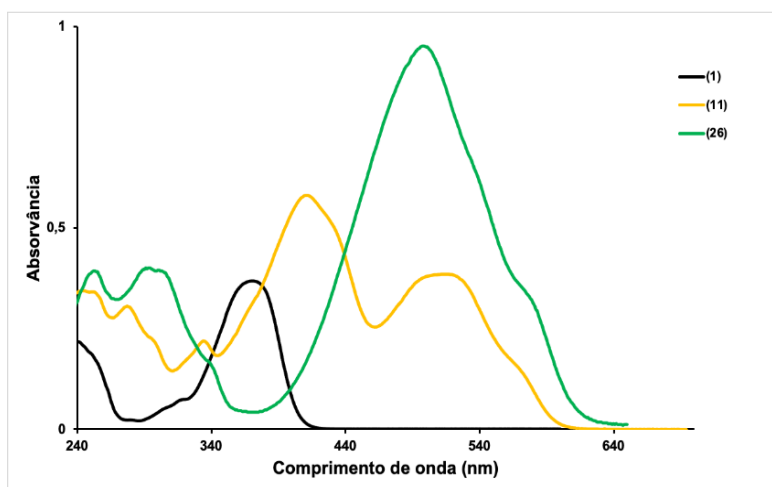


Figura II.3. Espectros de absorção da 7-dietilamino-4-metilcoumarina (**1**) e dos marcadores fluorescentes, (*E*)-2-(4-2-2-(dicianometileno)-7-(dietilamino)-2*H*-cromen-4-il)vinil)fenoxi)hexanoato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo (**11**) e (*E*)-6-((4-(2-(2-(dicianometileno)-7-dietilamino-2*H*-cromen-4-il)vinil)fenil)(metil)amino)hexanoato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo (**26**), em CH₃CN.

As absorptividades molares dos marcadores fluorescentes **11** e **26**, foram fortemente influenciadas pela natureza dos grupos doadores de elétrons do substituinte estirilo na posição 4 (ϵ (**11**) = 24000 cm⁻¹M⁻¹ vs. ϵ (**26**) = 59000 cm⁻¹M⁻¹), ou seja, a presença dum grupo amino nessa posição mais do que duplicou a absorptividade molar quando comparado com o grupo alcóxi.

O superior carácter doador de elétrons do grupo amino no referido substituinte 4-estirilo, quando comparado com o congénere alcóxi, também quase duplicou o desvio de Stokes devido à sua elevada influência no sistema π conjugado da molécula, que é essencial para um eficaz processo de transferência de carga intramolecular do estado excitado emissivo. Os marcadores fluorescentes com elevados desvios de Stokes oferecem uma vantagem devido à possível eliminação da sobreposição espectral entre a absorção e a emissão, o que reduz a interferência e o processo de extinção de fluorescência, proporcionando uma deteção mais simples e eficaz da emissão de fluorescência. Os marcadores fluorescentes com elevados desvios de Stokes são muito importantes para as aplicações de transferência de energia por ressonância do tipo Förster (FRET) e para a microscopia ótica baseada na depleção de emissão estimulada (STED).^[220, 221]

II.1.1.2.5. Cálculos DFT e TDDFT para os marcadores fluorescentes **11** e **26**

Para os marcadores fluorescentes **11** e **26**, as excitações de mais baixa energia S_1 e S_2 são, essencialmente, transições HOMO→LUMO e HOMO-1→LUMO, respetivamente, e as suas forças de oscilador relativas dependem da presença do grupo amino ou alcóxi, em posição *para* do substituinte 4-estirilo (Tabela VI.4 (Anexos)). Para o composto com o grupo alcóxi (**11**), a excitação S_2 foi dominante, enquanto a S_1 foi a mais intensa para o composto com o grupo amino (**26**), o que explica a elevada absortividade molar observada no composto com o grupo amino em comparação com o seu homólogo alcóxi (Figura II.4).

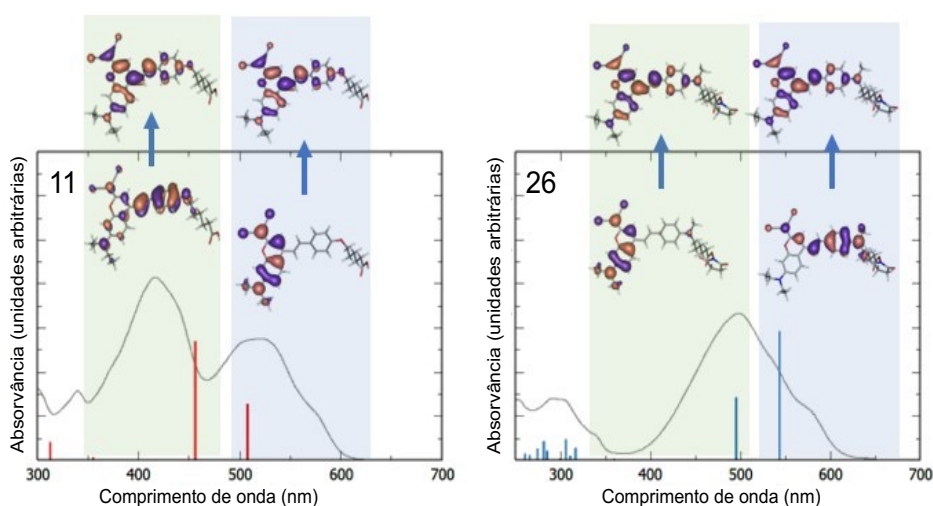


Figura II.4. Espectros experimentais (cinzento) comparados com as excitações calculadas (vermelho e azul) e as orbitais moleculares envolvidas nas duas transições eletrônicas de mais baixa energia dos marcadores fluorescentes **11** e **26**, em CH_3CN .^[82]

A forma e a distribuição espacial dos estados HOMO, HOMO-1 e LUMO apresentam diferenças notáveis, indicando características distintas da transferência de carga intramolecular que ocorreu na excitação. Para os marcadores fluorescentes **11** e **26**, nem a HOMO, nem a HOMO-1, nem as orbitais LUMO apresentaram contribuições relevantes sobre o grupo reativo ligado, indicando que este não participa no sistema π conjugado e não interfere no processo de excitação. Esta é uma característica importante, uma vez que é desejável uma interferência mínima da ligação dos marcadores fluorescentes a uma biomolécula com as suas propriedades de fluorescência.

Relativamente aos estados HOMO, a principal característica relevante foi que estas orbitais estavam maioritariamente localizadas nos anéis fundidos para o composto **11** com o grupo alcóxi, enquanto para o composto **26** com o grupo amino estavam localizadas no substituinte 4-estirilo. O inverso ocorreu para as orbitais HOMO-1, com a HOMO do composto **11** a apresentar grande semelhança com a HOMO-1 do composto **26** e vice-versa.

Para ambos os marcadores, as orbitais LUMO apresentam uma menor localização e extensão sobre a zona de ligação. Esta extensão facilita as absorções de transferência de carga interna de baixa energia. A transição mais intensa, quer seja a de maior comprimento de onda ou não, corresponde a uma transição do estado localizado maioritariamente no substituinte 4-estirilo para a LUMO, o que sugere que estes são os estados que se sobrepunham em maior escala com as orbitais LUMO. A transição de mais baixa energia no composto **26**, que exhibe a maior força de oscilador, envolve um processo de transferência de carga do substituinte 4-estirilo para os anéis fundidos, destacando a capacidade doadora significativa do grupo amino ligado ao substituinte 4-estirilo.

O índice Δr ,^[222] uma medida quantitativa da distância da transferência de carga, foi utilizado para caracterizar a natureza das transições eletrónicas. As transições que exibem um índice Δr substancial indicam um carácter significativo de transferência de carga, com um limiar geralmente aceite de 2.0 Å utilizado como critério para atribuir o carácter de transferência de carga. Seguindo este critério, a maioria das excitações S_1 e S_2 pode ser classificada como transferência de carga, com o composto **11** a apresentar os valores inferiores (Tabela VI.4 (Anexos)).

Na Figura II.5 estão representadas as geometrias moleculares otimizadas dos marcadores fluorescentes **11** e **26**, tanto no estado fundamental como no primeiro estado excitado singuleto. No estado fundamental, os referidos marcadores apresentaram um desvio da planaridade entre o plano médio dos anéis fundidos e o plano do substituinte 4-estirilo. Este desvio limita a conjugação π entre os grupos doadores e aceptores nas moléculas.

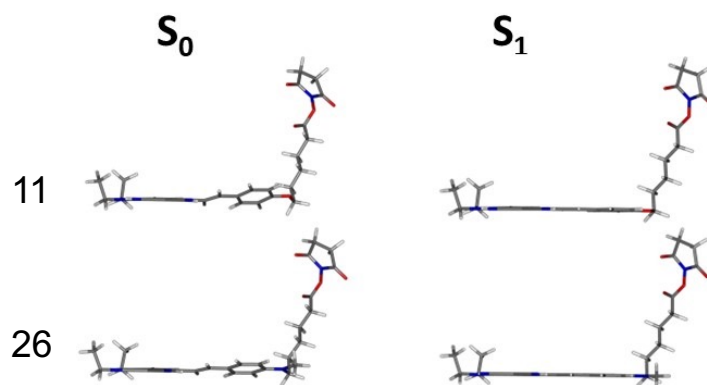


Figura II.5. Geometrias moleculares otimizadas, calculadas ao nível PBE0/6-31G (d,p), no estado fundamental e no primeiro estado excitado singuleto dos marcadores fluorescentes **11** e **26**, em CH_3CN .^[82]

Em contrapartida, o estado excitado S_1 revelou um cenário distinto, em que as moléculas se tornaram quase planares. Os desvios da planaridade foram mínimos, tendo o composto **26** um mínimo de 0.1° e o composto **11** um valor de 0.7° . A transição do estado S_0 para o estado S_1 também foi caracterizada por uma diminuição da alternância do comprimento da ligação calculada (BLA), que diminuiu consideravelmente, para todos os compostos, no estado excitado S_1 . No estado S_0 , os compostos exibiram variações de BLA, sendo de 0.08 \AA para o composto **26** e de 0.10 \AA para o composto **11**. No entanto, no estado excitado S_1 , o BLA diminuiu significativamente para 0.04 \AA em ambos os compostos (Tabela VI.5 (Anexos)).

De acordo com a regra de Kasha,^[223] a fluorescência, na maioria dos casos, restringe-se ao estado excitado de mais baixa energia, sendo que os estados eletrônicos excitados mais elevados não contribuem diretamente para a emissão de fluoróforos excitados. Por conseguinte, as emissões dos marcadores estudados seriam provenientes do estado S_1 . As propriedades de emissão dos marcadores foram calculadas a partir da geometria otimizada do estado S_1 e estão representadas na Tabela VI.6 (Anexos). Os comprimentos de onda de emissão $S_1 \rightarrow S_0$ foram sistematicamente maiores do que os correspondentes ao processo de absorção $S_0 \rightarrow S_1$

com base na geometria otimizada do estado fundamental. As mudanças de geometria observadas que ocorreram no estado excitado S_1 promoveram uma deslocalização eletrônica efetiva dentro no sistema π conjugado, resultando numa redução da diferença de energia entre HOMO e LUMO. Consequentemente, após uma excitação vertical, houve um notável relaxamento estrutural do estado excitado que ocorreu antes da emissão,^[217, 218] o que levou a uma menor energia de emissão em comparação com a energia de excitação, resultando assim num substancial desvio de Stokes.

A partir da geometria otimizada do estado excitado de menor energia S_1 , o tempo de vida de fluorescência teórico do estado excitado pode ser calculado, pela equação de Einstein da probabilidade de transições espontâneas:

$$\tau = \frac{c^3}{2E^2f}$$

em que τ é o tempo de vida de fluorescência, c é a velocidade da luz no vácuo, E é a energia de transição e f é a força de oscilador correspondente da transição $S_1 \rightarrow S_0$. Os tempos de vida fluorescente calculados para os marcadores fluorescentes **11** e **26** são inferiores a 10 ns, típicos de estados emissivos de fluoróforos orgânicos, enquanto tempos de vida radiativos maiores corresponderam a estados não radiativos (Tabela VI.6 (Anexos)). No entanto, uma vez que o composto com o grupo amino apresentou uma maior força de oscilador na transição $S_1 \rightarrow S_0$, o seu tempo de vida de fluorescência foi mais curto em comparação com o do seu homólogo com o grupo alcóxi.

II.1.1.3. Análise do potencial dos novos marcadores fluorescentes 11 e 26, através da técnica FISH

II.1.1.3.1. Modelo *Saccharomyces cerevisiae* com as sondas EUK516-(11) e EUK516-(26)

Os resultados obtidos por citometria de fluxo da hibridação de células de *Saccharomyces cerevisiae* com sondas oligonucleotídicas comerciais e sintetizadas são apresentados na Figura II.6. Após a análise destes resultados, é evidente que as células de levedura, quando marcadas com as sondas oligonucleotídicas EUK516, apresentaram uma intensidade de fluorescência relevante quando comparada com a autofluorescência das células de *S. cerevisiae* não marcadas. Este resultado está de acordo com as expectativas, uma vez que estas sondas são dirigidas à região do ARNr das células eucarióticas (Figura II.6; A, C e E).

As células hibridadas com a sonda EUK516-Cy3 (controlo positivo) apresentaram também uma elevada intensidade de fluorescência quando comparada com a sua autofluorescência (Figura II.6; A). Este sinal de fluorescência indica uma hibridação bem-sucedida da sonda EUK516-Cy3, o que é indicativo de taxas de ligações efetivas. Em contrapartida, e como previsto, as células expostas à sonda EUB338-Cy3 (controlo negativo) emitiram sinais de fluorescência comparáveis à autofluorescência das células não marcadas, indicando a ausência de hibridação (Figura II.6, B). Assim, esta sonda serve como controlo negativo em experiências que envolvem células eucarióticas, confirmando que nas condições experimentais, a autofluorescência celular permite uma deteção específica e seletiva.

As células de *S. cerevisiae* hibridadas com as sondas EUK516-(11) e EUK516-(26) apresentaram sinais de fluorescência (Figura II.6; C e E), mas as que foram submetidas a hibridação com as sondas EUB338-(11) e EUB338-(26), apenas produziram sinais de autofluorescência (Figura II.6; D e F).^[224]

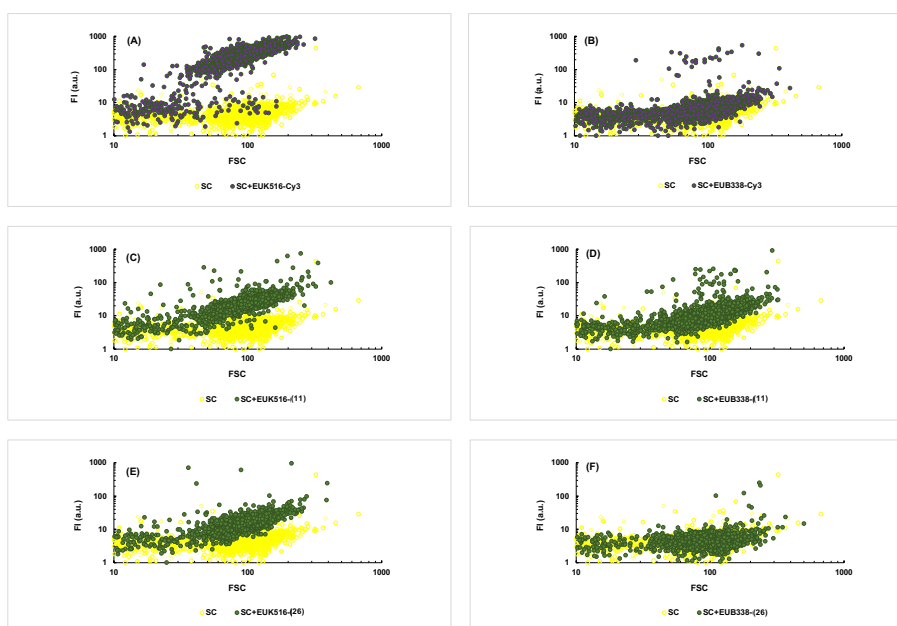


Figura II.6. Resultados de citometria de fluxo (intensidade de fluorescência (FI)/difusão direta (FSC)) referentes aos ensaios de hibridação das células de *Saccharomyces cerevisiae* (SC) com as sondas oligonucleotídicas: **(A)** EUK516-Cy3, **(B)** EUB338-Cy3, **(C)** EUK516-(11), **(D)** EUB338-(11), **(E)** EUK516-(26) e **(F)** EUB338-(26).

As células de *S. cerevisiae* hibridadas com a sonda EUK516-(**11**) apresentaram uma percentagem substancial de células fluorescentes ($\cong 65\%$), muito semelhante aos valores observados ($\cong 77\%$) com a sonda comercial EUK516-Cy3 (Figura II.7). Estes resultados demonstram de forma inequívoca a eficácia desta sonda para marcar células de *S. cerevisiae*. Embora se tenham obtido percentagens inferiores de células fluorescentes com a sonda EUK516-(**26**), esta demonstrou ainda assim uma capacidade notável de marcação das referidas células (Figura II.7).

A etapa de lavagem da técnica FISH poderá explicar o ligeiro aumento na percentagem de células fluorescentes observadas para as células marcadas com a sonda EUB338-Cy3 e EUB338-(**11**), quando comparadas com os mesmos valores das células de *S. cerevisiae*.^[224] O aumento de fluorescência observado poderá estar relacionado com ligações inespecíficas dos marcadores às células e/ou também da sua incompleta remoção durante a referida etapa.

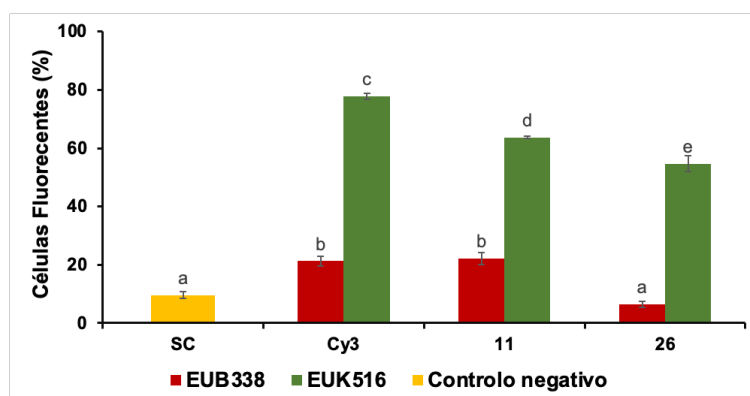


Figura II.7. Percentagem de células fluorescentes das células de *Saccharomyces cerevisiae* (SC) marcadas com as sondas EUK516 e EUB338 com os diferentes marcadores, **11**, **26** e Cy3®, e o controlo negativo. As letras indicam as diferenças estatisticamente significativas ($p < 0.05$).

Os resultados de microscopia de epifluorescência dos ensaios de hibridação envolvendo células de *S. cerevisiae* com as sondas oligonucleotídicas comerciais e sintetizadas são apresentados na Figura II.8. Estes resultados estão diretamente correlacionados com os dados gerados através de citometria de fluxo, confirmando que as sondas oligonucleotídicas EUK516-Cy3, EUK516-(**11**) e EUK516-(**26**), apresentaram sinais de fluorescência muito intensos (Figura II.8; A, C e E).

Como esperado, no contexto dos ensaios de hibridação envolvendo células de *S. cerevisiae* com as sondas oligonucleotídicas EUB338 (controlo negativo), não foi possível observar qualquer sinal de fluorescência (Figura II.8; B, D e F).

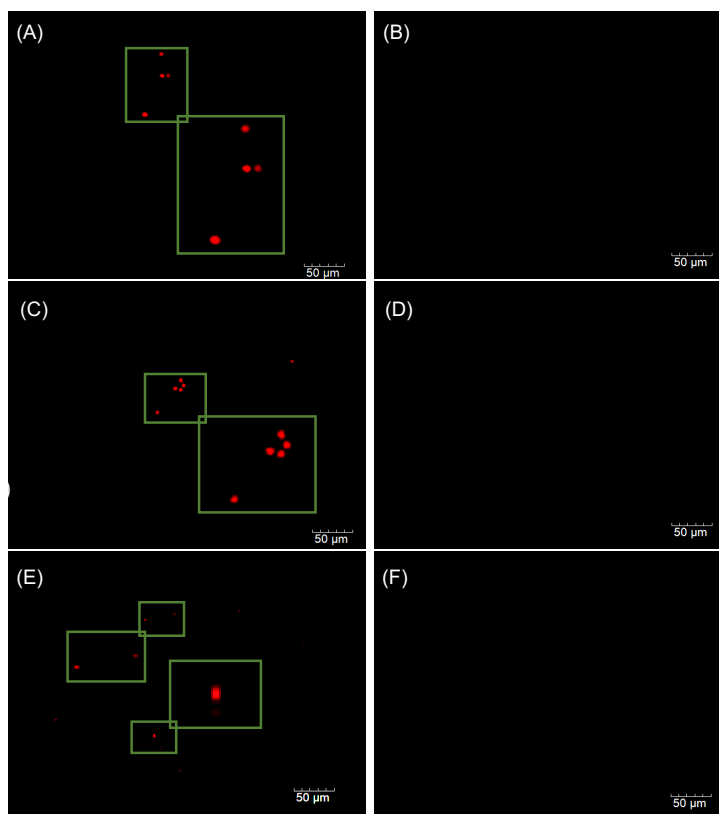


Figura II.8. Microfotografias obtidas através de microscopia de epifluorescência com o filtro TRITC referentes aos ensaios de hibridação das células de *Saccharomyces cerevisiae* com as sondas oligonucleotídicas: **(A)** EUK516-Cy3, **(B)** EUB338-Cy3, **(C)** EUK516-(11), **(D)** EUB338-(11), **(E)** EUK516-(26) e **(F)** EUB338-(26).

II.1.1.3.2. Modelo *Bacillus* sp. com as sondas EUB338-(11) e EUB338-(26)

Os resultados obtidos por citometria de fluxo da hibridação das células de *Bacillus* sp. com as sondas oligonucleotídicas comerciais e sintetizadas são apresentados na Figura II.9. Através da análise dos resultados, é evidente que as células bacterianas, quando marcadas com as sondas oligonucleotídicas EUB338, apresentaram uma elevada intensidade de fluorescência quando comparada com a autofluorescência das células de *Bacillus* sp. não marcadas. Este resultado está de acordo com as expectativas, uma vez que estas sondas são dirigidas à região de ARNr de células procarióticas (Figura II.9; A, C e E).

As células hibridadas com a sonda EUB338-Cy3 apresentaram também uma elevada intensidade de fluorescência quando comparada com a sua autofluorescência (Figura II.9; A). Este sinal de fluorescência indica uma hibridação bem-sucedida da sonda EUB338-Cy3, o que evidencia taxas de ligações efetivas. Por outro lado, as células hibridadas com a sonda EUK516-Cy3 emitiram sinais de fluorescência comparáveis à autofluorescência das células não marcadas, indicando a ausência de hibridação (Figura II.9; B). A referida sonda serve como controlo negativo em experiências que envolvem células procarióticas, confirmando que nas condições experimentais, a autofluorescência celular permite uma deteção específica e seletiva.

As células de *Bacillus sp.* hibridadas com as sondas EUB338-(11) e EUB338-(26) apresentaram sinais de fluorescência (Figura II.9; C e E), enquanto as que foram submetidas a hibridação com as sondas EUK516-(11) e EUK516-(26), apenas produziram sinais de autofluorescência (Figura II.9; D e F).^[224]

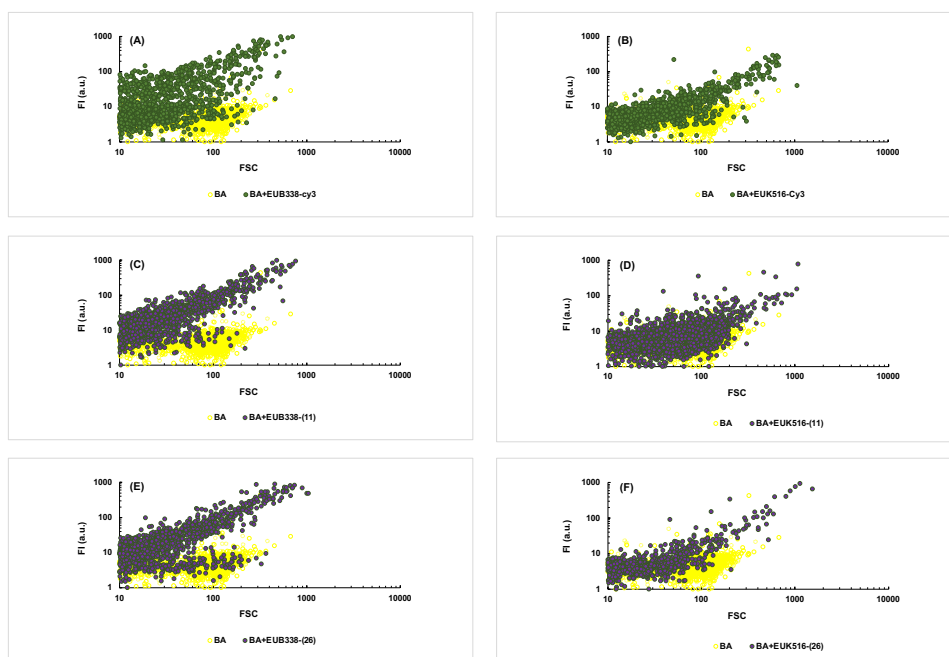


Figura II.9. Resultados de citometria de fluxo (intensidade de fluorescência (FI)/difusão direta (FSC)) referentes aos ensaios de hibridação das células de *Bacillus sp.* (BA) com as sondas oligonucleotídicas: **(A)** EUB338-Cy3, **(B)** EUK516-Cy3, **(C)** EUB338-(11), **(D)** EUK516-(11), **(E)** EUB338-(26) e **(F)** EUK516-(26).

As células de *Bacillus sp.* hibridadas com as sondas oligonucleotídicas sintetizadas, a EUB338-(**11**) e a EUB338-(**26**) apresentaram uma elevada percentagem de células fluorescentes ($\cong 31\%$), muito semelhante ($\cong 36\%$) aos valores observados com a sonda comercial EUB338-Cy3 (Figura II.10). Estes resultados demonstram de forma inequívoca a eficácia desta sonda para marcar células de *Bacillus sp.*. A avaliação da hibridação das células de *Bacillus sp.* com as sondas oligonucleotídicas EUB338-Cy3, EUB338-(**11**) e EUB338-(**26**), revelou que estas apresentaram valores idênticos de percentagem de células fluorescentes aos das células de *Bacillus sp.* não marcadas. Este resultado confirma que os fluoróforos sintetizados se ligaram às respetivas sondas oligonucleotídicas, não estabelecendo ligações inespecíficas com as células.^[224]

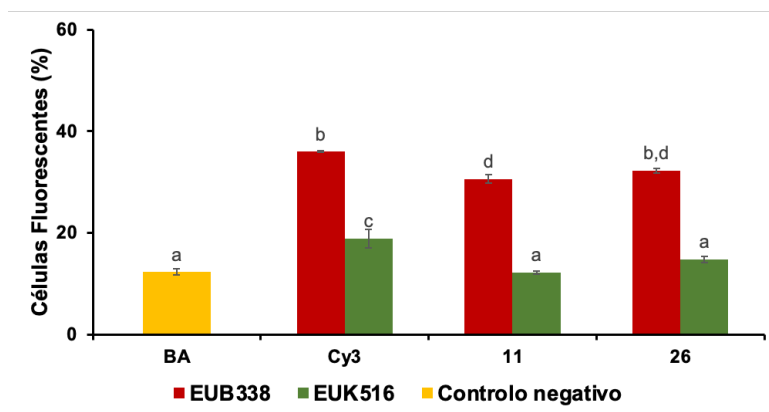


Figura II.10. Percentagem de células fluorescentes das células de *Bacillus sp.* (BA) marcadas com as sondas EUB338 e EUB338-Cy3 com os diferentes marcadores, **11**, **26** e Cy3®, e o controlo negativo. As letras indicam as diferenças estatisticamente significativas ($p < 0.05$).

Na Figura II.11 são apresentados os resultados de microscopia de epifluorescência dos ensaios de hibridação envolvendo células de *Bacillus sp.* com as sondas oligonucleotídicas comerciais e sintetizadas. Os resultados de microscopia de fluorescência estão diretamente correlacionados com os dados gerados através de citometria de fluxo, o que confirma que as sondas oligonucleotídicas EUB338-Cy3, EUB338-(11) e EUB338-(26), apresentaram sinais de fluorescência muito intensos (Figura II.11; A, C e E). Como era esperado, nos ensaios de hibridação com as sondas oligonucleotídicas EUK516 não foi possível observar qualquer sinal de fluorescência (Figura II.11; B, D e F).^[224]

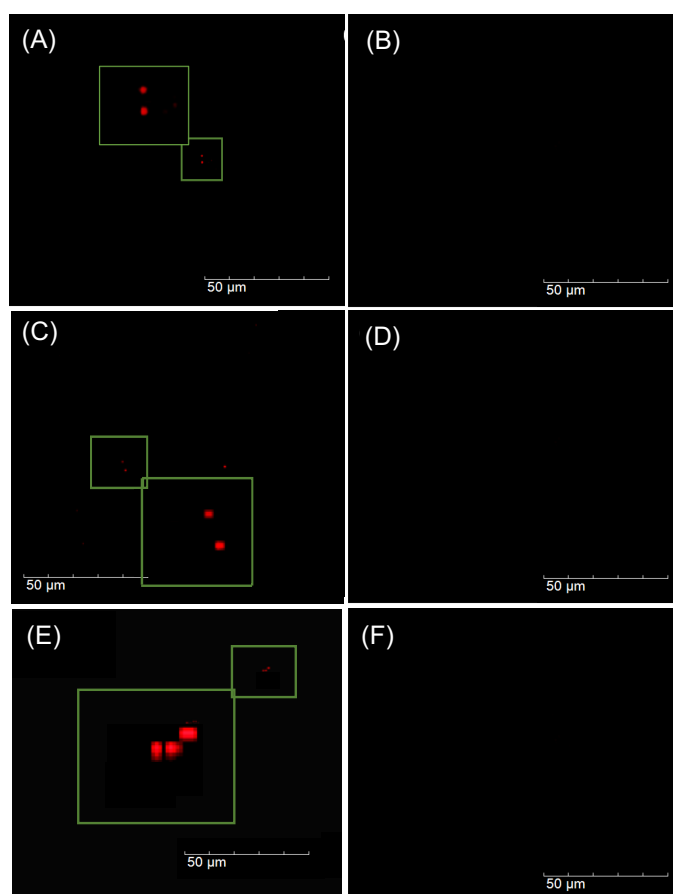
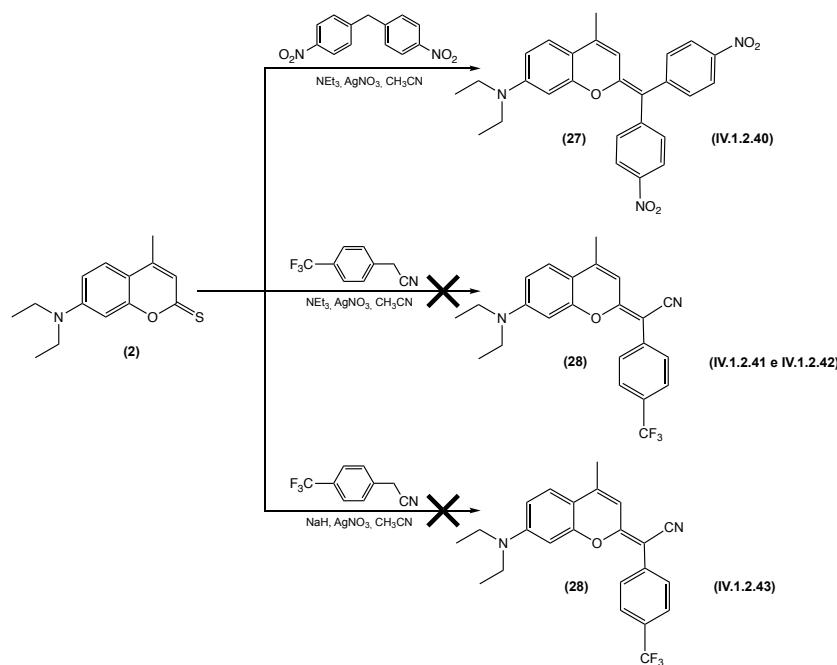


Figura II.11. Microfotografias obtidas através de microscopia de epifluorescência com o filtro TRITC referentes aos ensaios de hibridação das células de *Bacillus sp.* com as sondas oligonucleotídicas: **(A)** EUB338-Cy3, **(B)** EUK516-Cy3, **(C)** EUB338-(11), **(D)** EUK516-(11), **(E)** EUB338-(26) e **(F)** EUK516-(26).

II.1.1.4. Síntese do 2-(bis(4-nitrofenil)metileno)-*N,N*-dietil-4-metil-2*H*-cromen-7-amino (27) e tentativa de síntese do (*E*)-2-(7-dietilamino-4-metil-2*H*-cromen-2-ilideno)-2-(4-(trifluorometil)fenil)acetonitrilo (28)

Com o intuito de potenciar a deslocalização eletrônica, para a obtenção de compostos com superiores desvios batocrômicos, sintetizou-se o 2-(bis(4-nitrofenil)metileno)-*N,N*-dietil-4-metil-2*H*-cromen-7-amino (27) com a introdução de dois grupos 4-nitrofenilo em substituição dos anteriores grupos ciano (Esquema II.11). A presença dos dois substituintes nitro neste novo composto não produziu o efeito desejado, pois o mesmo não apresentou fluorescência, ou seja, a molécula deverá formar um dipolo efetivo com carga positiva no *N*-7 e negativa no grupo nitro.

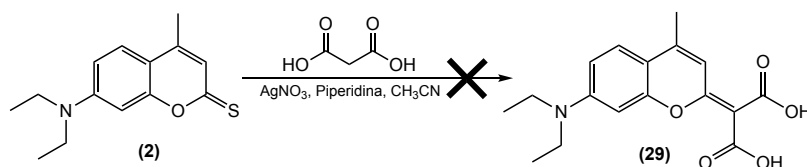
As tentativas de síntese (Reações IV.1.2.41 a IV.1.2.43) do (*E*)-2-(7-dietilamino-4-metil-2*H*-cromen-2-ilideno)-2-(4-(trifluorometil)fenil)acetonitrilo (28), para a inclusão de um grupo 4-(trifluorometil)fenilo em substituição de um grupo ciano, igualmente para obtenção de superiores desvios batocrômicos, revelaram-se infrutíferas (Esquema II.11). A não formação do produto esperado, pode dever-se à existência de reações secundárias entre os prótons metílicos na posição 4 da tiona (2) com os aniões formados a partir dos provavelmente muito ácidos prótons metilénicos do 2-(4-(trifluorometil)fenil)acetonitrilo.



Esquema II.11. Síntese do 2-(bis(4-nitrofenil)metileno)-*N,N*-dietil-4-metil-2*H*-cromen-7-amino (27) e tentativa de síntese do (*E*)-2-(7-dietilamino-4-metil-2*H*-cromen-2-ilideno)-2-(4-(trifluorometil)fenil)acetonitrilo (28).

II.1.1.5. Tentativa de síntese do ácido 2-(7-dietilamino-4-metil-2*H*-cromen-2-ilideno)malônico (29)

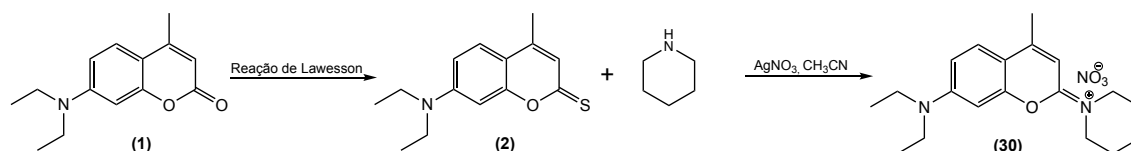
Com o intuito de sintetizar o ácido 2-(7-dietilamino-4-metil-2*H*-cromen-2-ilideno)malônico (29) (Esquema II.12) para a obtenção, por descarboxilação, de um intermediário com apenas um grupo carboxilo, formou-se exclusivamente um produto de cor verde que, por RMN, não correspondia ao produto desejado. A conjugação dos resultados obtidos nas referidas reações, sugere que a formação deste produto verde se deve exclusivamente à reação da 7-dietilamino-4-metil-2*H*-cromen-2-tiona (2) com a piperidina.



Esquema II.12. Tentativa de síntese do ácido 2-(7-dietilamino-4-metil-2*H*-cromen-2-ilideno)malônico (29).

II.1.1.6. Síntese do nitrato de 1-(7-dietilamino-4-metil-2*H*-cromen-2-ilideno)piperidín-1-io (30)

A síntese do nitrato de 1-(7-dietilamino-4-metil-2*H*-cromen-2-ilideno)piperidín-1-io (30) ocorreu durante a anterior tentativa de síntese do ácido 2-(7-dietilamino-4-metil-2*H*-cromen-2-ilideno)malônico (29). O derivado 2-piperidínico da coumarina (30), foi facilmente obtido, após a reação de tionação no grupo carbonilo da 7-dietilamino-4-metilcoumarina (1), seguido da condensação da 7-dietilamino-4-metil-2*H*-cromen-2-tiona (2) com a piperidina (Esquema II.13), com um elevado rendimento (85%).^[118]



Esquema II.13. Síntese do nitrato de 1-(7-dietilamino-4-metil-2*H*-cromen-2-ilideno)piperidín-1-io (30).

Esta nova molécula muito interessante (Figura II.12), apresenta um desvio batocrômico superior a 66 nm quando comparada com o seu precursor (**1**).

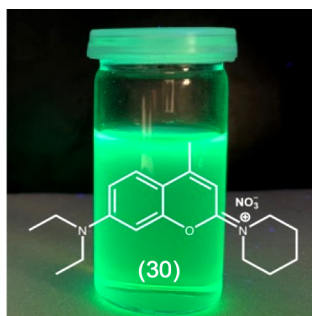


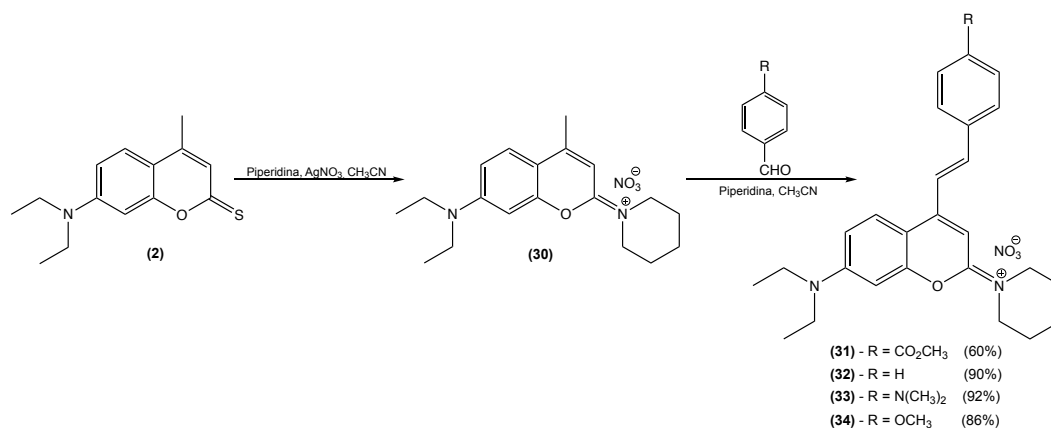
Figura II.12. Nitrato de 1-(7-dietilamino-4-metil-2*H*-cromen-2-ilideno)piperidín-1-io (**30**) em CH₃CN, a 365 nm.

II.1.1.6.1. Síntese dos derivados do nitrato de 1-(7-dietilamino-4-metil-2*H*-cromen-2-ilideno)piperidín-1-io (**30**)

Adicionalmente, e com o objetivo de aumentar a deslocalização dos eletrões π e o carácter *push-pull* da molécula, idealizou-se a inclusão de um grupo estirilo na posição 4 do referido derivado 2-piperidínico da coumarina (**30**). A presença de grupos doadores de eletrões ou aceitadores de eletrões na posição *para* do substituinte 4-estirilo, neste caso e como verificado anteriormente, pode melhorar as propriedades fotofísicas dos respetivos derivados, tais como superiores desvios batocrômicos e elevados desvios de Stokes, assim como elevados rendimentos quânticos de fluorescência.

De acordo com o acima mencionado, sintetizou-se e caraterizou-se espectralmente uma pequena biblioteca de derivados 4-estiril do nitrato de 1-(7-dietilamino-4-metil-2*H*-cromen-2-ilideno)piperidín-1-io (**30**) para explorar o efeito dos grupos doadores de eletrões e aceitadores de eletrões nas propriedades fotofísicas dos novos cromóforos. A principal estratégia sintética para obter os referidos compostos foi delineada considerando possíveis reações de condensação de aldólica no grupo metilo da posição 4 do nitrato de 1-(7-dietilamino-4-metil-2*H*-cromen-2-ilideno)piperidín-1-io (**30**), devido à elevada acidez dos seus protões.

As rotas sintéticas seguidas para a preparação dos novos derivados 4-estiril do nitrato de 1-(7-dietilamino-4-metil-2*H*-cromen-2-ilideno)piperidín-1-io (**30**) estão representadas no Esquema II.14.^[83]



Esquema II.14. Síntese dos derivados 4-estiril do nitrato de 1-(7-dietilamino-4-metil-2*H*-cromen-2-ilideno)piperidín-1-io (**30**).

Os novos compostos **31** a **34**, foram obtidos através de reações de condensação aldólica altamente eficientes e estereosseletivas entre os aldeídos aromáticos (4-formilbenzoato de metilo, benzaldeído, 4-dimetilaminobenzaldeído e 4-metoxibenzaldeído) e o derivado 2-piperidínico da coumarina (**30**), com muito bons a elevados rendimentos reacionais (Reações IV.1.2.46 a IV.1.2.49). Os novos produtos acima mencionados foram facilmente isolados por cromatografia em coluna de sílica e foram completamente caracterizados por espectroscopia de RMN e espectrometria de massa de alta resolução. Todos os dados espectrais foram consistentes com as estruturas propostas.

II.1.1.6.1.1. Propriedades fotofísicas dos derivados 4-estiril do nitrato de 1-(7-dietilamino-4-metil-2*H*-cromen-2-ilideno)piperidín-1-io (**30**)

As propriedades fotofísicas dos novos derivados 4-estiril do nitrato de 1-(7-dietilamino-4-metil-2*H*-cromen-2-ilideno)piperidín-1-io (**30**), **31** a **34**, nomeadamente as suas propriedades de absorção e emissão, assim como os rendimentos quânticos de fluorescência, foram avaliadas e estão registadas na Tabela II.3.

Tabela II.3. Propriedades fotofísicas dos derivados 4-estiril do nitrato de 1-(7-dietilamino-4-metil-2*H*-cromen-2-ilideno)piperidín-1-io (**30**).^[83]

Composto	λ_{abs}^a (nm)	λ_{em}^b (nm)	Desvio de Stokes (nm, cm^{-1})	ε^c ($\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$)	Φ_F^d
1	371	434	63, 3913	22910	0.73
30	437	490	53, 2475	21000	0.14
31	484	609	125, 4241	18000	0.08
32	467	525	58, 2366	17000	0.34
33	485	608	123, 4171	39000	0.98
34	410	578	168, 7089	30000	0.82

^aMáximos de absorção em CH_3CN . ^bMáximos de emissão em CH_3CN . ^cAbsortividade molar na transição de comprimento de onda mais longo. ^dRendimento quântico de fluorescência em EtOH, determinado utilizando 7-dietilamino-4-metil-coumarina ($\Phi_F = 0.73$ em EtOH) como padrão.^[118]

Os espectros de absorção dos novos compostos **31** a **34**, são apresentados na Figura II.13. Quase todos os referidos compostos apresentam máximos de absorção e emissão a comprimentos de onda mais longos, quando comparados com o seu precursor **30**, devido ao efeito de transferência de carga intramolecular entre o grupo dietilamino doador de eletrões, conjugado com os grupos estirilo na posição 4 e o grupo piperidínio aceitador de eletrões na posição 2.

O composto **34**, com o grupo alcóxi como grupo doador de elétrons no substituinte 4-estirilo, apresenta um comportamento diferente dos outros compostos, com um desvio hipsocrômico em relação aos restantes compostos no espectro de absorção, mas o seu elevado valor de máximo de emissão, confere-lhe um elevado desvio de Stokes (Tabela II.3).

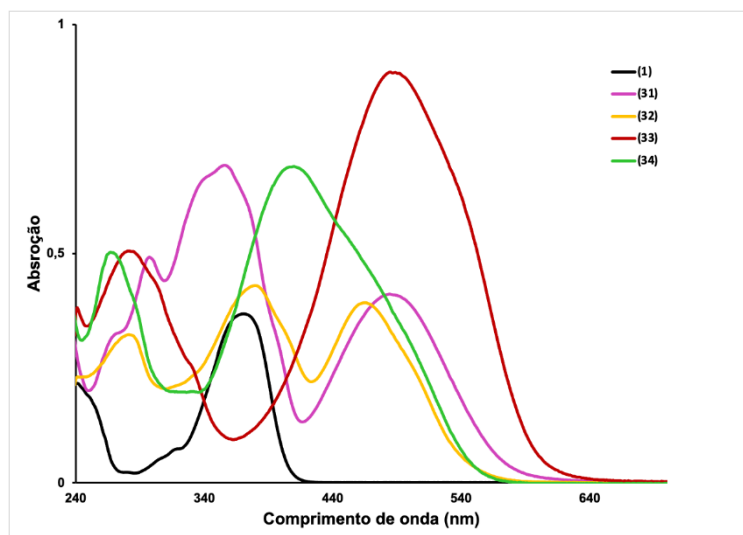


Figura II.13. Espectros de absorção da 7-dietilamino-4-metilcoumarina (**1**) e dos derivados 4-estiril do nitrato de 1-(7-dietilamino-4-metil-2*H*-cromen-2-ilideno)piperidín-1-io (**30**), em CH₃CN.

Em geral, todos os referidos compostos apresentam elevados desvios de Stokes devido à extensão do sistema π conjugado na molécula, que é essencial para um processo eficaz de transferência de carga intramolecular do estado excitado emissivo. Por outro lado, as absortividades molares foram fortemente afetadas pela natureza dos grupos doadores ou aceitadores de elétrons em posição *para* no substituinte 4-estirilo. A análise da Tabela II.2 permite verificar que no caso dos compostos **31** a **34**, os grupos doadores de elétrons promovem elevadas absortividades molares (ex., ϵ (**33**) = 39000 cm⁻¹M⁻¹ vs ϵ (**31**) = 18000 cm⁻¹M⁻¹) e também excelentes rendimentos quânticos de fluorescência (ex., Φ_F (**33**) = 0.98 vs Φ_F (**31**) = 0.08). A extensão do sistema π conjugado promove geralmente um processo eficaz de transferência de carga intramolecular que pode causar a diminuição do rendimento quântico de fluorescência nas moléculas.^[225] Este efeito não é observado nos compostos **33** e **34**, uma vez que estes apresentam rendimentos quânticos de fluorescência elevados, possivelmente devido à presença de fortes substituintes doadores de elétrons na posição *para* dos grupos estirilo.^[221]

Tendo em conta o elevado desvio de Stokes (168 nm) e o elevado rendimento quântico de fluorescência (Φ_F (**34**) = 0.82) induzido pelo grupo metoxi no composto **34**

e a elevada absortividade molar e rendimento quântico de fluorescência (ϵ (**33**) = 39000 $\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$; Φ_F (**33**) = 0.82) induzido pelo grupo dimetilamino no composto **33** (Tabela II.2), selecionámos estes grupos doadores de elétrons para sintetizar os marcadores fluorescentes eficazes e de baixo custo para biomoléculas.

II.1.1.6.1.2. Cálculos DFT e TDDFT para os derivados 4-estiril do nitrato de 1-(7-dietilamino-4-metil-2*H*-cromen-2-ilideno)piperidín-1-io (**30**)

Os espectros de absorção experimentais e calculados, juntamente com as orbitais de fronteira envolvidas nas transições de mais baixa energia dos derivados 4-estiril do nitrato de 1-(7-dietilamino-4-metil-2*H*-cromen-2-ilideno)piperidín-1-io (**30**), estão representados na Figura II.14. Existe uma relevante concordância entre os espectros de absorção calculados e os espectros de absorção experimentais, o que permite detetar as suas principais características e atribuir as bandas de absorção de mais baixa energia em termos de transições orbitais. Para os compostos **31** e **32**, as transições $S_0 \rightarrow S_1$ ou $S_0 \rightarrow S_2$ estão bem separadas, dando origem às duas bandas de absorção representadas nos espectros experimentais. Para os restantes compostos, estas transições apresentam energias mais próximas e fundem-se numa única banda, tal como observado nos espectros experimentais.^[83]

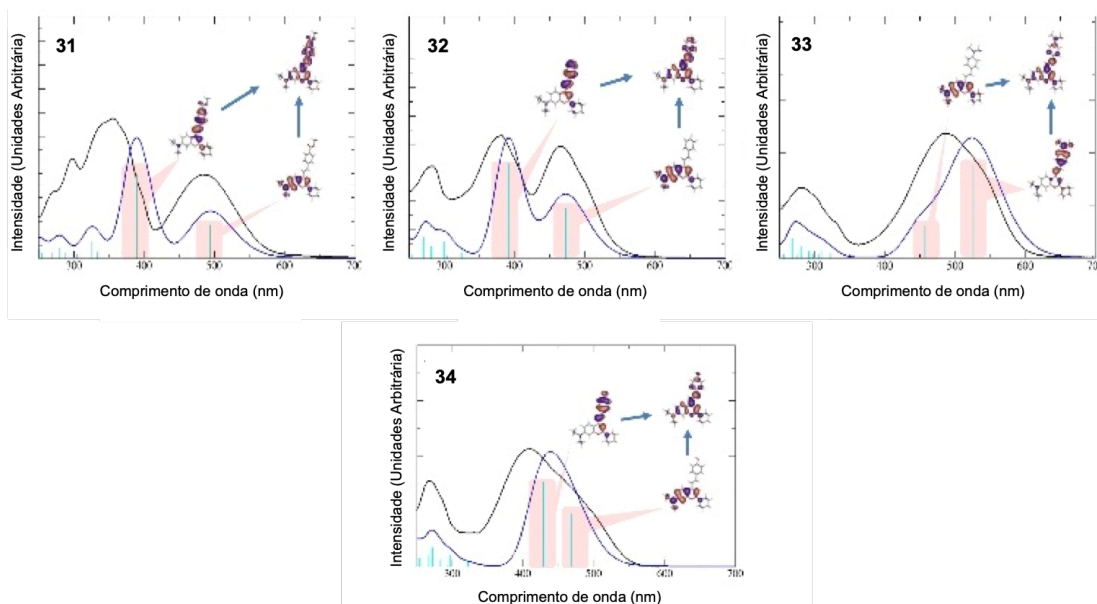


Figura II.14. Espectros experimentais (preto) comparados com os espectros calculados (azul) e orbitais moleculares envolvidas nas duas transições eletrónicas de mais baixa energia dos derivados 4-estiril do nitrato de 1-(7-dietilamino-4-metil-2*H*-cromen-2-ilideno)piperidín-1-io (**30**), em CH_3CN .

Enquanto na orbital LUMO a carga está muito deslocalizada por toda a molécula, nas orbitais HOMO e HOMO-1 está principalmente localizada ou no substituinte 4-estirilo ou nos anéis fundidos. No entanto, enquanto o estado HOMO está localizado principalmente nos anéis fundidos para os compostos **31**, **32** e **34**, para o composto **33** o estado HOMO está localizado principalmente no substituinte 4-estirilo. A situação é oposta para o estado HOMO-1, que está localizado no substituinte 4-estirilo para os compostos **31**, **32** e **34**, enquanto para o composto **33** está localizado nos anéis fundidos.

Os comprimentos de onda de absorção máxima e a força de oscilador (f) das transições-chave foram calculados e estão representados na Figura II.15 e na Tabela VI.7 (Anexos), juntamente com os componentes principais atribuídos às transições. Uma imagem visual do rearranjo eletrónico que ocorre nas transições mais baixas (e mais importantes) é dada pelas diferenças de densidade eletrónica dos estados envolvidos nas transições. A diferença de densidade eletrónica das excitações de mais baixa energia é apresentada na Figura II.14, ilustrando as regiões das moléculas que perdem ou ganham carga eletrónica. Todos os compostos apresentam duas excitações de mais baixa energia, $S_0 \rightarrow S_1$ e $S_0 \rightarrow S_2$, mostrando como estado final a LUMO e como estados iniciais a HOMO e HOMO-1, respetivamente.

Para todos os compostos, com exceção do composto **33**, $S_0 \rightarrow S_1$ representa um fluxo de densidade eletrônica do substituinte 4-estirilo para os anéis fundidos, enquanto $S_0 \rightarrow S_2$ representa uma transferência de densidade eletrônica para o substituinte 4-estirilo.^[83]

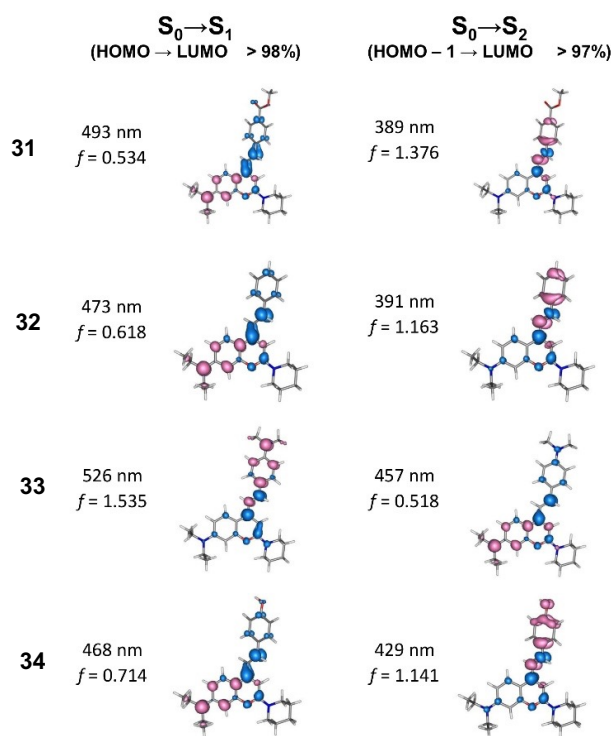


Figura II.15. Gráficos de contorno da diferença de densidade eletrônica $\Delta\rho(r)$ nas excitações de energia mais baixa para os derivados 4-estiril do nitrato de 1-(7-dietilamino-4-metil-2*H*-cromen-2-ilideno)piperidín-1-io (**30**). A cor azul indica um aumento da densidade eletrônica aquando da transição, enquanto a cor rosa representa uma diminuição da densidade eletrônica.

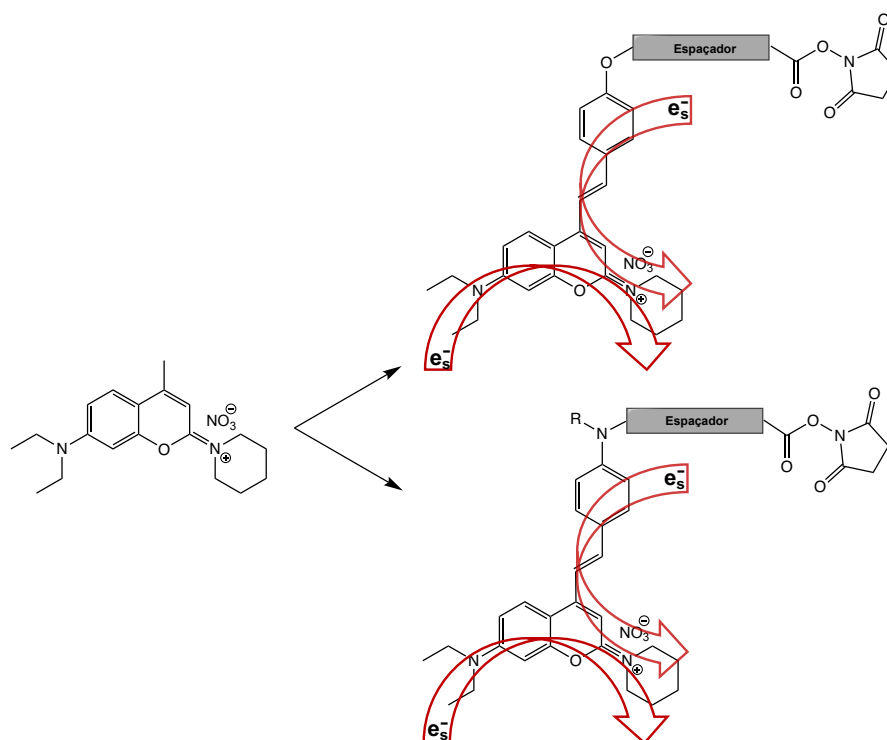
No entanto, para o composto **33**, o fluxo de eletrões ocorre na direção oposta. Para todos os compostos, a transição mais provável, ou seja, aquela com maior força de oscilador, independentemente de ser $S_0 \rightarrow S_1$ ou $S_0 \rightarrow S_2$, corresponde a uma diminuição da densidade eletrônica no substituinte 4-estirilo e a uma transferência de carga para os anéis fundidos. É também para este composto que a força de oscilador mais elevada corresponde à transição de mais baixa energia, dominando assim o espectro de absorção e indicando a intensa capacidade doadora da ligação do grupo amino no substituinte 4-estirilo.

Um fator central que afeta o processo de emissão são as alterações estruturais que podem ocorrer na geometria dos estados excitados após uma excitação vertical.^[217, 218]

Espera-se um elevado desvio de Stokes se ocorrer um relaxamento estrutural significativo no estado excitado antes da emissão. A geometria otimizada dos compostos, **31** a **34**, estudados no estado eletrônico fundamental e no primeiro estado excitado está representada na Figura VI.2 (Anexos). No estado fundamental, os compostos apresentam um desvio significativo da planaridade, com o plano do substituinte 4-estirilo a rodar relativamente ao plano dos anéis fundidos. A torção ocorre na ligação que une os anéis fundidos e o substituinte 4-estirilo, estando a ponte de etileno quase no plano do anel benzénico pendente. Este ângulo diedro apresenta valores entre 15° para o composto **33** e 26° para o composto **31** e limita o sistema π conjugado que liga os grupos doadores e aceptadores nas moléculas. No entanto, no estado excitado S_1 , após o relaxamento estrutural, o ângulo diedro muda para um mínimo de 2° para o composto **31** e um máximo de 7° para o composto **33**, pelo que as moléculas se tornam mais planares (Tabela VI.8 (Anexos)). Além disso, a alternância de comprimento de ligação calculada (BLA) para a pequena cadeia conjugada do substituinte 4-estirilo, atinge 0.11 Å para os compostos **31** e **32**, 0.10 Å para o composto **34** e 0.08 Å para o composto **33**, no estado S_0 . Para o estado S_1 , o BLA diminui para 0.06 Å para o composto **33** e 0.04 Å para todos os outros compostos (Tabela VI.8 (Anexos)). Estas alterações na geometria contribuem para um aumento da deslocalização eletrónica em toda a estrutura π conjugada e para uma diminuição do intervalo de energia HOMO e LUMO, resultando assim numa energia de emissão menor quando comparada com a energia de excitação.^[83]

II.1.1.7. Síntese dos marcadores fluorescentes para biomoléculas derivados do nitrato de 1-(7-dietilamino-4-metil-2*H*-cromen-2-ilideno)piperidín-1-io (30)

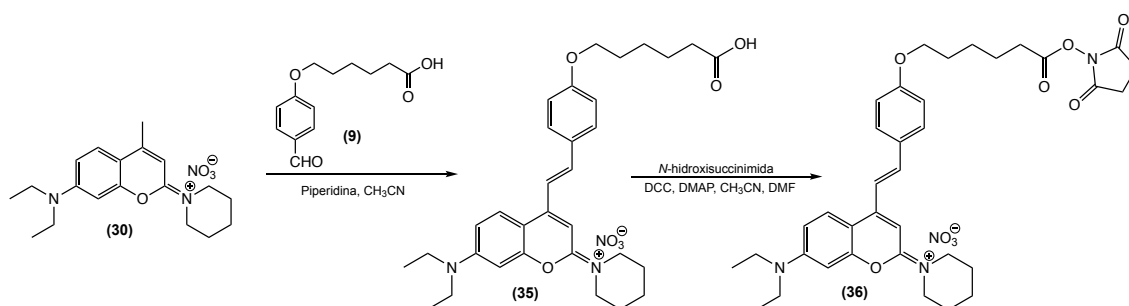
Como analisado na secção anterior, os candidatos mais promissores para futuros marcadores fluorescentes serão aqueles que apresentam doadores de eletrões na posição *para* no substituinte 4-estirilo, e por essa razão, idealizaram-se as estruturas moleculares apresentadas no Esquema II.15.



Esquema II.15. Estruturas moleculares para marcadores fluorescentes derivados do nitrato de 1-(7-dietilamino-4-metil-2*H*-cromen-2-ilideno)piperidín-1-io (30).

II.1.1.7.1. Síntese do marcador fluorescente, nitrato de (*E*)-1-(7-dietilamino-4-(4-((6-((2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi)-6-oxo-hexil)oxi)estiril)-2*H*-cromen-2-ilideno)piperidín-1-io (36)

No Esquema II.16 está representada a estratégia de síntese do marcador fluorescente nitrato de (*E*)-1-(7-dietilamino-4-(4-((6-((2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi)-6-oxo-hexil)oxi)estiril)-2*H*-cromen-2-ilideno)piperidín-1-io (36), que foi delineada usando o nitrato de (*E*)-1-(4-(4-((5-carboxipentil)oxi)estiril)-7-dietilamino-2*H*-cromen-2-ilideno)piperidín-1-io (35), como precursor (Reações IV.1.2.50 e IV.1.2.51).



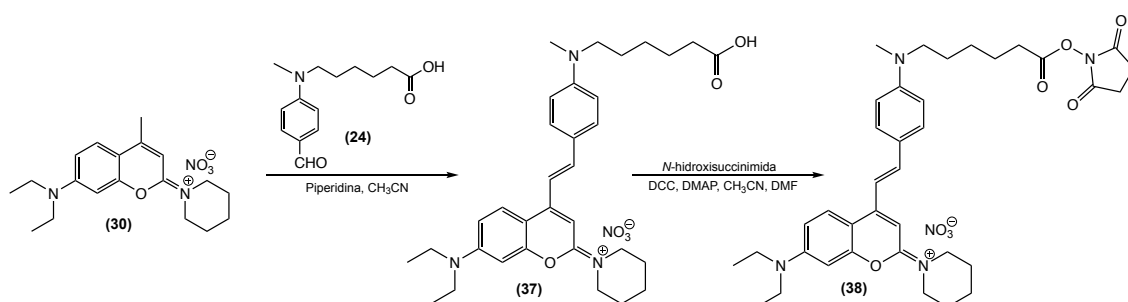
Esquema II.16. Síntese do marcador fluorescente, nitrato de (*E*)-1-(7-dietilamino-4-(4-((6-((2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi)-6-oxo-hexil)oxi)estiril)-2*H*-cromen-2-ilideno)piperidín-1-io (36).^[83]

O nitrato de (*E*)-1-(4-(4-((5-carboxipentil)oxi)estiril)-7-dietilamino-2*H*-cromen-2-ilideno)piperidín-1-io (35), foi sintetizado através de uma reação de condensação aldólica entre o nitrato de 1-(7-dietilamino-4-metil-2*H*-cromen-2-ilideno)piperidín-1-io (30) e o ácido 6-(4-formilfenoxi)hexanóico (9) (Reação IV.1.2.50). A síntese do marcador fluorescente nitrato de (*E*)-1-(7-dietilamino-4-(4-((6-((2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi)-6-oxo-hexil)oxi)estiril)-2*H*-cromen-2-ilideno)piperidín-1-io (36), funcionalizado com um éster succinimidílico está descrita na reação IV.1.2.51. O referido marcador fluorescente foi obtido através de cinco etapas sintéticas simples e eficazes a partir de precursores económicos disponíveis no mercado e, como esperado, as suas propriedades fotofísicas são muito semelhantes às propriedades do composto 34 (secção II.1.1.6.1.1).

O espetro de ¹H RMN apresenta um singuleto a 2.82 ppm, característico dos quatros prótons dos dois grupos metileno da succinimida e o espetro de ¹³C RMN apresenta um sinal a 169.4 ppm, característico dos grupos carbonilo da succinimida, o que comprova a sua presença no produto final. Os valores de massa exata são concordantes com a estrutura proposta. De referir também que este marcador foi sintetizado com um rendimento global de 64%.

II.1.1.7.2. Síntese do marcador fluorescente, nitrato de (*E*)-1-(7-dietilamino-4-(4-((6-((2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi)-6-oxo-hexil)(metil)amino)estiril)-2*H*-cromen-2-ilideno)piperidín-1-io (38)

A estratégia de síntese do marcador fluorescente nitrato de (*E*)-1-(7-dietilamino-4-(4-((6-((2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi)-6-oxo-hexil)(metil)amino)estiril)-2*H*-cromen-2-ilideno)piperidín-1-io (38), foi delineada usando o nitrato de (*E*)-1-(4-(4-((5-carboxipentil)(metil)amino)estiril)-7-dietilamino-2*H*-cromen-2-ilideno)piperidín-1-io (37), como precursor (Esquema II.17).^[82]



Esquema II.17. Síntese do marcador fluorescente, nitrato de (*E*)-1-(7-dietilamino-4-(4-((6-((2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi)-6-oxo-hexil)(metil)amino)estiril)-2*H*-cromen-2-ilideno)piperidín-1-io (38).

O nitrato de (*E*)-1-(4-(4-((5-carboxipentil)(metil)amino)estiril)-7-dietilamino-2*H*-cromen-2-ilideno)piperidín-1-io (37), foi sintetizado através de uma reação de condensação aldólica entre o nitrato de 1-(7-dietilamino-4-metil-2*H*-cromen-2-ilideno)-piperidín-1-io (30) e o ácido 6-(4-formilfenoxi)hexanóico (9), reação IV.1.2.52. A síntese do marcador fluorescente nitrato de (*E*)-1-(7-dietilamino-4-(4-((6-((2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi)-6-oxo-hexil)(metil)amino)estiril)-2*H*-cromen-2-ilideno)piperidín-1-io (38), obtido com um excelente rendimento (97%), está descrita na reação IV.1.2.53.

O espectro de ¹H RMN apresenta um singuleto a 2.86 ppm, característico dos quatros prótons dos dois grupos metileno da succinimida e o espectro de ¹³C RMN apresenta um sinal a 169.4 ppm, característico dos grupos carbonilo da succinimida, o que comprova a sua presença no produto final. Os valores de massa exata são concordantes com a estrutura proposta. De referir que este marcador foi obtido com um rendimento global de 63%.

II.1.1.7.3. Propriedades fotofísicas dos marcadores fluorescentes 36 e 38

As propriedades fotofísicas dos novos marcadores fluorescentes **36** e **38**, nomeadamente as suas propriedades de absorção e emissão, desvio de Stokes, absortividade molar e rendimento quântico de fluorescência, foram avaliadas e estão registadas na Tabela II.4.

Tabela II.4. Propriedades fotofísicas dos marcadores fluorescentes, nitrato de (*E*)-1-(7-dietil-amino-4-(4-((6-((2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi)-6-oxo-hexil)oxi)estiril)-2*H*-cromen-2-ilideno)piperidín-1-io (**36**) e do nitrato de (*E*)-1-(7-dietilamino-4-(4-((6-((2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi)-6-oxo-hexil)(metil)amino)estiril)-2*H*-cromen-2-ilideno)piperidín-1-io (**38**).

Composto	λ_{abs}^a (nm)	λ_{em}^b (nm)	Desvio de Stokes (nm, cm^{-1})	ε^c ($\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$)	Φ_F^d
35	406	578	172, 7330	30000	0.90
36	404	577	173, 7421	30000	0.92
37	489	628	139, 4526	64000	0.54
38	487	628	141, 4610	64000	0.56

^aMáximos de absorção em CH_3CN . ^bMáximos de emissão em CH_3CN . ^cAbsortividade molar na transição de comprimento de onda mais longo. ^dRendimento quântico de fluorescência em EtOH, determinado utilizando 7-dietilamino-4-metil-coumarina ($\Phi_F = 0.73$ em EtOH) como padrão.^[118]

Na Figura II.16 estão representados os espectros de absorção dos marcadores fluorescentes derivados do nitrato de 1-(7-dietilamino-4-metil-2*H*-cromen-2-ilideno)piperidín-1-io (**30**).

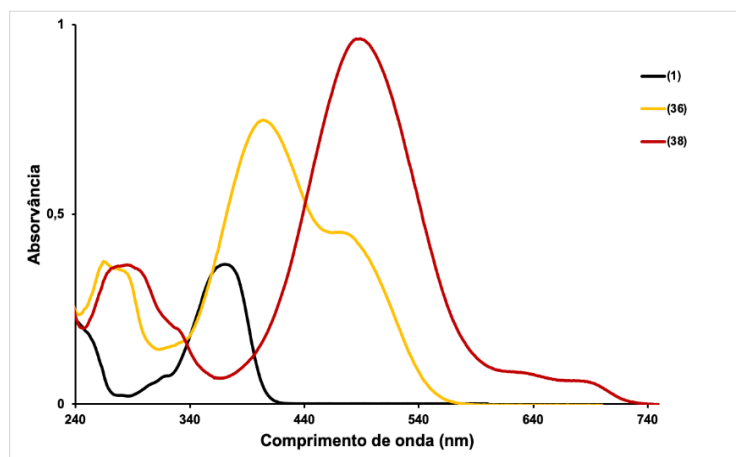


Figura II.16. Espectros de absorção da 7-dietilamino-4-metilcoumarina (**1**) e dos marcadores fluorescentes, nitrato de (*E*)-1-(7-dietilamino-4-(4-((6-((2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi)-6-oxo-hexil)oxi)estiril)-2*H*-cromen-2-ilideno)piperidín-1-io (**36**) e do nitrato de (*E*)-1-(7-dietilamino-4-(4-((6-((2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi)-6-oxo-hexil)(metil)amino)estiril)-2*H*-cromen-2-ilideno)piperidín-1-io (**38**), em CH₃CN.

O marcador fluorescente **36**, apresentou um rendimento quântico de fluorescência mais elevado que o seu congénere **38** (Φ_F (**36**) = 0.92 vs. Φ_F (**38**) = 0.56), possivelmente devido ao menor carácter doador de eletrões do grupo alcóxi ligado ao substituinte 4-estirilo, quando comparado com o grupo amino.

Como observado também na secção anterior, o grupo amino, quando comparado com o grupo alcóxi, promoveu desvios batocrómicos mais elevados ($\cong 40\%$) devido ao superior carácter doador de eletrões por efeito mesómero deste substituinte.

As absorptividades molares dos marcadores fluorescentes **36** e **38** também foram fortemente influenciados pela natureza dos grupos aceitadores de eletrões na posição 2 e os grupos doadores de eletrões do substituinte 4-estirilo (ϵ (**36**) = 30000 cm⁻¹M⁻¹ vs. ϵ (**38**) = 64000 cm⁻¹M⁻¹). Considerando apenas o efeito do substituinte 4-estirilo, a presença do grupo amino mais do que duplicou a absorptividade molar quando comparado com o congénere alcóxi.^[82]

II.1.1.7.4. Cálculos DFT e TDDFT para os marcadores fluorescentes **36** e **38**

As bandas de baixa energia dos espectros são dominadas por duas excitações, S_1 e S_2 , como se pode observar na Figura II.17. As excitações de mais baixa energia S_1 e S_2 consistem principalmente em contribuições de um eletrão HOMO→LUMO e HOMO-1→LUMO, respetivamente, para os compostos **36** e **38**, e as suas forças de oscilador relativas dependem do composto que apresenta o grupo alcóxi ou o grupo amino (Tabela VI.10 (Anexos)). Para o composto com o grupo alcóxi **36**, a excitação S_2 é dominante, enquanto a S_1 é a mais intensa para o composto do grupo amino **38**, o que explica a elevada absorvidade molar observada no composto com o grupo amino em comparação com os seus homólogos do grupo alcóxi.

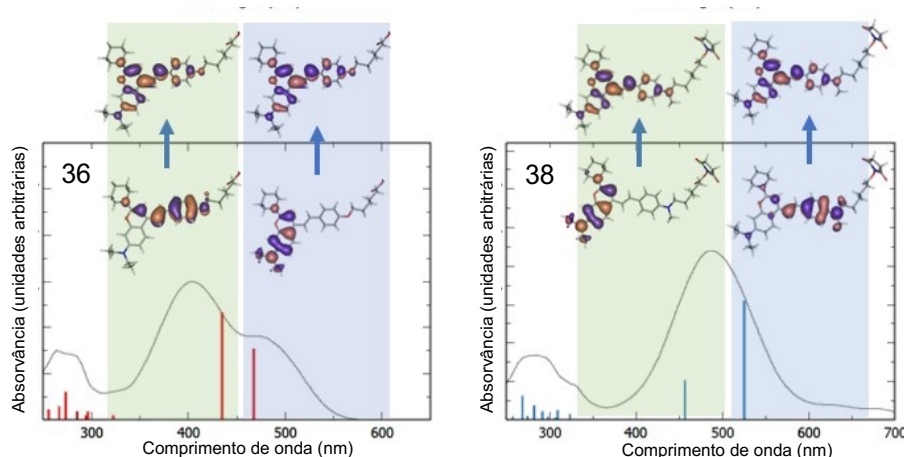


Figura II.17. Espectros experimentais (cinzento) comparados com as excitações calculadas (vermelho e azul) e as orbitais moleculares envolvidas nas duas transições eletrónicas de mais baixa energia dos marcadores fluorescentes **36** e **38**, em CH_3CN .^[82]

A forma e a distribuição espacial dos estados HOMO, HOMO-1 e LUMO apresentam diferenças notáveis, indicando características distintas da transferência de carga intramolecular que ocorre após a excitação. Verificou-se igualmente que para os marcadores fluorescentes **36** e **38**, nem a HOMO, nem a HOMO-1, nem as orbitais LUMO apresentaram contribuições relevantes sobre o grupo reativo ligado, indicando que este não participa no sistema π conjugado e não interfere no processo de excitação.

Como já foi referido, esta é uma característica importante, uma vez que é desejável uma interferência mínima da ligação dos marcadores a uma biomolécula com as suas propriedades de fluorescência.

Relativamente aos estados HOMO, a principal característica observada foi que as orbitais HOMO estão maioritariamente localizadas nos anéis fundidos para o composto com o grupo alcóxi (**36**), enquanto para o composto com o grupo amino (**38**), estão localizadas no substituinte 4-estirilo. Pelo contrário, o inverso ocorre para as orbitais HOMO-1, com a HOMO dos compostos do grupo do alcóxi a apresentar grande semelhança com a HOMO-1 dos compostos do grupo do amino e vice-versa.

Para estes compostos, **36** e **38**, no entanto, as orbitais LUMO apresentam uma menor localização e extensão sobre a zona de ligação e não mostram diferenças importantes para os referidos compostos. Esta extensão facilita as absorções de transferência de carga interna de baixa energia. A transição mais intensa, quer seja a de maior comprimento de onda ou não, correspondeu em todos os casos a uma transição do estado maioritariamente localizado no substituinte 4-estirilo para a LUMO, o que sugere que estes eram os estados que se sobrepunham em maior escala com as orbitais LUMO. A transição de mais baixa energia no composto **38**, que exhibe a maior força de oscilador, envolve um processo de transferência de carga do substituinte 4-estirilo para os anéis, destacando a capacidade doadora significativa do grupo amino ligado ao substituinte 4-estirilo.

Seguindo o critério do índice Δr (Secção II.1.1.2.5), a maioria das excitações S_1 e S_2 pode ser classificada como transferência de carga. Os valores mais elevados de Δr surgiram no composto **36**, indicando uma grande deslocação da carga à distância após a excitação (Tabela VI.10 (Anexos)).

A Figura II.18 apresenta a geometria molecular otimizada dos marcadores fluorescentes **36** e **38**, tanto no estado fundamental como no primeiro estado excitado singuleto. No estado fundamental, os referidos marcadores apresentaram um desvio da planaridade entre o plano médio dos anéis fundidos e o plano do substituinte 4-estirilo, o que limita a conjugação π entre os grupos doadores e aceptadores nas moléculas.

O composto **36** apresentou um valor de 19.9° de magnitude do ângulo diedro, mais elevado que os 15.4° do composto **38** (Tabela VI.11 (Anexos)).

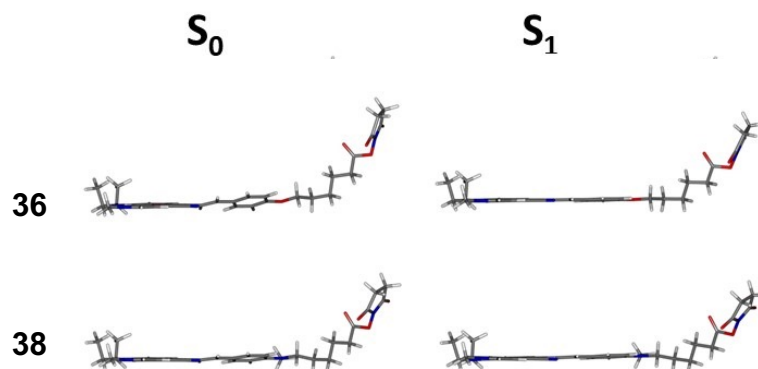


Figura II.18. Geometrias moleculares otimizadas, calculadas ao nível PBE0/6-31G (d,p), no estado fundamental e no primeiro estado excitado singuleto dos marcadores fluorescentes **36** e **38**, em CH_3CN .

Em contrapartida, o estado excitado S_1 revelou um cenário distinto, em que as moléculas se tornaram quase planares, ou seja, os desvios da planaridade foram mínimos, tendo sido de 3.6° para o composto **36** e 7.4° para o composto **38** (Tabela VI.11 (Anexos)).

A transição do estado S_0 para o estado S_1 também foi caracterizada por uma diminuição da alternância do comprimento da ligação calculada (BLA), que diminuiu consideravelmente, para os compostos **36** e **38**, no estado excitado S_1 . No estado S_0 , os compostos exibem variações de BLA sendo de 0.08 \AA para o composto **38** e 0.10 \AA para o composto **36**. No entanto, no estado excitado S_1 , o BLA diminuiu significativamente para 0.04 \AA para o composto **36** e de 0.06 \AA para o composto **38**.

De acordo com a regra de Kasha (Secção II.1.1.2.5), as emissões dos marcadores fluorescentes estudados são provenientes do estado S_1 . As propriedades de emissão foram calculadas a partir da geometria otimizada do estado S_1 e estão representadas na Tabela VI.12 (Anexos).

Os comprimentos de onda de emissão $S_1 \rightarrow S_0$ foram sistematicamente maiores do que os correspondentes ao processo de absorção $S_0 \rightarrow S_1$ com base na geometria otimizada do estado fundamental. As mudanças de geometria observadas que ocorreram no estado excitado S_1 promovem uma deslocalização eletrônica efetiva no sistema π conjugado, resultando numa redução no fosso de energia entre a HOMO e a LUMO. Consequentemente, após uma excitação vertical, há um notável relaxamento estrutural do estado excitado que ocorre antes da emissão,^[217, 218] o que leva a uma

energia de emissão menor em comparação com a energia de excitação, resultando assim num substancial desvio de Stokes.

A partir da geometria otimizada do estado excitado de menor energia S_1 , o tempo de vida de fluorescência teórico do estado excitado pode ser calculado, pela equação de Einstein (Secção II.1.1.2.5). Os tempos de vida de fluorescência calculados dos marcadores fluorescentes estão registados na Tabela VI.12 (Anexos) e, para os marcadores **36** e **38**, os valores foram inferiores a 10 ns, típicos de estados emissivos de fluoróforos orgânicos, enquanto tempos de vida radiativos maiores corresponderam a estados não radiativos. No entanto, uma vez que o composto com o grupo amino apresenta uma maior força de oscilador na transição $S_1 \rightarrow S_0$, o seu tempo de vida de fluorescência é mais curto em comparação com o do seu homólogo com o grupo alcóxi.^[82]

II.1.1.8. Análise do potencial dos novos marcadores fluorescentes 36 e 38, através da técnica FISH

II.1.1.8.1. Modelo *Saccharomyces cerevisiae* com as sondas EUK516-(36) e EUK516-(38)

Os resultados obtidos por citometria de fluxo da hibridação de células de *Saccharomyces cerevisiae* com sondas oligonucleotídicas comerciais e sintetizadas são apresentados na Figura II.19. Após a análise destes resultados, é evidente que as células de levedura, quando marcadas com sondas oligonucleotídicas EUK516, apresentaram uma intensidade de fluorescência muito significativa quando comparada com a autofluorescência das células de *S. cerevisiae* não marcadas. (Figura II.19; A, C e E).

Como era expectável, as células de *S. cerevisiae* hibridadas com as sondas EUK516-(36) e EUK516-(38) apresentaram sinais de fluorescência (Figura II.19; C e E), mas as que foram submetidas a hibridação com as sondas EUB338-(36) e EUB338-(38), apenas produziram sinais de autofluorescência (Figura II.19; D e F).^[224]

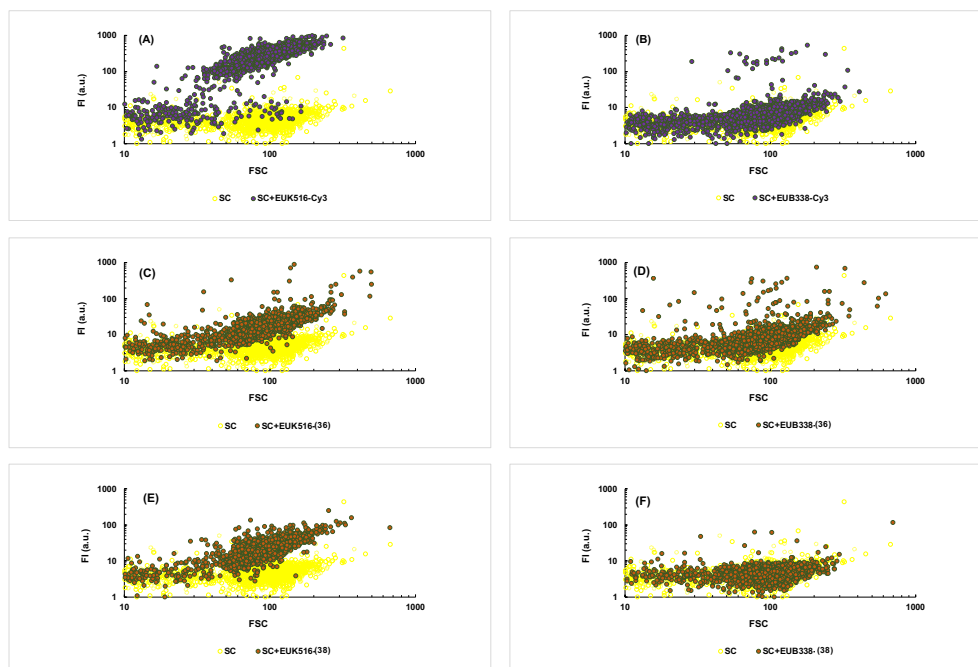


Figura II.19. Resultados de citometria de fluxo (intensidade de fluorescência (FI)/difusão direta (FSC)) referentes aos ensaios de hibridação das células de *Saccharomyces cerevisiae* (SC) com as sondas oligonucleotídicas: **(A)** EUK516-Cy3, **(B)** EUB338-Cy3, **(C)** EUK516-(36), **(D)** EUB338-(36), **(E)** EUK516-(38) e **(F)** EUB338-(38).

As células de *S. cerevisiae* hibridadas com a sonda EUK516-(36) apresentaram uma percentagem substancial de células fluorescentes ($\cong 75\%$), muito semelhante aos valores observados ($\cong 77\%$) com a sonda comercial EUK516-Cy3 (Figura II.20). Estes resultados demonstram de forma inequívoca a eficácia desta sonda para marcar células de *S. cerevisiae*. Além disso, as células submetidas a hibridação com a sonda EUK516-(38) também apresentaram uma percentagem substancial de células fluorescentes ($\cong 68\%$), muito semelhante aos valores observados com a sonda comercial.

A etapa de lavagem da técnica FISH, à semelhança do anteriormente referido (secção II.1.1.3.1), poderá explicar o ligeiro aumento na percentagem de células fluorescentes observadas para as células marcadas com a sonda EUB338-Cy3 e EUB338-(**36**) quando comparadas com os mesmos valores das células de *S. cerevisiae*.^[224]

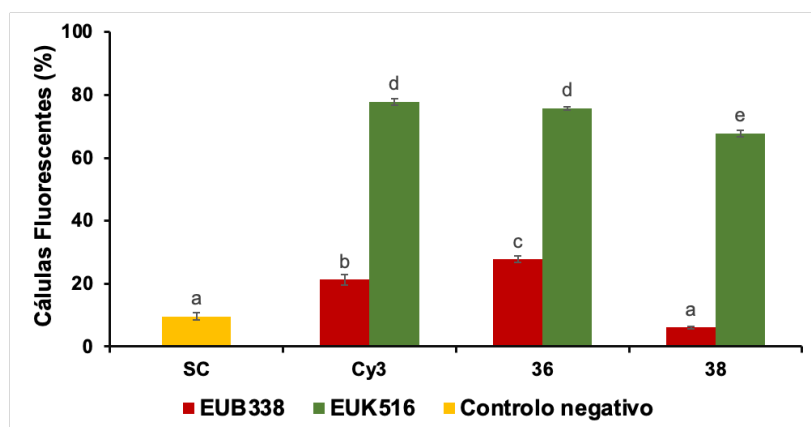


Figura II.20. Percentagem de células fluorescentes das células de *Saccharomyces cerevisiae* (SC) marcadas com as sondas EUK516 e EUB338 com os diferentes marcadores, **36**, **38** e Cy3®, e o controlo negativo. As letras indicam as diferenças estatisticamente significativas ($p < 0.05$).

Na Figura II.21 são apresentados os resultados de microscopia de epifluorescência dos ensaios de hibridação envolvendo células de *S. cerevisiae* com as sondas oligonucleotídicas comerciais e sintetizadas. Estes resultados são correlacionáveis com os dados de citometria de fluxo, confirmando que as sondas oligonucleotídicas EUK516-Cy3, EUK516-(**36**) e EUK516-(**38**), apresentaram sinais de fluorescência muito intensos (Figura II.21; A, C e E).

No contexto dos ensaios de hibridação envolvendo células de *S. cerevisiae* com as sondas oligonucleotídicas EUB338, e como esperado, não foi possível observar qualquer sinal de fluorescência (Figura II.21; B, D e F).

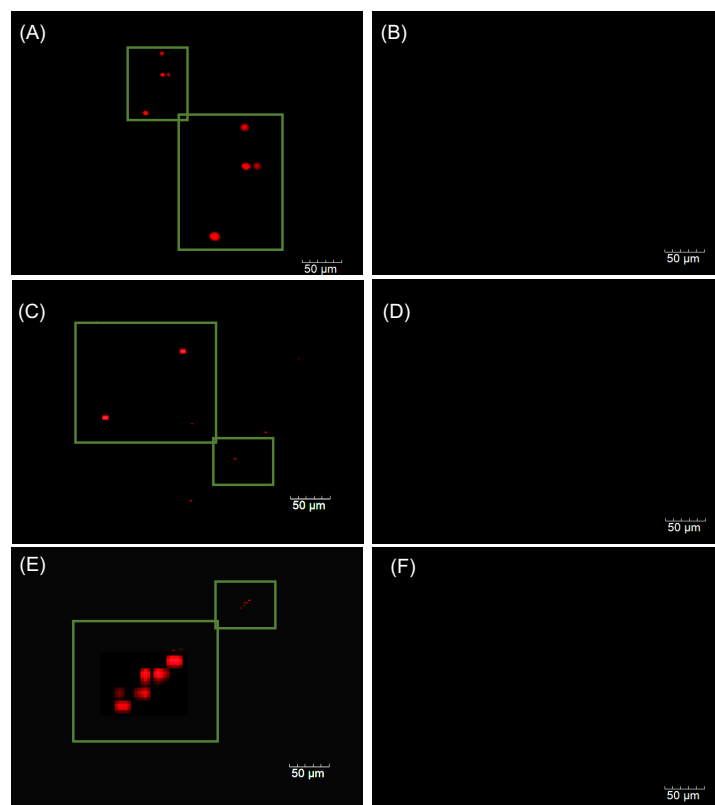


Figura II.21. Microfotografias obtidas através de microscopia de epifluorescência com o filtro TRITC referentes aos ensaios de hibridação das células de *Saccharomyces cerevisiae* com as sondas oligonucleotídicas: **(A)** EUK516-Cy3, **(B)** EUB338-Cy3, **(C)** EUK516-(36), **(D)** EUB338-(36), **(E)** EUK516-(38) e **(F)** EUB338-(38).

II.1.1.8.2. Modelo *Bacillus sp.* com as sondas EUB338-(36) e EUB338-(38)

Os resultados obtidos por citometria de fluxo da hibridação das células de *Bacillus sp.* com as sondas oligonucleotídicas comerciais e sintetizadas encontram-se na Figura II.22.

As células de *Bacillus sp.* hibridadas com as sondas EUB338-(36) e EUB338-(38), apresentaram sinais de fluorescência (Figura II.22; C e E), enquanto as que foram submetidas a hibridação com as sondas EUK516-(36) e EUK516-(38), apenas produziram sinais de autofluorescência (Figura II.22; D e F).^[224]

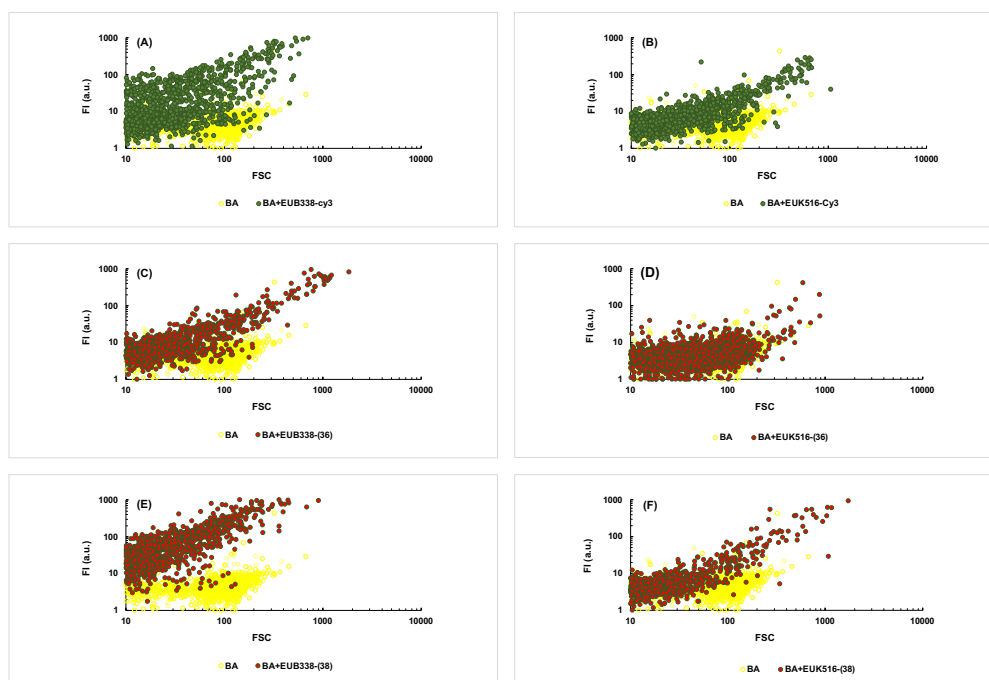


Figura II.22. Resultados de citometria de fluxo (intensidade de fluorescência (FI)/difusão direta (FSC)) referentes aos ensaios de hibridação das células de *Bacillus sp.* (BA) com as sondas oligonucleotídicas: **(A)** EUB338-Cy3, **(B)** EUK516-Cy3, **(C)** EUB338-(36), **(D)** EUK516-(36), **(E)** EUB338-(38) e **(F)** EUK516-(38).

As células de *Bacillus sp.* hibridadas com a sonda oligonucleotídica EUB338-(**38**) apresentaram um aumento estatisticamente significativo na percentagem de células fluorescentes ($\cong 53\%$), em comparação com as células hibridadas com a sonda EUB338-Cy3 ($\cong 36\%$), disponível no mercado (Figura II.23). Estes resultados demonstram de forma inequívoca o elevado potencial do marcador fluorescente **38** nas sondas oligonucleotídicas EUB338, quando comparado com o marcador comercial Cy3® e com o seu homólogo **36** (Figura II.23).^[224]

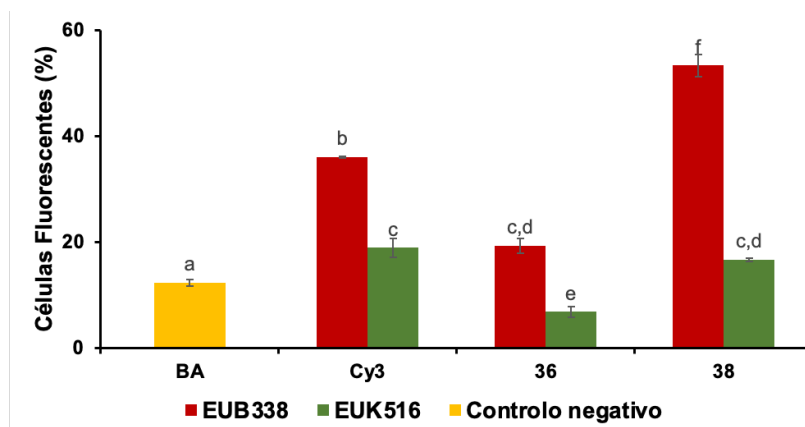


Figura II.23. Percentagem de células fluorescentes das células de *Bacillus sp.* (BA) marcadas com as sondas EUK516 e EUB338 com os diferentes marcadores, **36**, **38** e Cy3®, e o controlo negativo. As letras indicam as diferenças estatisticamente significativas ($p < 0.05$).

Os resultados de microscopia de epifluorescência dos ensaios de hibridação envolvendo células de *Bacillus sp.* com as sondas oligonucleotídicas comerciais e sintetizadas, são apresentados na Figura II.24. Estes resultados confirmam que as sondas oligonucleotídicas EUB338-Cy3, EUB338-(**36**) e EUB338-(**38**), apresentaram sinais de fluorescência muito intensos (Figura II.24; A, C e E).

Dos ensaios de hibridação que envolveram células de *Bacillus sp.* com as sondas oligonucleotídicas EUK516 não foi possível observar qualquer sinal de fluorescência, como era esperado (Figura II.24; B, D e F).^[224]

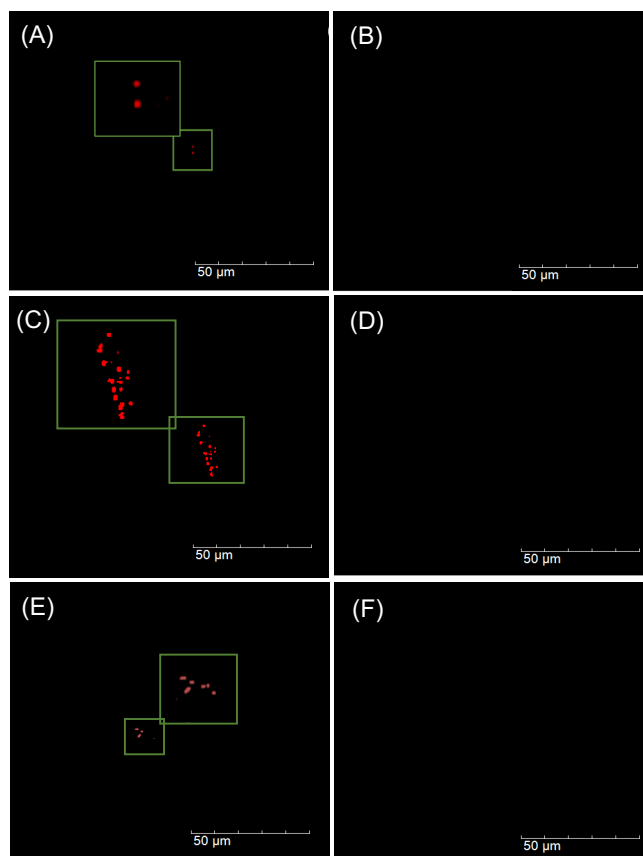
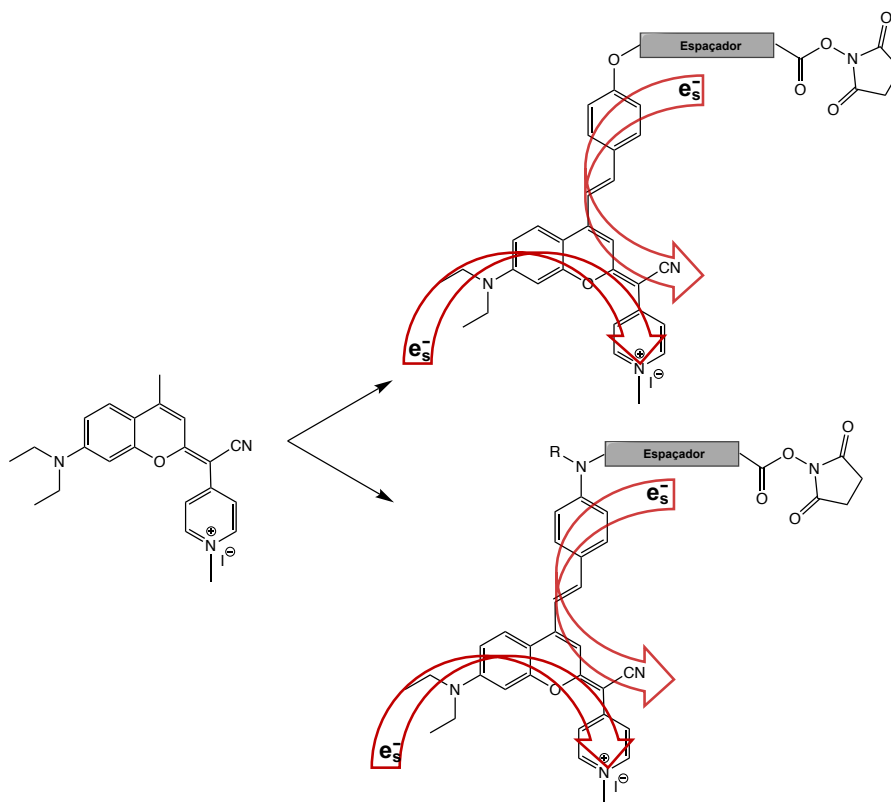


Figura II.24. Microfotografias obtidas através de microscopia de epifluorescência com o filtro TRITC referentes aos ensaios de hibridação das células de *Bacillus sp.* com as sondas oligonucleotídicas: **(A)** EUB338-Cy3, **(B)** EUK516-Cy3, **(C)** EUB338-(36), **(D)** EUK516-(36), **(E)** EUB338-(38) e **(F)** EUK516-(38).

II.1.1.9. Síntese dos marcadores fluorescentes para biomoléculas derivados do iodeto de (*E*)-4-(ciano(7-dietilamino-4-metil-2*H*-cromen-2-ilideno)metil)-1-metilpiridín-1-io (40)

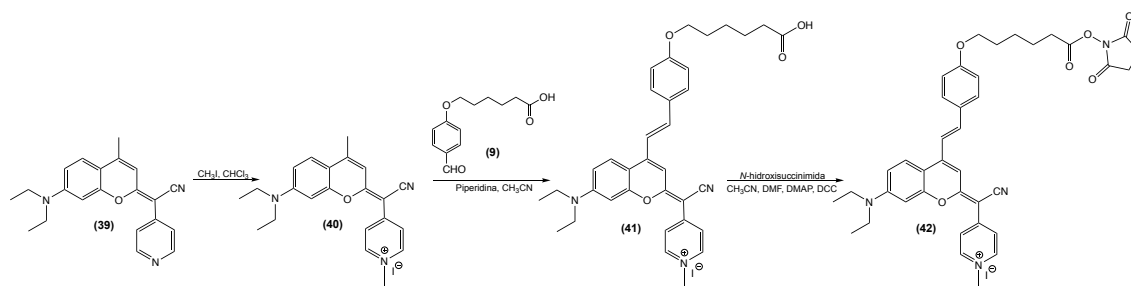
Considerando que a introdução de um novo grupo aceitador de elétrons na posição 2, com uma carga positiva formal num anel de piridina, potenciaria a deslocalização eletrônica, idealizaram-se as estruturas moleculares derivadas do iodeto de (*E*)-4-(ciano(7-dietilamino-4-metil-2*H*-cromen-2-ilideno)metil)-1-metilpiridín-1-io (40), apresentados no Esquema II.18. De acordo com os resultados obtidos nas secções anteriores (II.1.1.1 e II.1.1.6.1), os candidatos mais promissores serão aqueles que apresentam grupos doadores de elétrons na posição *para* no substituinte 4-estirilo, ou seja, o grupo amino e o grupo alcóxi.^[82]



Esquema II.18. Estruturas moleculares para marcadores fluorescentes derivados do iodeto de (*E*)-4-(ciano(7-dietilamino-4-metil-2*H*-cromen-2-ilideno)metil)-1-metilpiridín-1-io (40).

II.1.1.9.1. Síntese do marcador fluorescente, iodeto de 4-(ciano((*E*)-7-dietil-amino-4-((*E*)-4-((6-((2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi)-6-oxo-hexil)oxi)estiril)-2*H*-cromen-2-ilideno)metil)-1-metilpiridín-1-io (42)

A estratégia de síntese do marcador fluorescente iodeto de 4-(ciano((*E*)-7-dietil-amino-4-((*E*)-4-((6-((2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi)-6-oxo-hexil)oxi)estiril)-2*H*-cromen-2-ilideno)metil)-1-metilpiridín-1-io (42), foi delineada usando o iodeto de 4-(((*E*)-4-((*E*)-4-((5-carboxipentil)oxi)estiril)-7-dietilamino-2*H*-cromen-2-ilideno)(ciano)metil)-1-metilpiridín-1-io (41), como precursor (Esquema II.19).



Esquema II.19. Síntese do marcador fluorescente, iodeto de 4-(ciano((*E*)-7-dietilamino-4-((*E*)-4-((6-((2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi)-6-oxo-hexil)oxi)estiril)-2*H*-cromen-2-ilideno)metil)-1-metilpiridín-1-io (42).^[82]

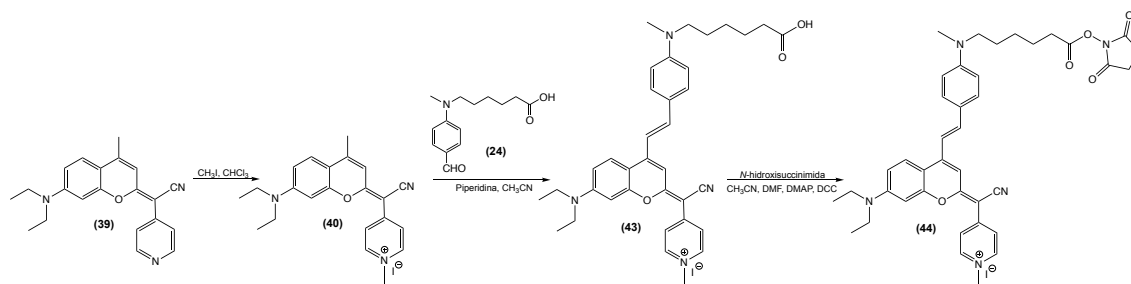
O intermediário iodeto de (*E*)-4-(ciano(7-dietilamino-4-metil-2*H*-cromen-2-ilideno)metil)-1-metilpiridín-1-io (40) com um grupo aceitador de elétrons na posição 2, foi facilmente sintetizado com um elevado rendimento (86%). Esta síntese envolveu uma reação de tonação no grupo carbonilo da 7-dietilamino-4-metilcoumarina (1), seguida da condensação do derivado 7-dietilamino-4-metil-2*H*-cromen-2-tiona (2) resultante, com o 4-piridilacetonitrilo. A condensação aldólica regioseletiva e altamente eficiente entre o intermediário 40 e o aldeído aromático com o grupo alcóxi na posição *para* (ácido 6-(4-formilfenoxi)hexanóico (9)) permitiu obter o iodeto de 4-(((*E*)-4-((*E*)-4-((5-carboxipentil)oxi)estiril)-7-dietilamino-2*H*-cromen-2-ilideno)(ciano)metil)-1-metilpiridín-1-io (41) (Reação IV.1.2.56). A síntese do marcador fluorescente iodeto de 4-(ciano((*E*)-7-dietil-amino-4-((*E*)-4-((6-((2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi)-6-oxo-hexil)oxi)estiril)-2*H*-cromen-2-ilideno)metil)-1-metilpiridín-1-io (42), funcionalizado com um éster succinimidílico está descrita na reação IV.1.2.57, com um rendimento de 91%.

O espectro de ^1H RMN apresenta um singuleto a 2.86 ppm, característico dos quatros prótons dos dois grupos metileno da succinimida e o espectro de ^{13}C RMN apresenta um sinal a 169.6 ppm, característico dos grupos carbonilo da succinimida, o

que comprova a sua presença no produto final. Os valores de massa exata são concordantes com a estrutura proposta. De referir também que este marcador foi sintetizado com um rendimento global de 47%.

II.1.1.9.2. Síntese do marcador fluorescente, iodeto de 4-(ciano((*E*)-7-dietil-amino-4-((*E*)-4-((6-((2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi)-6-oxo-hexil)(metil)amino)-estiril)-2*H*-cromen-2-ilideno)metil)-1-metilpiridín-1-io (44)

A estratégia de síntese do marcador fluorescente iodeto de 4-(ciano((*E*)-7-dietil-amino-4-((*E*)-4-((6-((2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi)-6-oxo-hexil)(metil)amino)estiril)-2*H*-cromen-2-ilideno)metil)-1-metilpiridín-1-io (**44**), foi delineada usando o iodeto de 4-(((*E*)-4-((*E*)-4-((5-carboxipentil)(metil)amino)estiril)-7-dietilamino-2*H*-cromen-2-ilideno)(ciano)-metil)-1-metilpiridín-1-io (**43**), como precursor (Esquema II.20).



Esquema II.20. Síntese do marcador fluorescente, iodeto de 4-(ciano((*E*)-7-dietilamino-4-((*E*)-4-((6-((2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi)-6-oxo-hexil)(metil)amino)estiril)-2*H*-cromen-2-ilideno)metil)-1-metilpiridín-1-io (**44**).^[82]

A condensação aldólica regioseletiva e altamente eficiente entre o intermediário **40** e o aldeído aromático com o grupo amino na posição *para* (ácido 6-((4-formilfenil)(metil)amino)hexanóico (**24**)) permitiu obter o iodeto de 4-(((*E*)-4-((*E*)-4-((5-carboxipentil)(metil)amino)estiril)-7-dietilamino-2*H*-cromen-2-ilideno)(ciano)metil)-1-metilpiridín-1-io (**43**) (Reação IV.1.2.58). A síntese do marcador fluorescente iodeto de 4-(ciano((*E*)-7-dietilamino-4-((*E*)-4-((6-((2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi)-6-oxo-hexil)(metil)amino)estiril)-2*H*-cromen-2-ilideno)metil)-1-metilpiridín-1-io (**44**), obtido com um excelente rendimento (97%), está descrita na reação IV.1.2.59.

O espectro de ^1H RMN apresenta um singuleto a 2.86 ppm, característico dos quatros prótons dos dois grupos metileno da succinimida e o espectro de ^{13}C RMN

apresenta um sinal a 169.4 ppm, característico dos grupos carbonilo da succinimida, o que comprova a sua presença no produto final. Os valores de massa exata são concordantes com a estrutura proposta. De referir que este marcador foi obtido com um rendimento global de 52%.

As diferenças entre a eletronegatividade do átomo de nitrogénio e de oxigénio no grupo doador de eletrões presentes nos respetivos aldeídos aromáticos podem explicar a pequena diferença nos rendimentos reacionais observados, com uma pequena vantagem para o aminobenzaldeído.

II.1.1.9.3. Propriedades fotofísicas dos marcadores fluorescentes **42** e **44**

As propriedades fotofísicas dos novos marcadores fluorescentes **42** e **44**, nomeadamente as suas propriedades de absorção e emissão, desvio de Stokes, absortividade molar e rendimento quântico de fluorescência, foram avaliadas e estão registadas na Tabela II.5.

Tabela II.5. Propriedades fotofísicas dos derivados do iodeto de (*E*)-4-(ciano(7-dietilamino-4-metil-2*H*-cromen-2-ilideno)metil)-1-metilpiridín-1-íio (**40**).^[82]

Composto	λ_{abs}^a (nm)	λ_{em}^b (nm)	Desvio de Stokes (nm, cm^{-1})	ϵ^c ($\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$)	Φ_F^d
1	371	434	63, 3913	22910	0.73
40	550	603	53, 1598	80000	0.36
41	593 (615) ^e	663	70, 1780	55000	0.07
42	589 (615) ^e	663	74, 1895	55000	0.10
43	634	685	51, 1174	113500	0.05
44	634	683	49, 1132	113500	0.07

^aMáximos de absorção em CH_3CN . ^bMáximos de emissão em CH_3CN . ^cAbsortividade molar na transição de comprimento de onda mais longo. ^dRendimento quântico de fluorescência em EtOH, determinado utilizando 7-dietilamino-4-metil-coumarina ($\Phi_F = 0.73$ em EtOH) como padrão. ^eOmbro.

Na Figura II.25 estão representados os espectros de absorção dos derivados do iodeto de (E)-4-(ciano(7-dietilamino-4-metil-2H-cromen-2-ilideno)metil)-1-metilpiridín-1-io (**40**).

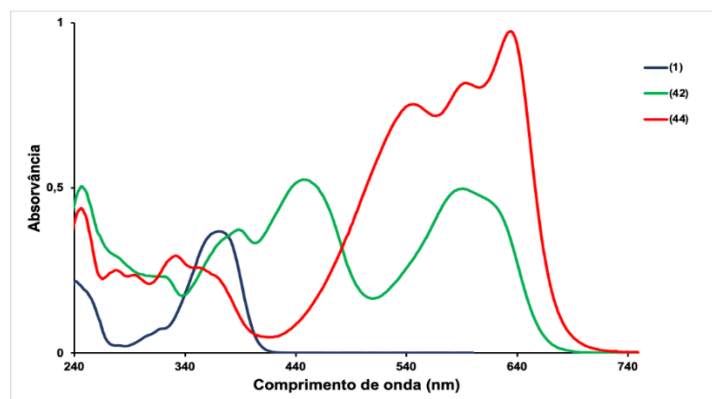


Figura II.25. Espectros de absorção da 7-dietilamino-4-metilcoumarina (**1**) e dos marcadores fluorescentes, iodeto de 4-(ciano((E)-7-dietilamino-4-((E)-4-((6-((2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi)-6-oxo-hexil)oxi)estiril)-2H-cromen-2-ilideno)metil)-1-metilpiridín-1-io (**42**) e do iodeto de 4-(ciano((E)-7-dietilamino-4-((E)-4-((6-((2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi)-6-oxo-hexil)(metil)amino)estiril)-2H-cromen-2-ilideno)metil)-1-metilpiridín-1-io (**44**), em CH₃CN.

A inclusão de um grupo aceitador de elétrons na posição 2, com carga positiva formal num anel de piridina, promoveu elevados desvios batocrômicos (179 nm), no intermediário **40**. Estas modificações aumentaram o caráter *push-pull* do grupo doador de elétrons (dietilamino), na posição 7, deslocalizando o sistema π com a introdução de uma nova ligação dupla conjugada com o grupo aceitador de elétrons mencionado anteriormente. A combinação entre uma carga positiva formal e a deslocalização eletrônica presente no grupo piridina do intermediário **40** permitiu o elevado desvio batocrômico observado. Como era de esperar, essas alterações tornaram-se ainda mais pronunciadas com a inclusão do substituinte 4-estirilo, contendo um grupo amino ou um grupo alcóxi doador de elétrons na posição *para*, com a obtenção de superiores comprimentos de onda. O grupo amino, quando comparado com o grupo alcóxi, promoveu superiores desvios batocrômicos ($\cong 40\%$) devido ao seu elevado caráter doador de elétrons.

As absorvidades molares dos marcadores fluorescentes **42** e **44**, também foram fortemente influenciados pela natureza do grupo aceitador de elétrons na posição 2 e os grupos doadores de elétrons na posição 4 (ϵ (**42**) = 55000 cm⁻¹ M⁻¹ vs. ϵ (**44**) = 113500 cm⁻¹ M⁻¹). Considerando apenas o efeito do substituinte 4-estirilo, a

presença do grupo amino mais que duplicou a absorvidade molar quando comparado ao grupo alcóxi correspondente.^[82]

A diminuição nos rendimentos quânticos de fluorescência nos marcadores fluorescentes **42** e **44**, pode estar relacionada com o processo efetivo de transferência de carga intramolecular devido ao aumento na extensão do sistema π conjugado nessas moléculas.^[225] De acordo com o exposto, devido ao inferior caráter doador de elétrons do grupo alcóxi no substituinte 4-estirilo, em comparação com o grupo amino, esse substituinte promoveu rendimentos quânticos de fluorescência mais elevados.

II.1.1.9.4. Cálculos DFT e TDDFT para os marcadores fluorescentes **42** e **44**

As bandas de menor energia dos espectros são dominadas por duas excitações, S_1 e S_2 , como podemos verificar na Figura II.26. As excitações de mais baixa energia S_1 e S_2 consistem principalmente em contribuições de um elétron HOMO \rightarrow LUMO e HOMO-1 \rightarrow LUMO, respetivamente, para os compostos **42** e **44**, e as suas forças de oscilador relativas dependem da presença do grupo alcóxi ou o grupo amino nos referidos compostos (Tabela VI.13 (Anexos)). Para o composto com o grupo alcóxi **42**, a excitação S_2 foi dominante, enquanto a S_1 foi a mais intensa para o composto com o grupo amino **44**, o que explica a elevada absorvidade molar observada no composto com o grupo amino em comparação com o seu homólogo com o grupo alcóxi.

Além disso, o valor mais elevado da força de oscilador do composto **44** está alinhado com a maior absorção molar observada para este composto em particular.^[82]

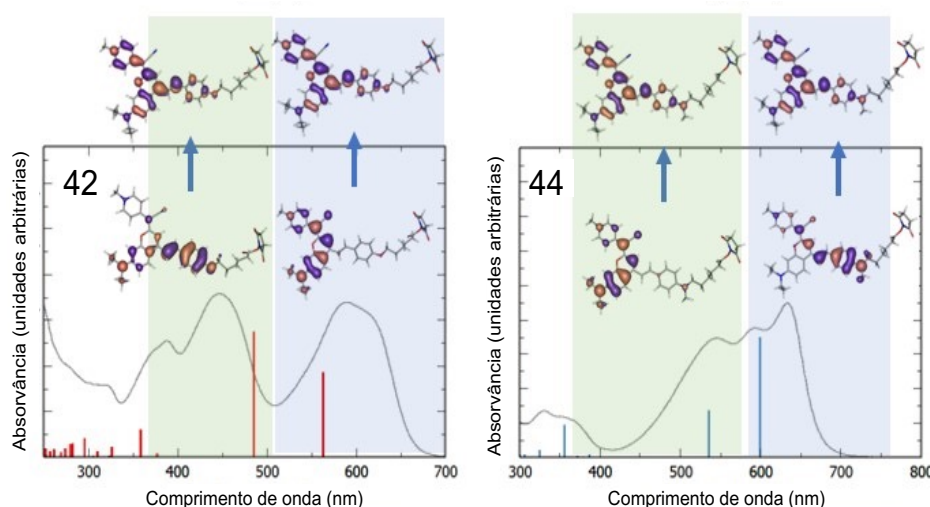


Figura II.26. Espectros experimentais (cinzento) comparados com as excitações calculadas (vermelho e azul) e as orbitais moleculares envolvidas nas duas transições eletrônicas de mais baixa energia dos marcadores fluorescentes **42** e **44**, em CH₃CN.^[82]

A forma e a distribuição espacial dos estados HOMO, HOMO-1 e LUMO apresentam diferenças notáveis, indicando características distintas da transferência de carga intramolecular que ocorre na excitação. Mais uma vez, observou-se que para os marcadores fluorescentes **42** e **44**, nem a HOMO, nem a HOMO-1, nem as orbitais LUMO apresentaram contribuições relevantes sobre o grupo reativo ligado, indicando que este não participa no sistema π conjugado e não interfere no processo de excitação.

Relativamente aos estados HOMO, a principal característica observada revela que as orbitais HOMO estavam maioritariamente localizadas nos anéis do derivado com o grupo alcóxi, enquanto para o derivado com o grupo amino, estavam localizadas no substituinte 4-estirilo. Pelo contrário, o inverso ocorreu para as orbitais HOMO-1, com a HOMO do composto com o grupo alcóxi a apresentar grande semelhança com a HOMO-1 do composto com o grupo amino e vice-versa.

Para os compostos **42** e **44**, no entanto, as orbitais LUMO mostraram menor localização e estenderam-se sobre a zona da ponte π e não apresentaram diferenças importantes entre os dois compostos. Esta extensão facilita as absorções de transferência de carga interna de baixa energia. A transição mais intensa, quer seja a de maior comprimento de onda ou não, correspondeu em todos os casos a uma transição do estado localizado maioritariamente no substituinte 4-estirilo para a LUMO,

o que sugere que estes eram os estados que se sobrepunham em maior medida com as orbitais LUMO. A transição de mais baixa energia no composto **44**, que exibe a maior força de oscilador, envolveu um processo de transferência de carga do substituinte 4-estirilo para os anéis fundidos, destacando a capacidade doadora significativa do grupo amino do substituinte 4-estirilo.

Seguindo o critério do índice Δr (Secção II.1.1.2.5), a maioria das excitações S_1 e S_2 pode ser classificada como transferência de carga. O valor mais elevado surgiu no composto **44**, indicando uma grande deslocação da carga à distância após a excitação.

A Figura II.27 apresenta a geometria molecular otimizada dos derivados do iodeto de (*E*)-4-(ciano(7-dietilamino-4-metil-2*H*-cromen-2-ilideno)metil)-1-metilpiridín-1-íio (**40**), tanto no estado fundamental como no primeiro estado excitado do singuleto. No estado fundamental, tanto o composto **42** como o **44** apresentam um desvio da planaridade entre o plano médio dos anéis fundidos e o plano do substituinte 4-estirilo. Este desvio limita a conjugação π que liga os grupos doadores e aceptores nas moléculas. A magnitude deste ângulo diedro variou para os referidos compostos, com o composto **44** a apresentar um ângulo diedro inferior, de 8.4° , e o composto **42** a apresentar um ângulo diedro mais elevado, de 15.5° (Tabela VI.14 (Anexos)).^[82]

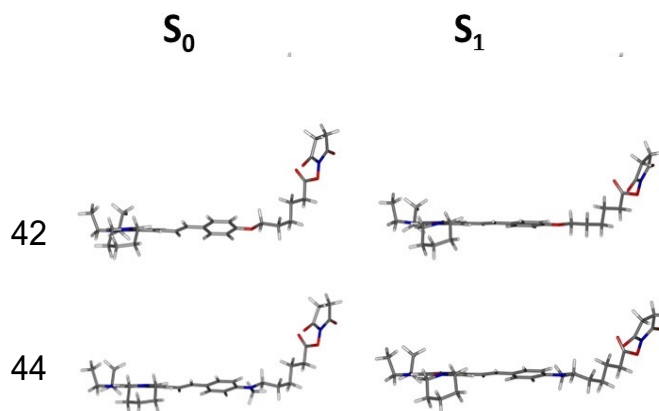


Figura II.27. Geometrias moleculares otimizadas, calculadas ao nível PBE0/6-31G (d,p), no estado fundamental e no primeiro estado excitado singuleto dos marcadores fluorescentes **42** e **44**, em CH_3CN .^[82]

Como observado nos compostos anteriores, o estado de excitação eletrónica S_1 também revelou um cenário distinto, onde os compostos **42** e **44** se tornaram quase planares. Os desvios da planaridade foram mínimos, de 1.4° para o composto **42** e de 1.8° para o composto **44** (Tabela VI.14 (Anexos)). A transição do estado S_0 para o

estado S_1 também foi caracterizada por uma diminuição da alternância do comprimento da ligação calculada (BLA), que diminuiu consideravelmente, para estes compostos, no estado excitado S_1 . No estado S_0 , os compostos exibiram variações de BLA de 0.09 Å para o composto **42** e 0.08 Å para o composto **44**. No entanto, no estado excitado S_1 , o BLA diminuiu significativamente para 0.05 Å tanto no composto **42** como no **44** (Tabela VI.14 (Anexos)).

De acordo com a regra de Kasha (Secção II.1.1.2.5), as emissões dos marcadores estudados são provenientes do estado S_1 . As propriedades de emissão foram calculadas a partir da geometria otimizada do estado S_1 e estão representadas na Tabela VI.15 (Anexos). Os comprimentos de onda de emissão $S_1 \rightarrow S_0$ foram sistematicamente menores do que os correspondentes ao processo de absorção $S_0 \rightarrow S_1$ com base na geometria otimizada do estado fundamental. As mudanças de geometria observadas que ocorreram no estado excitado eletronicamente S_1 promovem uma deslocalização eletrônica efetiva no sistema π conjugado, resultando numa redução no fosso de energia entre a HOMO e a LUMO. Consequentemente, após uma excitação vertical, há um notável relaxamento estrutural do estado excitado que ocorreu antes da emissão,^[217, 218] o que leva a uma energia de emissão menor em comparação com a energia de excitação, resultando assim num desvio substancial de Stokes.

A partir da geometria otimizada do estado excitado de menor energia S_1 , o tempo de vida de fluorescência teórico do estado excitado pode ser calculado pela equação de Einstein (Secção II.1.1.2.5). Os tempos de vida de fluorescência calculados dos marcadores fluorescentes estão registados na Tabela VI.15 (Anexos) e, para os referidos marcadores, os valores foram inferiores a 10 ns, típicos de estados emissivos de fluoróforos orgânicos. Mais uma vez, o composto com o grupo amino apresentou uma maior força de oscilador para a transição $S_1 \rightarrow S_0$, resultando num tempo de vida de fluorescência mais curto em comparação com o seu homólogo com o grupo alcóxi.^[82]

II.1.1.10. Análise do potencial dos novos marcadores fluorescentes 42 e 44, através da técnica FISH

II.1.1.10.1. Modelo *Saccharomyces cerevisiae* com as sondas EUK516-(42) e EUK516-(44)

Os resultados obtidos por citometria de fluxo da hibridação de células de *Saccharomyces cerevisiae* com sondas oligonucleotídicas comerciais e sintetizadas são apresentados na Figura II.28.

As células de *S. cerevisiae* hibridadas com as sondas EUK516-(42) e EUK516-(44), apresentaram sinais de fluorescência (Figura II.28; C e E), enquanto as que foram submetidas a hibridação com as sondas EUB338-(42) e EUB338-(44), apenas produziram sinais de autofluorescência (Figura II.28; D e F).^[224]

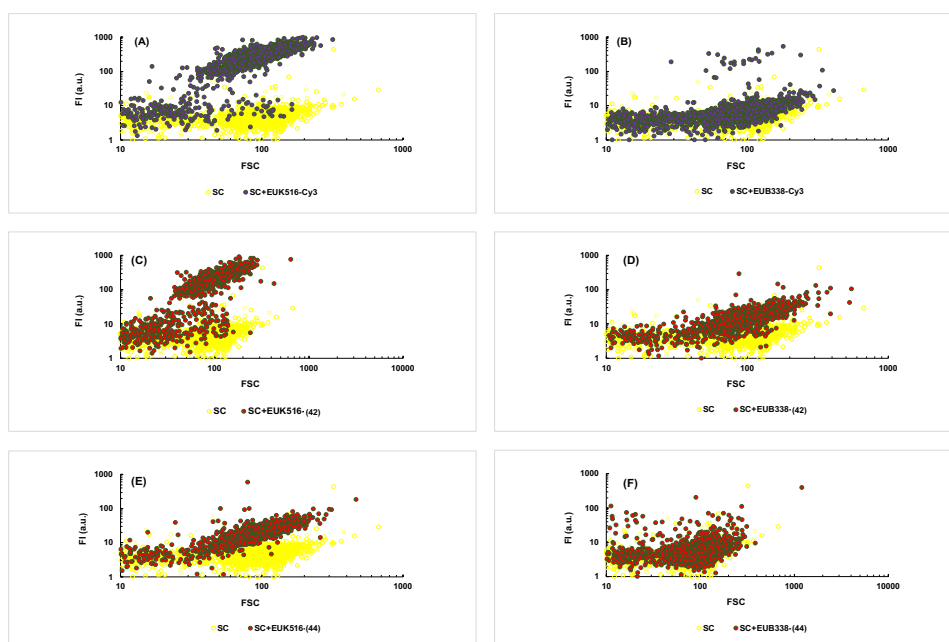


Figura II.28. Resultados de citometria de fluxo (intensidade de fluorescência (FI)/difusão direta (FSC)) referentes aos ensaios de hibridação das células de *Saccharomyces cerevisiae* (SC) com as sondas oligonucleotídicas: (A) EUK516-Cy3, (B) EUB338-Cy3, (C) EUK516-(42), (D) EUB338-(42), (E) EUK516-(44) e (F) EUB338-(44).

As células de *S.cerevisiae* hibridadas com a sonda EUK516-(**42**) apresentaram uma percentagem substancial de células fluorescentes ($\cong 76\%$), muito semelhante aos valores observados ($\cong 77\%$) com a sonda comercial EUK516-Cy3 (Figura II.29). Estes resultados demonstram de forma inequívoca a eficácia desta sonda para marcar células de *S. cerevisiae*. Embora se tenham obtido percentagens inferiores de células fluorescentes com a sonda EUK516-(**44**), esta demonstrou ainda assim uma capacidade notável de marcação das referidas células com uma percentagem de 67%. (Figura II.29). Mais uma vez, etapa de lavagem da técnica FISH poderá explicar o ligeiro aumento na percentagem de células fluorescentes observadas para as células marcadas com a sonda EUB338-Cy3 e EUB338-(**42**) quando comparadas com os mesmos valores das células de *S. cerevisiae*.

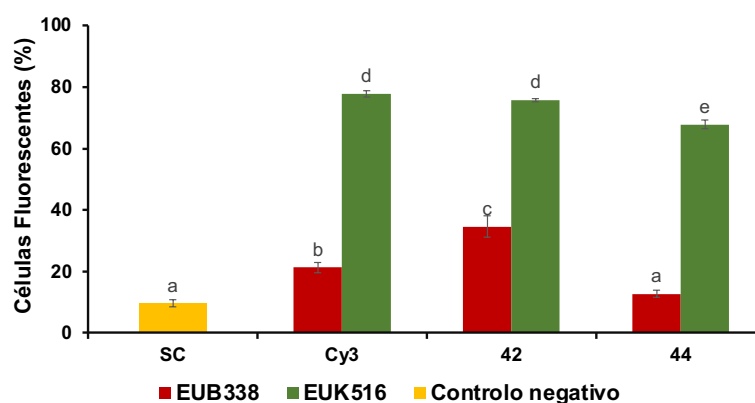


Figura II.29. Percentagem de células fluorescentes das células de *Saccharomyces cerevisiae* (SC) marcadas com as sondas EUK516 e EUB338 com os diferentes marcadores, **42**, **44** e Cy3®, e o controlo negativo. As letras indicam as diferenças estatisticamente significativas ($p < 0.05$).

Na Figura II.30 são apresentados os resultados de microscopia de epifluorescência dos ensaios de hibridação envolvendo células de *S. cerevisiae* com as sondas oligonucleotídicas comerciais e sintetizadas. Os referidos resultados confirmam que as sondas oligonucleotídicas EUK516-Cy3, EUK516-(**42**) e EUK516-(**44**), apresentaram sinais de fluorescência muito intensos (Figura II.30; A, C e E).

No contexto dos ensaios de hibridação envolvendo células de *S. cerevisiae* com as sondas oligonucleotídicas EUB338, não se observou qualquer sinal de fluorescência (Figura II.30; B, D e F).

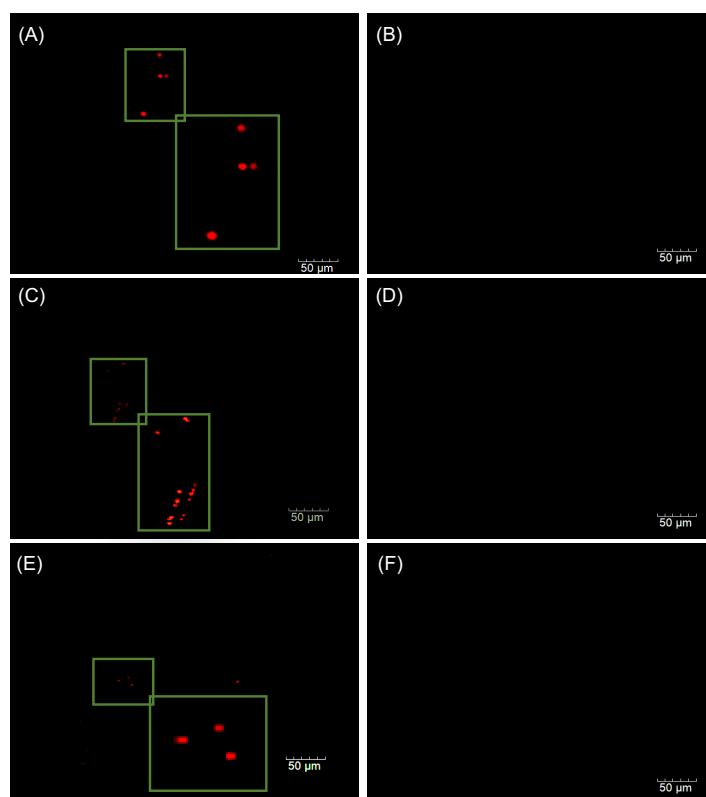


Figura II.30. Microfotografias obtidas através de microscopia de epifluorescência com o filtro TRITC referentes aos ensaios de hibridação das células de *Saccharomyces cerevisiae* com as sondas oligonucleotídicas: **(A)** EUK516-Cy3, **(B)** EUB338-Cy3, **(C)** EUK516-(42), **(D)** EUB338-(42), **(E)** EUK516-(44) e **(F)** EUB338-(44).

II.1.1.10.2. Modelo *Bacillus* sp. com as sondas EUB338-(42) e EUB338-(44)

Os resultados obtidos por citometria de fluxo da hibridação das células de *Bacillus* sp. com as sondas oligonucleotídicas comerciais e sintetizadas são apresentados na Figura II.31.

As células de *Bacillus* sp. hibridadas com as sondas EUB338-(42) e EUB338-(44), apresentaram sinais de fluorescência (Figura II.31; C e E), mas as células que foram submetidas a hibridação com as sondas EUK516-(42) e EUK516-(44), apenas produziram sinais de autofluorescência (Figura II.31; D e F).^[224]

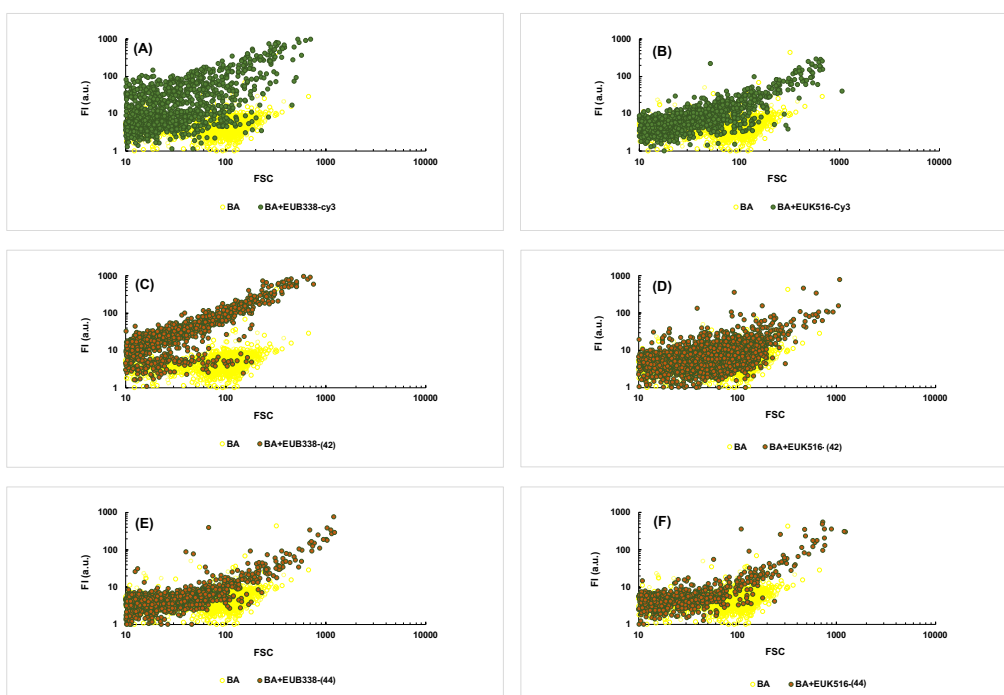


Figura II.31. Resultados de citometria de fluxo (intensidade de fluorescência (FI)/difusão direta (FSC)) referentes aos ensaios de hibridação das células de *Bacillus* sp. (BA) com as sondas oligonucleotídicas: **(A)** EUB338-Cy3, **(B)** EUK516-Cy3, **(C)** EUB338-(42), **(D)** EUK516-(42), **(E)** EUB338-(44) e **(F)** EUK516-(44).

As células de *Bacillus sp.* hibridadas com a sonda oligonucleotídica EUB338-(**42**) apresentaram uma percentagem substancial de células fluorescentes ($\cong 35\%$), muito semelhante aos valores observados ($\cong 36\%$) com a sonda EUB338-Cy3, disponível no mercado (Figura II.32). Os resultados obtidos revelam de forma evidente o elevado potencial do marcador fluorescente **42** nas sondas oligonucleotídicas EUB338, quando comparado com o dispendioso marcador comercial Cy3® e com o seu homólogo **44** (Figura II.32).^[224]

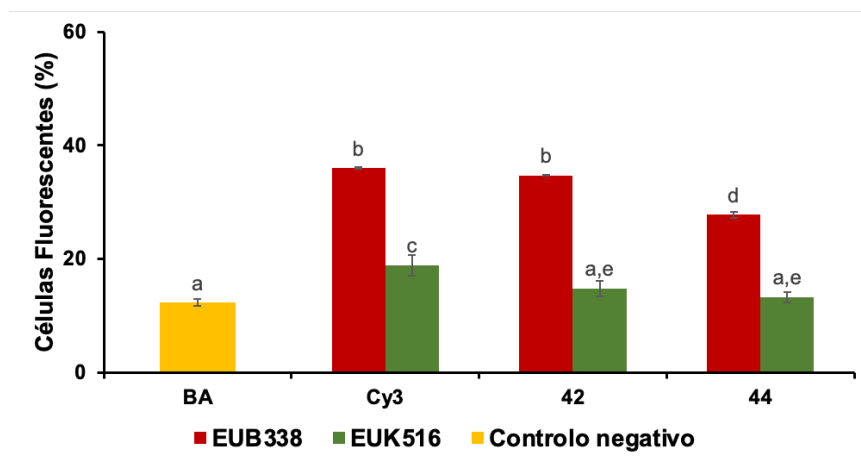


Figura II.32. Percentagem de células fluorescentes das células de *Bacillus sp.* (BA) marcadas com as sondas EUK516 e EUB338 com os diferentes marcadores, **42**, **44** e Cy3®, e o controlo negativo. As letras indicam as diferenças estatisticamente significativas ($p < 0.05$).

Na Figura II.33 são apresentados os resultados de microscopia de epifluorescência dos ensaios de hibridação envolvendo células de *Bacillus sp.* com as sondas oligonucleotídicas comerciais e sintetizadas. As sondas oligonucleotídicas EUB338-Cy3, EUB338-(**42**) e EUB338-(**44**), apresentaram sinais de fluorescência muito intensos o que correlaciona os resultados da microscopia de fluorescência com os de citometria de fluxo (Figura II.33; A, C e E).

Não foi possível observar qualquer sinal de fluorescência, como era esperado, nos ensaios de hibridação envolvendo células de *Bacillus sp.* com as sondas oligonucleotídicas EUK516 (Figura II.33; B, D e F).^[224]

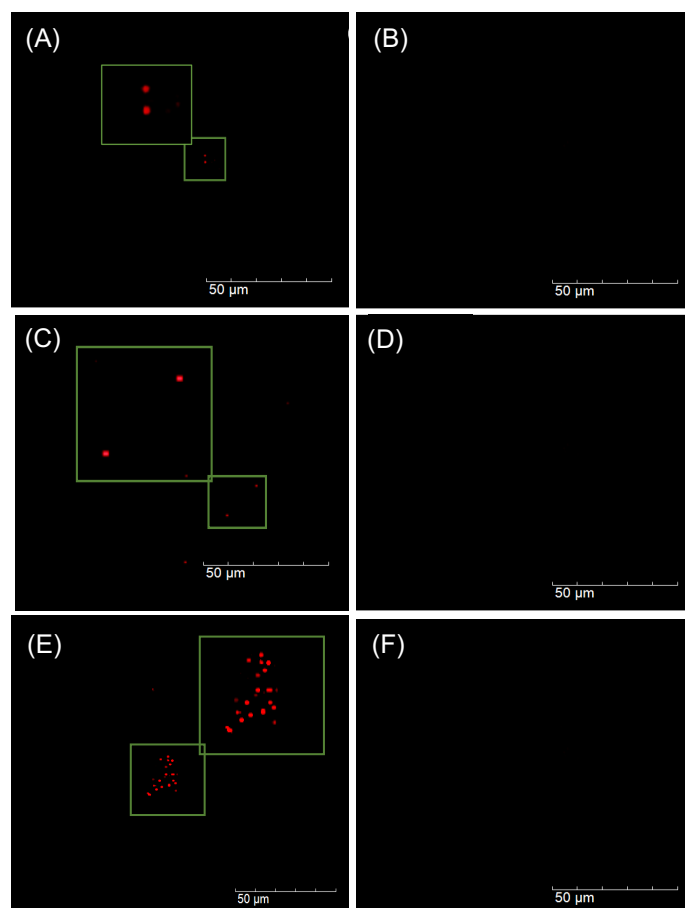


Figura II.33. Microfotografias obtidas através de microscopia de epifluorescência com o filtro TRITC referentes aos ensaios de hibridação das células de *Bacillus sp.* com as sondas oligonucleotídicas: **(A)** EUB338-Cy3, **(B)** EUK516-Cy3, **(C)** EUB338-(42), **(D)** EUK516-(42), **(E)** EUB338-(44) e **(F)** EUK516-(44).

II.1.2. Análise comparativa dos seis novos marcadores fluorescentes 11, 26, 36, 38, 42 e 44

Os seis novos marcadores fluorescentes 11, 26, 36, 38, 42 e 44, derivados da 7-dietilamino-4-metilcoumarina (1), apresentam colorações distintas em solução (Figura II.34).

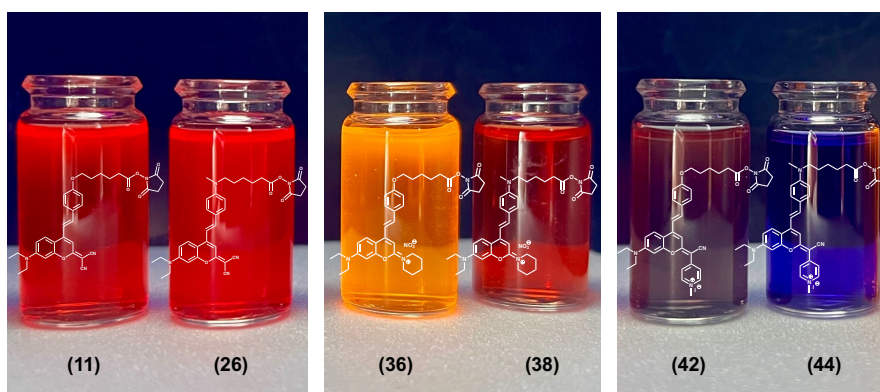


Figura II.34. Marcadores fluorescentes 11, 26, 36, 38, 42 e 44, a 365 nm, em CH₃CN.

II.1.2.1. Propriedades fotofísicas dos marcadores fluorescentes 11, 26, 36, 38, 42 e 44

A caracterização fotofísica dos seis novos marcadores fluorescentes 11, 26, 36, 38, 42 e 44, e os respectivos comprimentos de onda de absorção e emissão, assim como os rendimentos quânticos de fluorescência, estão resumidos na Tabela II.6.^[224]

Tabela II.6. Propriedades fotofísicas dos marcadores fluorescentes 11, 26, 36, 38, 42 e 44.

Composto	λ_{abs}^a (nm)	λ_{em}^b (nm)	Desvio de Stokes (nm, cm^{-1})	ϵ^c ($\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$)	Φ_F^d
1	371	434	63, 3913	22910	0.73
11	523	597	74, 2370	24000	0.29
26	498 (576) ^e	624	126, 4055	59000	0.27
36	404 (480) ^e	577	173, 7421	30000	0.92
38	487	628	141, 4610	64000	0.56
42	589 (615) ^e	663	74, 1895	55000	0.10
44	634	683	49, 1132	113500	0.07

^aMáximos de absorção em CH_3CN . ^bMáximos de emissão em CH_3CN . ^cAbsortividade molar na transição de comprimento de onda mais longo. ^dRendimento quântico de fluorescência em EtOH, determinado utilizando 7-dietilamino-4-metil-coumarina ($\Phi_F = 0.73$ em EtOH) como padrão. ^eOmbro.

Os espectros de absorção dos referidos marcadores estão representados na Figura II.35.

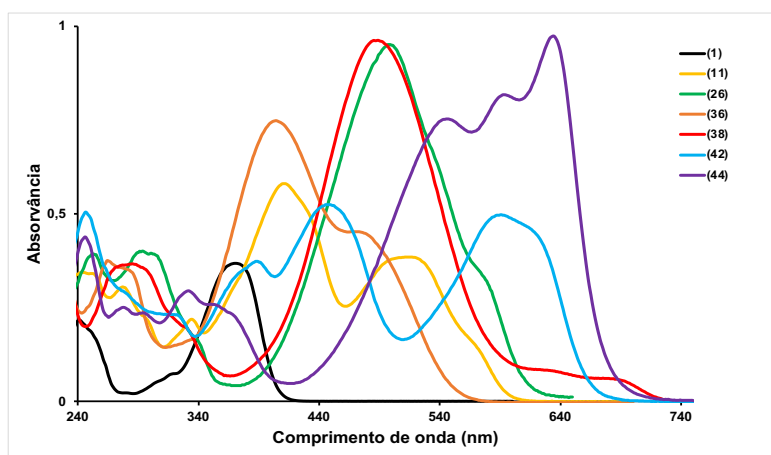


Figura II.35. Espectros de absorção da 7-dietilamino-4-metilcoumarina (**1**) e dos seis novos marcadores fluorescentes **11**, **26**, **36**, **38**, **42** e **44**, em CH_3CN .

Como se pode deduzir da Tabela II.6, as propriedades fotofísicas dos novos marcadores fluorescentes foram fortemente afetadas pela natureza dos grupos aceptadores de elétrons na posição 2 e também dos grupos doadores de elétrons na posição 4, e obviamente pela sua combinação. Considerando apenas o efeito do substituinte 4-estirilo, a presença do grupo amino neste substituinte mais do que duplicou a absortividade molar dos marcadores quando comparados com os seus homólogos com o grupo alcóxi.

Em relação ao efeito dos grupos aceptadores de elétrons na posição 2, verifica-se que a presença do substituinte iodeto de metilpiridínio provoca desvios hipercrômicos pronunciados nos marcadores **42** e **44**, o que será devido à presença de uma carga positiva formal neste substituinte, aliada ao efeito mesómero do mesmo para uma superior deslocalização eletrónica.

Todos os marcadores fluorescentes apresentaram muito bons e elevados desvios de Stokes que, como já foi referido, é uma condição essencial para uma eficaz deteção da emissão de fluorescência. O marcador fluorescente **44** apresenta um desvio de Stokes ligeiramente inferior ao dos seus congéneres, o que se pode ser atribuído à conjugação do forte efeito doador de elétrons do grupo estirilo na posição 4 com o do forte aceptador de elétrons na posição 2, que deverá conduzir a processos de transferência de carga intramoleculares mais efetivos após a excitação. A diminuição nos rendimentos quânticos de fluorescência nos marcadores fluorescentes **42** e **44**,

pode estar relacionada com o processo efetivo de transferência de carga intramolecular devido ao aumento na extensão do sistema π conjugado nessas moléculas.^[225] Obviamente, este efeito não foi tão pronunciado nos marcadores fluorescentes **36** e **38**, razão pela qual apresentaram rendimentos quânticos de fluorescência elevados. De acordo com o exposto, devido ao inferior caráter doador de elétrons do grupo alcóxi no substituinte 4-estiril, em comparação com o grupo amino, esse substituinte promoveu rendimentos quânticos de fluorescência mais elevados nos respectivos marcadores fluorescentes.

II.1.2.2. Análise do potencial dos novos marcadores fluorescentes 11, 26, 36, 38, 42 e 44, através da técnica FISH

II.1.2.2.1. Modelo *Saccharomyces cerevisiae* com as sondas EUK516-(11), EUK516-(26), EUK516-(36), EUK516-(38), EUK516-(42) e EUK516-(44)

As células de *Saccharomyces cerevisiae* hibridadas com as sondas oligonucleotídicas sintetizadas EUK516-(**36**) e EUK516-(**42**) apresentaram valores percentuais de células fluorescentes significativamente próximos aos das células hibridadas com a sonda comercial EUK516-Cy3 (Figura II.36). Estes resultados confirmam a elevada capacidade destas sondas para a marcação das células de *S. cerevisiae*. Por outro lado, as células hibridadas com as sondas EUK516-(**11**), EUK516-(**38**) e EUK516-(**44**) apresentaram uma percentagem substancial de células fluorescentes, variando entre 65% e 68%, muito semelhante aos valores observados com a sonda comercial. Estes resultados demonstram de forma inequívoca a eficácia destas sondas para marcar células de *S. cerevisiae*.

Embora as células submetidas a hibridação com as sondas EUK516-(26) apresentem percentagens inferiores de células fluorescentes, esta demonstrou ainda assim uma capacidade notável na marcação de células de *S. cerevisiae*.

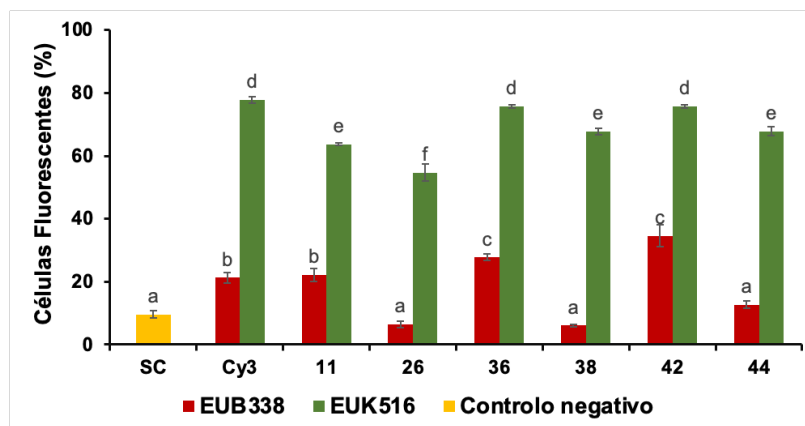


Figura II.36. Percentagem de células fluorescentes das células de *Saccharomyces cerevisiae* (SC) marcadas com as sondas EUK516 e EUB338 com os diferentes marcadores, 11, 26, 36, 38, 42, 44 e Cy3®, e o controlo negativo. As letras indicam as diferenças estatisticamente significativas ($p < 0.05$).^[224]

As sondas preparadas com os novos marcadores fluorescentes apresentaram elevada capacidade para a marcação das células de *S. cerevisiae*, com valores percentuais de células fluorescentes muito semelhantes aos das células hibridadas com a sonda comercial EUK516-Cy3. Os resultados obtidos são de difícil correlação direta com as propriedades fotofísicas dos respetivos marcadores fluorescentes, ou seja, em última análise, o desenvolvimento de novas sondas fluorescentes depende, em grande medida, de tentativa e erro ou de descoberta fortuita.

II.1.2.2.2. Modelo *Bacillus* sp. com as sondas EUB338-(11), EUB338-(26), EUB338-(36), EUB338-(38), EUB338-(42) e EUB338-(44)

As células de *Bacillus* sp. hibridadas com a sonda oligonucleotídica EUB338-(38), apresentaram um aumento estatisticamente significativo na percentagem de células fluorescentes em comparação com as células hibridadas com a sonda EUB338-Cy3. Estes resultados indicam a excecional capacidade da sonda EUB338-(38) para a marcação de células de *Bacillus* sp. (Figura II.37). Do mesmo modo, as sondas EUB338-(26) e EUB338-(42) também apresentaram percentagens de células fluo-

centes comparáveis às da sonda comercial EUB338-Cy3, confirmando também a sua capacidade para a marcação de células de *Bacillus sp.* (Figura II.37).

Por outro lado, as sondas EUB338-(11) e EUB338-(44), apesar de apresentarem uma intensidade de fluorescência reduzida em comparação com as células hibridadas com EUB338-Cy3, demonstraram percentagens relativamente elevadas de células fluorescentes, aproximando-se dos níveis observados com a sonda comercial. Em contrapartida, as células hibridadas com a sonda EUB338-(36) apresentaram uma percentagem significativamente inferior de células fluorescentes, sugerindo a sua limitada aptidão para a marcação destas células.

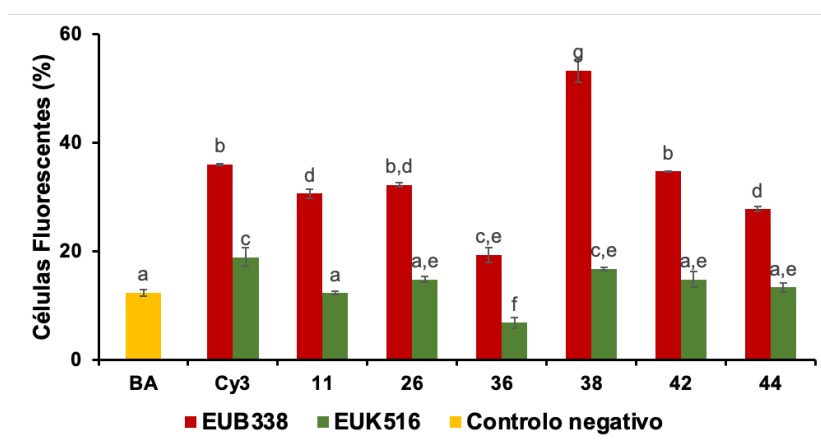


Figura II.37. Percentagem de células fluorescentes das células de *Bacillus sp.* (BA) marcadas com as sondas EUK516 e EUB338 com os diferentes marcadores, 11, 26, 36, 38, 42, 44 e Cy3®, e o controlo negativo. As letras indicam as diferenças estatisticamente significativas ($p < 0.05$).^[224]

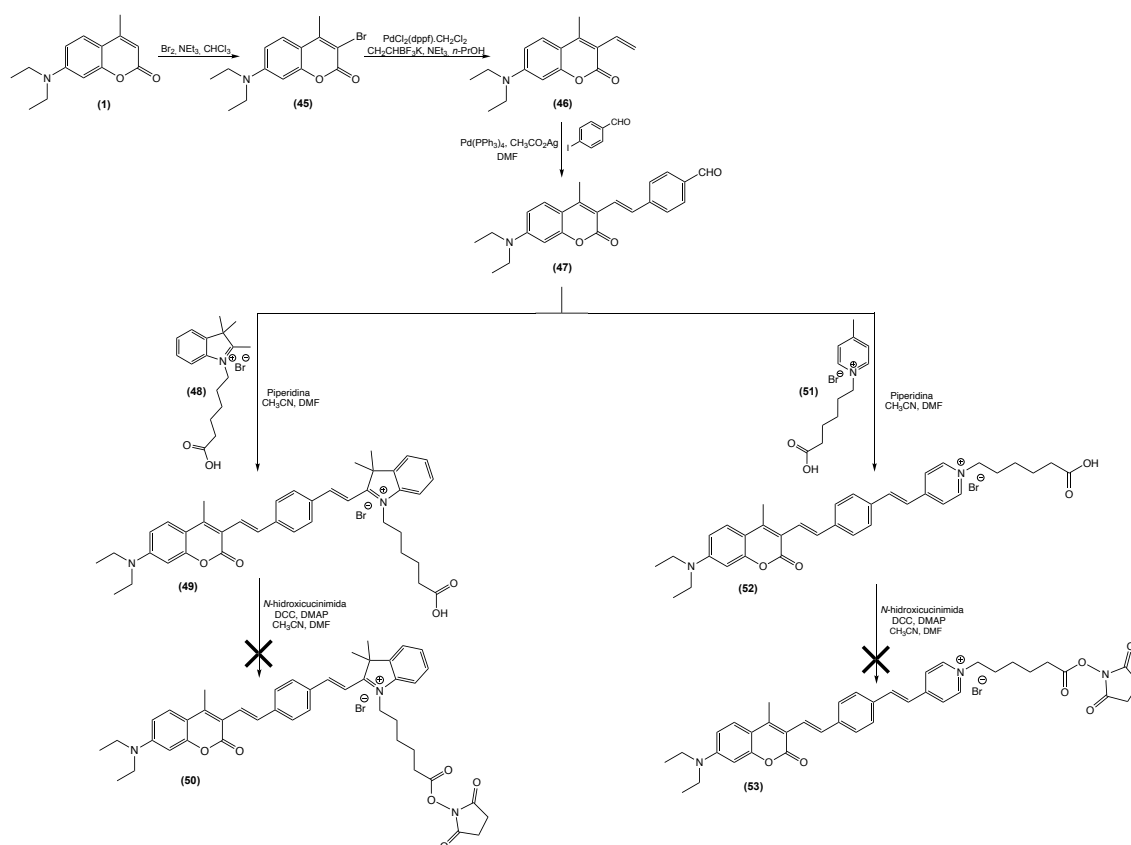
À semelhança do modelo anterior, as sondas preparadas com os novos marcadores fluorescentes também apresentaram elevada capacidade para a marcação das células de *Bacillus sp.*, com valores percentuais de células fluorescentes semelhantes aos das células hibridadas com a sonda comercial EUK516-Cy3. Também neste modelo os resultados obtidos são de difícil correlação direta com as propriedades fotofísicas dos respetivos marcadores fluorescentes, ou seja, apenas as muitas tentativas permitem o desenvolvimento de novas sondas fluorescentes.

II.1.3. Derivados 3-substituídos da 7-dietilamino-4-metilcoumarina

Como foi anteriormente referido, a extensão da conjugação na posição 2, eliminaria o indesejável efeito aceitador de eletrões do grupo carbonilo em coumarinas, caso se pretenda aumentar a deslocalização π a partir da posição 3. Considerando os conhecimentos adquiridos neste e em anteriores trabalhos, a síntese de coumarinas 3 substituídas por fortes grupos aceptadores de eletrões, para posterior comparação das suas propriedades fotofísicas com os seus congéneres 2-substituídos, tornou-se então um desafio sintético inevitável.

II.1.3.1. Tentativa de síntese do brometo de 2-((*E*)-4-((*E*)-2-(7-dietilamino-4-metil-2-oxo-2*H*-cromen-3-il)vinil)estiril)-1-(6-((2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi)-6-oxo-hexil)-3,3-dimetil-3*H*-indol-1-io (50) e do brometo de 4-((*E*)-4-((*E*)-2-(7-dietilamino-4-metil-2-oxo-2*H*-cromen-3-il)vinil)estiril)-1-(6-((2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi)-6-oxo-hexil)piridín-1-io (53)

A tentativa de síntese do brometo de 2-((*E*)-4-((*E*)-2-(7-dietilamino-4-metil-2-oxo-2*H*-cromen-3-il)vinil)estiril)-1-(6-((2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi)-6-oxo-hexil)-3,3-dimetil-3*H*-indol-1-io (50) e do brometo de 4-((*E*)-4-((*E*)-2-(7-dietilamino-4-metil-2-oxo-2*H*-cromen-3-il)vinil)estiril)-1-(6-((2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi)-6-oxo-hexil)piridín-1-io (53), foi planeada segundo o Esquema II.21.



Esquema II.21. Tentativa de síntese dos marcadores fluorescentes, brometo de 2-((*E*)-4-((*E*)-2-(7-dietilamino-4-metil-2-oxo-2*H*-cromen-3-il)vinil)estiril)-1-(6-((2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi)-6-oxo-hexil)-3,3-dimetil-3*H*-indol-1-io (50) e do brometo de 4-((*E*)-4-((*E*)-2-(7-dietilamino-4-metil-2-oxo-2*H*-cromen-3-il)vinil)estiril)-1-(6-((2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi)-6-oxo-hexil)piridín-1-io (53).

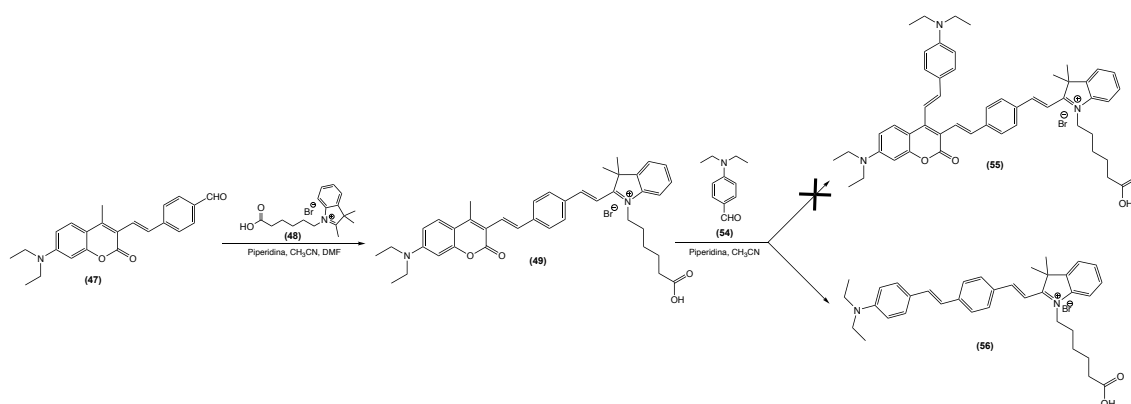
A estratégia de síntese do brometo de 1-(5-carboxipentil)-2-((*E*)-4-((*E*)-2-(7-dietil-amino-4-metil-2-oxo-2*H*-cromen-3-il)vinil)estiril)-3,3-dimetil-3*H*-indol-1-io (**49**) e do brometo de 1-(5-carboxipentil)-4-((*E*)-4-((*E*)-2-(7-dietilamino-4-metil-2-oxo-2*H*-cromen-3-il)-vinil)estiril)piridín-1-io (**52**), foi delineada utilizando grupos fortemente aceitadores de elétrons (**48** e **51**) com cargas positivas formais, e considerando o efeito mesómero dos mesmos para uma superior deslocalização eletrônica.

Os compostos **49** e **52**, foram sintetizados através de reações de condensação aldólica entre o (*E*)-4-(2-(7-dietilamino-4-metilcoumarina-3-il)vinil)benzaldeído (**47**) e o brometo de 1-(5-carboxipentil)-2,3,3-trimetil-3*H*-indol-1-io (**48**) (Reação IV.1.2.64) e o (*E*)-4-(2-(7-dietilamino-4-metilcoumarina-3-il)vinil)benzaldeído (**47**) e o brometo de 1-(5-carboxipentil)-4-metilpiridín-1-io (**51**) (Reação IV.1.2.67), respectivamente.

As tentativas de esterificação dos ácidos carboxílicos dos compostos **49** e **52**, com a *N*-hidroxissuccinimida **50** e **53** (Reações IV.1.2.65 e IV.1.2.68), revelaram-se infrutíferas. A avaliação qualitativa por RMN, da mistura reacional de ambas as reações, permitiu verificar a ausência do singuleto característico dos prótons metílicos em C-4. Este resultado sugere que o desaparecimento destes prótons nos compostos **49** e **52** se deve à sua participação em reações secundárias, devido à sua inesperada elevada acidez, quando comparada com o precursor aldeído **47**. Num trabalho anterior, o referido aldeído foi sujeito a reações de condensação de Knoevenagel, na presença de piperidina (base) e os referidos prótons metílicos em C-4 não participaram em qualquer reação secundária.^[123] Estes resultados sugerem que o aumento brusco na acidez destes prótons se deveu à inclusão, nos compostos **49** e **52**, de grupos fortemente aceitadores de elétrons na posição 3 da coumarina.

II.1.3.2. Tentativa de síntese do brometo de 1-(5-carboxipentil)-2-((*E*)-4-((*E*)-2-(7-dietilamino-4-((*E*)-4-(dietilamino)estiril)-2-oxo-2*H*-cromen-3-il)vinil)-estiril)-3,3-dimetil-3*H*-indol-1-íio (55)

De acordo com os resultados da secção anterior, o aumento de acidez dos prótons do grupo metilo em C-4 dos compostos **49** e **52**, poderia ser usado para uma estratégia sintética de derivatização a partir desse grupo, com o intuito de aumentar ainda mais a deslocalização eletrónica. Assim, testou-se a introdução de um substituinte 4-estirilo, com um grupo amino em posição *para*, no composto **49** (Reação IV.1.2.69), para confirmar o aumento da referida acidez (Esquema II.22).



Esquema II.22. Tentativa de síntese do brometo de 1-(5-carboxipentil)-2-((*E*)-4-((*E*)-2-(7-dietilamino-4-((*E*)-4-(dietilamino)estiril)-2-oxo-2*H*-cromen-3-il)vinil)estiril)-3,3-dimetil-3*H*-indol-1-íio (55).

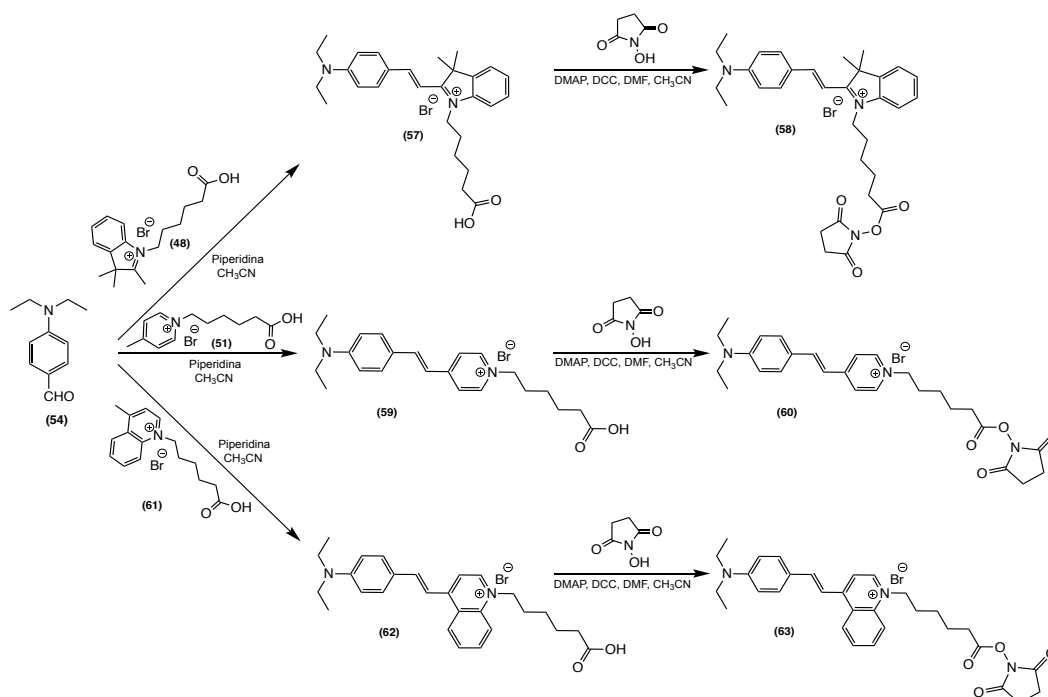
Na reação IV.1.2.69 formou-se exclusivamente um produto de cor laranja, facilmente isolado por cromatografia em coluna de sílica. A avaliação do seu espectro de ¹H-RMN permitiu verificar que não era o pretendido produto **55**, mas sim um produto (**56**) originado por um possível rearranjo intramolecular a partir do intermediário **55**. Este novo produto, cujo mecanismo reacional deverá ser objeto de um estudo mais aprofundado, poderá constituir uma estratégia sintética muito útil para incorporar grupos estirilo, com diversos substituintes, em fragmentos moleculares com grupos aceitadores de eletrões, numa nova tipologia de formação de alcenos à semelhança da reação de Heck.^[193-197]

II.2. Outras pequenas moléculas

II.2.1. Derivados da 4-dietilaminobenzaldeído (54)

Além dos derivados da 7-dietilamino-4-metilcoumarina (**1**), foi igualmente desenvolvida uma estratégia sintética mais simples e económica, através de três passos reacionais, para produzir novas pequenas moléculas de baixo custo, utilizando o 4-dietilaminobenzaldeído (**54**) como material de partida. Através de reações de condensação aldólica foram produzidos derivados do 4-dietilaminobenzaldeído (**54**), como potenciais marcadores fluorescentes para biomoléculas.

A principal abordagem sintética para produzir os referidos derivados baseou-se na elevada acidez dos prótons dos grupos metilo dos derivados indol, piridina e quinolina, com uma carga positiva formal, **48**, **51** e **61**, respetivamente, que permitem reações de condensação aldólica. As rotas sintéticas seguidas para a preparação dos marcadores fluorescentes para as biomoléculas **58**, **60** e **63**, com muito bons a elevados rendimentos reacionais, estão representados no Esquema II.23.



Esquema II.23. Síntese dos marcadores fluorescentes, brometo de (*E*)-2-(4-(dietilamino)estiril)-1-(6-((2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi)-6-oxo-hexil)-3,3-dimetil-3*H*-indol-1-io (**58**), brometo de (*E*)-4-(4-(dietilamino)estiril)-1-(6-((2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi)-6-oxo-hexil)piridín-1-io (**60**) e brometo de (*E*)-1-(5-carboxipentil)-4-(4-(dietilamino)estiril)quinolín-1-io (**63**).^[226]

A reação de condensação aldólica, estereosseletiva e altamente eficiente, entre o 4-dietilaminobenzaldeído (**54**) e os derivados de indol, piridina e quinolina, com efetivos grupos aceptadores de elétrons devido à presença de uma carga positiva formal, permitiu a síntese dos intermediários **57**, **59** e **62**. A presença, nestes intermediários, de um grupo doador e de um grupo aceitador de elétrons, aumentou evidentemente a deslocalização dos elétrons π e a natureza *push-pull* do cromóforo. O menor rendimento reacional observado no intermediário **62** pode ser atribuído a uma diminuição da acidez dos prótons de metilo no derivado de quinolina **61**. Esta diminuição pode resultar de uma maior deslocalização eletrônica através da estrutura molecular, facilitada pela presença adicional do grupo fenilo, em comparação com o derivado de piridina **51**. Os novos produtos acima mencionados **58**, **60** e **63** (Esquema II.23), foram facilmente isolados após cromatografia em coluna de sílica e foram completamente caracterizados por espectroscopia de RMN (1D e 2D) e espectrometria de massa de alta resolução. Todos os dados espectrais são consistentes com as estruturas propostas.

II.2.1.1. Propriedades fotofísicas dos marcadores fluorescentes, brometo de (*E*)-2-(4-(dietilamino)estiril)-1-(6-((2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi)-6-oxo-hexil)-3,3-dimetil-3*H*-indol-1-io (58), brometo de (*E*)-4-(4-(dietilamino)estiril)-1-(6-((2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi)-6-oxo-hexil)piridín-1-io (60) e brometo de (*E*)-1-(5-carboxipentil)-4-(4-(dietilamino)estiril)quinolín-1-io (63)

As propriedades fotofísicas do 4-dietilaminobenzaldeído (**54**) e dos seus derivados **58**, **60** e **63**, nomeadamente as suas propriedades de absorção e emissão, assim como os rendimentos quânticos de fluorescência, foram avaliadas e estão registadas na Tabela II.7.

A extensão do sistema π conjugado nestas moléculas é igualmente essencial para um processo eficaz de transferência de carga intramolecular do estado excitado emissivo, melhorando as suas propriedades fotofísicas, tais como elevadas absorvidades molares e, no caso dos compostos **60** e **63**, elevados desvios de Stokes.^[226]

Tabela II.7. Propriedades fotofísicas dos derivados do 4-dietilaminobenzaldeído (**54**).

Composto	λ_{abs}^a (nm)	λ_{em}^b (nm)	Desvio de Stokes (nm, cm^{-1})	ϵ^c ($\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$)	Φ_F
54	342	--	--	19400	--
58	556	597	41, 1235	90000	0.57
60	490	604	114, 3852	64000	0.30
63	560	665	105, 2820	60000	0.02

^aMáximos de absorção em CH_3CN . ^bMáximos de emissão em CH_3CN . ^cAbsortividade molar na transição de comprimento de onda mais longo. ^dRendimento quântico de fluorescência em EtOH, determinado utilizando 7-dietilamino-4-metil-coumarina ($\Phi_F = 0.73$ em EtOH) como padrão.

Como esperado, os compostos **58**, **60** e **63** apresentam máximos de absorção a comprimentos de onda muito mais longos, quando comparados com o precursor 4-dietilaminobenzaldeído (**54**), devido ao efeito de transferência de carga intramolecular pela conjugação do grupo dietilamino doador de eletrões do grupo estirilo na posição 4 conjugado com os grupos aceitadores de eletrões. A banda de absorção mais forte, na região de 440-640 nm, é provavelmente originada a partir das transições $\pi-\pi^*$ dos eletrões deslocalizados dos anéis aromáticos presentes nos referidos derivados. O composto **63**, com um grupo quinolina, apresenta uma absorção deslocada para o

vermelho em comparação com os seus análogos **58** e **60**. Isto deve-se provavelmente à superior energia de ressonância do indol e da piridina, quando comparada com a da quinolina, o que atrasa a deslocalização eletrônica através da sua estrutura molecular. As absorptividades molares e os rendimentos quânticos de fluorescência foram fortemente afetados, e na mesma direção, pela natureza dos grupos aceptadores de elétrons presentes nos derivados do 4-dietilaminobenzaldeído (**54**). A análise da Tabela II.7 confirma que o grupo indol promove o aumento da absorptividade molar e do rendimento quântico de fluorescência, em comparação com os valores mais baixos observados com o grupo quinolina. Esta diferença pode também resultar da variação dos efeitos da energia de ressonância dos grupos aceptadores de elétrons.

Os espectros de absorção dos referidos compostos estão apresentados na Figura II.38.

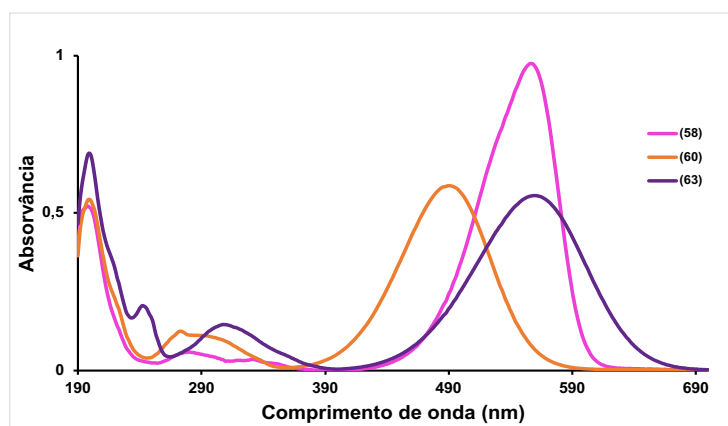


Figura II.38. Espectros de absorção dos marcadores fluorescentes, brometo de (*E*)-2-(4-(dietilamino)estiril)-1-(6-((2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi)-6-oxo-hexil)-3,3-dimetil-3*H*-indol-1-io (**58**), brometo de (*E*)-4-(4-(dietilamino)estiril)-1-(6-((2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi)-6-oxo-hexil)piridín-1-io (**60**) e brometo de (*E*)-1-(5-carboxipentil)-4-(4-(dietilamino)estiril)quinolín-1-io (**63**).

II.2.1.2. Cálculos DFT e TDDFT para os marcadores fluorescentes 58, 60 e 63

Para os marcadores fluorescentes **58**, **60** e **63**, a banda de menor energia dos espectros, de natureza HOMO→LUMO e bastante intensa (força de oscilador, f , maior que 1), está bem separada de outras transições (Figura II.39 e Tabela VI.16 (Anexos)). Como verificado em todos os casos anteriores, para estes marcadores fluorescentes, nem as orbitais HOMO, nem as HOMO-1, nem as LUMO apresentam contribuições relevantes no grupo reativo, indicando que este não participa no sistema π conjugado e não interfere no processo de excitação.^[226]

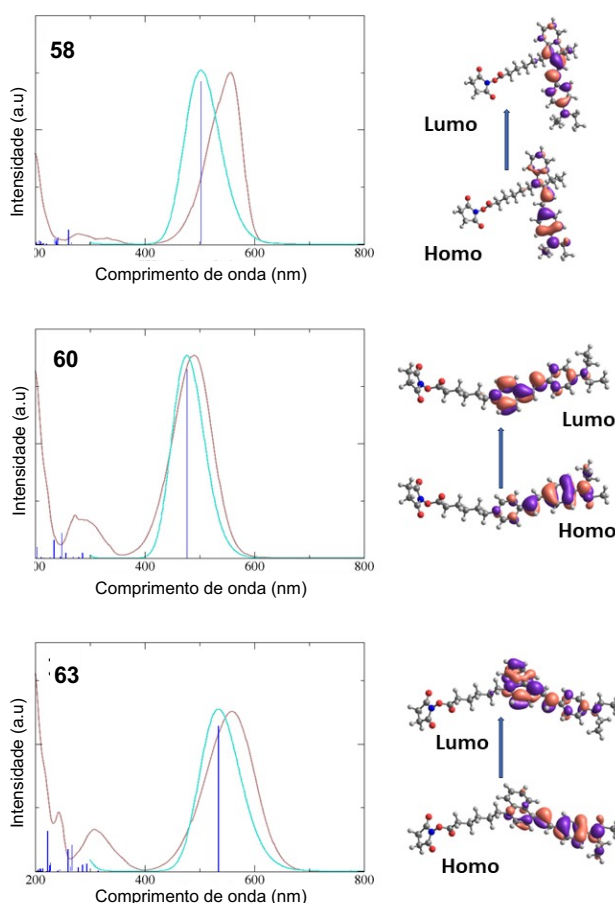


Figura II.39. Espectros experimentais (vermelho) comparados com os espectros calculados (verde) e energias de transição eletrônica (azul-escuro). Gráficos de contorno das orbitais moleculares envolvidas na excitação de mais baixa energia à direita.^[226]

Relativamente aos estados HOMO, a principal característica observada é que as orbitais HOMO estão mais localizadas na secção da *N,N*-dietil-4-vinilanilina para os três

compostos, enquanto as orbitais LUMO se espalham pelos grupos indol, piridina e quinolina. Este facto é mais pronunciado para o composto **63** e menos notório para o composto **58**. A caracterização do tipo de excitação pode ser obtida através da análise das orbitais envolvidas ou da diferença de densidade eletrónica que ocorre durante a excitação. A transição $S_0 \rightarrow S_1$ pode ser atribuída a transições de eletrões $\pi \rightarrow \pi^*$ e é principalmente de carácter HOMO \rightarrow LUMO para todos os compostos. O rearranjo de carga que ocorre durante as transições $S_0 \rightarrow S_1$ é apresentado na Figura VI.3 (Anexos), revelando a diferença nas densidades eletrónicas entre os estados envolvidos na transição e indicando claramente as regiões dos marcadores fluorescentes que perdem ou ganham carga eletrónica após a excitação. É evidente que para os compostos **60** e **63** existem grandes rearranjos da densidade de carga, com uma clara diminuição e aumento da densidade localizada em diferentes partes das moléculas e, portanto, a transição correspondente pode ser considerada como transferência de carga intramolecular. Uma medida quantitativa da distância da transferência de carga, o índice Δr , foi utilizada para caraterizar a natureza das transições eletrónicas.^[223] As transições que exibem um índice Δr substancial indicam um carácter de transferência de carga intramolecular significativo, com um valor geralmente aceite de 2.0 Å utilizado como critério para atribuir o carácter de transferência de carga intramolecular. Seguindo este critério, todas os estados excitados S_1 podem ser classificadas como de transferência de carga intramolecular, embora o valor do índice seja superior, indicando assim uma deslocação da carga a uma distância muito maior após a excitação, para os compostos **60** e **63**, estando no limite de classificação de transferência de carga intramolecular para o composto **58** (Tabela VI.16 (Anexos)). Outro parâmetro utilizado para caraterizar a natureza das transições eletrónicas é o índice Λ , que é uma medida da sobreposição entre os estados buraco e eletrão durante as excitações eletrónicas.

Em particular, os índices Λ são quase inversamente proporcionais aos índices Δr , uma vez que uma maior sobreposição buraco-eletrão indica geralmente uma menor distância de separação entre eles. Seguindo a tendência do valor observado em Δr , os valores de Λ são significativamente mais pequenos para os compostos **60** e **63** do que para o composto **58** (Tabela VI.16 (Anexos)). As configurações moleculares dos compostos no seu estado fundamental estão representadas na Figura VI.3 (Anexos). Neste estado, observam-se desvios da planaridade ($\sim 19.4^\circ$ e 8.1°) nos compostos **58** e **63**, respetivamente, nomeadamente entre os planos dos dois anéis, enquanto o composto **60** parece predominantemente planar (Tabela VI.17 (Anexos)).

No estado excitado S_1 , a estrutura do composto **60**, já planar, permanece relativamente estável, com o composto **58** a sofrer uma rotação de 2.9° no sentido da

planaridade e o composto **63** a tornar-se quase planar. A transição do estado S_0 para o estado S_1 é marcada por uma diminuição significativa da alternância do comprimento da ligação calculada (BLA) ao longo da ponte π , o que significa que a diferença média de comprimento entre uma ligação simples e uma ligação dupla adjacente diminui notavelmente em todos os compostos. No estado S_0 , os valores de BLA variam de 0.04 Å para o composto **58** a 0.07 Å para o composto **60**. Em contrapartida, no estado excitado S_1 , o BLA sofre uma redução substancial, atingindo 0.00 Å para o composto **58** e atingindo um valor máximo de 0.02 Å para o composto **63**. De acordo com a regra de Kasha, (Secção II.1.1.2.5), as emissões dos marcadores estudados são provenientes do estado S_1 . As propriedades de emissão foram calculadas a partir da geometria otimizada do estado S_1 e estão representadas na Tabela VI.16 (Anexos). Os comprimentos de onda de emissão $S_1 \rightarrow S_0$ são sistematicamente maiores do que os correspondentes ao processo de absorção $S_0 \rightarrow S_1$ com base na geometria otimizada do estado fundamental. As mudanças de geometria observadas que ocorrem no estado eletrónico excitado S_1 promovem uma maior deslocalização eletrónica no sistema π conjugado, resultando numa redução da diferença de energia entre a HOMO e a LUMO. Consequentemente, após uma excitação vertical, há um relaxamento estrutural do estado excitado que ocorre antes da emissão, o que leva a uma energia de emissão menor em comparação com a energia de excitação.^[227, 231] A partir da geometria otimizada do estado excitado de menor energia S_1 , o tempo de vida de fluorescência teórico do estado excitado pode ser calculado pela equação de Einstein (Secção II.1.1.2.5). Os tempos de vida de fluorescência calculados para os marcadores fluorescentes, estão registados na Tabela VI.18 (Anexos) e apresentam valores muito inferiores a 10 ns, o que é característico de estados emissivos de fluoróforos orgânicos, enquanto tempos de vida maiores correspondem a estados não radiativos.^[226]

II.2.1.3. Análise do potencial dos novos marcadores fluorescentes 58, 60 e 63, através da técnica FISH

II.2.1.3.1. Modelo *Saccharomyces cerevisiae* com as sondas EUK516-(58), EUK516-(60) e EUK516-(63)

Os resultados obtidos por citometria de fluxo da hibridação de células de *S. cerevisiae* com sondas oligonucleotídicas comerciais e sintetizadas são apresentados na Figura II.40.

As células de *S. cerevisiae* hibridadas com as sondas EUK516-(58) e EUK516-(60) apresentaram sinais de fluorescência (Figura II.40; C e E), enquanto as que foram submetidas a hibridação com a sonda EUK516-(63), não apresentaram qualquer sinal de fluorescência (Figura II.40; G). Esta sonda apresenta resultados pouco promissores, uma vez que apresenta intensidades de fluorescência semelhantes às do controlo negativo (EUB338-(63)) e à autofluorescência das células de *S. cerevisiae*. Em contrapartida, as células hibridadas com as sondas EUB338-(58), EUB338-(60) e EUB338-(63) apresentaram sinais de fluorescência idênticos à autofluorescência das referidas células (Figura II.40; D, F e H).^[226]

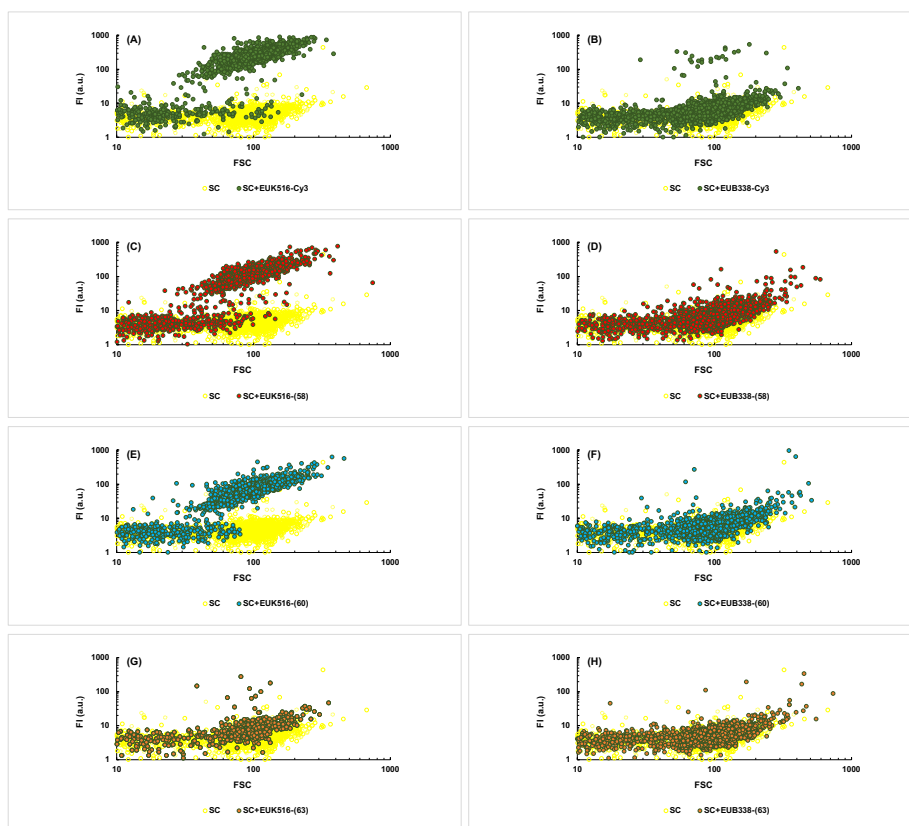


Figura II.40. Resultados de citometria de fluxo (intensidade de fluorescência (FI)/difusão direta (FSC)) referentes aos ensaios de hibridação das células de *Saccharomyces cerevisiae* (SC) com as sondas oligonucleotídicas: **(A)** EUK516-Cy3, **(B)** EUB338-Cy3, **(C)** EUK516-(58), **(D)** EUB338-(58), **(E)** EUK516-(60), **(F)** EUB338-(60), **(G)** EUK516-(63) e **(H)** EUB338-(63).

As células hibridadas com as sondas oligonucleotídicas EUK516-(**58**) e EUK516-(**60**) apresentaram uma percentagem substancial de células fluorescentes de aproximadamente 61% e de 60%, respetivamente, muito semelhante aos valores observados com a sonda comercial EUK516-Cy3 (Figura II.41). Estes resultados demonstram de forma inequívoca a eficácia desta sonda para marcar células de *S. cerevisiae*. Por outro lado, as células hibridadas com a sonda EUK516-(**63**) apresentaram uma baixa percentagem de células fluorescentes, inferior a 25%, revelando uma baixa capacidade para marcar este tipo de células. A análise da hibridação de células de *S. cerevisiae* com as sondas oligonucleotídicas EUB338-(**58**), EUB338-(**60**) e EUB338-(**63**) revelou que estas apresentaram valores de percentagem de células fluorescentes idênticos aos das células de *S. cerevisiae* não marcadas (Figura II.41).^[226]

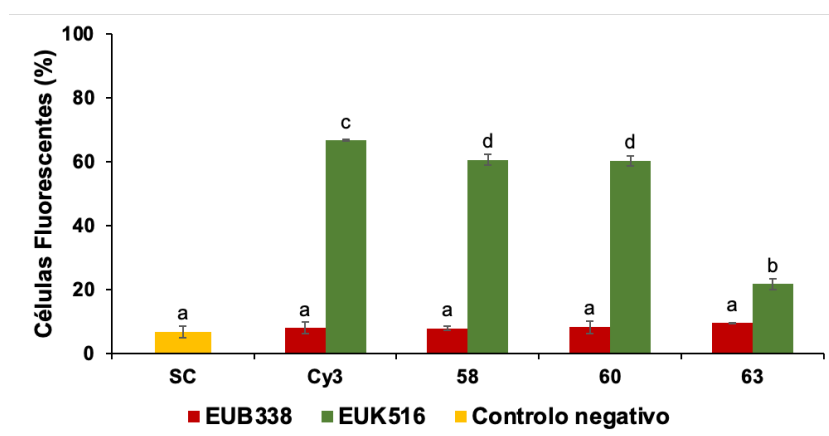


Figura II.41. Percentagem de células fluorescentes das células de *Saccharomyces cerevisiae* (SC) marcadas com as sondas EUK516 e EUB338 com os diferentes marcadores **58**, **60**, **63** e Cy3®, e o controlo negativo. As letras indicam as diferenças estatisticamente significativas ($p < 0.05$).

Na Figura II.42 são apresentados os resultados de microscopia de epifluorescência dos ensaios de hibridação envolvendo células de *S. cerevisiae* com as sondas oligonucleotídicas comerciais e sintetizadas. Estes resultados e os de citometria de fluxo estão diretamente correlacionados, confirmando que as sondas oligonucleotídicas EUK516-Cy3, EUK516-(**58**) e EUK516-(**60**), apresentaram sinais de fluorescência muito intensos (Figura II.42; A, C e E).

Como era esperado, os ensaios de hibridação envolvendo células de *S. cerevisiae* com as sondas oligonucleotídicas EUB338, não foi possível observar qualquer sinal de fluorescência (Figura II.42; B, D e F).^[226]

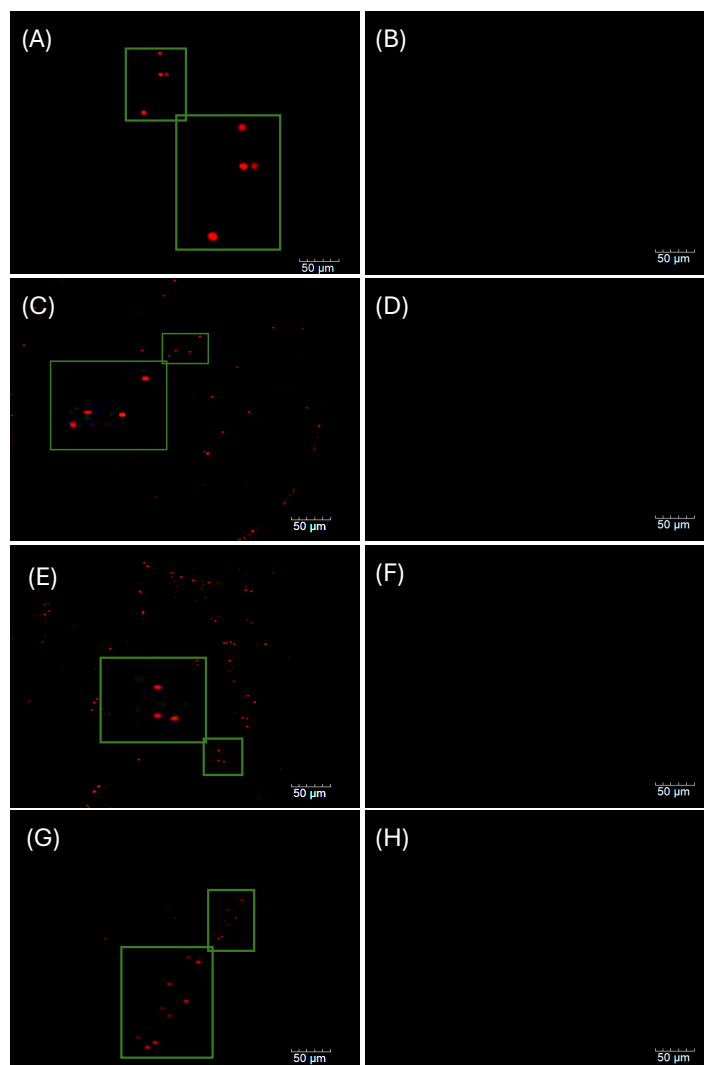


Figura II.42. Microfotografias obtidas através de microscopia de epifluorescência com o filtro TRITC referentes aos ensaios de hibridação das células de *Saccharomyces cerevisiae* com as sondas oligonucleotídicas: **(A)** EUB338-Cy3, **(B)** EUB338-Cy3, **(C)** EUB338-(58), **(D)** EUB338-(58), **(E)** EUB338-(60), **(F)** EUB338-(60), **(G)** EUB338-(63) e **(H)** EUB338-(63).

II.2.1.3.2. Modelo *Bacillus sp.* com as sondas EUB338-(58), EUB338-(60) e EUB338-(63)

Os resultados obtidos por citometria de fluxo da hibridação de células de *Bacillus sp.* com sondas oligonucleotídicas comerciais e sintetizadas estão representados na Figura II.43.

As células de *Bacillus sp.* hibridadas com as sondas EUB338-(58) e EUB338-(60) (Figura II.43; C e E) apresentaram maior intensidade de fluorescência do que as células hibridadas com a sonda EUB338-(63) (Figura II.43; G). As células marcadas com esta última sonda apresentaram a mesma intensidade de fluorescência que a autofluorescência das células de *Bacillus sp.* não marcadas (Figura II.43; H).^[226]

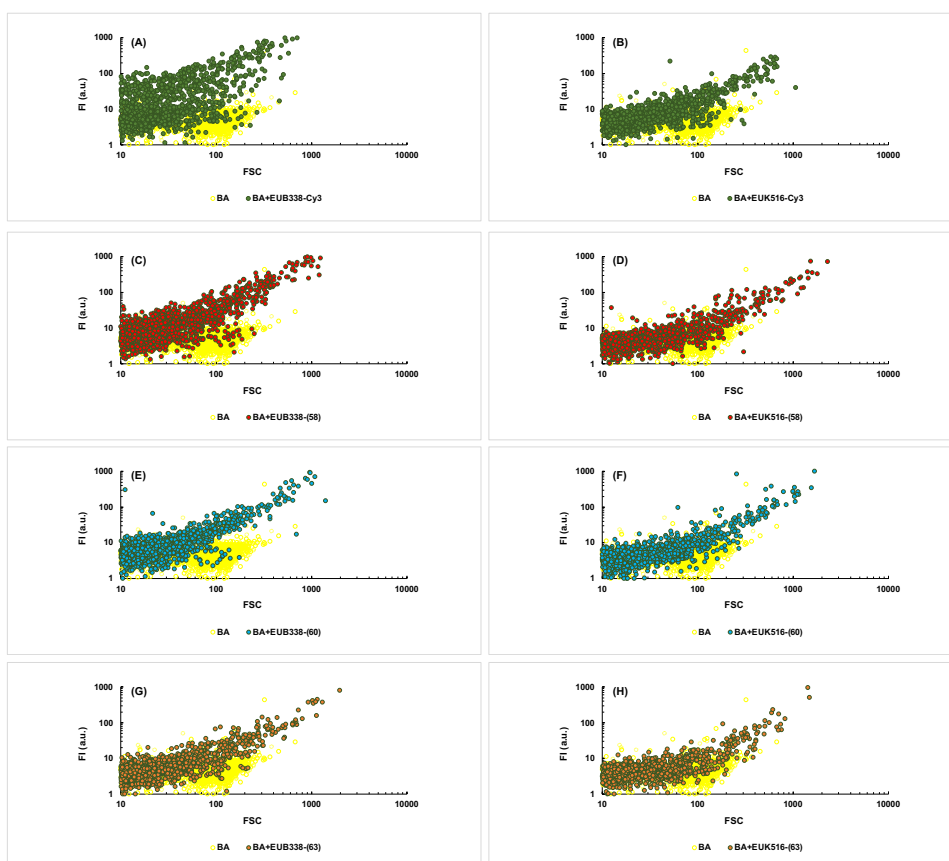


Figura II.43. Resultados de citometria de fluxo (intensidade de fluorescência (FI)/difusão direta (FSC)) referentes aos ensaios de hibridação das células de *Bacillus sp.* (BA) com as sondas oligonucleotídicas: **(A)** EUB338-Cy3, **(B)** EUK516-Cy3, **(C)** EUB338-(58), **(D)** EUK516-(58), **(E)** EUB338-(60), **(F)** EUK516-(60), **(G)** EUB338-(63) e **(H)** EUK516-(63).

As células de *Bacillus sp* hibridadas com a sonda EUB338-(58) apresentaram uma percentagem substancial de células fluorescentes (34%) quando comparadas com as células hibridadas com as sondas EUB338-(60) e EUB338-(63), de aproximadamente 23% e 12%, respetivamente (Figura II.44). Estes resultados demonstram de forma inequívoca a eficácia da sonda EUB338-(58) para marcar células de *Bacillus sp.*

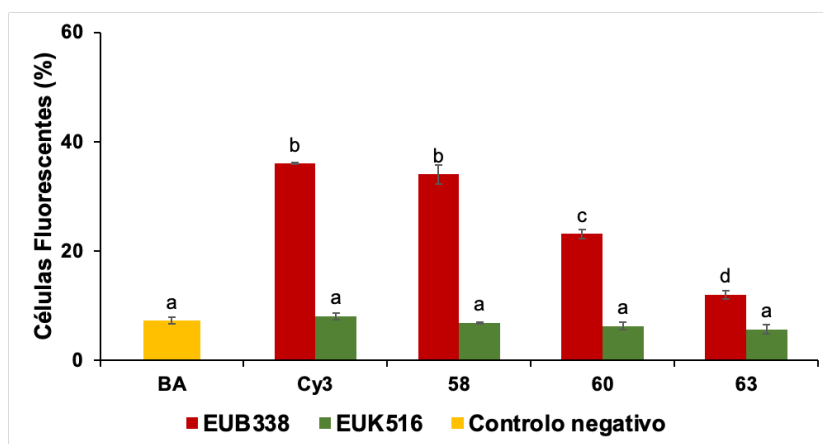


Figura II.44. Percentagem de células fluorescentes das células de *Bacillus sp.* (BA) marcadas com as sondas EUB338 e EUK516 com os diferentes marcadores 58, 60, 63 e Cy3®, e o controlo negativo. As letras indicam as diferenças estatisticamente significativas ($p < 0.05$).

Os resultados de microscopia de epifluorescência dos ensaios de hibridação envolvendo células de *Bacillus sp.* com as sondas oligonucleotídicas comerciais e sintetizadas são apresentados na Figura II.45. As sondas oligonucleotídicas EUB338-Cy3, EUB338-(58), EUB338-(60) e EUB338-(63), apresentaram sinais de fluorescência muito intensos (Figura II.45; A, C, E e G), o que confirma a correlação direta entre os resultados de microscopia de epifluorescência e de citometria de fluxo. Nos ensaios de hibridação de células de *Bacillus sp.* com as sondas oligonucleotídicas EUK516, não foi possível observar qualquer sinal de fluorescência (Figura II.45; B, D, F e H).

Estes resultados confirmam que independentemente do marcador usado, as sondas EUB338 não hibridam com células eucariotas evidenciando a ligação seletiva dos fluoróforos sintetizados às respectivas sondas oligonucleotídicas, descartando assim possíveis interações inespecíficas com as células procariotas.^[226]

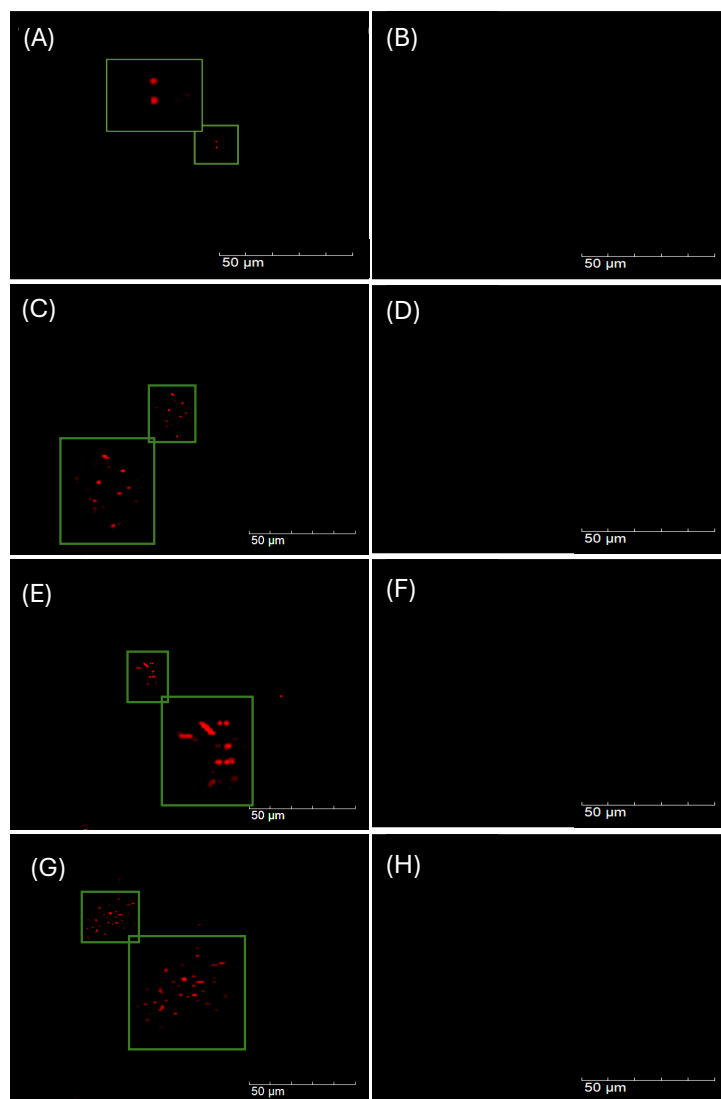
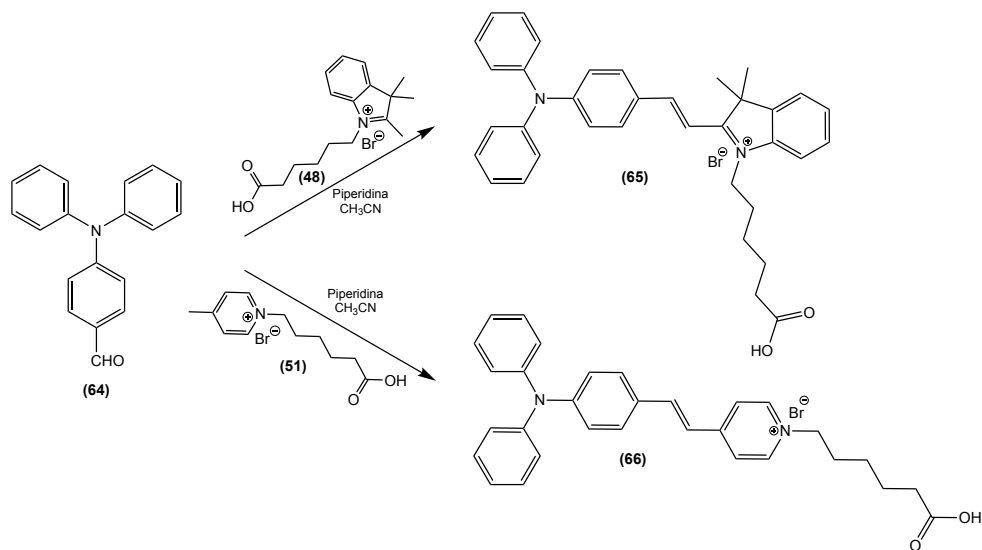


Figura II.45. Microfotografias obtidas através de microscopia de epifluorescência com o filtro TRITC referentes aos ensaios de hibridação das células de *Bacillus* sp. com as sondas oligonucleotídicas: **(A)** EUB338-Cy3, **(B)** EUK516-Cy3, **(C)** EUB338-(58), **(D)** EUK516-(58), **(E)** EUB338-(60), **(F)** EUK516-(60), **(G)** EUB338-(63) e **(H)** EUK516-(63).

II.2.2. Derivados do 4-difenilaminobenzaldeído (64)

Com o objetivo de avaliar o efeito da substituição do grupo dietilo pelo grupo difenilo nas propriedades fotofísicas dos compostos **57** e **59** discutidos na secção anterior (II.2.1), sintetizou-se o brometo de (*E*)-1-(5-carboxipentil)-2-(4-(difenilamino)estiril)-3,3-dimetil-3*H*-indol-1-íio (**65**) e o brometo de (*E*)-1-(5-carboxipentil)-4-(4-(difenilamino)estiril)piridín-1-íio (**66**), apresentado no Esquema II.24.



Esquema II.24. Síntese do brometo de (*E*)-1-(5-carboxipentil)-4-(4-(difenilamino)estiril)piridín-1-íio (**65**) e do brometo de (*E*)-1-(5-carboxipentil)-2-(4-(difenilamino)estiril)-3,3-dimetil-3*H*-indol-1-íio (**66**).

II.2.2.1. Propriedades fotofísicas do brometo de (*E*)-1-(5-carboxipentil)-2-(4-(difenilamino)estiril)-3,3-dimetil-3*H*-indol-1-io (**65**) e do brometo de (*E*)-1-(5-carboxipentil)-4-(4-(difenilamino)estiril)piridín-1-io (**66**)

As propriedades fotofísicas do brometo de (*E*)-1-(5-carboxipentil)-2-(4-(difenilamino)estiril)-3,3-dimetil-3*H*-indol-1-io (**65**) e o brometo de (*E*)-1-(5-carboxipentil)-4-(4-(difenilamino)estiril)piridín-1-io (**66**), estão resumidos na Tabela II.8.

Tabela II.8. Propriedades fotofísicas dos derivados do 4-difenilaminobenzaldeído (**63**).

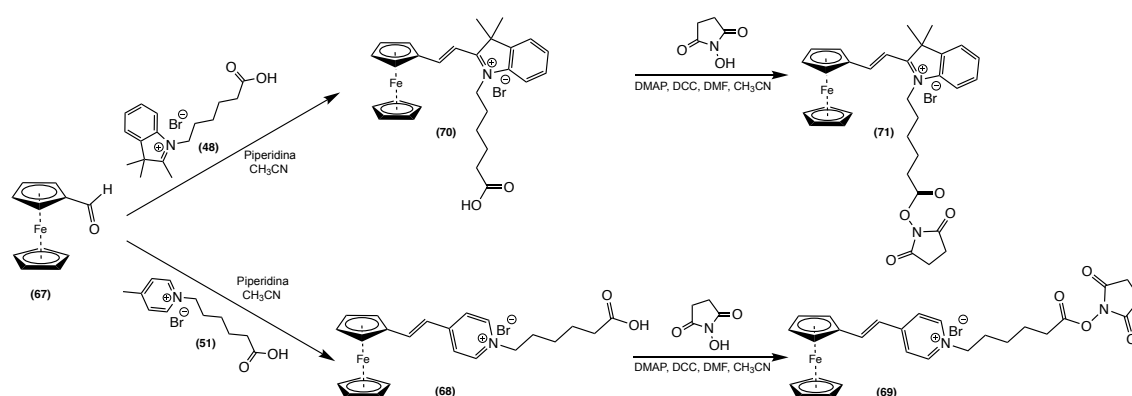
Composto	λ_{abs}^a (nm)	λ_{em}^b (nm)	Desvio de Stokes (nm, cm ⁻¹)	ϵ^c (cm ⁻¹ M ⁻¹)	Φ_F
65	538	561 ^e	--	--	--
66	467	534 ^e	--	--	--

^aMáximos de absorção em CH₃CN. ^bMáximos de emissão em CH₃CN. ^cAbsortividade molar na transição de comprimento de onda mais longo. ^dRendimento quântico de fluorescência em EtOH, determinado utilizando 7-dietilamino-4-metil-coumarina ($\Phi_F = 0.73$ em EtOH) como padrão. ^eNão foi detetada fluorescência após excitação.

Nos compostos **65** e **66**, a absorção máxima foi de 538 e de 467 nm, respetivamente, ou seja, os substituintes difenilo provocaram um desvio hipsocrómico quando comparados com os congéneres **57** e **59**. Este facto deve-se provavelmente à elevada energia de ressonância dos grupos fenilo, obviamente inexistente nos grupos etilo, que atrasa a deslocalização eletrónica através da estrutura molecular. Após a excitação apenas foram detetadas bandas de emissão vestigiais de muito baixa intensidade, ou seja, os compostos **65** e **66** apenas apresentaram fluorescência residual.

II.2.3. Derivados do ferrocenocarboxaldeído (**67**)

Com o objetivo de avaliar a viabilidade de moléculas híbridas como promissores marcadores fluorescentes para biomoléculas, foi desenvolvida uma estratégia sintética simples e econômica, para produzir este tipo de moléculas, utilizando como material de partida o ferrocenocarboxaldeído (**67**), segundo o Esquema II.25.



Esquema II.25. Síntese dos marcadores fluorescentes, brometo de (*E*)-1-(6-((2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi)-6-oxo-hexil)-4-(2-(ferrocenil)vinil)piridín-1-íio (**69**) e brometo de (*E*)-1-(6-((2,5-dioxociclopentil)oxi)-6-oxo-hexil)-3,3-dimetil-2-(2-(ferrocenil)vinil)-3*H*-indol-1-íio (**71**).

A principal abordagem sintética para produzir as referidas moléculas híbridas com uma ponte π , baseou-se na elevada acidez dos prótons metálicos presentes nos derivados indólicos e piridínicos, **48** e **51** respetivamente, que permitem como já foi referido, reações do tipo da condensação aldólica. As referidas reações entre o material de partida, o ferrocenocarboxaldeído (**67**) com os derivados indólicos e piridínicos, com efetivos grupos aceptores de eletrões foram estereosseletivas e altamente eficientes, e permitiram a síntese dos intermediários **68** e **70**. A presença, nestes intermediários, de um grupo doador e de um grupo aceptor de eletrões, deverá aumentar evidentemente tanto a deslocalização de eletrões π como a natureza *push-pull* do cromóforo.

Os novos marcadores fluorescentes para biomoléculas **69** e **71**, foram facilmente isolados após cromatografia em coluna de sílica e completamente caracterizados por espectroscopia de RMN (1D e 2D). Todos os dados espectrais são consistentes com as estruturas propostas.

II.2.3.1. Propriedades fotofísicas dos marcadores fluorescentes, brometo de (*E*)-1-(6-((2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi)-6-oxo-hexil)-4-(2-(ferrocenil)vinil)-piridín-1-io (**69**) e brometo de (*E*)-1-(6-((2,5-dioxociclopentil)oxi)-6-oxo-hexil)-3,3-dimetil-2-(2-(ferrocenil)vinil)-3*H*-indol-1-io (**71**)

As propriedades fotofísicas dos novos marcadores fluorescentes **69** e **71**, nomeadamente as suas propriedades de absorção e emissão, desvio de Stokes, absortividade molar e rendimento quântico de fluorescência, foram avaliadas e estão registadas na Tabela II.9.

Tabela II.9. Propriedades fotofísicas dos derivados do ferrocenocarboxaldeído (**67**).

Composto	$\lambda_{\text{abs}}^{\text{a}}$ (nm)	$\lambda_{\text{em}}^{\text{b}}$ (nm)	Desvio de Stokes (nm, cm^{-1})	ϵ^{c} ($\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$)	Φ_{F}
67	340	--	--	1600	--
69	365	457	92, 5515	24000	< 0.01
71	409	485	76, 3831	16000	< 0.01

^aMáximos de absorção em CH_3CN . ^bMáximos de emissão em CH_3CN . ^cAbsortividade molar na transição de comprimento de onda mais longo. ^dRendimento quântico de fluorescência em EtOH, determinado utilizando 7-dietilamino-4-metil-coumarina ($\Phi_{\text{F}} = 0.73$ em EtOH) como padrão.

Como esperado, os produtos finais **69** e **71**, apresentam máximos de absorção a comprimentos de onda mais longos, quando comparados com o material de partida, devido ao efeito de transferência de carga intramolecular obtido através da conjugação do grupo doador de eletrões e do grupo vinil conjugado com os grupos aceitadores de eletrões.

As absortividades molares e os rendimentos quânticos de fluorescência dos produtos **69** e **71**, em que o doador é o grupo ferroceno, apresentam valores muito baixos, o que sugere que a presença do ferroceno nestes compostos poderá condicionar as suas propriedades fotofísicas para possíveis aplicações como marcadores fluorescentes.

Os espectros de absorção dos referidos compostos estão apresentados na Figura II.46.

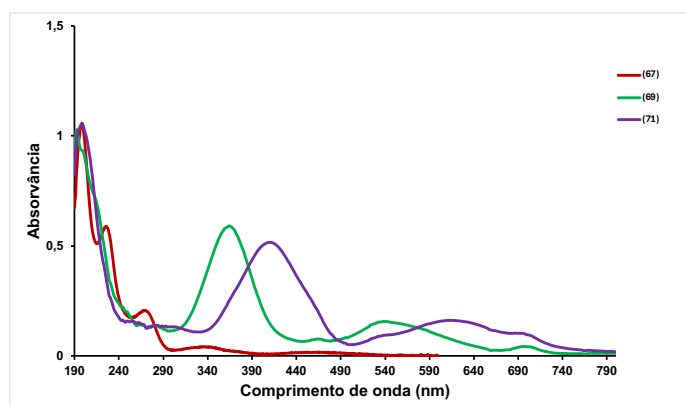


Figura II.46. Espectros de absorção do ferrocenocarboxaldeído (**67**) e dos marcadores fluorescentes, brometo de (*E*)-1-(6-((2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi)-6-oxo-hexil)-4-(2-(ferrocenil)vinil)piridín-1-io (**69**) e brometo (*E*)-1-(6-((2,5-dioxociclopentil)oxi)-6-oxo-hexil)-3,3-dimetil-2-(2-(ferrocenil)vinil)-3*H*-indol-1-io (**71**).

II.2.3.2. Análise do potencial dos novos marcadores fluorescentes 69 e 71, através da técnica FISH

II.2.3.2.1. Modelo *Saccharomyces cerevisiae* com as sondas EUK516-(69) e EUK516-(71)

Os resultados obtidos por citometria de fluxo da hibridação de células de *Saccharomyces cerevisiae* com sondas oligonucleotídicas comerciais e sintetizadas são apresentados na Figura II.47. Através da análise destes resultados, é evidente que as células de levedura, quando marcadas com sondas oligonucleotídicas EUK516, apresentaram uma fluorescência mínima, quando comparada com a autofluorescência das células de *S. cerevisiae* não marcadas (Figura II.47; C, e E). Assim, as sondas EUK516-(**69**) e EUK516-(**71**) apresentaram resultados pouco promissores, uma vez que demonstram intensidades de fluorescência semelhantes à autofluorescência das células de *S. cerevisiae* e do controlo negativo (Figura II.47; D e F).

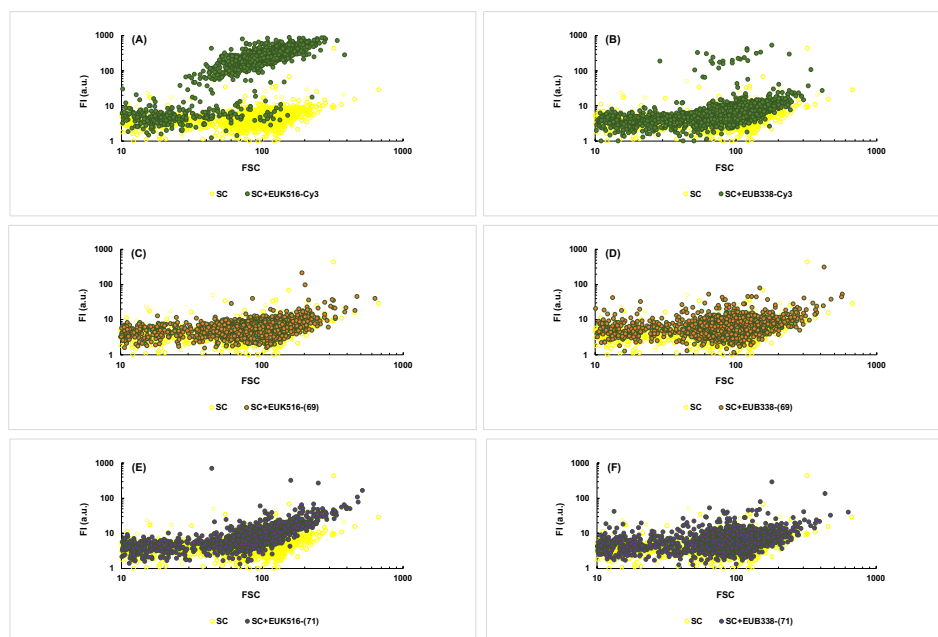


Figura II.47. Resultados de citometria de fluxo (intensidade de fluorescência (FI)/difusão direta (FSC)) referentes aos ensaios de hibridação das células de *Saccharomyces cerevisiae* (SC) com as sondas oligonucleotídicas: **(A)** EUK516-Cy3, **(B)** EUB338-Cy3, **(C)** EUK516-(69), **(D)** EUB338-(69), **(E)** EUK516-(71) e **(F)** EUB338-(71).

As células hibridadas com as sondas oligonucleotídicas EUK516-(69) e EUK516-(71) apresentaram uma percentagem de células fluorescentes inferior a 20%, o que é indicativo do fraco desempenho fotofísico dos marcadores usados nestas sondas (Figura II.48).

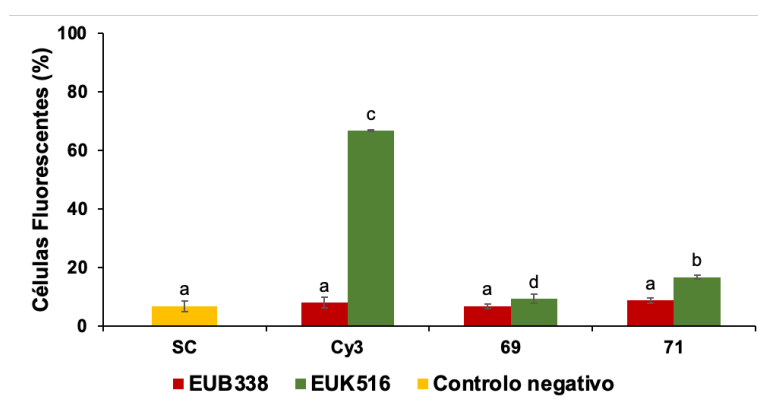


Figura II.48. Percentagem de células fluorescentes das células de *Saccharomyces cerevisiae* (SC) marcadas com as sondas EUK516 e EUB338 com os diferentes marcadores 69, 71 e Cy3®, e o controlo negativo. As letras indicam as diferenças estatisticamente significativas ($p < 0.05$).

II.2.3.2.2. Modelo *Bacillus sp.* com as sondas EUB338-(69) e EUB338-(71)

Os resultados de citometria de fluxo da hibridação de células de *Bacillus sp.* com sondas oligonucleotídicas comerciais e sintetizadas estão apresentados na Figura II.49.

Após a análise destes resultados, é evidente que as células bacterianas, quando marcadas com as sondas oligonucleotídicas EUB338, apresentaram uma intensidade de fluorescência idêntica às sondas oligonucleotídicas EUK516, o que sugere que as sondas EUB338-(69) e EUB338-(71) apresentam uma baixa capacidade para marcar estas células (Figura II.49; C e E).

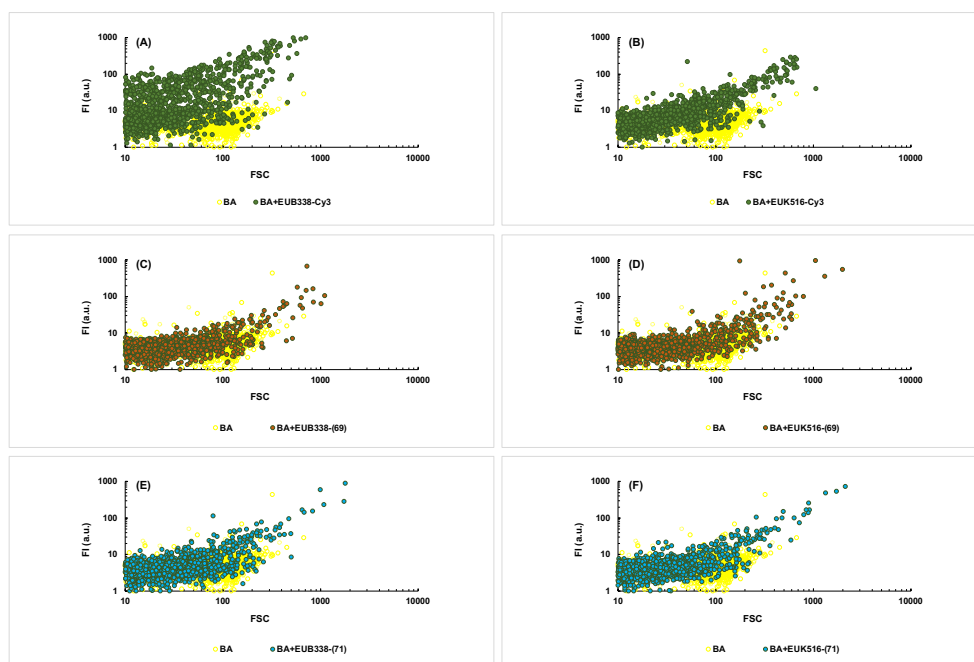


Figura II.49. Resultados de citometria de fluxo (intensidade de fluorescência (FI)/difusão direta (FSC)) referentes aos ensaios de hibridação das células de *Bacillus sp.* (BA) com as sondas oligonucleotídicas: **(A)** EUB338-Cy3, **(B)** EUK516-Cy3, **(C)** EUB338-(69), **(D)** EUK516-(69), **(E)** EUB338-(71) e **(F)** EUK516-(71).

As células hibridadas com as sondas oligonucleotídicas EUB338-(**69**) e EUB338-(**71**) apresentaram uma baixa percentagem de células fluorescentes, inferior a 20% (Figura II.50). À semelhança do modelo anterior, estes resultados sugerem que os marcadores usados nestas sondas apresentam um fraco desempenho fotofísico.

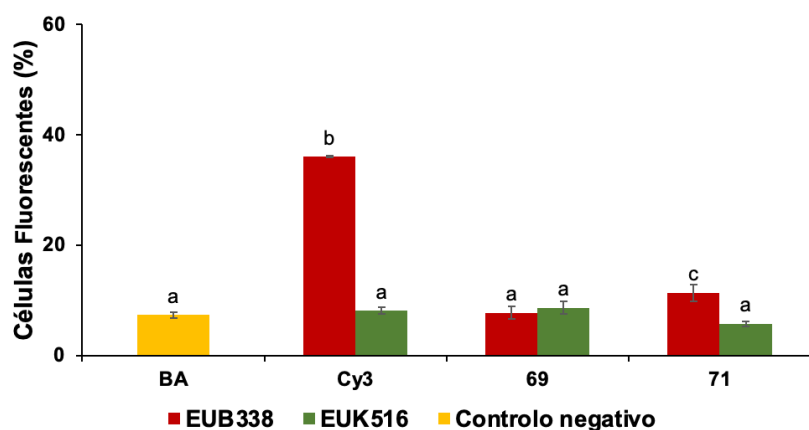


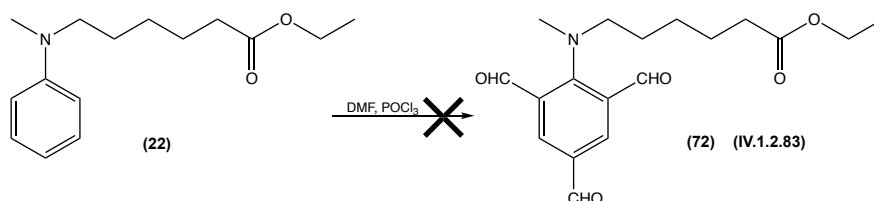
Figura II.50. Percentagem de células fluorescentes das células de *Bacillus sp.* (BA) marcadas com as sondas EUK516 e EUB338 com os diferentes marcadores **69**, **71** e Cy3®, e o controlo negativo. As letras indicam as diferenças estatisticamente significativas ($p < 0.05$).

II.2.4. Compostos com mais do que um cromóforo

Com a finalidade de aumentar a intensidade do sinal dos fluoróforos, desvio hiperocrómico, foram realizadas diversas sínteses com o objetivo de desenvolver novos marcadores com mais do que um cromóforo. Esta característica é fundamental para diversas aplicações como a microscopia de fluorescência, citometria de fluxo e outras técnicas analíticas que dependem de sinais com forte intensidade fluorescente para superiores deteções e quantificações. Este aumento da intensidade é importante para melhorar a sensibilidade analítica, permitindo assim a deteção de moléculas-alvo em concentrações muito baixas.

II.2.4.1. Tentativa de síntese do ácido 6-(metil(2,4,6-triformilfenil)amino)hexanóico (72)

A tentativa de síntese do ácido 6-(metil(2,4,6-triformilfenil)amino)hexanóico (**72**) foi delineada utilizando a reação de Vilsmeier-Haack, mas com os reagentes de formulação DMF e POCl₃ em excesso (Esquema II.26), com o objetivo de introduzir três grupos formilo nas posições *orto* e *para* do 6-(metil(fenil)amino)hexanoato de etilo (**22**).^[229] De referir que a monoformilação deste éster em posição *para* foi discutida na secção II.1.1.2.2.4 e está descrita na reação IV.1.2.36.



Esquema II.26. Tentativa de síntese do ácido 6-(metil(2,4,6-triformilfenil)amino)hexanóico (**72**).

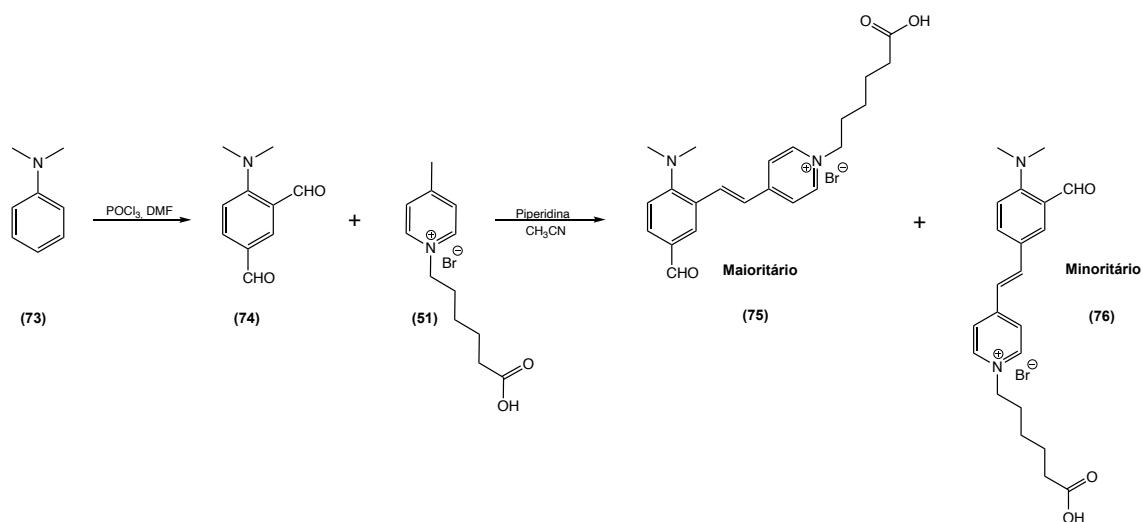
Por ¹H-RMN não foi detetada a presença do produto triformilado **72**. A reação IV.1.2.83, originou dois produtos secundários, um deles o produto monoformilado **23** (Secção II.1.1.2.2.4, Reação IV.1.2.36) e um outro sem a presença de qualquer protão aromático e da cadeia ligada ao átomo de nitrogénio.

II.2.4.2. Tentativa de síntese do brometo de (*E*)-1-(5-carboxipentil)-4-(2-(dimetilamino)-5-formilestiril)piridín-1-io (**75**) e do brometo de (*E*)-1-(5-carboxipentil)-4-(4-(dimetilamino)-3-formilestiril)piridín-1-io (**76**)

A ineficácia da triformilação do 6-(metil(fenil)amino)hexanoato de etilo, discutida na anterior secção, pode ter-se devido ao impedimento estereoquímico da cadeia ligada ao átomo de nitrogénio

Considerando este facto, foi efetuada uma nova tentativa de formilação, mas com uma molécula menos impedida, a dimetilanilina (**73**). Não foi obtido o produto resultante da triformilação, obtendo-se apenas o 4-(dimetilamino)isofaldeído (**74**) com um modesto rendimento reacional de 25%. A reação deste último com o brometo de 1-(5-carboxipentil)-4-metilpiridín-1-io (**51**) originou dois produtos, um maioritário (83%) resultado da reação na posição *orto*, mais impedida, e um outro minoritário (17%) da reação na posição *para* (Esquema II.27). Estes dois produtos foram identificados por

^1H -RMN e NOESY, mas o seu isolamento tornou-se um processo muito pouco efetivo e rentável devido à forte adsorção que estes desenvolveram com as fases estacionárias (normal e reversa) nos processos de purificação cromatográfica.

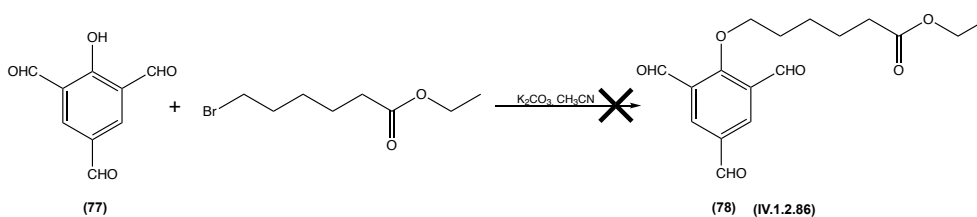


Esquema II.27. Tentativa de síntese do brometo de (*E*)-1-(5-carboxipentil)-4-(2-(dimetilamino)-5-formilestiril)piridín-1-io (75) e do brometo de (*E*)-1-(5-carboxipentil)-4-(4-(dimetilamino)-3-formilestiril)piridín-1-io (76).

II.2.4.3. Tentativa de síntese do 6-(2,4,6-triformilfenoxi)hexanoato de etilo (78)

A solução para a introdução de três cromóforos numa molécula poderia passar pela utilização do comercialmente disponível 2-hidroxibenzeno-1,3,5-tricarbaldeído (**77**) como material de partida. A tentativa de inserção da cadeia, com o 6-bromo-hexanoato de etilo, para posterior funcionalização com um éster succinimidílico, não ocorreu (Esquema II.28).

A não formação do produto 6-(2,4,6-triformilfenoxi)hexanoato de etilo (**78**) pode dever-se ao impedimento estereoquímico do grupo hidroxilo ou à diminuição da sua nucleofilicidade devido à influência dos três grupos formilo nas posições *orto* e *para*.

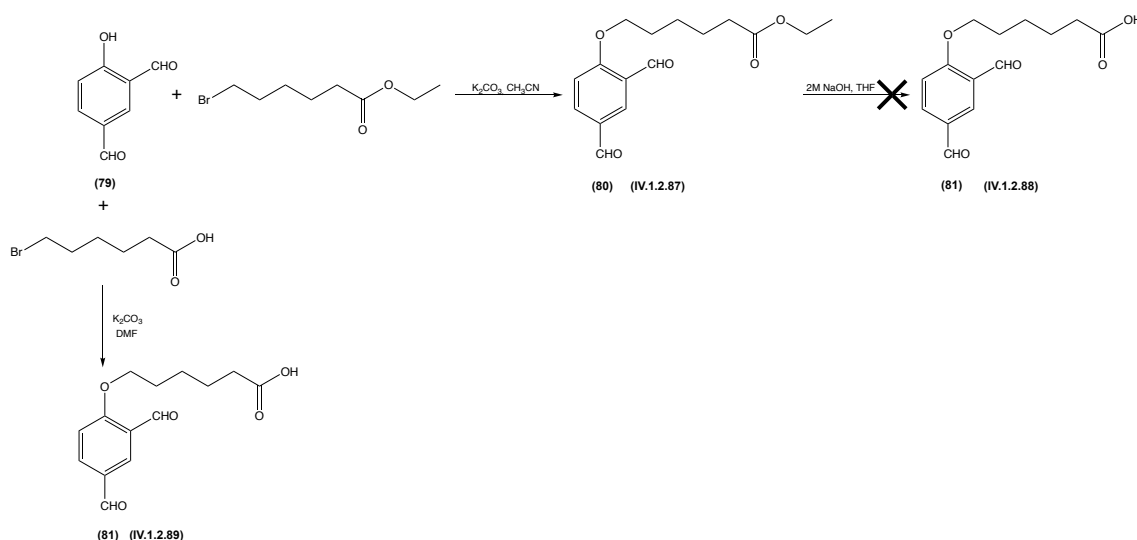


Esquema II.28. Tentativa de síntese do 6-(2,4,6-triformilfenoxi)hexanoato de etilo (**78**).

II.2.4.4. Tentativa de síntese do ácido 6-(2,4-diformilfenoxi)hexanóico (81)

Considerando os resultados obtidos anteriormente, utilizou-se como material de partida o também disponível comercialmente 4-hidroxiisofthalaldeído (**79**), um composto com apenas dois grupos formilo nas posições *orto* e *para* (Esquema II.29). O intermediário 6-(2,4-diformilfenoxi)hexanoato de etilo (**80**) foi obtido com um excelente rendimento (99%), o que confirma o anteriormente referido para o congénere triformilado (**77**). Da hidrólise do éster **80** foram isoladas, através de cromatografia em coluna de sílica, três frações distintas que foram posteriormente avaliadas por ^1H -RMN.

As referidas frações continham apenas múltiplos produtos secundários sem a presença de qualquer grupo formilo, ou seja, a sua reatividade não permitiu a obtenção do produto da reação, o ácido 6-(2,4-diformilfenoxi)hexanóico (**81**).



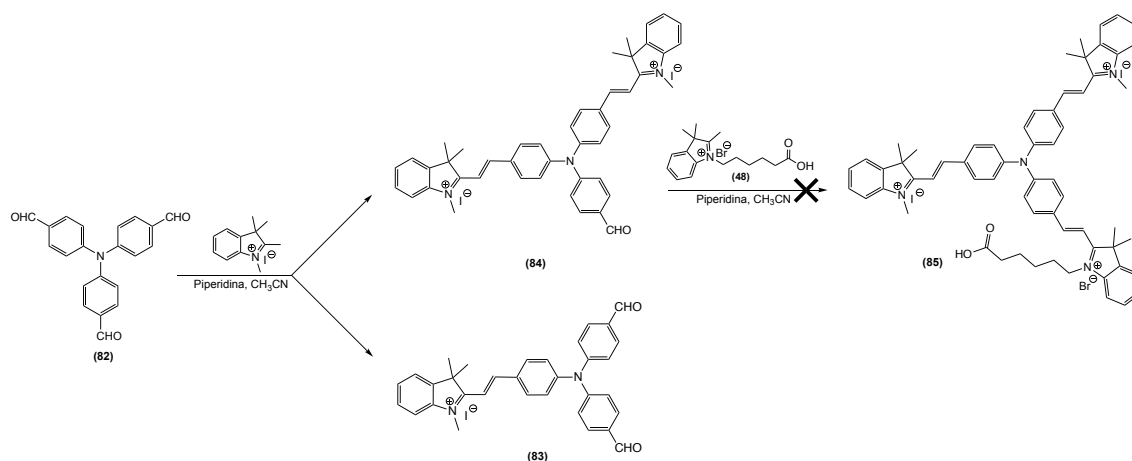
Esquema II.29. Tentativa de síntese do ácido 6-(2,4-diformilfenoxi)hexanóico (**81**).

De acordo com o exposto, para evitar a posterior hidrólise do éster **80** optou-se por efetuar a síntese direta do ácido 6-(2,4-diformilfenoxi)hexanóico (**81**), a partir do 4-hidroxiisofthalaldeído (**79**) e do ácido 6-bromo-hexanóico (Esquema II.29). O produto foi identificado por ^1H -RMN em quantidades vestigiais (« 5%), o que o afasta de um potencial intermediário para a síntese de marcadores fluorescentes de baixo custo.

II.2.4.5. Tentativa de síntese do brometo (iodeto) de 2,2'-((1*E*,1'*E*)-(((4-((*E*)-2-(1-(5-carboxipentil)-3,3-dimetil-3*H*-indol-1-ilo-2-il)vinil)fenil)azanediil)bis-(4,1-fenileno))bis(eteno-2,1-diil))bis(1,3,3-trimetil-3*H*-indol-1-ilo) (**85**)

A utilização do 4,4',4''-nitritotribenzaldeído (**82**) como material de partida, para a inclusão de três cromóforos, foi a última tentativa no âmbito deste trabalho para sintetizar moléculas que permitissem essencialmente aumentar a intensidade do sinal dos fluoróforos (Esquema II.30). A reação entre o tribenzaldeído **82** e um excesso molar do iodeto de 1,2,3,3-tetrametil-3*H*-indol-1-ilo permitiu a obtenção do produto **84** (cor violeta), com a inclusão de dois grupos indólicos como pretendido, mas também, e com um rendimento superior, o produto **83** (cor rosa) com a inclusão de apenas um grupo

indólico (Reação IV.1.2.90). A reação entre o composto **84** e o indol com um grupo carboxílico, para posterior funcionalização com um éster succinimidílico, eventualmente gerou o produto esperado, que não foi possível isolar devido à muito forte adsorção entre este e as fases estacionárias (normal e reversa) envolvidas nas várias tentativas de purificação. De referir que durante as tentativas de isolamento/purificação através de cromatografia de exclusão molecular, o eventual produto da reação (**85**) ficou adsorvido nos grânulos do gel.

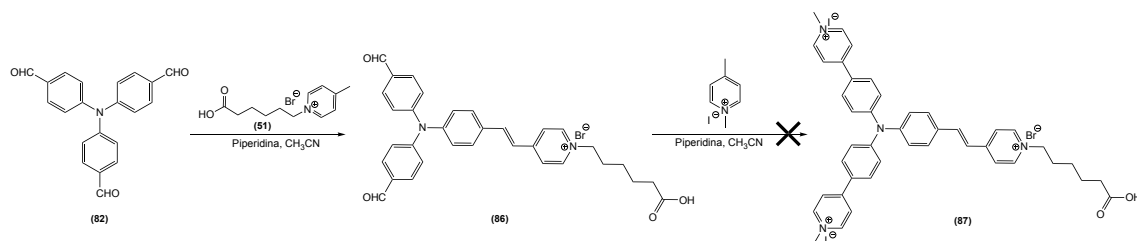


Esquema II.30. Tentativa de síntese do brometo (iodeto) de 2,2'-((1*E*,1'*E*)-(((4-((*E*)-2-(1-(5-carboxipentil)-3,3-dimetil-3*H*-indol-1-ilo-2-il)vinil)fenil)azanediil)bis(4,1-fenileno))bis(etene-2,1-diil))-bis(1,3,3-trimetil-3*H*-indol-1-ilo) (**85**).

II.2.4.6. Tentativa de síntese do brometo (iodeto) de (*E*)-4,4'-(((4-(2-(1-(5-carboxipentil)piridín-1-ilo-4-il)vinil)fenil)azanediil)bis(4,1-fenileno))bis(1-metilpiridín-1-ilo) (**87**)

Numa derradeira tentativa para sintetizar este tipo de compostos, optou-se por simplificar os grupos aceitadores de elétrões, ou seja, alterou-se o grupo indol para um grupo piridina e introduziu-se primeiro o substituinte com o grupo carboxílico (Esquema II.31). A reação gerou o produto pretendido, mas a sua purificação tornou-se um processo muito pouco efetivo e rentável devido à forte adsorção que este desenvolveu com a fase estacionária, ou seja, o seu manuseamento envolve constantes perdas.

À semelhança do caso anterior, a reação entre o composto **86** e a inclusão de dois grupos piridínicos como pretendido, eventualmente gerou o produto esperado, que não foi possível isolar devido novamente à muito forte adsorção entre este e as fases estacionárias (normal e reversa) envolvidas nas várias tentativas de purificação.



Esquema II.31. Tentativa de síntese do brometo (iodeto) de (*E*)-4,4'-(((4-(2-(1-(5-carboxipentil)piridín-1-ilo-4-il)vinil)fenil)azanediil)bis(4,1-fenileno))bis(1-metilpiridín-1-ilo) (**87**).

A presença neste tipo de compostos nomeadamente o **75**, **76**, **85** e **87**, de efetivas cargas formais envolvidas diretamente nos processos de deslocalização eletrónica e de um adicional grupo carboxílico, faz com que estes apresentem características físicas e químicas que tornam difícil o seu manuseamento através das clássicas técnicas de cromatografia. Estes estudos preliminares poderão impulsionar e dinamizar num futuro próximo o desenvolvimento deste tipo de compostos, com inesperadas características físicas e químicas, para uma vasta gama de aplicações em múltiplas áreas do conhecimento.

III. CONCLUSÕES

Um dos principais objetivos deste trabalho consistiu no desenvolvimento de marcadores fluorescentes solúveis em água, de baixo custo e reativos ao grupo amino, para a marcação eficiente de biomoléculas.

A síntese de derivados 2-substituídos da 7-dietilamino-4-metilcoumarina com a inclusão de um grupo 4-estirilo, com o objetivo de expandir a deslocalização eletrônica através de um sistema do tipo Doador de elétrons - ponte π - Aceitador de elétrons, permitiu a obtenção de seis novos promissores marcadores fluorescentes.

Considerando os diferentes grupos aceptadores de elétrons na posição 2, constatou-se que a presença do grupo amino no substituinte 4-estirilo, mais do que duplicou a absorvidade molar dos marcadores em relação aos seus homólogos com o grupo alcóxi, o que reflete a sua superior capacidade doadora de elétrons.

Quanto ao efeito dos grupos aceptadores de elétrons na posição 2, verificou-se que a presença do substituinte iodeto de metilpiridínio, com uma carga positiva formal, aliada ao seu efeito mesómero, promoveu desvios hipercrômicos muito pronunciados nos respectivos marcadores fluorescentes.

Todos os marcadores fluorescentes derivados da 7-dietilamino-4-metilcoumarina apresentaram muito bons a elevados desvios de Stokes, uma condição essencial para uma eficaz detecção da emissão de fluorescência.

A diminuição dos rendimentos quânticos de fluorescência e dos desvios de Stokes em alguns dos marcadores fluorescentes, poderá estar relacionada com a elevada conjugação do sistema π da molécula, que originou processos de transferência de carga intramoleculares mais efetivos após a excitação.

O inferior caráter doador de elétrons do grupo alcóxi no substituinte 4-estirilo, promove rendimentos quânticos de fluorescência mais elevados, devido a processos de transferência de carga intramoleculares menos efetivos, do que os seus congêneres com o grupo amino.

Nas tentativas de síntese de coumarinas 3 substituídas por fortes grupos aceptadores de elétrões, com um substituinte 4-estirilo com um grupo amino em posição *para*, formou-se um produto originado por um possível rearranjo intramolecular, cujo mecanismo reacional deverá ser objeto de um estudo mais aprofundado. Este tipo de reação poderá constituir uma estratégia sintética muito útil para incorporar grupos estirilo, com diversos substituintes, em fragmentos moleculares com grupos aceptadores de elétrões, numa nova tipologia de formação de alcenos semelhante à reação de Heck.

A síntese de marcadores fluorescentes eficazes, e com um custo inferior aos derivados da 7-dietilamino-4-metilcoumarina, utilizando uma estratégia eficiente e económica a partir do 4-dietilaminobenzaldeído, permitiu a síntese de três novos marcadores fluorescentes com excelentes propriedades fotofísicas.

A extensão do sistema π conjugado nestas moléculas, com grupos fortemente aceptadores de elétrões, nomeadamente os derivados indol, piridina e quinolina com cargas positivas formais, foi essencial para um processo eficaz de transferência de carga intramolecular do estado excitado emissivo, melhorando as suas propriedades fotofísicas, tais como elevadas absortividades molares e, em dois deles, elevados desvios de Stokes.

O grupo indol promove o mais elevado rendimento quântico de fluorescência e o grupo quinolina o mais baixo, resultado da variação dos efeitos da energia de ressonância dos grupos aceptadores de elétrões.

A síntese de moléculas híbridas como promissores marcadores fluorescentes para biomoléculas, utilizando como material de partida o ferrocenocarboxaldeído, produziu derivados com reduzidos valores de absortividade molar e de rendimento quântico de fluorescência, que obviamente condicionaram negativamente as suas propriedades fotofísicas nas respetivas sondas.

As várias tentativas de síntese de compostos com dois ou três cromóforos, com elevados desvios hipercrómicos, fundamentais para inúmeras aplicações analíticas, produziram interessantes derivados fluorescentes, mas com processos de isolamento muito pouco efetivos e rentáveis devido à forte adsorção que estes desenvolveram com as fases estacionárias nos processos de purificação cromatográfica.

Os cálculos teóricos (DFT e TDDFT) efetuados para todos os marcadores fluorescentes, permitiram detetar diferenças significativas nas geometrias dos estados fundamental e excitado, fornecendo informações importantes sobre as propriedades fotofísicas observadas, nomeadamente os elevados desvios de Stokes. Estes desvios foram principalmente atribuídos a um relaxamento estrutural substancial observado nos estados excitados das moléculas, o que proporcionou uma explicação racional para o fenómeno da emissão.

A maioria dos novos marcadores fluorescentes sintetizados demonstrou um elevado potencial para as sondas de RNA-FISH, permitindo a marcação e deteção eficaz de células microbianas, nomeadamente de *S. cerevisiae* e de *Bacillus sp.*. Algumas das sondas sintetizadas apresentaram uma proporção de células fluorescentes semelhante à das sondas comerciais com o fluoróforo Cy3[®], um dos marcadores fluorescentes mais utilizado, mas muito dispendioso. Considerando que a técnica citogenética FISH é amplamente utilizada na investigação genómica e na biológica celular, assim como em aplicações de diagnóstico em medicina preventiva e reprodutiva, e também em oncologia, estes novos marcadores fluorescentes eficazes e de baixo custo, têm um elevado potencial para utilizações de rotina nestas áreas e em muitas outras técnicas bioanalíticas.

Os resultados obtidos através da técnica FISH são de difícil correlação direta com as propriedades fotofísicas dos respetivos marcadores fluorescentes, ou seja, em última análise, o desenvolvimento de sondas fluorescentes depende, em grande medida, de tentativa e erro ou de descoberta fortuita.

No futuro, e com base nos resultados obtidos neste trabalho, será potencialmente relevante:

- avaliar o potencial dos novos marcadores fluorescentes sintetizados em muitos outros sistemas biológicos e também noutras técnicas bioanalíticas;
- introduzir grupos sulfonato nos marcadores fluorescentes, com o intuito de aumentar a sua solubilidade em água e evitar as possíveis interações marcador-marcador;
- desenvolver novas técnicas de síntese, isolamento e purificação de marcadores fluorescentes com dois ou três cromóforos;
- avaliar e compreender, o mecanismo reacional que ocorreu nas coumarinas 3 substituídas, para uma efetiva estratégia sintética de incorporação de grupos estirilo em fragmentos moleculares com grupos aceitadores de elétrões, à semelhança da reação de Heck.

IV. PARTE EXPERIMENTAL

IV.1. Síntese de marcadores fluorescentes

IV.1.1. Equipamentos e materiais

Todos os reagentes usados eram de qualidade analítica, adquiridos a empresas comerciais como a Acros Organics, BLDpharm, Merck, VWR Sigma-Aldrich, TCI Europe, entre outras, e utilizados sem qualquer purificação adicional. Os solventes orgânicos foram sujeitos a agentes de secagem adequados e destilados antes da sua utilização.

Os espectros de ressonância magnética nuclear de próton (^1H -RMN) e de carbono (^{13}C -RMN), mono e bi-dimensionais, foram registados a 400 MHz (^1H) e a 100.61 MHz (^{13}C), num espectrómetro Bruker Advance III. Os solventes usados foram o CDCl_3 , CD_3OD e o $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$. Os dados obtidos são indicados em valores de desvio químico (d, em ppm); a intensidade relativa é indicada pelo número de prótons (H); as multiplicidades são indicadas por s (singuleto), sl (singuleto largo), d (duplete), t (triplete), q (quadruplete) e m (multiplete); as constantes de acoplamento são indicadas em Hertz (Hz).

Os espectros de massa exata por FTMS-ESI foram obtidos usando um espectrómetro de massa Thermo Scientific Q Exactive Orbitrap (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) do Laboratório de Análises do Serviço de Análise Elementar, Cromatografia e Massas da Universidade de Salamanca (Espanha).

Os espectros de UV/Vis foram registados num espectrofotómetro Thermo Electron Corporation, modelo Nicolet Evolution 300, usando CH_3CN como solvente, com uma concentração de 2.0×10^{-5} M.

Os espectros de fluorescência foram registados num espectrofotómetro PerkinElmer modelo LS 55, usando EtOH como solvente.

A cromatografia de *flash* foi efetuada usando sílica gel 60 de 230-400 'mesh' (Merck), salvo especificação em contrário.^[230]

A cromatografia de fase reversa foi efetuada usando sílica gel LiChroprep® RP-18 (Merck).

A cromatografia de exclusão molecular foi efetuada usando o gel Lipophilic Sephadex® LH-20 (Sigma-Aldrich).

Na cromatografia de camada preparativa (ccp) utilizaram-se placas de sílica gel Merck 60 F₂₄₅ de 0.5, 1.0 e 2.0 mm de espessura.

Na cromatografia de camada delgada (ccd) utilizaram-se placas de sílica gel 60 F₂₄₅ de 0.25 mm de espessura (Merck) e de sílica gel 60 RP-18 F₂₄₅S de 0.20 mm de

espessura (Merck). A composição das frações recolhidas em cromatografia e a evolução das reações foi seguida por ccd, indicando-se os eluentes na proporção usada (v:v).

A revelação das placas de ccd foi efetuada por *spray* por diversos reveladores preparados de acordo com a literatura:^[231]

Ácido fosfomolíbdico

Solução de 10% de ácido fosfomolíbdico em EtOH.

Revelação por aquecimento até visualização das manchas.

Dragendorff

Solução A: 1.7 g de nitrato de bismuto (III) e 20 g de ácido tartárico em 80 mL de água

Solução B: 16 g iodeto de potássio em 40 mL de água.

Solução C: mistura de igual volume da solução A e B.

Solução *spray*: 10 mL da solução C, numa solução de 10 g de ácido tartárico em 50 mL de água.

Utilizado para identificar compostos azotados. A sua revelação não necessita de aquecimento.

DNPH (2,4-dinitrofenil-hidrazina)

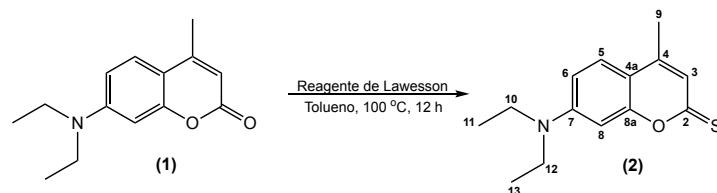
Solução *spray*: 1.0 g de DNPH

Solução A: 10 mL de HCl (37%) em 1000 mL de EtOH.

Utilizado para identificar aldeídos e cetonas. A sua revelação não necessita de aquecimento.

IV.1.2. Reações de síntese

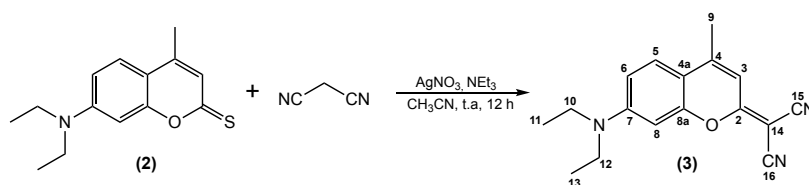
IV.1.2.1. Síntese da 7-dietilamino-4-metil-2H-cromen-2-tiona (2)



Num balão de fundo redondo, colocaram-se 1.72 g de 7-dietilamino-4-metilcoumarina (7.42×10^{-3} mol, 1.0 eq), 1.65 g de reagente de Lawesson (4.08×10^{-3} mol, 0.5 eq) em 40 mL de tolueno. A mistura reacional foi colocada sob agitação magnética a uma temperatura de 100 °C durante 12 h. A reação foi continuamente monitorizada através de ccd, utilizando como eluente CH_2Cl_2 . O produto da reação foi isolado por cromatografia *flash*, usando como eluente CH_2Cl_2 , tendo-se obtido 1.60 g ($\eta = 87\%$).

^1H RMN (400 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 1.19 (6H, t, $J = 7.1$, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$), 2.26 (3H, s, H-9), 3.40 (4H, q, $J = 7.1$, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$), 6.61 (1H, d, $J_{8,6} = 2.4$, H-8), 6.64 (1H, dd, $J_{6,5} = 8.9$, $J_{6,8} = 2.4$, H-6), 6.88 (1H, s, H-3), 7.40 (1H, d, $J_{5,6} = 8.9$, H-5). ^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 12.5 (C-11, C-13), 17.9 (C-9), 45.0 (C-10, C-12), 97.2 (C-8), 110.2 (C-6), 111.2 (C-4a), 123.6 (C-3), 125.7 (C-5), 146.4 (C-4), 151.0 (C-7), 159.0 (C-8a), 197.0 (C-2). UV λ_{max} (CH_3CN): 251, 269, 460.

IV.1.2.2. Síntese do 2-(7-dietilamino-4-metil-2H-cromen-2-ilideno)malononitrilo (3)

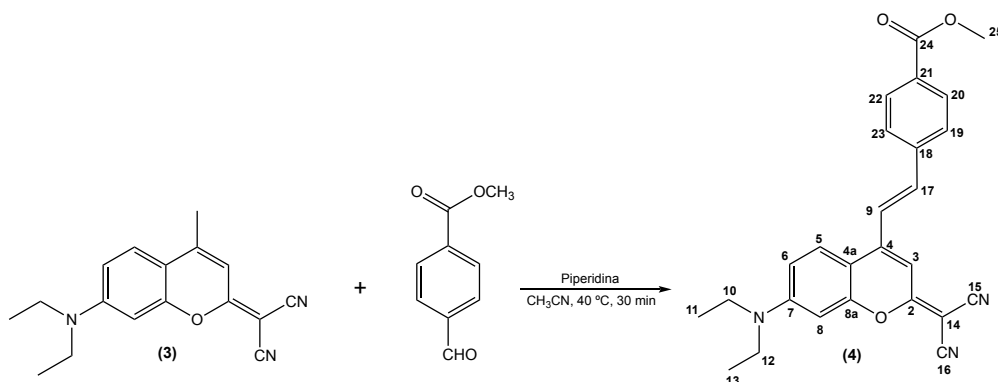


Num balão de fundo redondo, colocaram-se 100 mg de 7-dietilamino-4-metil-2H-cromen-2-tiona (4.0×10^{-4} mol, 1.0 eq), 40 mg de malononitrilo (6.1×10^{-4} mol, 1.5 eq), em CH_3CN (seco) e 200 μL de NEt_3 (1.41×10^{-3} mol, 3.5 eq), e após 10 min adicionou-se 172 mg de AgNO_3 (1.02×10^{-3} mol, 2.5 eq). A mistura reacional foi colocada sob agitação magnética, em atmosfera inerte (N_2), a temperatura ambiente durante 2 h. O produto da

reação, foi isolado por cromatografia *flash*, usando como eluente CHCl_3 , tendo-se obtido 97.6 mg ($\eta = 86\%$).

^1H RMN (400 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 1.23 (6H, t, $J = 7.1$, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$), 2.40 (3H, s, H-9), 3.44 (4H, q, $J = 7.1$, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$), 6.53 (1H, s, H-3), 6.55 (1H, d, $J_{8,6} = 2.4$, H-8), 6.68 (1H, dd, $J_{6,5} = 9.0$, $J_{6,8} = 2.4$, H-6), 7.42 (1H, d, $J_{5,6} = 9.0$, H-5). ^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 12.6 (C-11, C-13), 18.7 (C-9), 45.0 (C-10, C-12), 97.1 (C-8), 108.6 (C-3), 110.0 (C-4a), 110.6 (C-6), 114.5 (C-14), 115.3 (2xCN), 126.2 (C-5), 150.2 (C-4), 151.7 (C-7), 155.0 (C-8a), 172.0 (C-2). UV λ_{max} (nm, CH_3CN): 252, 276, 452, 477.

IV.1.2.3. Síntese do (E)-4-(2-(2-(dicianometileno)-7-dietilamino-2H-cromen-4-il)-benzoato de metilo (4)

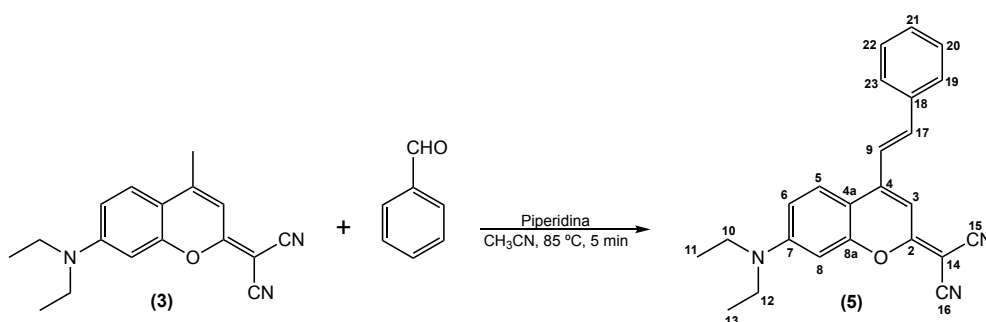


Num balão de fundo redondo, colocaram-se 45 mg de 2-(7-dietilamino-4-metil-2H-cromen-2-ilideno)malononitrilo (1.61×10^{-4} mol, 1.0 eq), 26 mg de 4-formilbenzoato de metilo (1.61×10^{-4} mol, 1.0 eq) em 4 mL de CH_3CN (seco) e 16 μL de piperidina (1.61×10^{-4} mol, 1.0 eq). A mistura reacional foi colocada sob agitação magnética a uma temperatura de 40 °C durante 2 h. A reação foi continuamente monitorizada através de ccd, utilizando como eluente CH_2Cl_2 . O produto da reação, foi isolado por cromatografia *flash*, usando como eluente CH_2Cl_2 , tendo-se obtido 48 mg ($\eta = 71\%$).

^1H RMN (400 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 1.25 (6H, t, $J = 7.1$, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$), 3.47 (4H, q, $J = 7.1$, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$), 3.94 (3H, s, H-25), 6.59 (1H, d, $J_{8,6} = 2.4$, H-8), 6.71 (1H, dd, $J_{6,5} = 9.2$, $J_{6,8} = 2.4$, H-6), 6.83 (1H, s, H-3), 7.40 (2H, sl, H-9, H-17), 7.63 (1H, d, $J_{5,6} = 9.2$, H-5), 7.64 (2H, d, $J = 8.2$, H-19, H-23), 8.08 (2H, d, $J = 8.2$, H-20, H-22). ^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 12.6 (C-11, C-13), 45.1 (C-10, C-12), 52.4 (C-25), 97.7 (C-8), 103.7 (C-3), 108.5 (C-4a), 110.7 (C-6), 114.6 (C-15, C-16), 115.6 (C-14),

122.2 (C-9), 125.8 (C-5), 127.7 (C-19, C-23), 130.4, (C-20, C-22), 131.1 (C-21), 137.4 (C-17), 139.6 (C-18), 146.0 (C-4), 151.8 (C-7), 155.5 (C-8a), 166.6 (C-24) 171.6 (C-2). FTMS(+) - ESI calculado para $C_{26}H_{24}N_3O_3$ $[M+H]^+$ 426.1812 encontrado 426.1807. UV λ_{\max} (nm, CH_3CN): 312, 348, 395, 520. ϵ ($cm^{-1} M^{-1}$): 19000. $\Phi_F = 0.04$.

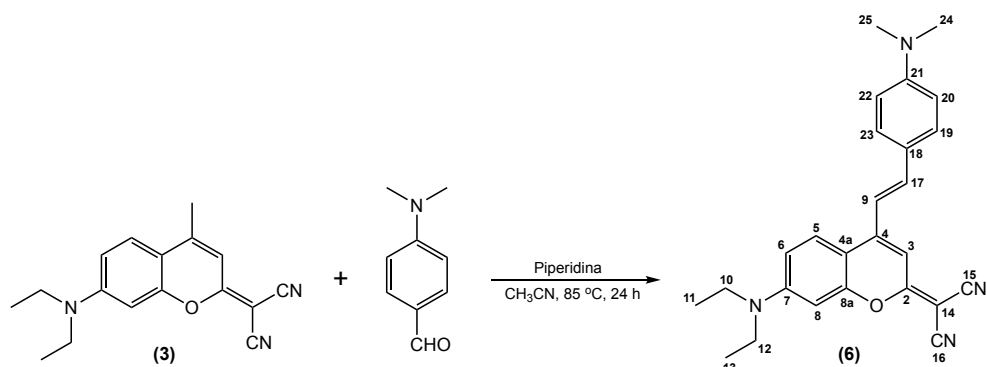
IV.1.2.4. Síntese do (E)-2-(7-dietilamino-4-estiril)-2H-cromen-2-ilideno)malononitrilo (5)



Num balão de fundo redondo, colocaram-se 100 mg de 2-(7-dietilamino-4-metil-2H-cromen-2-ilideno)malononitrilo (3.58×10^{-4} mol, 1.0 eq) em 4 mL de CH_3CN (seco), adicionou-se 36 μL de benzaldeído (3.58×10^{-4} mol, 1.0 eq) e 36 μL de piperidina (3.58×10^{-4} mol, 1.0 eq). A mistura reacional foi colocada sob agitação magnética a uma temperatura de 85 °C, mas quando atingiu a referida temperatura, considerou-se a reação terminada. A reação foi continuamente monitorizada através de ccd, utilizando como eluente *n*-hexano/ CH_2Cl_2 (2:8), O produto da reação, foi isolado por cromatografia *flash*, usando como eluente *n*-hexano/ CH_2Cl_2 (2:8), tendo-se obtido 121 mg ($\eta = 92\%$).

1H RMN (400 MHz, $CDCl_3$, δ , ppm): 1.25 (6H, t, $J = 7.1$, $N(CH_2CH_3)_2$), 3.47 (4H, q, $J = 7.1$, $N(CH_2CH_3)_2$), 6.61 (1H, d, $J_{8,6} = 2.4$, H-8), 6.70 (1H, dd, $J_{6,5} = 9.1$, $J_{6,8} = 2.4$, H-6), 6.87 (1H, s, H-3), 7.34 (1H, d, $J_{9,17} = 16$, H-9), 7.40-7.46 (4H, m, H-17, H-20, H-22, H-21), 7.60 (2H, d, $J_{19,20} = 6.8$, H-19, H-23), 7.65 (1H, d, $J_{5,6} = 9.1$, H-5). ^{13}C RMN (100 MHz, $CDCl_3$, δ , ppm): 12.5 (C-11, C-13), 45.0 (C-10, C-12), 97.6 (C-8), 103.1 (C-3), 108.6 (C-4a), 110.6 (C-6), 114.8 (C-15, C-16), 115.7 (C-14), 119.5 (C-9), 125.7 (C-5), 127.8 (C-19, C-23), 129.1 (C-20, C-22), 130.1 (C-21), 135.4 (C-18), 138.9 (C-17), 146.5 (C-4), 151.6 (C-7), 155.4 (C-8a), 171.6 (C-2). FTMS(+) - ESI calculado para $C_{24}H_{22}N_3O$ $[M+H]^+$ 368.1757 encontrado 368.1752. UV λ_{\max} (nm, CH_3CN): 341, 396, 516. ϵ ($cm^{-1} M^{-1}$): 17000. $\Phi_F = 0.16$.

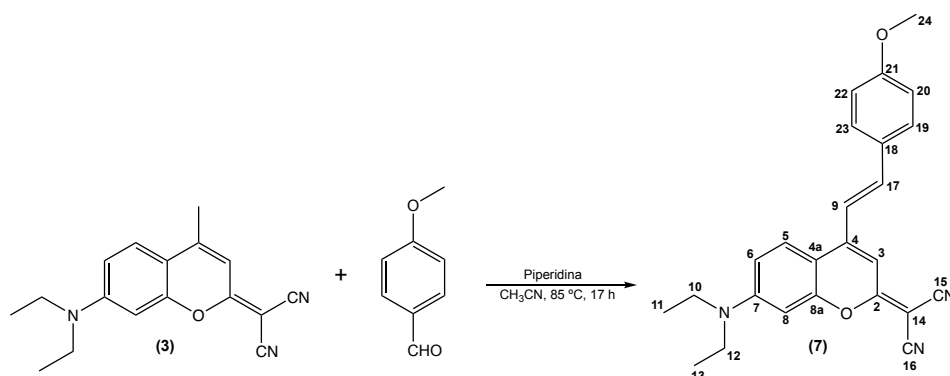
IV.1.2.5. Síntese do (*E*)-2-(7-dietilamino-4-(4-(dimetilamino)estiril)-2*H*-cromen-2-ilideno)malononitrilo (6)



Num balão de fundo redondo, colocaram-se 150 mg de 2-(7-dietilamino-4-metil-2*H*-cromen-2-ilideno)malononitrilo (5.37×10^{-4} mol, 1.0 eq), 81 mg de 4-dimetilaminobenzaldeído (5.37×10^{-4} mol, 1.0 eq) em 4 mL de CH₃CN (seco) e adicionou-se 60 μL de piperidina (5.37×10^{-4} mol, 1.0 eq). A mistura reacional foi colocada sob agitação magnética a uma temperatura de 85 °C durante 24 h. O produto da reação, foi isolado por cromatografia *flash*, usando como eluentes *n*-hexano/CH₂Cl₂ (2:8), *n*-hexano/CH₂Cl₂ (1:9), e CH₂Cl₂ tendo-se obtido 210 mg (η = 95%).

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃, δ , ppm): 1.24 (6H, t, J = 7.1, N(CH₂CH₃)₂), 3.06 (6H, s, N(CH₃)₂), 3.45 (4H, q, J = 7.1, N(CH₂CH₃)₂), 6.54 (1H, d, $J_{8,6}$ = 2.4, H-8), 6.68 (2H, d, $J_{20,19}$ = 8.8, H-20, H-22), 6.69 (1H, dd, $J_{6,5}$ = 8.8, $J_{6,8}$ = 2.4, H-6), 6.77 (1H, s, H-3), 7.08 (1H, d, $J_{9,17}$ = 15.8, H-9), 7.37 (1H, d, $J_{17,9}$ = 15.8, H-17), 7.47 (1H, d, $J_{19,20}$ = 8.8, H-19, H-23), 7.66 (1H, d, $J_{5,6}$ = 8.8, H-5). ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃, δ , ppm): 12.7 (C-11, C-13), 40.3 (C-24, C-25), 45.0 (C-10, C-12), 97.6 (C-8), 100.8 (C-3), 108.8 (C-4a), 110.5 (C-6), 112.1 (C-20, C-22), 113.2 (C-9), 115.7 (C-14), 116.6 (C-15, C-16), 123.3 (C-18), 125.6 (C-5), 129.9 (C-19, C-23), 140.0 (C-17), 147.3 (C-4), 151.5 (C-7), 151.8 (C-21), 155.5 (C-8a), 171.3 (C-2). FTMS(+) - ESI calculado para C₂₆H₂₇N₄O [M+H]⁺ 411.2179 encontrado 411.2174. UV λ_{max} (nm, CH₃CN): 294, 341, 496. ϵ (cm⁻¹ M⁻¹): 34000. Φ_F = 0.95.

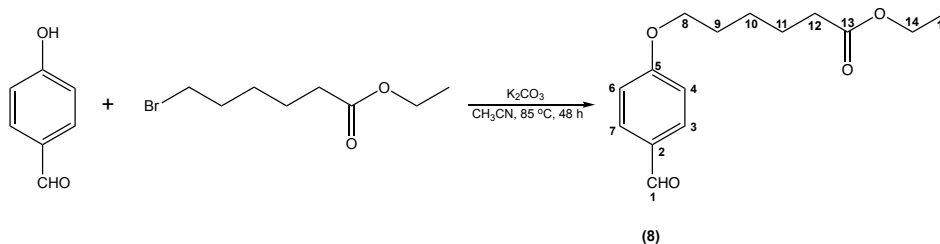
IV.1.2.6. Síntese da (*E*)-2-(7-dietilamino-4-(4-metoxiestiril)-2*H*-cromen-2-ilideno)-malononitrilo (7)



Num balão de fundo redondo, colocaram-se 279 mg de 2-(7-dietilamino-4-metil-2*H*-cromen-2-ilideno)malononitrilo (2.51×10^{-4} mol, 1.0 eq), 30 μ L de 4-metoxibenzaldeído (2.51×10^{-4} mol, 1.0 eq) em 5 mL de CH₃CN (seco) e 25 μ L de piperidina (2.51×10^{-4} mol, 1.0 eq). A mistura reacional foi colocada sob agitação magnética a uma temperatura de 85 °C durante 17 h. A reação foi continuamente monitorizada através de ccd, utilizando como eluente CHCl₃/CH₃OH (99:1). O produto da reação, foi isolado por cromatografia *flash*, usando como eluente CHCl₃/CH₃OH (99:1), tendo-se obtido 95 mg (η = 96%).

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃, δ , ppm): 1.24 (6H, t, J = 7.1, N(CH₂CH₃)₂), 3.46 (4H, q, J = 7.1, N(CH₂CH₃)₂), 3.87 (3H, s, H-24), 6.58 (1H, d, $J_{8,6}$ = 2.4, H-8), 6.70 (1H, dd, $J_{6,5}$ = 9.1, $J_{6,8}$ = 2.4, H-6), 6.82 (1H, s, H-3), 6.94 (2H, d, $J_{20,19}$ = 8.7, H-20, H-22), 7.19 (1H, d, $J_{9,17}$ = 15.9, H-9), 7.39 (1H, d, $J_{17,9}$ = 15.9, H-17), 7.54 (1H, d, $J_{19,20}$ = 8.7, H-19, H-23), 7.65 (1H, d, $J_{5,6}$ = 9.1, H-5). ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃, δ , ppm): 12.6 (C-11, C-13), 45.1 (C-10, C-12), 55.6 (C-24), 97.7 (C-8), 102.4 (C-3), 108.7 (C-4a), 110.6 (C-6), 114.7 (C-20, C-22), 115.1 (C-14), 116.1 (C-15, C-16), 116.9 (C-9), 125.8 (C-5), 128.3 (C-18), 129.6 (C-19, C-23), 138.8 (C-17), 146.9 (C-4), 151.7 (C-7), 155.6 (C-8a), 161.5 (C-21), 171.6 (C-2). FTMS(+) - ESI calculado para C₂₅H₂₄O₂N₃ [M+H]⁺ 398.1863 encontrado 398.1854. UV λ_{\max} (nm, CH₃CN): 418, 522. ϵ (cm⁻¹ M⁻¹): 24000. Φ_F = 0.34.

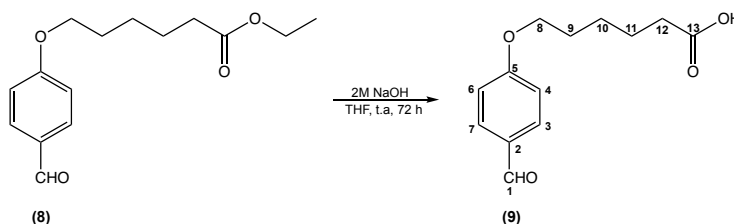
IV.1.2.7. Síntese do 6-(4-formilfenoxi)hexanoato de etilo (8)



Num balão de fundo redondo, colocaram-se 1.22 g de 4-hidroxibenzaldeído (1.00×10^{-2} mol, 1.0 eq), 829 mg de K_2CO_3 (6.00×10^{-3} mol, 0.6 eq) e 1.9 mL de 6-bromo-hexanoato de etilo (1.10×10^{-2} mol, 1.1 eq) em 25 mL de CH_3CN . A reação foi monitorizada através de ccd, utilizando como eluente CH_2Cl_2 . O produto da reação foi isolado por cromatografia *flash*, usando como eluentes *n*-hexano, *n*-hexano/ CH_2Cl_2 (5:5) e CH_2Cl_2 , tendo-se obtido 2.64 g ($\eta = 99\%$).

1H RMN (400 MHz, $CDCl_3$, δ , ppm): 1.25 (3H, t, $J_{15,14} = 7.2$, H-15), 1.52 (2H, m, H-10), 1.71 (2H, m, H-11), 1.83 (2H, m, H-9), 2.33 (2H, t, $J = 7.4$, H-12), 4.04 (2H, t, $J = 6.4$, H-8), 4.12 (2H, q, $J_{14,15} = 7.2$, H-14), 6.97 (2H, d, $J_{4,3} = 8.8$, H-4, H-6), 7.82 (2H, d, $J_{3,4} = 8.8$, H-3, H-7), 9.87 (1H, s, H-1). ^{13}C RMN (100 MHz, $CDCl_3$, δ , ppm): 14.4 (C-15), 24.7 (C-11), 25.7 (C-10), 28.9 (C-9), 60.4 (C-14), 68.2 (C-8), 114.8 (C-4, C-6), 129.9 (C-2), 132.1 (C-3, C-7), 164.3 (C-5), 173.7 (C-13), 191.0 (C-1).

IV.1.2.8. Síntese do ácido 6-(4-formilfenoxi)hexanóico (9)

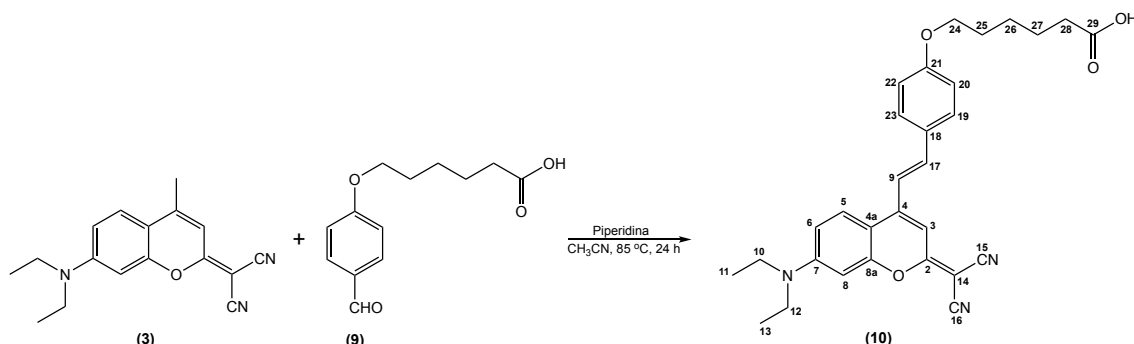


Num balão de fundo redondo, colocaram-se 1.00 g de 6-(4-formilfenoxi)hexanoato de etilo (3.78×10^{-3} mol, 1.0 eq), solubilizou-se em 10 mL de THF e depois adicionou-se 9.5 mL de solução de NaOH 2M (1.89×10^{-2} mol, 5.0 eq). A mistura reacional foi colocada sob agitação magnética a temperatura ambiente durante 72 h. Após esse tempo reacional acidificou-se com HCl 6M. A reação foi monitorizada através de ccd, utilizando

como eluente $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (9:1). O produto da reação foi isolado por cromatografia *flash*, usando como eluente CH_3CN , tendo-se obtido 640 mg ($\eta = 72\%$).

^1H RMN (400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, δ , ppm): 1.41 (2H, m, H-10), 1.56 (2H, m, H-11), 1.73 (2H, m, H-9), 2.23 (2H, t, $J = 7.2$, H-12), 4.07 (2H, t, $J = 6.4$, H-8), 7.10 (2H, d, $J_{4,3} = 8.4$, H-4, H-6), 7.85 (2H, d, $J_{3,4} = 8.4$, H-3, H-7), 9.45 (H-1) ^{13}C RMN (100 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, δ , ppm): 24.3 (C-11), 25.1 (C-10), 28.3 (C-9), 68.0 (C-8), 115.0 (C-4, C-6), 129.6 (C-2), 132.0 (C-3, C-7), 163.8 (C-5), 174.6 (C-13), 191.4 (C-1).

IV.1.2.9. Síntese do ácido (*E*)-2-(4-(2-(2-(dicianometileno)-7-dietilamino-2*H*-cromen-4-il)vinil)fenoxi)hexanóico (10)

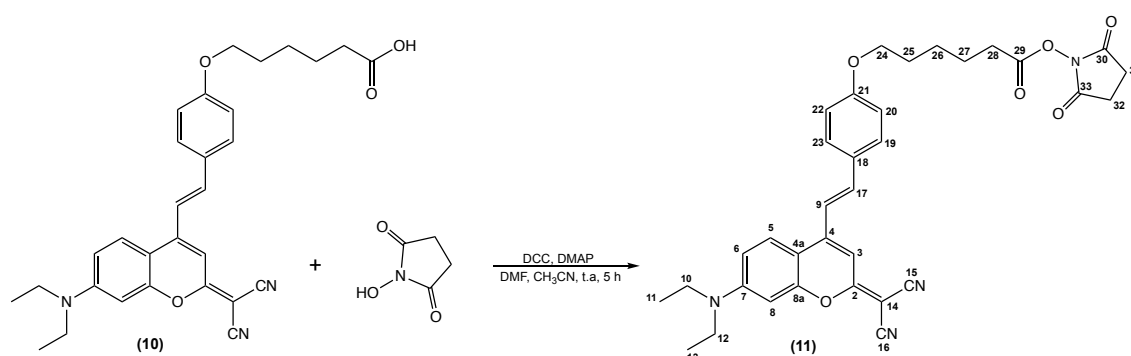


Num balão de fundo redondo, colocaram-se 125 mg de 2-(7-dietilamino-4-metil-2*H*-cromen-2-ilideno)malononitrilo (4.48×10^{-4} mol, 1.0 eq), 106 mg de ácido 6-(4-formilfenoxi)hexanóico (4.48×10^{-4} mol, 1.0 eq) em 10 mL de CH_3CN (seco) e 22 μL de piperidina (2.24×10^{-4} mol, 0.5 eq). A mistura reacional foi colocada sob agitação magnética a uma temperatura de 85 °C durante 24 h. A reação foi monitorizada através de ccd, utilizando como eluente $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (95:5). O produto da reação, foi isolado por cromatografia *flash*, usando como eluentes $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (99:1) e $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (95:5), tendo-se obtido 187 mg ($\eta = 84\%$).

^1H RMN (400 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 1.25 (6H, t, $J = 6.8$, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$), 1.56 (2H, m, H-26), 1.74 (2H, m, H-27), 1.84 (2H, m, H-25), 2.42 (2H, t, $J = 6.6$, H-28) 3.46 (4H, q, $J = 6.8$, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$), 4.02 (2H, t, H-24), 6.58 (1H, sl, H-8), 6.70 (1H, d, $J_{6,5} = 9.2$, H-6), 6.83 (1H, s, H-3), 6.93 (2H, d, $J_{20,19} = 7.8$, H-20, H-22), 7.19 (1H, d, $J_{9,17} = 15.8$, H-9), 7.39 (1H, d, $J_{17,9} = 15.8$, H-17), 7.53 (2H, d, $J_{19,20} = 7.8$, H-19, H-23), 7.65 (1H, d, $J_{5,6} = 9.2$, H-5). ^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 12.7 (C-11, C-13), 24.5 (C-27), 25.7

(C-26), 29.0 (C-25), 33.8 (C-28), 45.1 (C-10, C-12), 68.0 (C-24), 97.7 (C-8), 102.3 (C-3), 108.7 (C-4a), 110.6 (C-6), 115.1 (C-14), 115.2 (C-20, C-22), 116.1 (2xCN), 116.8 (C-9), 125.8 (C-5), 128.2 (C-18), 129.6 (C-19, C2-3), 138.9 (C-17), 147.0 (C-4), 151.7 (C-7), 155.6 (C-8a), 160.9 (C-21), 171.6 (C-29), 178.7 (C-2). FTMS(+) - ESI calculado para $C_{30}H_{32}N_3O_4$ $[M+H]^+$ 498.2387 encontrado 498.2379. UV λ_{max} (nm, CH_3CN): 340, 418, 519. ϵ ($cm^{-1} M^{-1}$): 24000. $\Phi_F = 0.28$.

IV.1.2.10. Síntese do (*E*)-2-(4-2-2-(dicianometileno)-7-dietilamino-2*H*-cromen-4-il)-vinil)fenoxi)hexanoato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo (11)

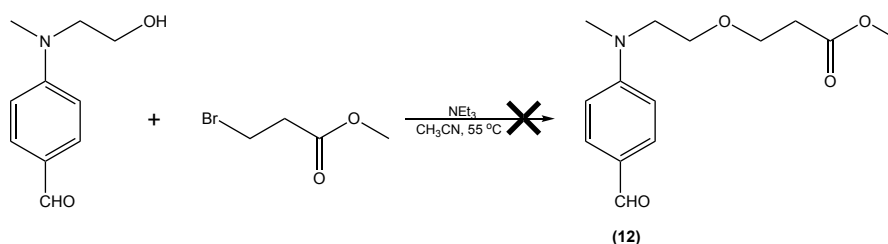


Num balão de fundo redondo, colocaram-se 110 mg de ácido (*E*)-2-(4-(2-(2-(dicianometileno)-7-dietilamino-2*H*-cromen-4-il)vinil)fenoxi)hexanóico (2.21×10^{-4} mol, 1.0 eq), 55 mg de DCC (2.65×10^{-4} mol, 1.2 eq) e 3 mg de DMAP (2.21×10^{-5} mol, 0.1 eq) em 2 mL de DMF (seco) e 25 mL de CH_3CN (seco), e após 5 min adicionou-se 28 mg de *N*-hidroxisuccinimida (2.43×10^{-4} mol, 1.2 eq). A mistura reacional foi colocada sob agitação magnética a temperatura ambiente durante 5 h. A reação foi monitorizada através de ccd, utilizando como eluente $CHCl_3/CH_3OH$ (95:5). O produto da reação foi isolado por cromatografia *flash*, usando como eluente $CH_3CN/CHCl_3$ (7:3), tendo-se obtido 117 mg ($\eta = 89\%$).

1H RMN (400 MHz, $CDCl_3$, δ , ppm): 1.24 (6H, t, $J = 6.8$, $N(CH_2CH_3)_2$), 1.58-1.89 (6H, m, H-25, H-26, H-27), 2.67 (2H, t, $J = 7.4$, H-28), 2.85 (2H, m, H-31, H-32), 3.46 (4H, q, $J = 6.8$, $N(CH_2CH_3)_2$), 4.02 (2H, t, $J = 6.4$, H-24), 6.59 (1H, d, $J_{8,6} = 2.4$, H-8), 6.70 (1H, dd, $J_{6,5} = 9.2$, $J_{6,8} = 2.4$, H-6), 6.85 (1H, s, H-3), 6.93 (2H, d, $J_{20,19} = 8.6$, H-20, H-22), 7.20 (1H, d, $J_{9,17} = 16.0$, H-9), 7.40 (1H, d, $J_{17,9} = 16.0$, H-17), 7.54 (2H, d, $J_{19,20} = 8.6$, H-19, H-23), 7.66 (1H, d, $J_{6,5} = 9.2$, H-5). ^{13}C RMN (100 MHz, $CDCl_3$, δ , ppm): 12.6 (C-11, C-13), 24.5 (C-27), 25.4 (C-26), 25.7 (C-31, C-32), 28.8 (C-25), 31.0 (C-28), 45.1

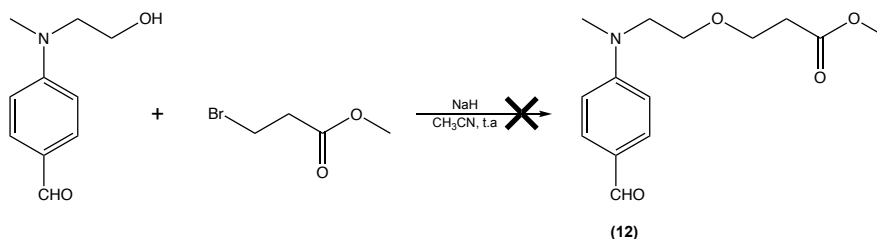
(C-10, C-12), 67.8 (C-24), 97.7 (C-8), 102.4 (C-3), 108.8 (C-4a), 110,6 (C-6), 115.2 (C-14, C-20, C-22), 116.8 (2xCN, C-9), 125.8 (C-5), 128.2 (C-18), 129.6 (C-19, C-23), 138.9 (C-17), 147.0 (C-4), 151.7 (C-7), 155.6 (C-8a), 160.9 (C-21), 168.6 (C-29), 169.3 (C-30, C-33), 171.7 (C-2). FTMS(+) - ESI calculado para $C_{34}H_{35}N_4O_6$ $[M+H]^+$ 595.2551 encontrado 595.2543. UV λ_{max} (nm, CH_3CN): 340, 418, 523. ϵ ($cm^{-1} M^{-1}$): 24000. $\Phi_F = 0.29$.

IV.1.2.11. Tentativa de síntese do 3-(2-((4-formilfenil)(metil)amino)etoxi)propanoato de metilo (12)



Num balão de fundo redondo, colocaram-se 500 mg de *N*-metil-*N*-(2-hidroxi-etil)-4-aminobenzaldeído (2.79×10^{-3} mol, 1.0 eq), 335 μL de 3-bromopropanoato de metilo (3.07×10^{-3} mol, 1.1 eq), 466 μL de piperidina (3.35×10^{-3} mol, 1.2 eq) em 20 mL de CH_3CN (seco). A mistura reacional foi colocada sob agitação magnética a $55^\circ C$ durante 3 h. A reação foi monitorizada através de ccd, utilizando como eluente $CHCl_3/CH_3OH$ (9:1).

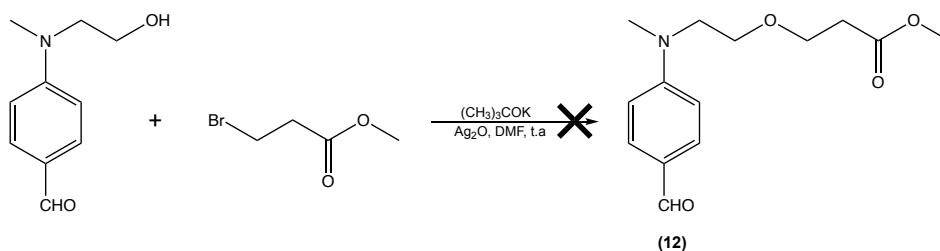
IV.1.2.12. Tentativa de síntese do 3-(2-((4-formilfenil)(metil)amino)etoxi)propanoato de metilo (12)



Num balão de fundo redondo, colocaram-se 50 mg de *N*-metil-*N*-(2-hidroxi-etil)-4-aminobenzaldeído (2.79×10^{-4} mol, 1.0 eq), 13 mg de NaH (3.07×10^{-4} mol, 1.1 eq) em 5 mL de CH_3CN (seco) e de seguida 34 μL de 3-bromopropanoato de metilo (3.07×10^{-4} mol,

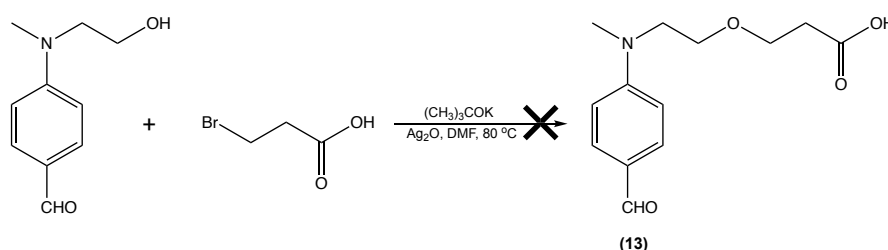
1.1 eq). A mistura reacional foi colocada sob agitação magnética a temperatura ambiente. A reação foi monitorizada através de ccd, utilizando como eluente $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (9:1).

IV.1.2.13. Tentativa de síntese do 3-(2-((4-formilfenil)(metil)amino)etoxi)propanoato de metilo (12)



Num balão de fundo redondo, colocaram-se 50 mg de *N*-metil-*N*-(2-hidroxietyl)-4-aminobenzaldeído (2.79×10^{-4} mol, 1.0 eq), 35 mg de *t*-butóxido de potássio (3.07×10^{-4} mol, 1.1 eq) em 5 mL de DMF e de seguida 34 μL de 3-bromopropanoato de metilo (3.07×10^{-4} mol, 1.1 eq), e após 1 h adicionou-se 8 mg de Ag_2O (3.35×10^{-4} mol, 1.2 eq). A mistura reacional foi colocada sob agitação magnética a temperatura ambiente. A reação foi monitorizada através de ccd, utilizando como eluente Et_2O .

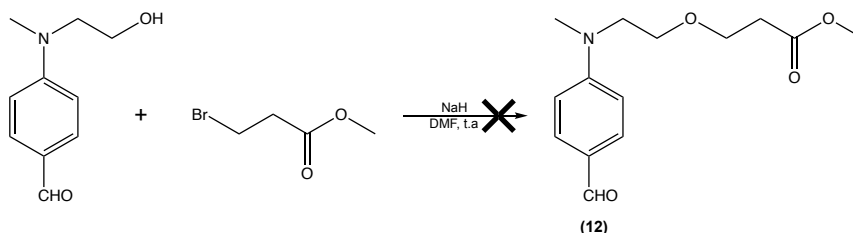
IV.1.2.14. Tentativa de síntese do ácido 3-(2-((4-formilfenil)(metil)amino)etoxi)propanóico (13)



Num balão de fundo redondo, colocaram-se 100 mg de *N*-metil-*N*-(2-hidroxietyl)-4-aminobenzaldeído (5.58×10^{-4} mol, 1.0 eq), 150 mg de *t*-butóxido de potássio (1.23×10^{-3} mol, 2.2 eq) em 5 mL de DMF, a mistura reacional foi colocada sob agitação durante 10 min, num outro balão, colocaram-se 259 mg de Ag_2O (1.12×10^{-3} mol, 2.0 eq) e 187 mg de ácido 3-bromopropanoato (1.12×10^{-3} mol, 2.0 eq), de seguida juntou-se à

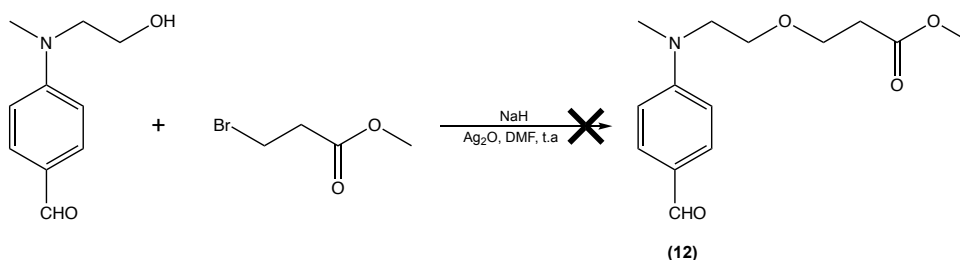
mistura reacional do primeiro balão. A mistura reacional foi colocada sob agitação magnética a 80 °C, durante a noite. A reação foi monitorizada através de ccd, utilizando como eluente CHCl₃/CH₃OH/H₂O (65:10:1).

IV.1.2.15. Tentativa de síntese do 3-(2-((4-formilfenil)(metil)amino)etoxi)propanoato de metilo (12)



Num balão de fundo redondo, colocaram-se 30 mg de *N*-metil-*N*-(2-hidroxietil)-4-amino-benzaldeído (1.67×10^{-4} mol, 1.0 eq), 6.7 mg de NaH (1.67×10^{-4} mol, 1.0 eq) em 3 mL de DMF num banho de gelo, a mistura reacional foi colocada sob agitação durante 1 h, de seguida adicionou-se 34 µL de 3-bromopropanoato de metilo (2.34×10^{-4} mol, 1.4 eq). A mistura reacional foi colocada sob agitação magnética a temperatura ambiente, durante a noite. A reação foi monitorizada através de ccd, utilizando como eluente Et₂O.

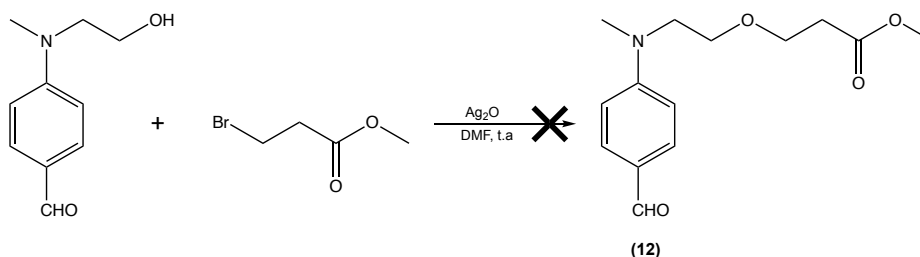
IV.1.2.16. Tentativa de síntese do 3-(2-((4-formilfenil)(metil)amino)etoxi)propanoato de metilo (12)



Num balão de fundo redondo, colocaram-se 30 mg de *N*-metil-*N*-(2-hidroxietil)-4-amino-benzaldeído (1.67×10^{-4} mol, 1.0 eq), 6.7 mg de NaH (1.67×10^{-4} mol, 1.0 eq) em 3 mL de DMF num banho de gelo, a mistura reacional foi colocada sob agitação durante 1 h, de seguida adicionou-se 34 µL de 3-bromopropanoato de metilo (2.34×10^{-4} mol, 1.4 eq) e 46 mg de Ag₂O (2.00×10^{-4} mol, 1.2 eq). A mistura reacional foi colocada sob

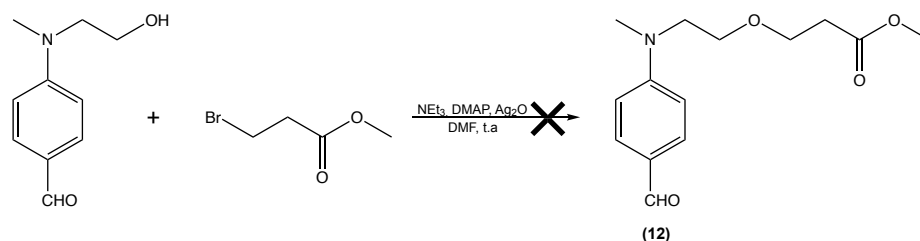
agitação magnética a temperatura ambiente, durante a noite. A reação foi monitorizada através de ccd, utilizando como eluente Et₂O.

IV.1.2.17. Tentativa de síntese do 3-(2-((4-formilfenil)(metil)amino)etoxi)propanoato de metilo (12)



Num balão de fundo redondo, colocaram-se 30 mg de *N*-metil-*N*-(2-hidroxi-etil)-4-amino-benzaldeído (1.67×10^{-4} mol, 1.0 eq), 46 mg de Ag_2O (2.00×10^{-4} mol, 1.2 eq) em 3 mL de DMF num banho de gelo, a mistura reacional foi colocada sob agitação durante 5 min, de seguida adicionou-se 34 μL de 3-bromopropanoato de metilo (2.34×10^{-4} mol, 1.4 eq). A mistura reacional foi colocada sob agitação magnética a temperatura ambiente, durante a noite. A reação foi monitorizada através de ccd, utilizando como eluente Et₂O.

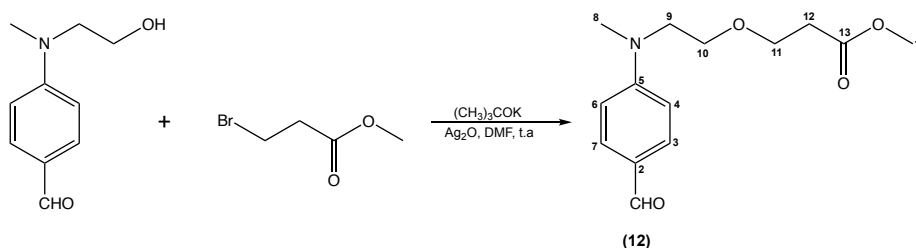
IV.1.2.18. Tentativa de síntese do 3-(2-((4-formilfenil)(metil)amino)etoxi)propanoato de metilo (12)



Num balão de fundo redondo, colocaram-se 20 mg de *N*-metil-*N*-(2-hidroxi-etil)-4-amino-benzaldeído (1.12×10^{-4} mol, 1.0 eq), 30 μL de NEt_3 (2.24×10^{-4} mol, 2.0 eq), 3.5 mg de DMAP (1.12×10^{-5} mol, 0.1 eq) em 5 mL de DMF num banho de gelo, a mistura reacional foi colocada sob agitação durante 10 min, num outro balão, colocaram-se 31 mg de Ag_2O (1.13×10^{-4} mol, 2.0 eq), 30 μL de 3-bromopropanoato metilo (2.10×10^{-4} mol, 1.9

eq), de seguida juntou-se à mistura reacional do primeiro balão. A mistura reacional foi colocada sob agitação magnética a temperatura ambiente, durante a noite.

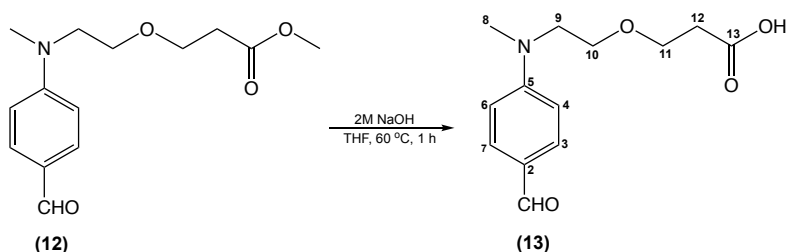
IV.1.2.19. Síntese do 3-(2-((4-formilfenil)(metil)amino)etoxi)propanoato de metilo (12)



Num balão de fundo redondo, colocaram-se 500 mg de *N*-metil-*N*-(2-hidroxietyl)-4-aminobenzaldeído (2.79×10^{-4} mol, 1.0 eq), 344 mg de *t*-butóxido de potássio (3.07×10^{-4} mol, 1.1 eq) em 5 mL de DMF, a mistura reacional foi colocada sob agitação durante 10 min, num outro balão, colocaram-se 1.3 mg de Ag_2O (5.58×10^{-3} mol, 2.0 eq) e 609 μL de 3-bromopropanoato de metilo (5.58×10^{-3} mol, 2.0 eq), de seguida juntou-se à mistura reacional do primeiro balão. A mistura reacional foi colocada sob agitação magnética a temperatura ambiente, durante a noite. A reação foi monitorizada através de ccd, utilizando como eluente Et_2O . O produto da reação foi isolado por cromatografia *flash*, usando como eluente *n*-hexano/ Et_2O (1:1), tendo-se obtido 300 mg ($\eta = 40\%$).

^1H RMN (400 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 2.51 (2H, t, H-12), 3.03 (3H, s, H-14), 3.54-3.60 (4H, m, H-11, H-10), 3.60 (3H, s, H-8), 3.66 (2H, t, H-9), 6.67 (2H, d, $J = 8.8$, H-4, H-6), 7.67 (2H, d, $J = 8.8$, H-3, H-7), 9.68 (1H, s, CHO). ^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 34.9 (C-12), 39.2 (C-14), 51.7 (C-10 ou C-11), 51.9 (C-10 ou C-11), 67.0 (C-9), 68.4 (C-8), 111.0 (C-4, C-6), 125.2 (C-2), 132.2 (C-3, C-7), 153.5 (C-5), 171.9 (C-13), 190.2 (CHO).

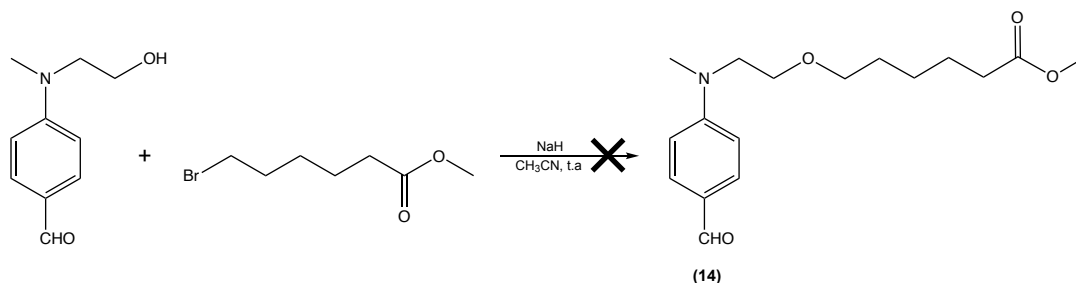
IV.1.2.20. Síntese do ácido 3-(2-((4-formilfenil)(metil)amino)etoxi)propanóico (13)



Num balão de fundo redondo, colocaram-se 130 mg de 3-(2-((4-formilfenil)(metil)amino)etoxi)propanoato de metilo (4.90×10^{-4} mol, 1.0 eq), 1.2 mL de NaOH 2M (2.45×10^{-3} mol, 5.0 eq) em 8 mL de THF. A mistura reacional foi colocada sob agitação magnética a 60 °C durante 1 h e de seguida acidificada com HCl 6M. A reação foi monitorizada através de ccd, utilizando como eluente Et₂O. O produto da reação foi isolado por cromatografia *flash*, usando como eluentes CH₃CN e CHCl₃/CH₃OH (9:1), tendo-se obtido 40 mg (η = 16%).

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃, δ , ppm): 2.58 (2H, t, H-12), 3.06 (3H, s, H-8) 3.60-3.65 (4H, m, H-11, H-10), 3.71 (2H, t, H-9), 6.70 (2H, d, J = 8.8, H-4, H-6), 7.70 (2H, d, J = 8.8, H-3, H-7), 9.69 (1H, s, CHO). ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃, δ , ppm): 35.1 (C-12), 39.3 (C-14), 52.1 (C-10 e C-11), 66.7 (C-9), 68.6 (C-8), 111.2 (C-4, C-6), 125.2 (C-2), 132.3 (C-3, C-7), 153.7 (C-5), 176.8 (C-13), 190.7 (CHO).

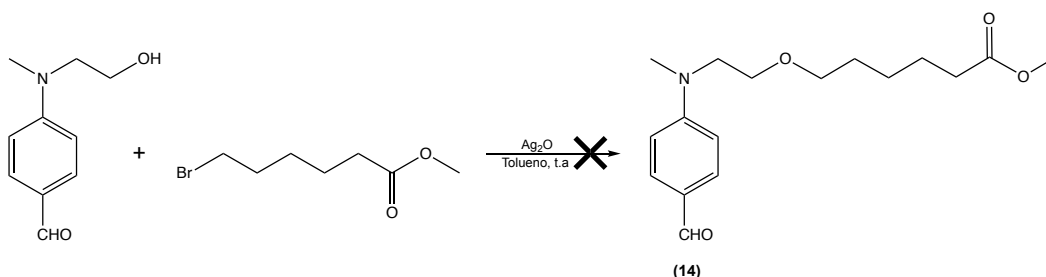
IV.1.2.21. Tentativa de síntese do 3-(2-((4-formilfenil)(metil)amino)etoxi)propanoato de metilo (14)



Num balão de fundo redondo, colocaram-se 50 mg de *N*-metil-*N*-(2-hidroxietil)-4-amino-benzaldeído (2.79×10^{-4} mol, 1.0 eq), 13 mg de NaH (3.07×10^{-4} mol, 1.1 eq) em 5 mL de CH₃CN (seco) e de seguida 55 μ L de 3-bromo-hexanoato de metilo (3.07×10^{-4} mol, 1.1 eq). A mistura reacional foi colocada sob agitação magnética a temperatura

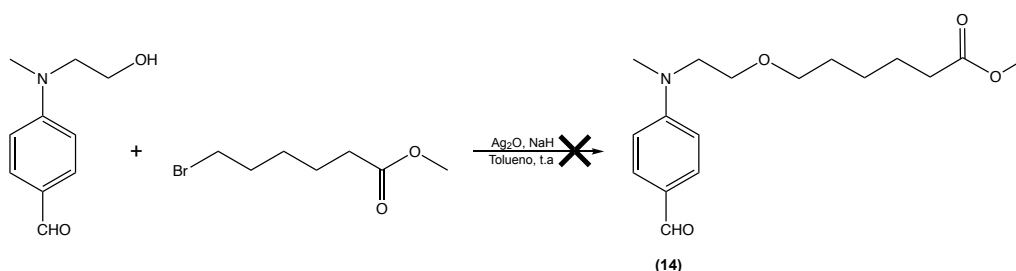
ambiente. A reação foi monitorizada através de ccd, utilizando como eluente $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (9:1).

IV.1.2.22. Tentativa de síntese do 3-(2-((4-formilfenil)(metil)amino)etoxi)propanoato de metilo (14)



Num balão de fundo redondo, colocaram-se 50 mg de *N*-metil-*N*-(2-hidroxi-etil)-4-amino-benzaldeído (2.79×10^{-4} mol, 1.0 eq), 8 mg de Ag_2O (3.35×10^{-4} mol, 1.2 eq) em 5 mL de tolueno, de seguida adicionou-se 55 μL de 3-bromo-hexanoato de metilo (3.07×10^{-4} mol, 1.1 eq). A mistura reacional foi colocada sob agitação magnética a temperatura ambiente. A reação foi monitorizada através de ccd, utilizando como eluente $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (9:1).

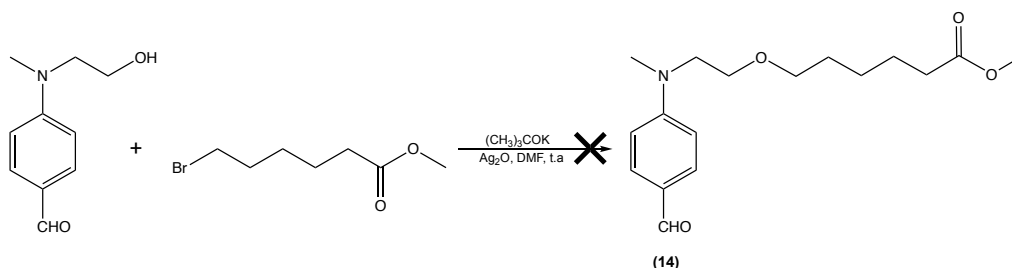
IV.1.2.23. Tentativa de síntese do 3-(2-((4-formilfenil)(metil)amino)etoxi)propanoato de metilo (14)



Num balão de fundo redondo, colocaram-se 50 mg de *N*-metil-*N*-(2-hidroxi-etil)-4-amino-benzaldeído (2.79×10^{-4} mol, 1.0 eq), 13 mg de NaH (3.07×10^{-4} mol, 1.1 eq) em 5 mL de tolueno, num outro balão, colocaram-se 8 mg de Ag_2O (3.35×10^{-4} mol, 1.2 eq) e 55 μL de 3-bromo-hexanoato de metilo (3.07×10^{-4} mol, 1.1 eq), adicionou-se esta mistura ao primeiro balão. A mistura reacional foi colocada sob agitação magnética a

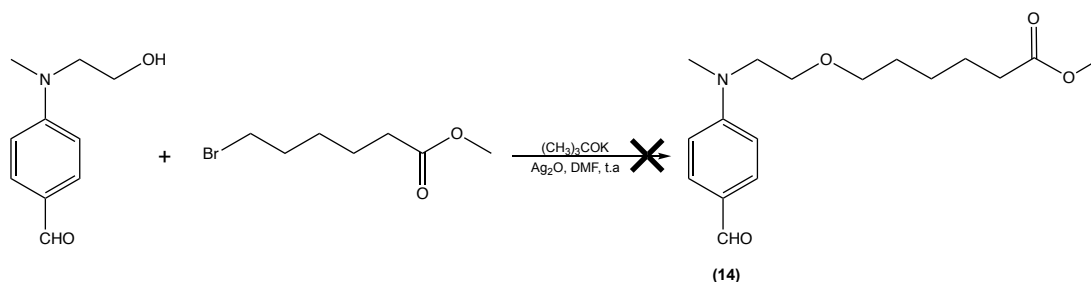
temperatura ambiente. A reação foi monitorizada através de ccd, utilizando como eluente $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (9:1).

IV.1.2.24. Tentativa de síntese do 3-(2-((4-formilfenil)(metil)amino)etoxi)propanoato de metilo (14)



Num balão de fundo redondo, colocaram-se 50 mg de *N*-metil-*N*-(2-hidroxietil)-4-amino-benzaldeído (2.79×10^{-4} mol, 1.0 eq), 35 mg de *t*-butóxido de potássio (3.07×10^{-4} mol, 1.1 eq) em 5 mL de DMF e de seguida 55 μL de 3-bromo-hexanoato de metilo (3.07×10^{-4} mol, 1.1 eq), e após 1 h adicionou-se 8 mg de Ag_2O (3.35×10^{-4} mol, 1.2 eq). A mistura reacional foi colocada sob agitação magnética a temperatura ambiente. A reação foi monitorizada através de ccd, utilizando como eluente Et_2O .

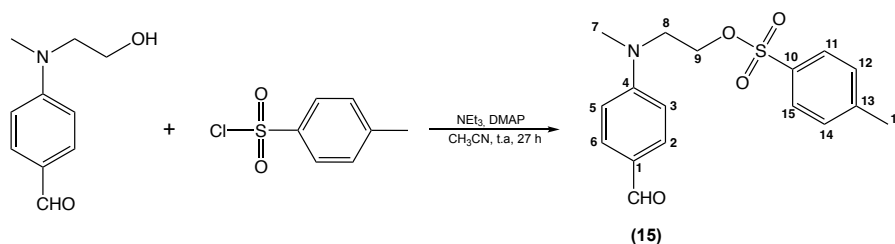
IV.1.2.25. Tentativa de síntese do 3-(2-((4-formilfenil)(metil)amino)etoxi)propanoato de metilo (14)



Num balão de fundo redondo, colocaram-se 500 mg de *N*-metil-*N*-(2-hidroxietil)-4-aminobenzaldeído (2.79×10^{-4} mol, 1.0 eq), 344 mg de *t*-butóxido de potássio (3.07×10^{-4} mol, 1.1 eq) em 8 mL de DMF, a mistura reacional foi colocada sob agitação durante 10 min, num outro balão, colocaram-se 1.3 mg de Ag_2O (5.58×10^{-3} mol, 2.0 eq) e 993 μL de 3-bromo-hexanoato de metilo (5.58×10^{-3} mol, 2.0 eq), de seguida juntou-se à

mistura reacional do primeiro balão. A mistura reacional foi colocada sob agitação magnética a temperatura ambiente, durante a noite. A reação foi monitorizada através de ccd, utilizando como eluente $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (99:1).

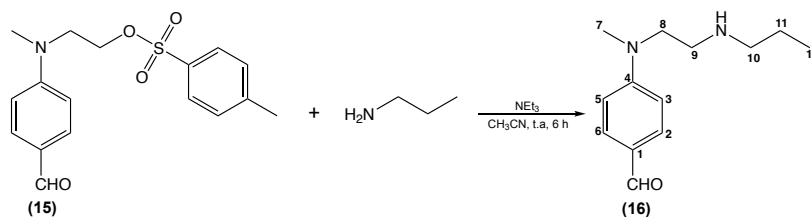
IV.1.2.26. Síntese do 4-metilbenzenossulfonato de 2-((4-formilfenil)(metil)amino)-etilo (15)



Num balão de fundo redondo, colocaram-se 100 mg de *N*-metil-*N*-(2-hidroxietil)-4-aminobenzaldeído (5.58×10^{-4} mol, 1.0 eq), 120 μL de NEt_3 (8.37×10^{-4} mol, 1.5 eq), 14 mg de DMAP (1.12×10^{-4} mol, 0.2 eq) em 5 mL de CH_3CN num banho de gelo, a mistura reacional foi colocada sob agitação durante 10 min, num outro balão, colocaram-se 160 mg de cloreto de 4-metilbenzenossulfonilo (8.37×10^{-4} mol, 1.5 eq) em 5 mL de CH_3CN , de seguida juntou-se à mistura reacional do primeiro balão. A mistura reacional foi colocada sob agitação magnética a temperatura ambiente durante 27 h. A reação foi monitorizada através de ccd, utilizando como eluente Et_2O . O produto da reação foi isolado por cromatografia *flash*, usando como eluente Et_2O , tendo-se obtido 160 mg ($\eta = 86\%$).

^1H RMN (400 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 2.39 (3H, s, H-16), 3.00 (3H, s, H-7), 3.72 (2H, t, $J_{9,8} = 5.6$, H-9), 4.20 (2H, t, $J_{8,9} = 5.6$, H-8), 6.58 (2H, d, $J = 9.2$, H-3, H-5), 7.23 (2H, d, $J = 8.4$, H-2, H-6), 7.67 (4H, dd, H-11, H-12, H-14, H-15), 9.74 (1H, s, CHO).

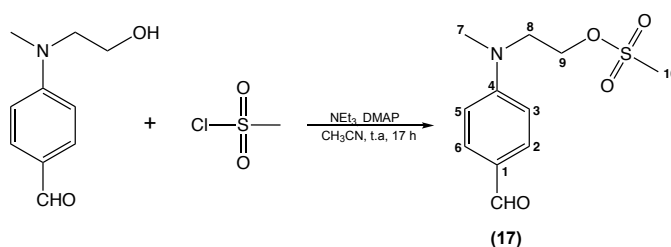
IV.1.2.27. Síntese do 4-(metil(2-(propilamino)etil)amino)benzaldeído (16)



Num balão de fundo redondo, colocaram-se 120 mg de 4-metilbenzenossulfonato de 2-((4-formilfenil)(metil)amino)etilo (3.60×10^{-4} mol, 1.0 eq), 30 μ L de propilamina (3.60×10^{-4} mol, 1.0 eq) e 50 μ L de NEt_3 (3.96×10^{-4} mol, 1.1 eq) em 10 mL de CH_3CN . A mistura reacional foi colocada sob agitação magnética a temperatura ambiente durante 6 h. A reação foi monitorizada através de ccd, utilizando como eluente Et_2O . O produto da reação foi isolado por cromatografia *flash*, usando como eluente Et_2O , tendo-se obtido 40 mg ($\eta = 50\%$).

^1H RMN (400 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 0.90 (3H, t, $J = 7.2$, H-12), 1.58 (2H, q, $J = 7.6$, H-11), 2.70 (2H, t, $J = 7.6$, H-10), 2.93 (2H, t, $J = 7.2$, H-9), 3.04 (3H, s, H-7), 3.68 (2H, t, $J = 7.2$, H-8), 6.73 (2H, d, $J = 8.8$, H-3, H-5), 7.67 (2H, d, $J = 8.8$, H-2, H-6), 9.70 (1H, s, CHO).

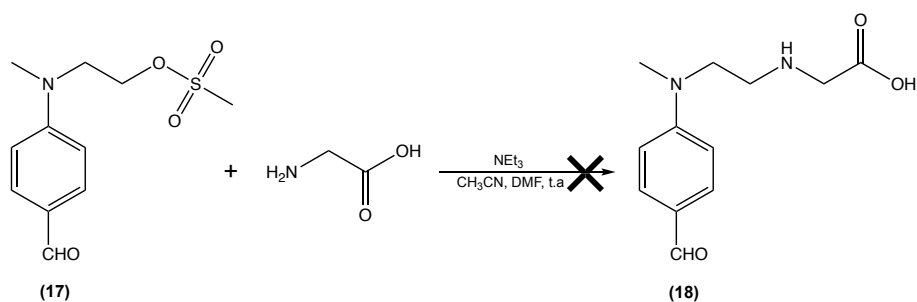
IV.1.2.28. Síntese do metanossulfonato de 2-((4-formilfenil)(metil)amino)etilo (17)



Num balão de fundo redondo, colocaram-se 300 mg de *N*-metil-*N*-(2-hidroxi)etil-4-aminobenzaldeído (1.67×10^{-3} mol, 1.0 eq), 200 μ L de cloreto de metanossulfonilo (2.50×10^{-3} mol, 1.5 eq), 350 μ L de NEt_3 (2.50×10^{-3} mol, 1.5 eq) e 41 mg de DMAP (3.34×10^{-4} mol, 0.2 eq) em 10 mL de CH_3CN . A mistura reacional foi colocada sob agitação magnética a temperatura ambiente durante 17 h. A reação foi monitorizada através de ccd, utilizando como eluente Et_2O . O produto da reação foi isolado por cromatografia *flash*, usando como eluente Et_2O , tendo-se obtido 429 mg ($\eta = 99\%$).

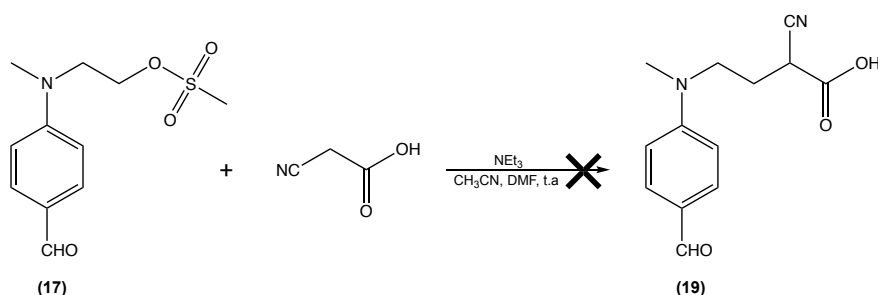
^1H RMN (400 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 2.90 (3H, s, H-7), 3.05 (3H, s, H-10), 3.74 (2H, t, $J = 5.6$, H-9), 4.33 (2H, t, $J = 5.6$, H-8), 6.69 (2H, d, $J = 8.8$, H-3, H-5), 7.66 (2H, d, $J = 8.8$, H-2, H-6), 9.66 (1H, s, CHO). ^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 37.3 (C-10), 39.0 (C-7), 50.9 (C-8), 66.2 (C-9), 111.1 (C-3, C-5), 125.7 (C-1), 132.0 (C-2, C6), 152.9 (C-4), 190.2 (CHO).

IV.1.2.29. Tentativa de síntese do 2-((4-formilfenil)(metil)amino)etilglicina (18)



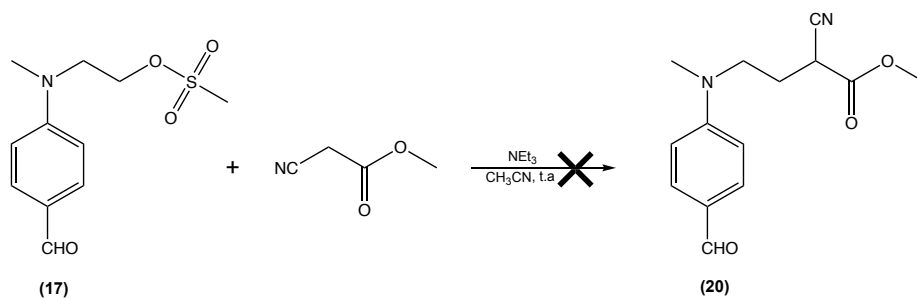
Num balão de fundo redondo, colocaram-se 150 mg de metanossulfonato de 2-((4-formilfenil)(metil)amino)etilo (5.80×10^{-4} mol, 1.0 eq), 132 mg de glicina (1.75×10^{-3} mol, 3.0 eq) e 163 μL de NEt_3 (1.16×10^{-3} mol, 2.0 eq) em 5 mL de CH_3CN e 3 mL de DMF. A mistura reacional foi colocada sob agitação magnética a temperatura ambiente, durante a noite. A reação foi monitorizada através de ccd, utilizando como eluente Et_2O .

IV.1.2.30. Tentativa de síntese do ácido 2-ciano-4-((4-formilfenil)(metil)amino)butanoico (19)



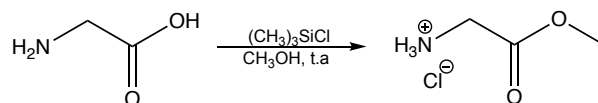
Num balão de fundo redondo, colocaram-se 50 mg de metanossulfonato de 2-((4-formilfenil)(metil)amino)etilo (1.94×10^{-4} mol, 1.0 eq), 17 mg de ácido 2-cianoacético (1.94×10^{-4} mol, 1.0 eq) e 54 μ L de NEt_3 (3.88×10^{-4} mol, 2.0 eq) em 5 mL de CH_3CN . A mistura reacional foi colocada sob agitação magnética a temperatura ambiente, durante a noite. A reação foi monitorizada através de ccd, utilizando como eluente Et_2O .

IV.1.2.31. Tentativa de síntese do 2-ciano-4-((4-formilfenil)(metil)amino)butanoato de metilo (20)



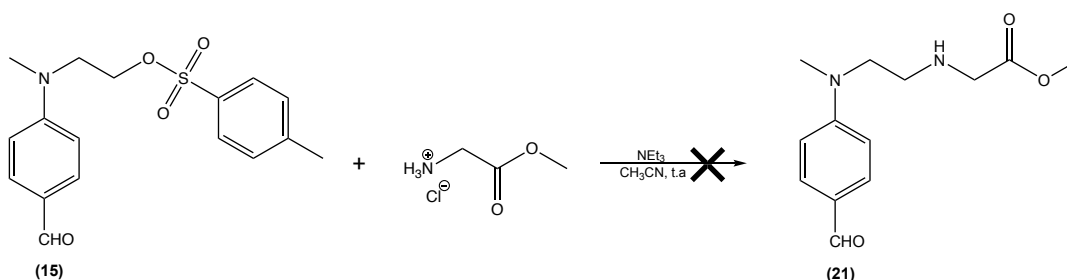
Num balão de fundo redondo, colocaram-se 50 mg de metanossulfonato de 2-((4-formilfenil)(metil)amino)etilo (1.94×10^{-4} mol, 1.0 eq), 19 mg de cianoacetato de metilo (1.94×10^{-4} mol, 1.0 eq) e 27 μ L de NEt_3 (1.94×10^{-4} mol, 1.0 eq) em 5 mL de CH_3CN . A mistura reacional foi colocada sob agitação magnética a temperatura ambiente, durante a noite. A reação foi monitorizada através de ccd, utilizando como eluente Et_2O .

IV.1.2.32. Síntese do cloreto de 2-metoxi-2-oxoetan-1-amínio



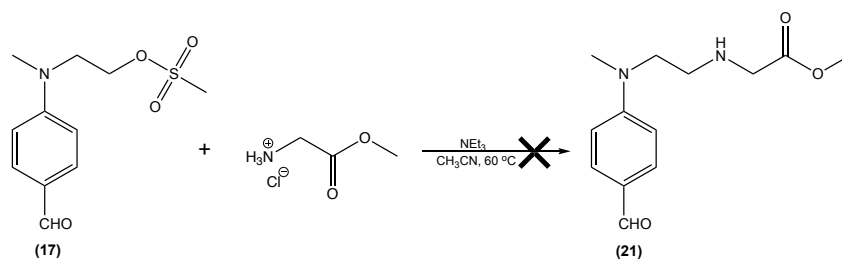
Num balão de fundo redondo, colocaram-se 600 mg de glicina (7.99×10^{-3} mol, 1.0 eq) e 2 ml de cloreto de trimetilsililo (1.59×10^{-2} mol, 2.0 eq) em 5 mL de CH_3OH . A mistura reacional foi colocada sob agitação magnética a temperatura ambiente, durante a noite. A reação foi monitorizada através de ccd, utilizando como eluente $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ (65:35:5).

IV.1.2.33. Tentativa de síntese do (2-((4-formilfenil)(metil)amino)etil)glicinato de metilo (21)



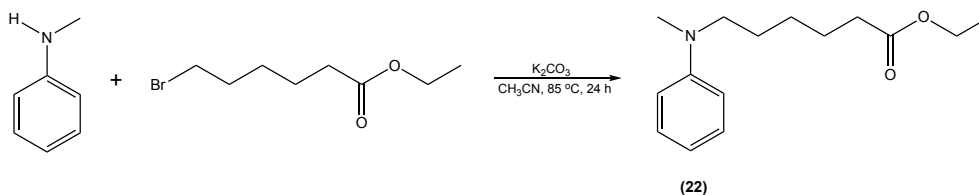
Num balão de fundo redondo, colocaram-se 420 mg 4-metilbenzenossulfonato de 2-((4-formilfenil)(metil)amino)etilo (1.26×10^{-3} mol, 1.0 eq), 474 mg cloreto de 2-metoxi-2-oxoetan-1-amínio (3.78×10^{-3} mol, 3.0 eq) e 580 μL de NEt_3 (4.16×10^{-3} mol, 3.3 eq) em 10 mL de CH_3CN . A mistura reacional foi colocada sob agitação magnética a temperatura ambiente durante 4 h. A reação foi monitorizada através de ccd, utilizando como eluente Et_2O .

IV.1.2.34. Tentativa de síntese do (2-((4-formilfenil)(metil)amino)etil)glicinato de metilo (21)



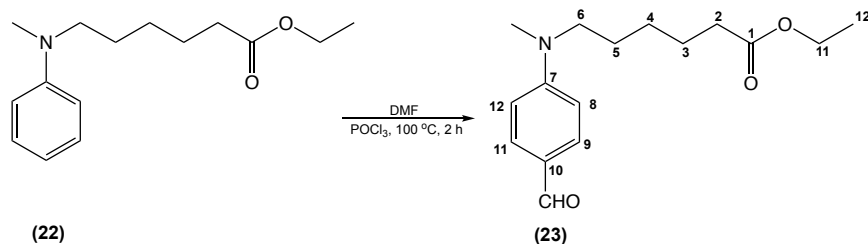
Num balão de fundo redondo, colocaram-se 190 mg de metanossulfonato de 2-((4-formilfenil)(metil)amino)etilo (7.38×10^{-4} mol, 1.0 eq), 278 mg cloreto de 2-metoxi-2-oxoetan-1-amínio (2.22×10^{-3} mol, 3.0 eq) e 340 μ L de NEt_3 (2.44×10^{-3} mol, 1.0 eq) em 10 mL de CH_3CN . A mistura reacional foi colocada sob agitação magnética a 60 °C, durante a noite. A reação foi monitorizada através de ccd, utilizando como eluente Et_2O .

IV.1.2.35. Síntese do 6-(metil(fenil)amino)hexanoato de etilo (22)



Num balão de fundo redondo, colocaram-se 1.0 g de *N*-metilanilina (1.86×10^{-2} mol, 1.0 eq), 3.3 mL de 6-bromo-hexanoato de etilo (1.86×10^{-2} mol, 1.0 eq), 2.58 g de carbonato de potássio (1.86×10^{-2} mol, 1.0 eq) em 20 mL de CH_3CN (seco). A mistura reacional foi colocada sob agitação magnética a uma temperatura de 85 °C durante 24 h. A reação foi monitorizada através de ccd, utilizando como eluente *n*-hexano/ CH_2Cl_2 (5:5). Seguidamente procedeu-se à extração líquido/líquido da mistura reacional através de um sistema $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$. Secou-se a fase orgânica com sulfato de sódio anidro e evaporou-se à secura no evaporador rotativo. O produto da reação, foi isolado por cromatografia *flash*, usando um gradiente de *n*-hexano, *n*-hexano/ CH_2Cl_2 (5:5) e CH_2Cl_2 , tendo-se obtido 3.95 g ($\eta = 85\%$).

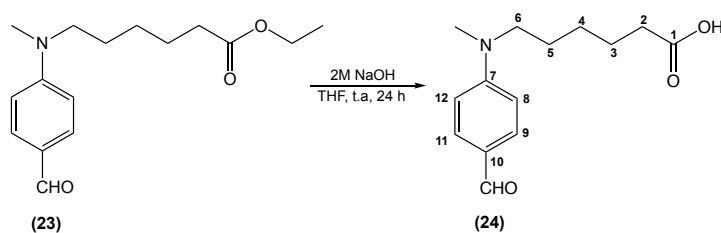
IV.1.2.36. Síntese do 6-((4-formilfenil)(metil)amino)hexanoato de etilo (23)



Num balão de fundo redondo, colocaram-se 2.1 ml de DMF (2.67×10^{-2} mol, 3.6 eq) e 700 μ L de POCl_3 (7.42×10^{-3} mol, 1.0 eq) em banho de gelo. A mistura reacional foi agitada durante 5 min, retirou-se o banho de gelo e de seguida adicionou-se 1.85 g de 6-(metil(fenil)amino)hexanoato de etilo (7.42×10^{-3} mol, 1.0 eq). A mistura reacional foi colocada sob agitação magnética a uma temperatura de 100 °C durante 2 h. Após o tempo referido deixou-se arrefecer à temperatura ambiente e adicionou-se uma solução aquosa de NaO_2CCH_3 (sat.), permanecendo em agitação à temperatura ambiente durante 2 h. A reação foi monitorizada através de ccd, utilizando como eluente CH_2Cl_2 . Seguidamente procedeu-se à extração líquido/líquido da mistura reacional através de um sistema $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$. Secou-se a fase orgânica com sulfato de sódio anidro e evaporou-se à secua no evaporador rotativo. O produto da reação, foi isolado por cromatografia *flash*, usando CH_2Cl_2 como eluente, tendo-se obtido 1.50 g ($\eta = 73\%$).

^1H RMN (400 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 1.23 (3H, t, H-12), 1.31-1.39 (2H, m, H-4), 1.58-1.69 (4H, m, H-3, H-5), 2.29 (2H, t, $J = 7.3$, H-2), 3.02 (3H, s, NCH_3), 3.39 (2H, t, $J = 7.2$, H-6), 4.10 (2H, q, $J = 7.2$, H-11), 6.65 (2H, d, $J = 8.8$, H-8, H-12), 7.69 (2H, d, $J = 8.8$, H-9, H-11), 9.70 (1H, s, CHO).

IV.1.2.37. Síntese do ácido 6-((4-formilfenil)(metil)amino)hexanóico (24)

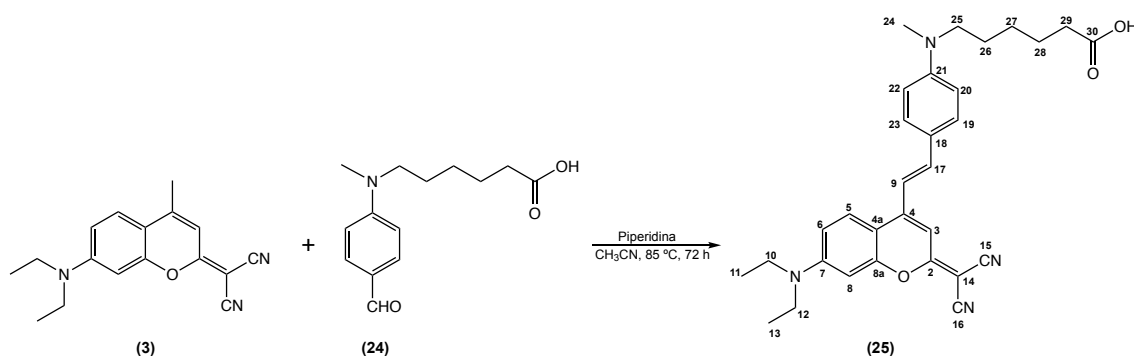


Num balão de fundo redondo, colocaram-se 1.3 g de 6-((4-formilfenil)(metil)amino)hexanoato de etilo (4.69×10^{-3} mol, 1.0 eq) solubilizou-se em 10 mL de THF e de seguida

adicionou-se 11.7 mL de solução de NaOH 2M (2.34×10^{-2} mol, 5.0 eq). A mistura reacional foi colocada sob agitação magnética a temperatura ambiente durante 24 h. Após esse tempo reacional neutralizou-se com HCl 6M. A reação foi monitorizada através de ccd, utilizando como eluente $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (9:1). O produto da reação foi isolado por cromatografia *flash*, usando como eluente $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (95:5) e $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (9:1), tendo-se obtido 1.15 mg ($\eta = 98\%$).

^1H RMN (400 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 1.39-1.45 (2H, m, H-4), 1.62-1.70 (4H, m, H-3, H-5), 2.38 (2H, t, $J = 7.3$, H-2), 3.04 (3H, s, NCH_3), 3.41 (2H, t, $J = 7.5$, H-6), 6.67 (2H, d, $J = 8.8$, H-8, H-12), 7.72 (2H, d, $J = 8.8$, H-9, H-11), 9.70 (1H, s, CHO). ^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 24.6 (C-3), 26.5 (C-4), 26.7 (C-5), 34.0 (NCH_3), 52.4 (C-6), 111.0 (C-8, C-12), 125.0 (C-10), 132.4 (C-9, C-11), 153.6 (C-7), 179.3 (COOH), 190.5 (CHO).

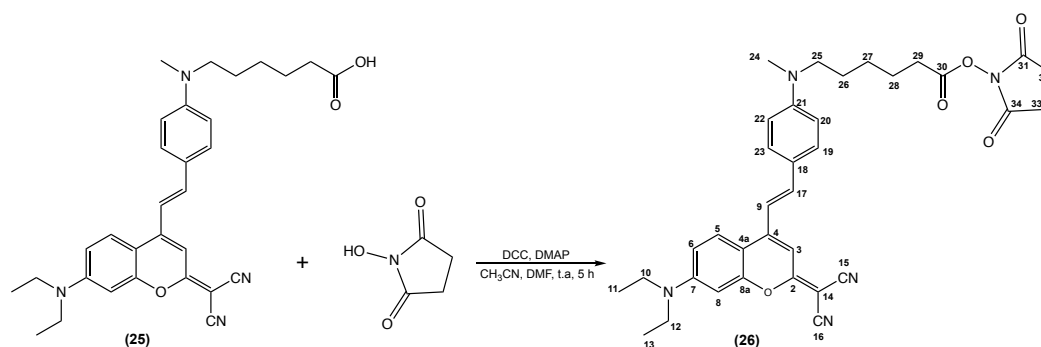
IV.1.2.38. Síntese do ácido (*E*)-6-((4-(2-(2-(dicianometileno)-7-dietilamino-2*H*-cromen-4-il)vinil)fenil)(metil)amino)hexanóico (25)



Num balão de fundo redondo, colocaram-se 175 mg de 2-(7-dietilamino-4-metil-2*H*-cromen-2-ilideno)malononitrilo (6.26×10^{-4} mol, 1.0 eq), 156 mg do ácido 6-((4-formilfenil)(metil)amino)hexanóico (6.26×10^{-4} mol, 1.0 eq) e 124 μL de piperidina (1.25×10^{-3} mol, 2.0 eq) em 10 mL de CH_3CN (seco). A mistura reacional foi colocada sob agitação magnética a uma temperatura de 85 °C durante 72 h. Após esse tempo reacional acidificou-se com HCl 6M. A reação foi continuamente monitorizada através de ccd, utilizando como eluente $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ (65:10:1). O produto da reação, foi isolado por cromatografia *flash*, usando como eluentes CHCl_3 , $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (99:1), tendo-se obtido 273 mg ($\eta = 86\%$).

^1H RMN (400 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 1.25 (6H, t, $J = 7.1$, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$), 1.36-1.46 (2H, m, H-26), 1.61-1.74 (4H, m, H-25, H-27), 2.39 (2H, t, $J = 7.3$, H-28), 3.02 (3H, s, H-30), 3.39 (2H, t, $J = 7.5$, H-24), 3.45 (4H, q, $J = 7.1$, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$), 6.55 (1H, d, $J = 2.6$, H-8), 6.67 (2H, d, $J_{20,19} = 8.9$, H-20, H-22), 6.70 (1H, dd, $J_{6,5} = 9.3$, $J_{6,8} = 2.6$, H-6), 6.80 (1H, s, H-3), 7.09 (1H, d, $J_{9,17} = 15.8$, H-9), 7.40 (1H, d, $J_{17,9} = 15.8$, H-17), 7.48 (2H, d, $J_{19,20} = 8.9$, H-19, H-23), 7.67 (1H, d, $J_{5,6} = 9.3$, H-5). ^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 12.7 (C-11, C-13), 24.6 (C-27), 26.6 (C-26), 26.8 (C-25), 33.9 (C-28), 38.6 (C-30), 45.0 (C-10, C-12), 52.4 (C-24), 97.7 (C-8), 100.9 (C-3), 108.9 (C-4a), 110.5 (C-6), 112.9 (C-14, C-20, C-22), 113.0 (C-9), 115.7 (CN), 116.7 (CN), 123.1 (C-18), 125.7 (C-5), 130.1 (C-19, C-23), 140.0 (C-17), 147.3 (C-4), 150.8 (C-21), 151.5 (C-7), 155.6 (C-8a), 171.3 (C-2), 178.7 (C-29). FTMS(+) - ESI calculado para $\text{C}_{31}\text{H}_{34}\text{O}_3\text{N}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 511.2704 encontrado 511.2696. UV λ_{max} (nm, CH_3CN): 500, 578. ϵ ($\text{cm}^{-1} \text{M}^{-1}$): 59000. $\Phi_F = 0.27$.

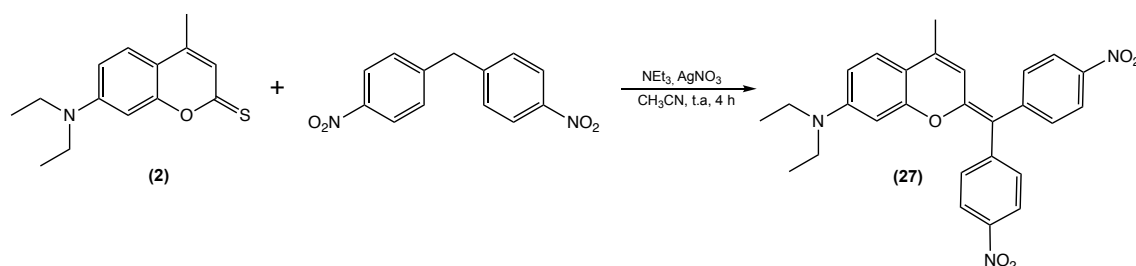
IV.1.2.39. Síntese do (*E*)-6-((4-(2-(2-(dicianometileno)-7-dietilamino-2*H*-cromen-4-il)vinil)fenil)(metil)amino)hexanoato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo (26)



Num balão de fundo redondo, colocaram-se 150 mg de ácido (*E*)-6-((4-(2-(2-(dicianometileno)-7-dietilamino-2*H*-cromen-4-il)vinil)fenil)(metil)amino)hexanóico (2.94×10^{-4} mol, 1.0 eq), 73 mg de DCC (3.52×10^{-4} mol, 1.2 eq) e 0.32 mg de DMAP (2.64×10^{-6} mol, 0.1 eq) em 2 mL de DMF (seco) e 8 mL de CH_3CN (seco), e após 5 min adicionou-se 41 mg de *N*-hidroxisuccinimida (3.52×10^{-4} mol, 1.2 eq). A mistura reacional foi colocada sob agitação magnética a temperatura ambiente durante 5 h. A reação foi monitorizada através de ccd, utilizando como eluente CH_2Cl_2 . O produto da reação foi isolado por cromatografia *flash*, usando como eluentes CH_2Cl_2 e $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ (95:5), tendo-se obtido 170 mg ($\eta = 95\%$).

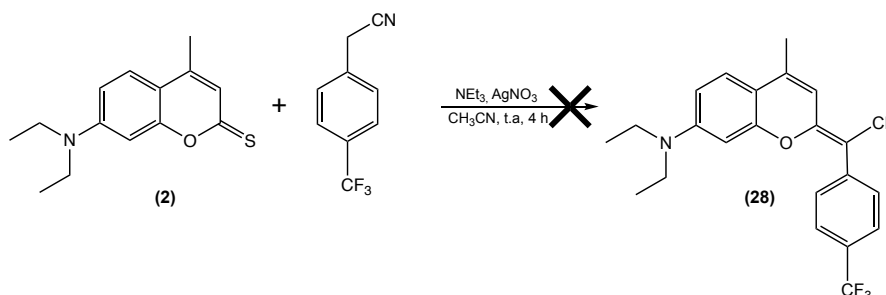
^1H RMN (400 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 1.25 (6H, t, $J = 7.1$, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$), 1.45-1.49 (2H, m, H-26), 1.63-1.68 (2H, m, H-25), 1.77-1.82 (2H, m, H-27), 2.63 (2H, t, $J = 7.3$, H-28), 2.84-2.85 (4H, m, H-32, H-33), 3.03 (3H, s, H-30), 4.21 (2H, t, $J = 7.5$, H-24), 3.45 (4H, q, $J = 7.1$, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$), 6.58 (1H, d, $J = 2.6$, H-8), 6.69 (2H, d, $J_{20,19} = 8.8$, H-20, H-22), 6.69 (1H, dd, $J_{6,5} = 9.3$, $J_{6,8} = 2.6$, H-6), 6.84 (1H, s, H-3), 7.11 (1H, d, $J_{9,17} = 15.8$, H-9), 7.43 (1H, d, $J_{17,9} = 15.8$, H-17), 7.50 (2H, d, $J_{19,20} = 8.8$, H-19, H-23), 7.68 (1H, d, $J_{5,6} = 9.3$, H-5). ^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 12.7 (C-11, C-13), 24.6 (C-27), 25.7 (C-32, C-33), 26.3 (C-26), 26.6 (C-25), 31.0 (C-28), 38.3 (C-30), 45.0 (C-10, C-12), 52.5 (C-24), 97.7 (C-8), 101.1 (C-3), 109.0 (C-4a), 110.4 (C-6), 112.9 (C-14, C-20, C-22), 113.3 (C-9), 115.6 (CN), 116.6 (CN), 123.1 (C-18), 125.7 (C-5), 130.0 (C-19, C-23), 140.0 (C-17), 147.3 (C-4), 150.8 (C-21), 151.5 (C-7), 155.6 (C-8a), 168.6 (C-2), 169.3 (C-31, C-34), 171.4 (C-29). FTMS(+) - ESI calculado para $\text{C}_{35}\text{H}_{38}\text{O}_5\text{N}_5$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 608.2868 encontrado 608.2863. UV λ_{max} (nm, CH_3CN): 498, 576. ε ($\text{cm}^{-1} \text{M}^{-1}$): 59000. $\Phi_{\text{F}} = 0.27$.

IV.1.2.40. Síntese do 2-(bis(4-nitrofenil)metileno)-*N,N*-dietil-4-metil-2*H*-cromen-7-amino (27)



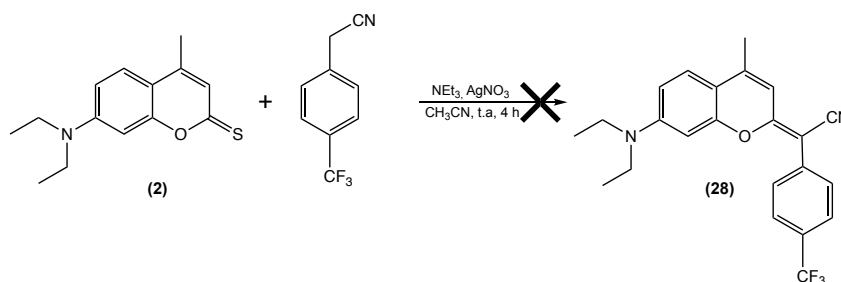
Num balão de fundo redondo, colocaram-se 150 mg de 7-dietilamino-4-metil-2*H*-cromen-2-tiona (6.06×10^{-4} mol, 1.0 eq), 235 mg de bis(4-nitrofenil)metano (9.1×10^{-4} mol, 1.5 eq) e 296 μL de NEt_3 (2.12×10^{-3} mol, 3.5 eq) em 10 mL de CH_3CN (seco), e após 2 h adicionou-se 257 mg de AgNO_3 (1.52×10^{-3} mol, 2.5 eq). A mistura reacional foi colocada sob agitação magnética a temperatura ambiente durante 2 h. A reação foi monitorizada através de ccd, utilizando como eluente CHCl_3 . O produto da reação, foi isolado por cromatografia *flash*, usando como eluente *n*-hexano/ CHCl_3 (2:8), tendo-se obtido 150 mg ($\eta = 53\%$).

IV.1.2.41. Tentativa de síntese do (*E*)-2-(7-dietilamino-4-metil-2*H*-cromen-2-ili-deno)-2-(4-(trifluorometil)fenil)acetonitrilo (28)



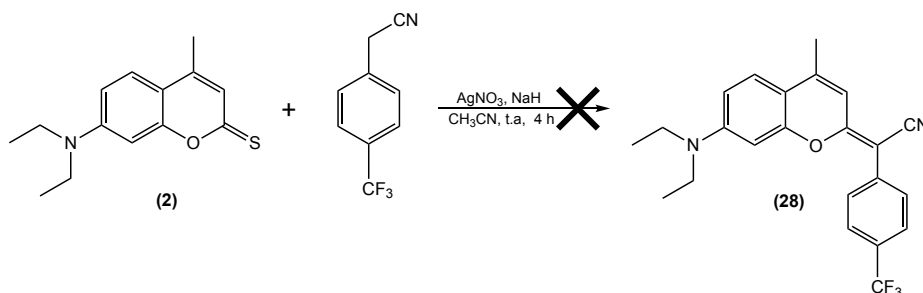
Num balão de fundo redondo, colocaram-se 50 mg de 7-dietilamino-4-metil-2*H*-cromeno-2-tiona (2.02×10^{-4} mol, 1.0 eq), 566 mg de 2-(4-(trifluorometil)fenil)acetonitrilo (3.03×10^{-4} mol, 1.5 eq) e 98 μ L de NEt₃ (7.07×10^{-4} mol, 3.5 eq) em 5 mL de CH₃CN (seco). Após a mistura reacional ter sido colocada sob agitação magnética a temperatura ambiente durante 2 h, adicionou-se 86 mg de AgNO₃ (5.05×10^{-4} mol, 2.5 eq), a mistura reacional foi agitada a temperatura ambiente por mais 2 h. A reação foi continuamente monitorizada através de ccd, utilizando como eluente CH₂Cl₂.

IV.1.2.42. Tentativa de síntese do (*E*)-2-(7-dietilamino-4-metil-2*H*-cromen-2-ili-deno)-2-(4-(trifluorometil)fenil)acetonitrilo (28)



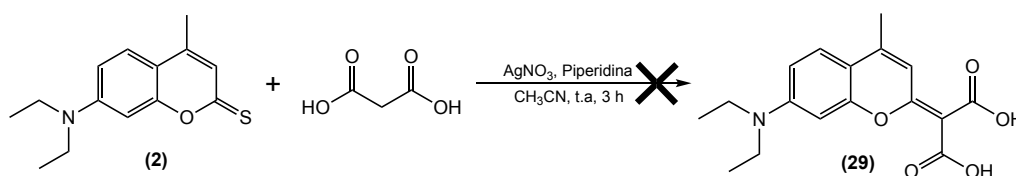
Num balão de fundo redondo, colocaram-se 50 mg de 7-dietilamino-4-metil-2*H*-cromeno-2-tiona (2.02×10^{-4} mol, 1.0 eq), 566 mg de 2-(4-(trifluorometil)fenil)acetonitrilo (3.03×10^{-4} mol, 1.5 eq) e 98 μ L de NEt₃ (7.07×10^{-4} mol, 3.5 eq) em 5 mL de CH₃CN (seco), e após 10 min adicionou-se 86 mg de AgNO₃ (5.05×10^{-4} mol, 2.5 eq), a mistura reacional foi agitada a temperatura ambiente durante 4 h. A reação foi continuamente monitorizada através de ccd, utilizando como eluente CH₂Cl₂.

IV.1.2.43. Tentativa de síntese do (*E*)-2-(7-dietilamino-4-metil-2*H*-cromen-2-ili-deno)-2-(4-(trifluorometil)fenil)acetonitrilo (28)



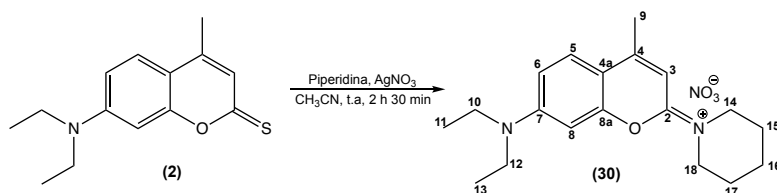
Num balão de fundo redondo, colocaram-se 378 mg de 7-dietilamino-4-metil-2*H*-cromeno-2-tiona (1.53×10^{-3} mol, 1.0 eq), 566 mg de 2-(4-(trifluorometil)fenil)acetoneitrilo (3.06×10^{-3} mol, 2.0 eq) e 905 mg de NaH (2.26×10^{-2} mol, 14.0 eq) em 10 mL de CH_3CN (seco). Após a mistura reacional ter sido colocada sob agitação magnética a temperatura ambiente durante 2 h, adicionou-se 519 mg de AgNO_3 (3.06×10^{-3} mol, 2.0 eq), a mistura reacional foi agitada a temperatura ambiente por mais 2 h. A reação foi continuamente monitorizada através de ccd, utilizando como eluente CH_2Cl_2 .

IV.1.2.44. Tentativa de síntese do ácido 2-(7-dietilamino-4-metil-2*H*-cromen-2-ili-deno)malônico (29)



Num balão de fundo redondo, colocaram-se 50 mg de 7-dietilamino-4-metil-2*H*-cromeno-2-tiona (2.02×10^{-4} mol, 1.0 eq), 32 mg de ácido malônico (0.31×10^{-3} mol, 1.5 eq) em 10 mL de CH_3CN (seco) e 70 μL de piperidina (7.07×10^{-4} mol, 3.5 eq), e após 10 min adicionou-se 86 mg de AgNO_3 (5.05×10^{-4} mol, 2.5 eq), onde permaneceu sob agitação magnética durante 3 h. A reação foi continuamente monitorizada através de ccd, utilizando como eluente $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ (65:10:1), verificando-se apenas a formação de um produto de cor verde. O espectro de ^{13}C RMN da mistura reacional não confirma a formação do composto pretendido.

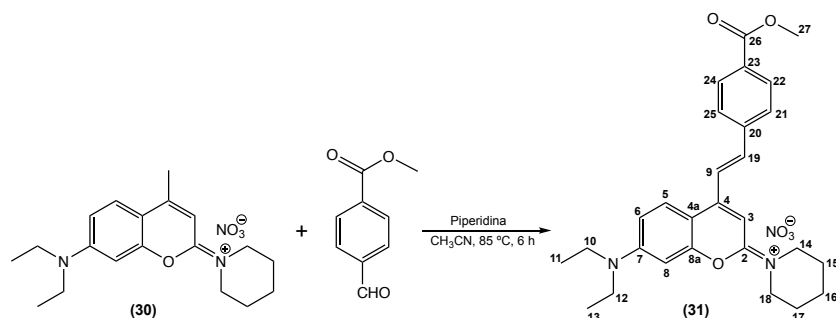
IV.1.2.45. Síntese do nitrato de 1-(7-dietilamino-4-metil-2H-cromen-2-ilideno)pi-peridín-1-íio (30)



Num balão de fundo redondo colocaram-se 200 mg de 7-dietilamino-4-metil-2H-cromeno-2-tiona (8.09×10^{-4} mol, 1.0 eq) em 10 mL de CH_3CN (seco), adicionou-se 120 μL de piperidina (1.21×10^{-3} mol, 1.5 eq) e 343 mg de AgNO_3 (2.02×10^{-3} mol, 2.5 eq). A mistura reacional foi colocada sob agitação magnética à temperatura ambiente durante 2 h e 30 min. A reação foi monitorizada através de ccd, utilizando como eluente $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ (8:2), onde se detetou a presença do mesmo produto de cor verde (reação IV.1.2.44). O produto da reação foi isolado por cromatografia *flash*, usando como eluente $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ (8:2), tendo-se obtido 248 mg ($\eta = 85\%$).

^1H RMN (400 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 1.24 (6H, t, $J = 7.1$, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$), 1.80-1.82 (6H, m, H-15, H-16, H-17), 2.58 (3H, s, 4- CH_3), 3.47 (4H, q, $J = 7.1$, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$), 3.94-4.01 (4H, m, H-14, H-18), 6.95 (1H, s, H-3), 6.61 (1H, d, $J_{8,6} = 2.4$, H-8), 6.78 (1H, dd, $J_{6,5} = 9.2$, $J_{6,8} = 2.4$, H-6), 7.56 (1H, d, $J_{5,6} = 9.2$, H-5). ^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 12.5 (C-11, C-13), 19.4 (C-9), 23.6 (C-16), 26.0 (C-15, C-17), 45.2 (C-10, C-12), 46.8 (C-14/C-18), 48.8 (C-14/C-18), 96.5 (C-8), 100.7 (C-3), 109.2 (C-4a), 111.8 (C-6), 127.0 (C-5), 158.4 (C-4), 152.6 (C-7), 154.2 (C-8a), 160.0 (C-2). FTMS(+) - ESI calculado para $\text{C}_{19}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O} [\text{M}-(\text{NO}_3^-)]^+$ 299.2117 encontrado 299.2111. UV λ_{max} (nm, CH_3CN): 261, 298, 437. ϵ ($\text{cm}^{-1} \text{M}^{-1}$): 21000. $\Phi_F = 0.14$.

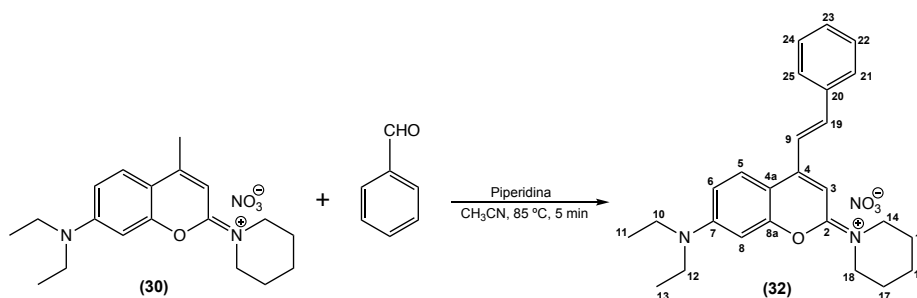
IV.1.2.46. Síntese do nitrato de (*E*)-1-(7-dietilamino-4-(4-(metoxicarboxil)estiril)-2*H*-cromen-2-ilideno)piperidín-1-io (31)



Num balão de fundo redondo, colocaram-se 154 mg de nitrato de 1-(7-dietilamino-4-metil-2*H*-cromen-2-ilideno)piperidín-1-io (4.26×10^{-4} mol, 1.0 eq), 26 mg de 4-formilbenzoato de metilo (4.26×10^{-4} mol, 1.0 eq) em 25 mL de CH₃CN (seco) e 42 µL de piperidina (4.26×10^{-4} mol, 1.0 eq). A mistura reacional foi colocada sob agitação magnética a uma temperatura de 85 °C durante 6 h. A reação foi continuamente monitorizada através de ccd, utilizando como eluente CHCl₃/CH₃OH (9:1). O produto da reação, foi isolado por cromatografia *flash*, usando como eluentes CHCl₃ e CHCl₃/CH₃OH (8:2), tendo-se obtido 130 mg (η = 60%).

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃, δ , ppm): 1.26 (6H, t, J = 7.2, N(CH₂CH₃)₂), 1.80-1.89 (6H, m, H-15, H-16, H-17), 3.49 (4H, q, J = 7.2, N(CH₂CH₃)₂), 3.90 (3H, s, CH₃), 3.96-4.21 (4H, m, H-14, H-18), 6.53 (1H, d, $J_{8,6}$ = 2.4, H-8), 6.84 (1H, dd, $J_{6,5}$ = 9.2, $J_{6,8}$ = 2.4, H-6), 7.49 (1H, d, $J_{19,9}$ = 16, H-19), 7.52 (1H, s, H-3), 7.83 (2H, d, $J_{21,22}$ = 8.4, H-21, H-25), 7.89 (1H, d, $J_{5,6}$ = 9.2, H-5), 7.95 (2H, d, $J_{22,21}$ = 8.4, H-22, H-24), 8.37 (1H, d, $J_{9,19}$ = 16, H-9).
¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃, δ , ppm): 12.6 (C-11, C-13), 23.8 (C-16), 26.2 (C-15, C-17), 45.2 (C-10, C-12), 46.8 (C-14/C-18), 49.2 (C-14/C-18), 52.3 (OCH₃), 95.2 (C-3), 96.8 (C-8), 108.0 (C-4a), 112.0 (C-6), 120.8 (C-19), 127.0 (C-5), 128.6 (C-21, C-25), 129.9 (C-22, C-24), 130.8 (C-23), 140.1 (C-4), 141.6 (C-9), 152.5 (C-7, C-20), 154.6 (C-8a), 160.0 (C-2), 166.7 (C-26). FTMS(+) - ESI calculado para C₂₈H₃₃O₃N₂[M-(NO₃⁻)]⁺ 445.2486 encontrado 445.2479. UV λ_{max} (nm, CH₃CN): 362, 484. ϵ (cm⁻¹ M⁻¹): 18000. Φ_F = 0.08.

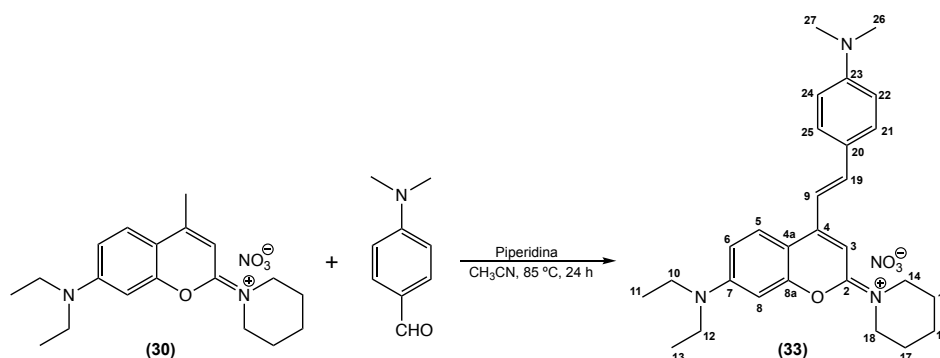
IV.1.2.47. Síntese do nitrato de (*E*)-1-(7-dietilamino-4-estiril-2*H*-cromen-2-ilideno)piperidín-1-io (32)



Num balão de fundo redondo, colocaram-se 276 mg de nitrato de 1-(7-dietilamino-4-metil-2*H*-cromen-2-ilideno)piperidín-1-io (7.64×10^{-4} mol, 1.0 eq), 93 μ L de benzaldeído (7.64×10^{-4} mol, 1.0 eq) em 10 mL de CH₃CN (seco) e 76 μ L de piperidina (7.64×10^{-4} mol, 1.0 eq). A mistura reacional foi colocada sob agitação magnética a uma temperatura de 85 °C durante 5 min. A reação foi continuamente monitorizada através de ccd, utilizando como eluente *n*-hexano/CH₂Cl₂ (2:8). O produto da reação, foi isolado por cromatografia *flash*, usando como eluente *n*-hexano/CH₂Cl₂ (2:8), tendo-se obtido 309 mg (η = 90%).

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃, δ , ppm): 1.24 (6H, t, J = 7.2, N(CH₂CH₃)₂), 1.73-1.79 (6H, m, H-15, H-16, H-17), 3.46 (4H, q, J = 7.1, N(CH₂CH₃)₂), 3.91-3.97 (4H, m, H-14, H-18), 6.57 (1H, d, $J_{8,6}$ = 2.4, H-8), 6.81 (1H, dd, $J_{6,5}$ = 9.2, $J_{6,8}$ = 2.4, H-6), 7.18 (1H, s, H-3), 7.30-7.33 (3H, m, H-22, H-23, H-24), 7.35 (1H, d, $J_{9,19}$ = 16, H-9), 7.68 (2H, dd, $J_{21,22}$ = 8.0, $J_{21,23}$ = 2.0, H-21, H-25), 7.81 (1H, d, $J_{5,6}$ = 9.2, H-5), 8.01 (1H, d, $J_{19,9}$ = 16, H-19). ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃, δ , ppm): 12.6 (C-11, C-13), 23.7 (C-16), 26.1 (C-15, C-17), 45.2 (C-10, C-12), 46.8 (C-14/C-18), 48.7 (C-14/C-18), 93.9 (C-3), 97.0 (C-8), 107.8 (C-4a), 111.9 (C-6), 118.5 (C-9), 126.7 (C-5), 128.6 (C-21, C-25), 128.9 (C-22, C-24), 130.2 (C-23), 135.6 (C-20), 142.5 (C-19), 152.5 (C-7), 152.9 (C-4), 154.6 (C-8a), 159.9 (C-2). FTMS(+) - ESI calculado para C₂₆H₃₁N₂O[M-(NO₃⁻)]⁺ 387.2431 encontrado 387.2424. UV λ_{\max} (nm, CH₃CN): 282, 301, 467. ϵ (cm⁻¹ M⁻¹): 17000. Φ_F = 0.34.

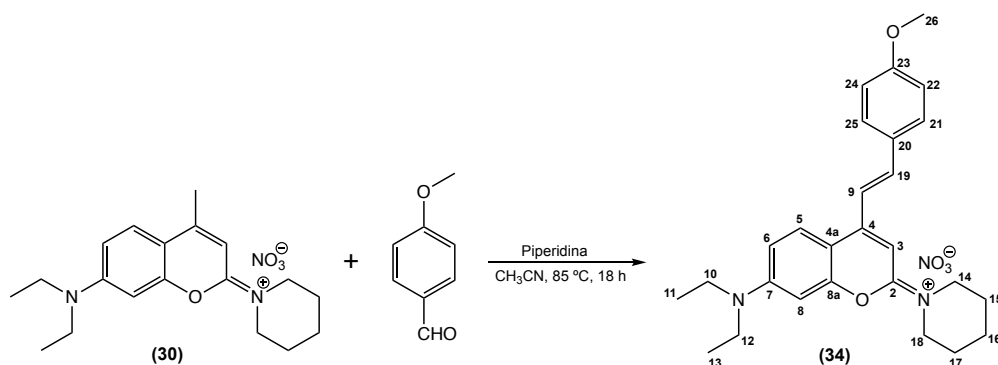
IV.1.2.48. Síntese de nitrato de (*E*)-1-(7-dietilamino-4-(4-(dimetilamino)estiril)-2*H*-cromen-2-ilideno)piperidín-1-io (33)



Num balão de fundo redondo, colocaram-se 162 mg de nitrato de 1-(7-dietilamino-4-metil-2*H*-cromen-2-ilideno)piperidín-1-io (4.48×10^{-4} mol, 1.0 eq), 67 mL de 4-dimetilaminobenzaldeído (4.48×10^{-4} mol, 1.0 eq) em 10 mL de CH₃CN (seco) e 44 μ L de piperidina (4.48×10^{-4} mol, 1.0 eq). A mistura reacional foi colocada sob agitação magnética a uma temperatura de 85 °C durante 24 h. A reação foi continuamente monitorizada através de ccd, utilizando como eluente CHCl₃/CH₃OH/H₂O (65:20:2). O produto da reação, foi isolado por cromatografia *flash*, usando como eluentes CHCl₃/CH₃OH/H₂O (65:10:1) e CHCl₃/CH₃OH/H₂O (65:20:2), tendo-se obtido 205 mg (η = 92%).

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃, δ , ppm): 1.26 (6H, t, J = 7.2, N(CH₂CH₃)₂), 1.80-1.82 (6H, m, H-15, H-16, H-17), 3.04 (6H, s, (NCH₃)₂), 3.49 (4H, q, J = 7.2, N(CH₂CH₃)₂), 4.00 (4H, m, H-14, H-18), 6.59 (1H, d, $J_{8,6}$ = 2.4, H-8), 6.68 (2H, d, J = 8.8, H-22, H-24), 6.80 (1H, dd, $J_{6,5}$ = 8.8, $J_{6,8}$ = 2.4, H-6), 7.10 (1H, s, H-3), 7.18 (1H, d, $J_{9,17}$ = 15.8, H-9), 7.69 (1H, d, J = 8.8, H-21, H-25), 7.85 (1H, d, $J_{5,6}$ = 8.8, H-5), 8.11 (1H, d, $J_{19,9}$ = 15.8, H-19). ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃, δ , ppm): 12.7 (C-11, C-13), 23.9 (C-16), 26.2 (C-15, C-17), 40.3 (C-26, C-27), 45.2 (C-10, C-12), 47.5 (C-14/C-18), 48.4 (C-14/C-18), 91.5 (C-3), 97.0 (C-8), 108.2 (C-4a), 111.5 (C-6), 112.1 (C-22, C-24), 112.2 (C-9), 123.6 (C-20), 126.6 (C-5), 131.0 (C-21, C-25), 144.3 (C-19), 152.2 (C-7, C-23), 153.5 (C-4), 154.7 (C-8a), 159.8 (C-2). FTMS(+) - ESI calculado para C₂₈H₃₆N₃O[M-(NO₃⁻)]⁺ 430.2853 encontrado 430.2845. UV λ_{\max} (nm, CH₃CN): 282, 485. ϵ (cm⁻¹ M⁻¹): 39000. Φ_F = 0.98.

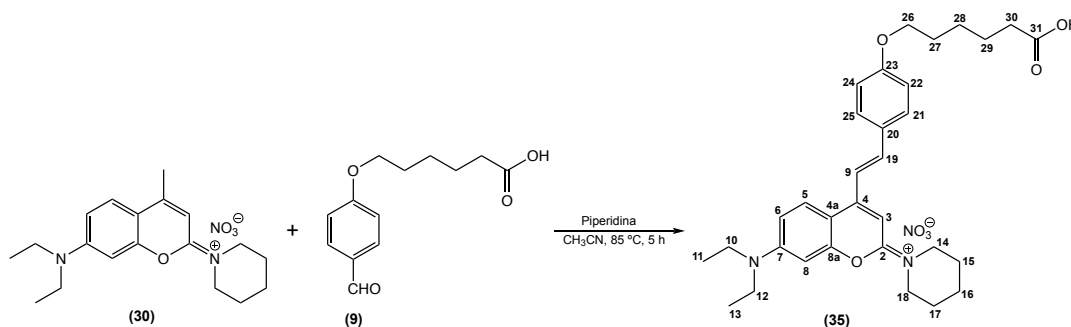
IV.1.2.49. Síntese do nitrato de (*E*)-1-(7-dietilamino-4-(4-(metoxiestiril)-2*H*-cromen-2-ilideno)piperidín-1-io (34)



Num balão de fundo redondo, colocaram-se 150 mg de nitrato de 1-(7-dietilamino-4-metil-2*H*-cromen-2-ilideno)piperidín-1-io (4.15×10^{-4} mol, 1.0 eq), 50 μ L de 4-metoxibenzaldeído (4.15×10^{-4} mol, 1.0 eq) em 10 mL de CH₃CN (seco) e 41 μ L de piperidina (4.15×10^{-4} mol, 1.0 eq). A mistura reacional foi colocada sob agitação magnética a uma temperatura de 85 °C durante 18 h. A reação foi continuamente monitorizada através de ccd, utilizando como eluente CHCl₃/CH₃OH/H₂O (65:20:2). O produto da reação, foi isolado por cromatografia *flash*, usando como eluente CHCl₃/CH₃OH/H₂O (65:20:2), tendo-se obtido 171 mg (η = 86%).

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃, δ , ppm): 1.24 (6H, t, J = 7.1, N(CH₂CH₃)₂), 1.75-1.80 (6H, m, H-15, H-16, H-17), 3.47 (4H, q, J = 7.1, N(CH₂CH₃)₂), 3.79 (3H, s, H-26), 3.97 (4H, m, H-14, H-18), 6.57 (1H, d, $J_{8,6}$ = 2.2, H-8), 6.79 (1H, dd, $J_{6,5}$ = 9.2, $J_{6,8}$ = 2.2, H-6), 6.85 (2H, d, $J_{22,21}$ = 8.6, H-22, H-24), 7.18 (1H, s, H-3), 7.24 (1H, d, $J_{9,19}$ = 15.9, H-9), 7.70 (1H, d, $J_{21,22}$ = 8.6, H-21, H-25), 7.84 (1H, d, $J_{5,6}$ = 9.2, H-5), 8.06 (1H, d, $J_{19,9}$ = 15.8, H-19). ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃, δ , ppm): 12.6 (C-11, C-13), 23.9 (C-16), 26.1 (C-15, C-17), 44.6 (C-14/C-18), 45.2 (C-10, C-12), 46.5 (C-14/C-18), 55.5 (C-26), 93.0 (C-3), 97.0 (C-8), 108.0 (C-4a), 111.7 (C-6), 114.4 (C-22, C-24), 115.8 (C-9), 126.7 (C-5), 128.5 (C-20), 131.6 (C-21, C-25), 142.7 (C-19), 152.4 (C-7), 153.2 (C-4), 154.7 (C-8a), 159.9 (C-2), 161.6 (C-23). FTMS(+) - ESI calculado para C₂₇H₃₃O₂N₂[M-(NO₃⁻)]⁺ 417.2537 encontrado 417.2527. UV λ_{\max} (nm, CH₃CN): 410. ϵ (cm⁻¹ M⁻¹): 30000. Φ_F = 0.82.

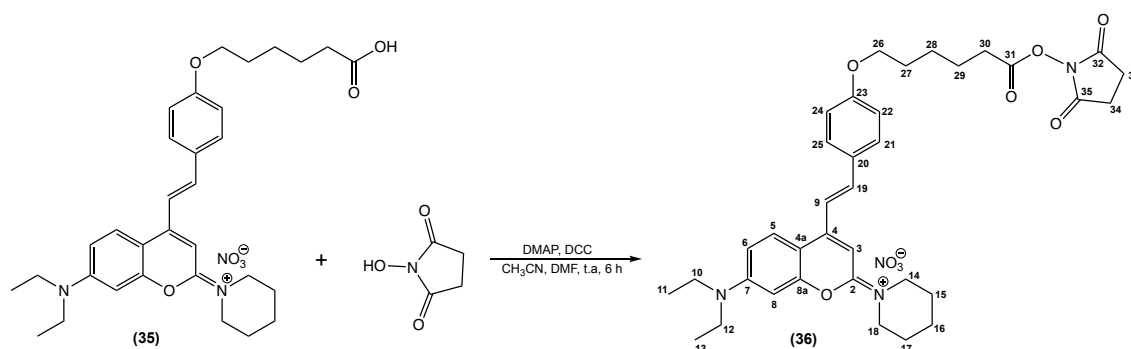
IV.1.2.50. Síntese do nitrato de (*E*)-1-(4-(4-((5-carboxipentil)oxi)estiril)-7-ditilamino-2*H*-cromen-2-ilideno)piperidín-1-io (35)



Num balão de fundo redondo, colocaram-se 232 mg de nitrato de 1-(7-dietilamino-4-metil-2*H*-cromen-2-ilideno)piperidín-1-io (6.42×10^{-4} mol, 1.0 eq), 152 mg de ácido 6-(4-formilfenoxi)hexanóico (6.42×10^{-4} mol, 1.0 eq) em 10 mL de CH₃CN (seco) e 63 μ L de piperidina (6.42×10^{-4} mol, 1.0 eq). A mistura reacional foi colocada sob agitação magnética a uma temperatura de 85 °C durante 5 h. A reação foi monitorizada através de ccd, utilizando como eluente CHCl₃/CH₃OH (9:1). O produto da reação, foi isolado por cromatografia *flash*, usando como eluentes CHCl₃/CH₃OH (95:5), CHCl₃/CH₃OH (9:1) e CHCl₃/CH₃OH (8:2), tendo-se obtido 326 mg (η = 88%).

¹H RMN (400 MHz, CD₃OD, δ , ppm): 1.26 (6H, t, J = 7., N(CH₂CH₃)₂), 1.53 (2H, m, H-28), 1.69 (2H, m, H-29), 1.78-1.83 (2H, m, H-27), 1.83 (6H, m, H-15, H-16, H-17), 2.32 (2H, t, H-30), 3.56 (4H, q, J = 7.1, N(CH₂CH₃)₂), 3.97 (4H, m, H-14, H-18), 4.02 (2H, t, H-26), 6.84 (1H, d, $J_{8,6}$ = 2.2, H-8), 6.95-6.98 (1H, dd, $J_{6,5}$ = 9.2, $J_{6,8}$ = 2.2, H-6), 6.98 (1H, s, H-3), 6.96 (2H, d, J = 8.4, H-22, H-24), 7.49 (1H, d, $J_{9,19}$ = 15.9, H-9), 7.70 (2H, d, J = 8.4, H-21, H-25), 7.83 (1H, d, $J_{19,9}$ = 15.9, H-19), 8.03 (1H, d, $J_{5,6}$ = 9.2, H-5).
¹³C RMN (100 MHz, CD₃OD, δ , ppm): 12.8 (C-11, C-13), 24.8 (C-16), 26.1 (C-29), 26.8 (C-28), 27.0 (C-15, C-17), 30.0 (C-27), 35.6 (C-30), 45.7 (C-14/C-18), 46.0 (C-10, C-12), 47.6 (C-14/C-18), 69.1 (C-26), 93.0 (C-3), 98.0 (C-8), 109.0 (C-4a), 113.0 (C-6), 116.1 (C-22, C-24), 117.5 (C-9), 127.9 (C-5), 129.6 (C-20), 131.3 (C-21, C-25), 142.5 (C-19), 154.1 (C-7), 154.7 (C-4), 156.3 (C-8a), 161.5.9 (C-2), 162.7 (C-23), 178.3 (C-31).
 FTMS(+) - ESI calculado para C₃₂H₄₁O₄N₂[M-(NO₃⁻)]⁺ 517.3061 encontrado 517.3055.
 UV λ_{\max} (nm, CH₃CN): 406, 478. ϵ (cm⁻¹ M⁻¹): 30000. Φ_F = 0.90.

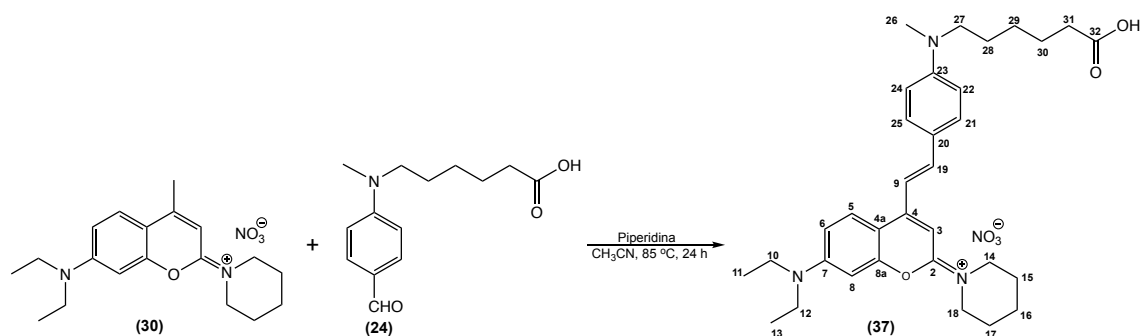
IV.1.2.51. Síntese do nitrato de (*E*)-1-(7-dietilamino-4-(4-((6-((2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi)-6-oxo-hexil)oxi)estiril)-2*H*-cromen-2-ilideno)piperidín-1-io (36)



Num balão de fundo redondo, colocaram-se 160 mg de nitrato de (*E*)-1-(4-(4-((5-carboxipentil)oxi)estiril)-7-(dietilamino)-2*H*-cromen-2-ilideno)piperidín-1-io (3.09×10^{-4} mol, 1.0 eq), 77 mg de DCC (3.71×10^{-4} mol, 1.2 eq) e 4 mg de DMAP (3.09×10^{-5} mol, 0.1 eq) em 2 mL de DMF (seco) e 8 mL de CH₃CN (seco), e após 5 min adicionou-se 43 mg de *N*-hidroxisuccinimida (3.71×10^{-4} mol, 1.2 eq). A mistura reacional foi colocada sob agitação magnética a temperatura ambiente durante 6 h. A reação foi monitorizada através de ccd, utilizando como eluente CHCl₃/CH₃OH/H₂O (65:20:2). O produto da reação foi isolado por cromatografia *flash*, usando como eluentes CHCl₃/CH₃OH (95:5), CHCl₃/CH₃OH (9:1) e CHCl₃/CH₃OH (8:2), tendo-se obtido 200 mg ($\eta = 98\%$).

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃, δ , ppm): 1.22 (6H, t, $J = 7.1$, N(CH₂CH₃)₂), 1.57 (2H, m, H-28), 1.72-1.82 (2H, m, H-15, H-16, H-17, H-27, H-29), 2.61 (2H, t, H-30), 2.82 (4H, s, H-33, H-34), 3.45 (4H, q, $J = 7.1$, N(CH₂CH₃)₂), 3.92 (4H, m, H-14, H-18), 3.93 (2H, t, H-26), 6.55 (1H, d, $J_{8,6} = 2.3$, H-8), 6.79 (1H, dd, $J_{6,5} = 9.2$, $J_{6,8} = 2.3$, H-6), 6.82 (2H, d, $J = 8.8$, H-22, H-24), 7.07 (1H, s, H-3), 7.22 (1H, d, $J_{9,19} = 15.9$, H-9), 7.64 (2H, d, $J = 8.8$, H-21, H-25), 8.82 (1H, d, $J_{5,6} = 9.2$, H-5), 7.94 (1H, d, $J_{19,9} = 15.9$, H-19). ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃, δ , ppm): 12.6 (C-11, C-13), 23.7 (C-16), 24.4 (C-29), 25.3 (C-28), 25.7 (C-33, C-34), 26.0 (C-15, C-17), 28.7 (C-27), 31.0 (C-30), 45.1 (C-10, C-12), 46.7 (C-14/C-18), 48.4 (C-14/C-18), 67.7 (C-26), 92.7 (C-3), 96.9 (C-8), 107.9 (C-4a), 111.8 (C-6), 115.0 (C-22, C-24), 115.7 (C-9), 126.7 (C-5), 128.3 (C-20), 130.5 (C-21, C-25), 142.5 (C-19), 152.4 (C-7), 153.1 (C-4), 154.6 (C-8a), 159.8 (C-2), 161.0 (C-23), 168.6 (C-31), 169.4 (C-32, C-35). FTMS(+) - ESI calculado para C₃₆H₄₄O₆N₃[M-(NO₃)]⁺ 614.3225 encontrado 614.3215. UV λ_{\max} (nm, CH₃CN): 404, 480. ϵ (cm⁻¹ M⁻¹): 30000. $\Phi_F = 0.92$.

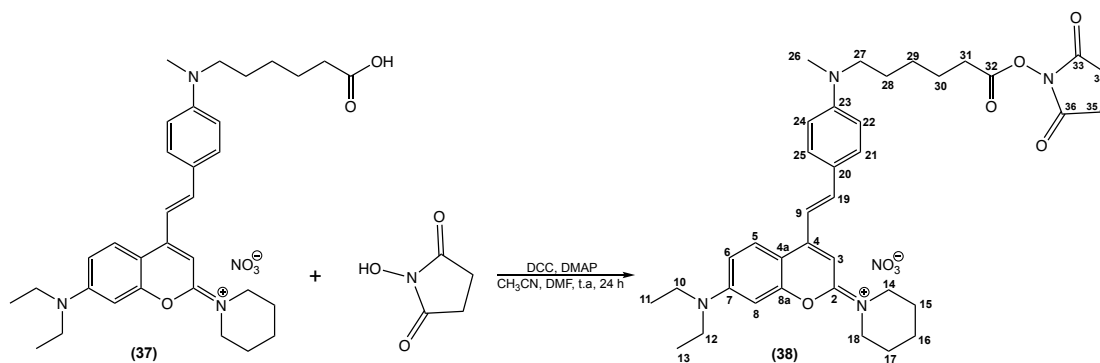
IV.1.2.52. Síntese do nitrato de (*E*)-1-(4-(4-((5-carboxipentil)(metil)amino)estiril)-7-dietilamino-2*H*-cromen-2-ilideno)piperidín-1-io (37)



Num balão de fundo redondo, colocaram-se 85 mg de nitrato de 1-(7-dietilamino-4-metil-2*H*-cromen-2-ilideno)piperidín-1-io (2.35×10^{-4} mol, 1.0 eq), 58 mg de ácido 6-((4-formilfenil)(metil)amino)hexanóico (2.35×10^{-4} mol, 1.0 eq) e 23 μ L de piperidina (2.35×10^{-4} mol, 1.0 eq) em 10 mL de CH₃CN (seco). A mistura reacional foi colocada sob agitação magnética a uma temperatura de 85 °C durante 24 h. Após esse tempo reacional acidificou-se com HCl 6M. A reação foi monitorizada através de ccd, utilizando como eluente CHCl₃/CH₃OH/H₂O (65:10:1). O produto da reação, foi isolado por cromatografia *flash*, usando como eluentes CHCl₃/CH₃OH (9:1), CHCl₃/CH₃OH (8:2), CHCl₃/CH₃OH/H₂O (65:10:1), CHCl₃/CH₃OH/H₂O (65:20:2) e CHCl₃/CH₃OH/H₂O (65:35:5), tendo-se obtido 122 mg (η = 88%).

¹H RMN (400 MHz, CD₃OD, δ , ppm): 1.26 (6H, t, J = 7.2, N(CH₂CH₃)₂), 1.36-1.43 (2H, m, H-28), 1.62-1.70 (4H, m, H-27, H-29), 1.83 (6H, m, H-15, H-16, H-17), 2.25 (2H, t, $J_{30,29}$ = 7.4, H-30), 3.05 (1H, s, H-32), 3.46 (2H, t, $J_{26,27}$ = 7.4, H-26), 3.57 (4H, q, J = 7.2, N(CH₂CH₃)₂), 3.95 (4H, m, H-14, H-18), 6.76 (2H, d, $J_{22,21}$ = 9.0, H-22, H-24), 6.84 (1H, d, $J_{8,6}$ = 2.6, H-8), 6.95 (1H, s, H-3), 6.99 (1H, dd, $J_{6,5}$ = 9.4, $J_{6,8}$ = 2.6, H-6), 7.42 (1H, d, $J_{9,19}$ = 15.7, H-9), 7.66 (2H, d, $J_{21,22}$ = 9.0, H-21, H-25), 7.87 (1H, d, $J_{19,9}$ = 15.7, H-19), 8.07 (1H, d, $J_{5,6}$ = 9.4, H-5). ¹³C RMN (100 MHz, CD₃OD, δ , ppm): 12.7 (C-11, C-13), 24.8 (C-16), 26.7 (C-29), 27.0 (C-15, C-17), 27.7 (C-27), 27.8 (C-28), 36.8 (C-30), 38.7 (C-32), 46.0 (C-10, C-12), 48.1 (C-14/C-18), 53.1 (C-26), 91.1 (C-3), 98.0 (C-8), 109.1 (C-32), 112.8 (C-6), 113.0 (C-22, C-24), 113.4 (C-9), 124.4 (C-20), 127.8 (C-5), 131.8 (C-21, C-25), 144.2 (C-19), 152.8 (C-23), 154.0 (C-7), 155.1 (C-4), 156.3 (C-8a), 161.3 (C-2), 178.0 (C-31). FTMS(+) - ESI calculado para C₃₃H₄₄O₃N₃ [M-(NO₃)]⁺ 530.3377 encontrado 530.3369. UV λ_{\max} (nm, CH₃CN): 489. ϵ (cm⁻¹ M⁻¹): 64000. Φ_F = 0.54.

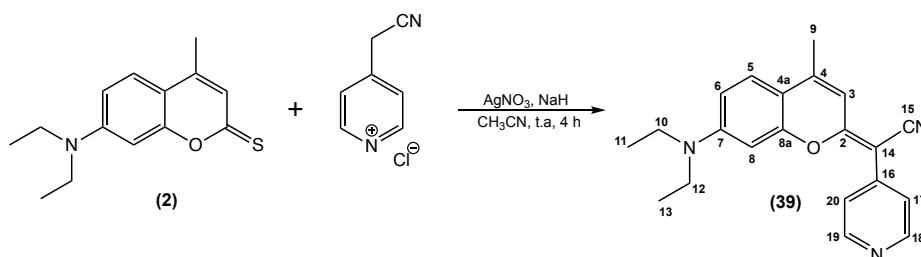
IV.1.2.53. Síntese do nitrato de (*E*)-1-(7-dietilamino-4-(4-((6-((2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi)-6-oxo-hexil)(metil)amino)estiril)-2*H*-cromen-2-ilideno)piperidín-1-io (38)



Num balão de fundo redondo, colocaram-se 65 mg de nitrato de (*E*)-1-(4-(4-((5-carboxipentil)(metil)amino)estiril)-7-dietilamino-2*H*-cromen-2-ilideno)piperidín-1-io (1.09×10^{-4} mol, 1.0 eq), 27 mg de DCC (1.32×10^{-4} mol, 1.2 eq) e 0.13 mg de DMAP (1.09×10^{-5} mol, 0.1 eq) em 2 mL de DMF (seco) e 8 mL de CH₃CN (seco), e após 5 min adicionou-se 15 mg de *N*-hidroxisuccinimida (1.32×10^{-4} mol, 1.2 eq). A mistura reacional foi colocada sob agitação magnética a temperatura ambiente durante 24 h. A reação foi monitorizada através de ccd, utilizando como eluente CH₂Cl₂/CH₃OH (9:1). O produto da reação foi isolado por cromatografia *flash*, usando como eluentes CH₂Cl₂/CH₃OH (9:1) e CH₂Cl₂/CH₃OH (8:2), tendo-se obtido 68 mg (η = 97%).

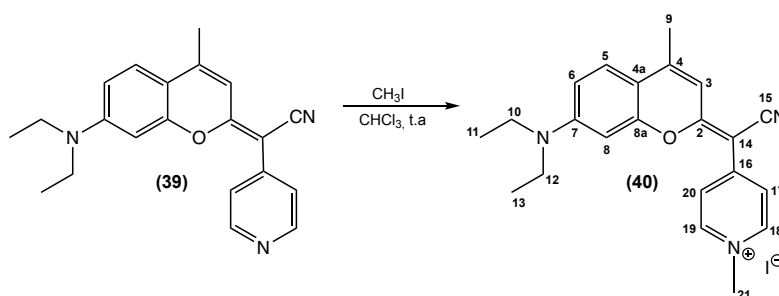
¹H RMN (400 MHz, CDCl₃, δ , ppm): 1.26 (6H, t, J = 7.1, N(CH₂CH₃)₂), 1.45-1.50 (2H, m, H-28), 1.61-1.69 (2H, m, H-29), 1.76-1.80 (8H, m, H-27, H-15, H-16, H-17), 2.63 (2H, t, $J_{30,29}$ = 7.2, H-30), 2.86 (4H, s, H-34, H-35), 3.02 (1H, s, H-32), 3.41 (2H, t, $J_{26,27}$ = 7.3, H-26), 3.49 (4H, q, J = 7.1, N(CH₂CH₃)₂), 3.97 (4H, m, H-14, H-18), 6.61 (1H, d, $J_{8,6}$ = 2.5, H-8), 6.68 (2H, d, $J_{22,21}$ = 9.0, H-22, H-24), 6.80 (1H, dd, $J_{6,5}$ = 9.4, $J_{6,8}$ = 2.6, H-6), 7.02 (1H, s, H-3), 7.18 (1H, d, $J_{9,19}$ = 15.7, H-9), 7.66 (2H, d, $J_{21,22}$ = 9.0, H-21, H-25), 7.84 (1H, d, $J_{5,6}$ = 9.4, H-5), 7.97 (1H, d, $J_{19,9}$ = 15.7, H-19). ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃, δ , ppm): 12.7 (C-11, C-13), 23.8 (C-16), 24.6 (C-29), 25.8 (C-34, C-35), 26.1 (C-15, C-17), 26.2 (C-28), 26.6 (C-27), 31.0 (C-30), 38.7 (C-32), 45.2 (C-10, C-12), 47.7 (C-14, C-18), 52.3 (C-26), 91.2 (C-3), 97.1 (C-8), 108.2 (C-4a), 111.5 (C-6), 112.0 (C-22, C-24), 112.1 (C-9), 123.7 (C-20), 126.5 (C-5), 131.1 (C-21, C-25), 144.0 (C-19), 151.2 (C-23), 152.3 (C-7), 153.5 (C-4), 154.7 (C-8a), 159.8 (C-2), 168.6 (C-31), 169.4 (C-33, C-36). FTMS(+) - ESI calculado para C₃₇H₄₇O₅N₄ [M-(NO₃⁻)]⁺ 627.3541 encontrado 627.3531. UV λ_{\max} (nm, CH₃CN): 487. ϵ (cm⁻¹ M⁻¹): 64000. Φ_F = 0.56.

IV.1.2.54. Síntese do (E)-2-(7-dietilamino-4-metil-2H-cromen-2-ilideno)-2-(piridín-4-il)acetonitrilo (39)



Num balão de fundo redondo, colocaram-se 1.0 g de 7-dietilamino-4-metil-2H-cromen-2-tiona (4.04×10^{-3} mol, 1.0 eq), 1.25 g de hidrocloreto de 4-piridilacetonitrilo (8.08×10^{-3} mol, 2.0 eq) e 2.4 g de NaH (5.66×10^{-2} mol, 14.0 eq) em 20 mL de CH₃CN (seco). Após a mistura reacional ter sido colocada sob agitação magnética a temperatura ambiente durante 2 h, adicionou-se 1.45 g de AgNO₃ (8.08×10^{-3} mol, 2.0 eq), a mistura reacional foi agitada a temperatura ambiente por mais 2 h. A reação foi continuamente monitorizada através de ccd, utilizando como eluente CHCl₃/CH₃OH (9:1). O produto da reação, foi isolado por cromatografia *flash*, usando como eluentes CH₂Cl₂, CH₂Cl₂/CH₃OH (99:1), CH₂Cl₂/CH₃OH (98:2), tendo-se obtido 1,19 g ($\eta = 89\%$).^[232]

IV.1.2.55. Síntese do iodeto de (E)-4-(ciano(7-dietilamino-4-metil-2H-cromen-2-ilideno)metil)-1-metilpiridín-1-io (40)

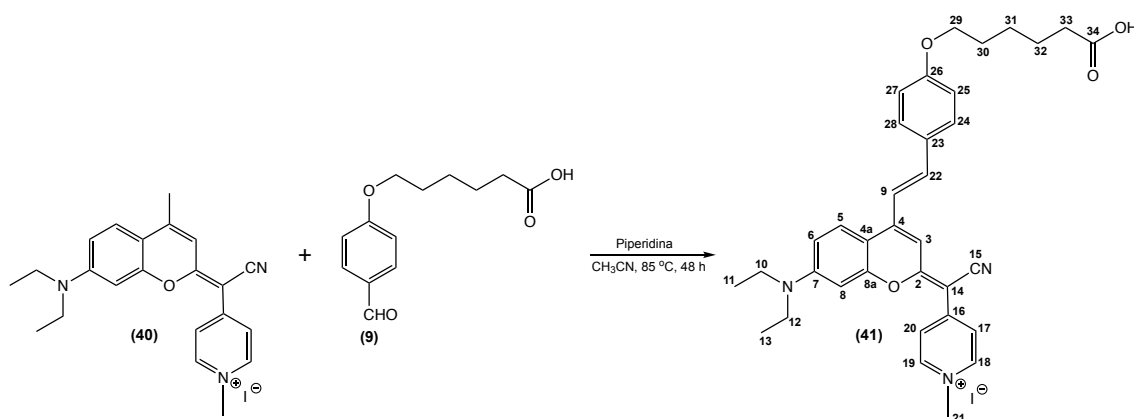


Num balão de fundo redondo, colocaram-se 300 mg de (E)-2-(7-dietilamino-4-metil-2H-cromen-2-ilideno)-2-(piridín-4-il)acetonitrilo (9.05×10^{-4} mol, 1.0 eq) em 20 mL de CHCl₃, de seguida adicionou-se 141 μ L de iodometano (2.26×10^{-3} mol, 2.5 eq). A mistura reacional foi colocada sob agitação magnética a temperatura ambiente durante a noite. A reação foi continuamente monitorizada através de ccd, utilizando como eluente CHCl₃/CH₃OH (95:5). O produto da reação, foi isolado por cromatografia *flash*,

usando como eluentes $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (95:5), $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (9:1), $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (8:2) e $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ (65:10:1) tendo-se obtido 400 mg ($\eta = 93\%$).

^1H RMN (400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, δ , ppm): 1.17 (6H, t, $J = 7.0$, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$), 2.49 (3H, s, H-9), 3.54 (4H, q, $J = 7.0$, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$), 4.18 (3H, s, H-21), 6.80 (1H, d, $J_{3,9} = 7.2$, H-3), 6.91 (2H, m, H-6, H-8), 7.64 (1H, dd, $J_{5,9} = 5.2$, $J_{5,6} = 9.2$, H-5), 8.07 (2H, m, H-17, H-20), 8.58 (2H, d, $J_{18,17} = 6.7$, H-18, H-19). ^{13}C RMN (100 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, δ , ppm): 12.5 (C-11, C-13), 18.5 (C-9), 44.3 (C-10, C-12), 46.1 (C-21), 78.0 (C-16), 96.4 (C-8), 110.2 (C-3), 110.3 (C-4a), 111.7 (C-6), 118.2 (C-15), 120.6 (C-17, C-20), 127.0 (C-5), 143.8 (C-18, C-19), 148.4 (C-14), 151.9 (C-7), 152.2 (C-4), 154.7 (C-8a), 166.5 (C-2). FTMS(+) - ESI calculado para $\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{ON}_3$ $[\text{M}-(\text{I}^-)]^+$ 346.1914 encontrado 346.1906. UV λ_{max} (nm, CH_3CN): 550. ϵ ($\text{cm}^{-1} \text{M}^{-1}$): 80000. $\Phi_F = 0.36$.

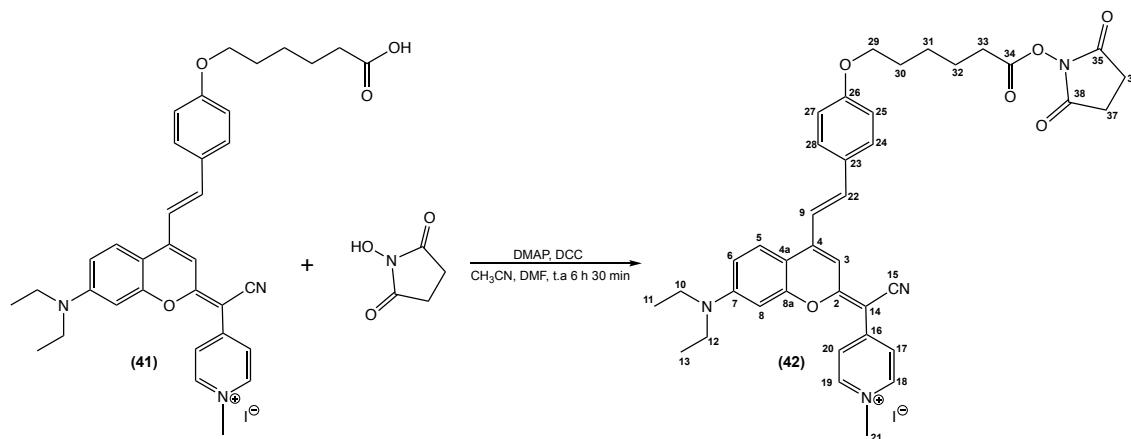
IV.1.2.56. Síntese do iodeto de 4-(((*E*)-4-((5-carboxipentil)oxi)estiril)-7-dietil-amino-2*H*-cromen-2-ilideno)(ciano)metil)-1-metilpiridín-1-io (41)



Num balão de fundo redondo, colocaram-se 300 mg de iodeto de (*E*)-4-(ciano(7-dietil-amino-4-metil-2*H*-cromen-2-ilideno)metil)-1-metilpiridín-1-io (6.34×10^{-4} mol, 1.0 eq), 150 mg do ácido 6-(4-formilfenoxi)hexanóico (6.34×10^{-4} mol, 1.0 eq) em 20 mL de CH_3CN (seco), de seguida adicionou-se 126 μL de piperidina (1.27×10^{-3} mol, 2.0 eq). A mistura reacional foi colocada sob agitação magnética a uma temperatura de 85 °C durante 48 h e de seguida acidificada com HCl 6M. A reação foi continuamente monitorizada através de ccd, utilizando como eluente $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ (65:10:1). O produto da reação, foi isolado por cromatografia *flash*, usando como eluente $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ (65:10:1), tendo-se obtido 312 mg ($\eta = 72\%$).

^1H RMN (400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, δ , ppm): 1.16 (6H, t, $J = 6.9$, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$), 1.45 (2H, m, H-31), 1.58 (2H, m, H-32), 1.74 (2H, m, H-30), 2.24 (2H, t, H-33), 3.51 (4H, q, $J = 6.9$, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$), 4.03 (2H, t, H-29), 4.13 (3H, s, H-21), 6.84 (1H, sl, H-6), 6.85 (1H, sl, H-8), 6.98 (1H, s, H-3), 6.99 (2H, d, $J_{25,24} = 8.6$, H-25, H-27), 7.54 (2H, s, H-9, H-22), 7.78 (2H, $J_{24,25} = 8.6$, H-24, H-28), 7.96 (2H, d, $J_{17,18} = 7.0$, H-17, H-20), 8.07 (1H, d, $J_{5,6} = 9.7$, H-5), 8.47 (2H, d, $J_{18,17} = 7.0$, H-18, H-19). ^{13}C RMN (100 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, δ , ppm): 12.5 (C-11, C-13), 24.3 (C-32), 25.2 (C-31), 28.4 (C-30), 33.8 (C-33), 44.2 (C-10, C-12), 45.8 (C-21), 67.6 (C-29), 77.7 (C-16), 96.7 (C-8), 103.3 (C-3), 108.6 (C-4a), 111.6 (C-6), 114.8 (C-25, C-27), 117.2 (C-9), 118.5 (C-15), 119.9 (C-17, C-20), 127.0 (C-5), 128.1 (C-23), 130.4 (C-24, C-28), 139.1 (C-22), 143.3 (C-18, C-19), 147.7 (C-4), 148.4 (C-14), 151.9 (C-7), 155.1 (C-8a), 160.5 (C-26), 166.0 (C-2), 174.5 (C-34). FTMS(+) - ESI calculado para $\text{C}_{35}\text{H}_{38}\text{O}_4\text{N}_3$ $[\text{M}-(\text{I}^-)]^+$ 564.2857 encontrado 564.2849. UV λ_{max} (nm, CH_3CN): 593, 615. ϵ ($\text{cm}^{-1} \text{M}^{-1}$): 55000. $\Phi_F = 0.07$.

IV.1.2.57. Síntese do iodeto de 4-(ciano((*E*)-7-dietilamino-4-((*E*)-4-((2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi)-6-oxo-hexil)oxi)estiril)-2*H*-cromen-2-ilideno)metil)-1-metil-piridín-1-íio (42)

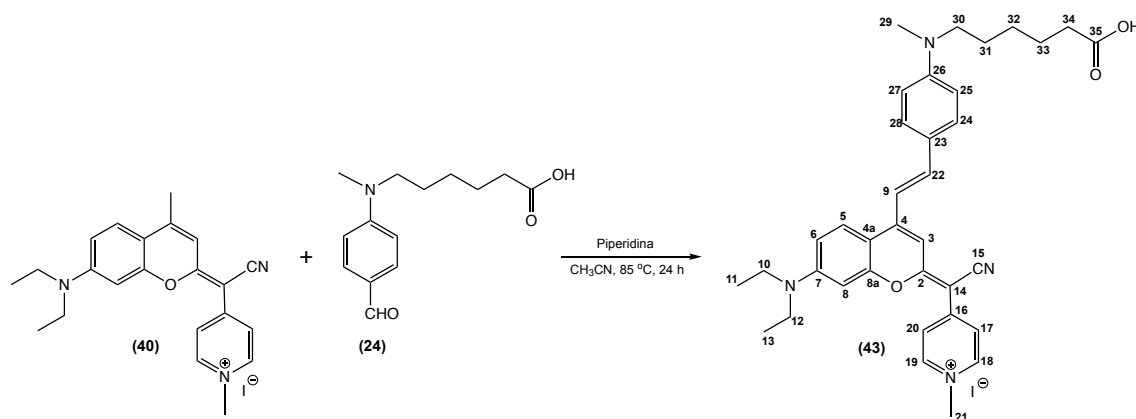


Num balão de fundo redondo, colocaram-se 160 mg de iodeto de 4-(((*E*)-4-((*E*)-4-((5-carboxipentil)oxi)estiril)-7-dietilamino-2*H*-cromen-2-ilideno)(ciano)metil)-1-metilpiridín-1-íio (2.31×10^{-4} mol, 1.0 eq), 57 mg de DCC (2.78×10^{-4} mol, 1.2 eq) e 3 mg de DMAP (2.31×10^{-5} mol, 0.1 eq) em 2 mL de DMF (seco) e 8 mL de CH_3CN (seco), e após 5 min adicionou-se 32 mg de *N*-hidroxissuccinimida (2.78×10^{-4} mol, 1.2 eq). A mistura reacional foi colocada sob agitação magnética a temperatura ambiente durante 6 h e 30 min. A reação foi monitorizada através de ccd, utilizando como eluente $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$

(9:1). O produto da reação foi isolado por cromatografia *flash*, usando como eluentes $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (95:5) e $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (9:1) tendo-se obtido 165 mg ($\eta = 91\%$).

^1H RMN (400 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 1.25 (6H, t, $J = 6.9$, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$), 1.54 (2H, m, H-31), 1.83 (4H, m, H-30, H-32), 2.67 (2H, t, $J = 7.2$, H-33), 2.86 (4H, s, H-36, H-37), 3.59 (4H, q, $J = 6.9$, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$), 4.02 (2H, t, $J = 6.1$, H-29), 4.13 (3H, s, H-21), 6.77 (1H, dd, $J_{6,5} = 9.2$, H-6), 6.90 (2H, d, $J_{25,24} = 8.5$, H-25, H-27), 6.97 (1H, sl, H-8), 7.03 (1H, s, H-3), 7.26 (1H, d, $J_{9,22} = 15.8$, H-9), 7.38 (1H, d, $J_{22,9} = 15.8$, H-22), 7.56 (2H, d, $J_{24,25} = 8.5$, H-24, H-28), 7.81 (1H, $J_{5,6} = 9.2$, H-5), 7.98 (2H, d, $J_{17,18} = 6.2$, H-17, H-20), 8.57 (1H, d, $J_{18,17} = 6.3$, H-18, H-19). ^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3 , δ ppm): 13.2 (C-11, C-13), 24.7 (C-32), 25.6 (C-31), 26.0 (C-36, C-37), 29.0 (C-30), 31.2 (C-33), 46.0 (C-10, C-12), 46.7 (C-21), 68.1 (C-29), 79.1 (C-16), 98.2 (C-8), 104.2 (C-3), 109.5 (C-4a), 112.5 (C-6), 115.3 (C-25, C-27), 117.0 (C-9), 119.2 (C-15), 120.6 (C-17, C-20), 126.6 (C-5), 128.3 (C-23), 130.4 (C-24, C-28), 139.7 (C-22), 143.1 (C-18, C-19), 148.5 (C-4), 149.7 (C-14), 152.9 (C-7), 156.1 (C-8a), 161.3 (C-26), 167.0 (C-2), 168.8 (C-34), 169.6 (C-35, C-38). FTMS(+) - ESI calculado para $\text{C}_{39}\text{H}_{41}\text{O}_6\text{N}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 661.3021 encontrado 661.3013. UV λ_{max} (nm, CH_3CN): 589, 615. ϵ ($\text{cm}^{-1} \text{M}^{-1}$): 55000. $\Phi_F = 0.10$.

IV.1.2.58. Síntese do iodeto de 4-(((*E*)-4-((*E*)-4-((5-carboxipentil)(metil)amino)es-tiril)-7-dietilamino-2*H*-cromen-2-ilideno)(ciano)metil)-1-metilpiridín-1-io (43)

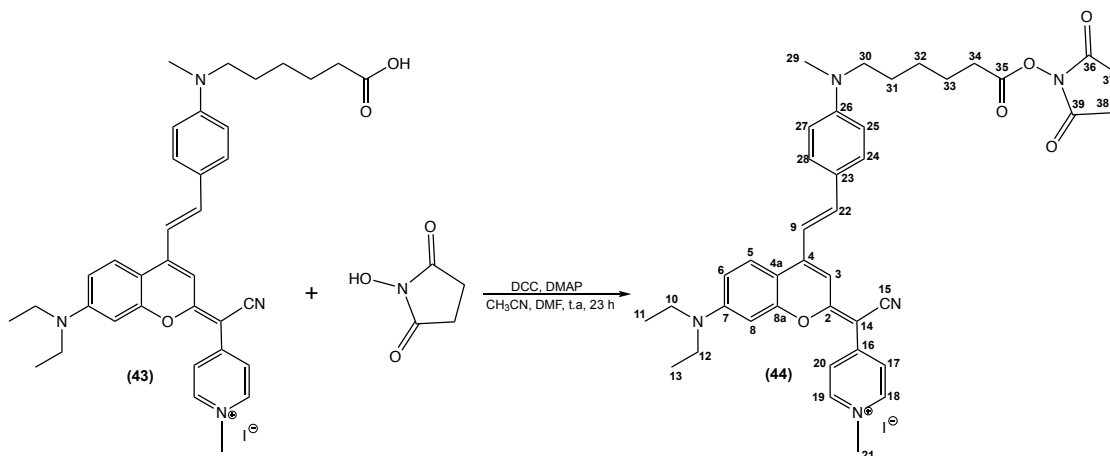


Num balão de fundo redondo, colocaram-se 150 mg de iodeto de (*E*)-4-(ciano(7-dietil-amino-4-metil-2*H*-cromen-2-ilideno)metil)-1-metilpiridín-1-io (3.17×10^{-4} mol, 1.0 eq), 79 mg do ácido 6-((4-formilfenil)(metil)amino)hexanóico (3.17×10^{-4} mol, 1.0 eq) e 31 μL de piperidina (3.17×10^{-4} mol, 1.0 eq) em 10 mL de CH_3CN (seco). A mistura reacional foi colocada sob agitação magnética a uma temperatura de 85 °C durante 24 h. Após esse

tempo reacional acidificou-se com HCl 6M. A reação foi continuamente monitorizada através de ccd, utilizando como eluente $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ (65:10:1). O produto da reação, foi isolado por cromatografia *flash*, usando como eluentes $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ (65:10:1) e $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ (65:20:2), tendo-se obtido 168 mg ($\eta = 75\%$).

^1H RMN (400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, δ , ppm): 1.14 (6H, t, $J = 6.9$, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$), 1.27-1.33 (2H, m, H-31), 1.48-1.56 (4H, m, H-30, H-32), 2.17 (2H, t, $J = 7.3$, H-33), 2.99 (3H, s, H-35), 3.40 (2H, t, $J = 7.0$, H-29), 3.45 (4H, q, $J = 6.9$, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$), 4.05 (3H, s, H-21), 6.68 (2H, d, $J_{25,24} = 8.8$, H-25, H-27), 6.72 (1H, sl, H-8), 6.75 (1H, d, $J_{6,5} = 9.3$, H-6), 6.82 (1H, s, H-3), 7.27 (1H, d, $J_{9,22} = 15.6$, H-9), 7.38 (1H, d, $J_{22,9} = 15.6$, H-22), 7.59 (2H, $J_{24,25} = 8.8$, H-24, H-28), 7.79 (2H, d, $J_{17,18} = 7.1$, H-17, H-20), 7.97 (1H, d, $J_{5,6} = 9.3$, H-5), 8.36 (2H, d, $J_{18,17} = 7.1$, H-18, H-19). ^{13}C RMN (100 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, δ , ppm): 12.5 (C-11, C-13), 24.8 (C-32), 26.1 (C-31), 26.2 (C-30), 34.6 (C-33), 38.1 (C-35), 44.2 (C-10, C-12), 45.5 (C-21), 51.3 (C-29), 76.7 (C-16), 96.6 (C-8), 101.6 (C-3), 108.6 (C-4a), 111.4 (C-25, C-27), 111.5 (C-6), 112.9 (C-9), 118.8 (C-15), 119.1 (C-17, C-20), 122.6 (C-23), 126.7 (C-5), 130.9 (C-24, C-28), 140.6 (C-22), 142.8 (C-18, C-19), 148.0 (C-4), 148.5 (C-14), 150.8 (C-26), 151.7 (C-7), 155.0 (C-8a), 165.3 (C-2), 175.0 (C-34). FTMS(+) - ESI calculado para $\text{C}_{36}\text{H}_{41}\text{O}_3\text{N}_4$ $[\text{M}(\text{I})^+]$ 577.3173 encontrado 577.3161. UV λ_{max} (nm, CH_3CN): 634. ϵ ($\text{cm}^{-1} \text{M}^{-1}$): 113500. $\Phi_F = 0.05$.

IV.1.2.59. Síntese do iodeto de 4-((ciano((*E*)-7-dietilamino-4-((*E*)-4-((6-((2,5-di-oxopirrolidin-1-il)oxi)-6-oxo-hexil)(metil)amino)estiril)-2*H*-cromen-2-ilideno)metil)-1-metilpiridín-1-io (44)

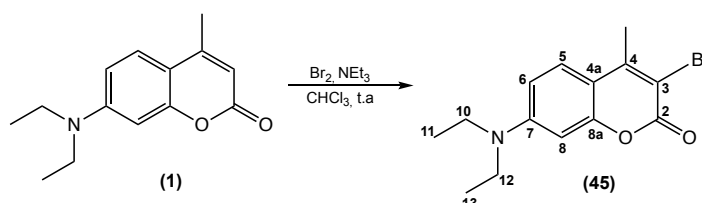


Num balão de fundo redondo, colocaram-se 48 mg de iodeto de 4-(((*E*)-4-((*E*)-4-((5-carboxipentil)(metil)amino)estiril)-7-dietilamino-2*H*-cromen-2-ilideno)(ciano)metil)-1-metilpiridín-1-io (6.81×10^{-5} mol, 1.0 eq), 17 mg de DCC (8.17×10^{-5} mol, 1.2 eq) e 0.08 mg de DMAP (6.81×10^{-7} mol, 0.1 eq) em 2 mL de DMF (seco) e 8 mL de CH₃CN (seco), e após 5 min adicionou-se 9.4 mg de *N*-hidroxisuccinimida (8.17×10^{-5} mol, 1.2 eq). A mistura reacional foi colocada sob agitação magnética a temperatura ambiente durante 23 h. A reação foi monitorizada através de ccd, utilizando como eluente CH₂Cl₂/CH₃OH (9:1). O produto da reação foi isolado por cromatografia *flash*, usando como eluentes CH₂Cl₂/CH₃OH (9:1) e CH₂Cl₂/CH₃OH (8:2), tendo-se obtido 53 mg ($\eta = 97\%$).

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃, δ , ppm): 1.25 (6H, t, $J = 7.1$, N(CH₂CH₃)₂), 1.46-1.52 (2H, m, H-31), 1.62-1.72 (2H, m, H-32), 1.77-1.85 (2H, m, H-30) 2.64 (2H, t, $J = 7.2$, H-33), 2.86 (4H, s, H-37, H-38), 3.04 (3H, s, H-35), 3.42 (2H, t, $J = 7.2$, H-29), 3.57 (4H, q, $J = 7.1$, N(CH₂CH₃)₂), 4.11 (3H, s, H-21), 6.66 (2H, d, $J_{25,24} = 8.9$, H-25, H-27), 6.77 (1H, d, $J_{6,5} = 9.3$, $J_{6,8} = 2.3$, H-6) 6.90 (1H, d, $J_{8,6} = 2.3$ H-8), 7.03 (1H, s, H-3), 7.15 (1H, d, $J_{9,22} = 15.7$, H-9), 7.41 (1H, d, $J_{22,9} = 15.7$, H-22), 7.51 (2H, $J_{24,25} = 8.9$, H-24, H-28), 7.83 (1H, d, $J_{5,6} = 9.3$, H-5), 7.93 (2H, d, $J_{17,18} = 5.2$, H-17, H-20), 8.45 (2H, d, $J_{18,17} = 5.1$, H-18, H-19). ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃, δ ppm): 13.0 (C-11, C-13), 24.6 (C-32), 25.8 (C-37, C-38), 26.2 (C-31), 26.7 (C-30), 29.8 (C-33), 38.7 (C-35), 45.6 (C-10, C-12), 46.3 (C-21), 52.3 (C-29), 77.4 (C-16), 97.9 (C-8), 103.0 (C-3), 109.4 (C-4a), 112.0 (C-25, C-27), 112.2 (C-6), 113.2 (C-9), 119.3 (C-15), 120.0 (C-17, C-20), 123.2 (C-23), 126.3 (C-5), 130.8 (C-24, C-28), 141.0 (C-22), 142.4 (C-18, C-19), 148.9 (C-4), 149.8 (C-14),

151.1 (C-26), 152.5 (C-7), 156.0 (C-8a), 166.3 (C-2), 168.6 (C-34), 169.4 (C-36, C-39). FTMS(+) - ESI calculado para $C_{40}H_{44}O_5N_5$ $[M-(I^-)]^+$ 674.3337 encontrado 674.3331. UV λ_{\max} (nm, CH_3CN): 634. ϵ ($cm^{-1} M^{-1}$): 113500. $\Phi_F = 0.07$.

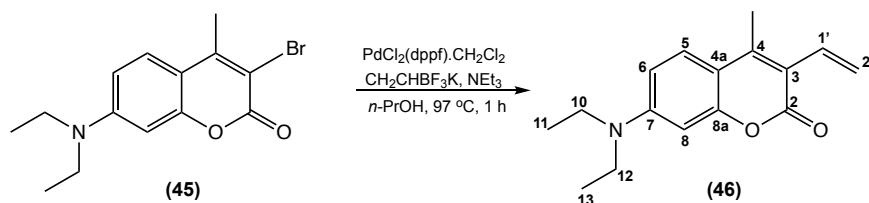
IV.1.2.60. Síntese do 3-bromo-7-dietilamino-4-metilcoumarina (45)



Num balão de fundo redondo, colocaram-se 1.5 g de 7-dietilamino-4-metilcoumarina (6.50×10^{-3} , 1.0 eq) em 30 mL de $CHCl_3$. Em seguida adicionou-se lentamente, à solução em banho de gelo, 333 μL de bromo (6.50×10^{-3} , 1.0 eq). A mistura reacional foi colocada sob agitação à temperatura ambiente, durante a noite. Após o tempo referido adicionou-se lentamente à mistura reacional 3 mL de NEt_3 , permanecendo em agitação à temperatura ambiente durante 30 min. Seguidamente procedeu-se à extração líquido/líquido da mistura reacional através sistema H_2O/CH_2Cl_2 . Secou-se a fase orgânica com sulfato de sódio anidro e evaporou-se à secua no evaporador rotativo. O produto da reação, foi isolado por cromatografia *flash*, usando como eluente um gradiente de *n*-hexano/ Et_2O , tendo-se obtido 1.98 g ($\eta = 98\%$).

1H RMN (400 MHz, $CDCl_3$, δ , ppm): 1.19 (6H, t, $J = 7.1$, $N(CH_2CH_3)_2$), 2.50 (3H, s, 4- CH_3), 3.40 (4H, q, $J = 7.1$, $N(CH_2CH_3)_2$), 6.46 (1H, s, H-8), 6.59 (1H, d, $J_{6,5} = 9.0$, H-6), 7.40 (1H, d, $J_{5,6} = 9.0$, H-5). ^{13}C RMN (100 MHz, $CDCl_3$, δ , ppm): 12.5 (C-11, C-13), 19.2 (C-9), 44.9 (C-10, C-12), 97.3 (C-8), 105.7 (C-3), 109.0 (C-4a), 126.2 (C-6), 126.2 (C-5), 150.7 (C-7), 151.6 (C-4), 154.5 (C-8a), 158.3 (C-2).

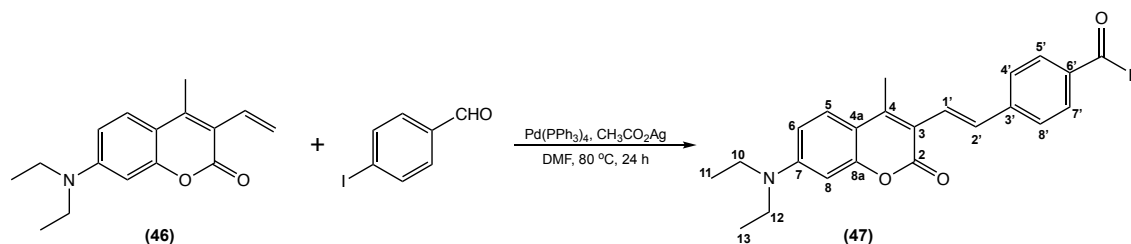
IV.1.2.61. Síntese da 7-dietilamino-4-metil-3-vinilcoumarina (46)



Num balão de fundo redondo, colocaram-se 580 mg de 3-bromo-7-dietilamino-4-metilcoumarina (1.87×10^{-3} mol, 1.0 eq), 61 mg de $\text{Pd(dppf)Cl}_2 \cdot \text{CH}_2\text{Cl}_2$ (7.48×10^{-4} mol, 0.04 eq), 376 mg de viniltrifluoroborato de potássio (2.80×10^{-3} mol, 1.5 eq), 522 μL de NEt_3 (3.74×10^{-3} mol, 2.0 eq), em 10 ml de *n*-propanol. A mistura reacional, em atmosfera inerte (N_2), foi colocado sob agitação magnética e uma temperatura de 97 °C durante 1 h. A reação foi continuamente monitorizada através de ccd, utilizando como eluente CH_2Cl_2 . A mistura reacional foi filtrada através de uma coluna contendo, sílica, usando CH_2Cl_2 como eluente. O produto da reação, foi isolado por cromatografia *flash*, usando como eluente CH_2Cl_2 , tendo-se obtido 461 mg ($\eta = 96\%$).

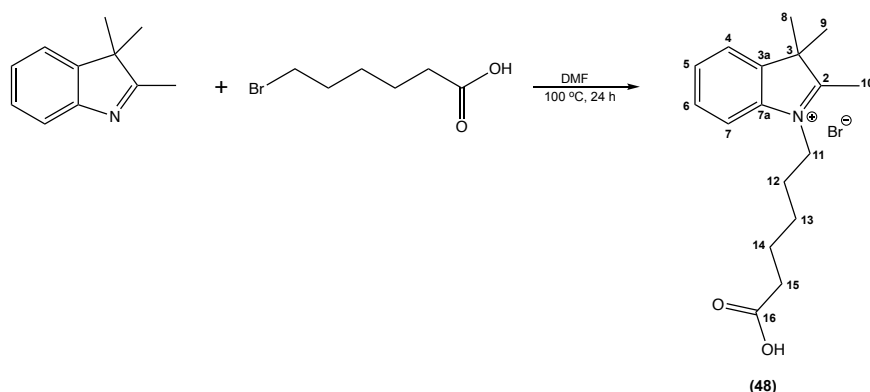
^1H RMN (400 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 1.19 (6H, t, $J = 7.1$, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$), 2.41 (3H, s, 4- CH_3), 3.39 (4H, q, $J = 7.1$, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$), 5.51 (1H, dd, $J_{2'a, 2'b} = 2.08$, 2.1, $J_{2'a, 1'} = 11.7$, H-2'a), 6.03 (1H, dd, $J_{2'b, 2'a} = 2.1$, $J_{2'b, 1'} = 17.5$, H-2'b), 6.46 (1H, d, $J_{8,6} = 2.6$, H-8), 6.58 (1H, dd, $J_{6,8} = 2.6$, $J_{6,5} = 9.1$, H-6), 6.70 (1H, dd, $J_{1', 2'a} = 11.7$, $J_{1', 2'b} = 17.5$, H-1'), 7.43 (1H, d, $J_{5,6} = 9.1$, H-5). ^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 12.7 (C-11, C-13), 15.1 (C-9), 44.9 (C-10, C-12), 97.3 (C-8), 108.8 (C-6), 109.7 (C-3), 116.4 (C-4a), 120.3 (C-2'), 126.2 (C-5), 129.5 (C-1'), 147.7 (C-7), 150.3 (C-4), 154.6 (C-8a), 161.2 (C-2). FTMS(+) - ESI calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{NO}_2\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 280.1308 encontrado 280.1309. UV λ_{max} (CH_3CN): 208, 261, 388.

IV.1.2.62. Síntese do (E)-4-(2-(7-dietilamino-4-metilcoumarina-3-il)vinil)benzaldeído (47)



Num balão de fundo redondo, colocaram-se 1.4 g de 7-dietilamino-4-metil-3-vinilcoumarina (5.44×10^{-3} mol, 1.0 eq), 1.13 g de 4-iodobenzaldeído (4.90×10^{-3} mol, 0.9 eq), 908 mg de acetato de prata (5.44×10^{-3} mol, 1.0 eq), 289 mg de $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (2.50×10^{-4} mol, 0.05 eq) em 10 mL de DMF (seco). A mistura reacional foi colocada sob agitação magnética, em atmosfera inerte (N_2), a uma temperatura de 85 °C durante 24 h. A reação foi continuamente monitorizada através de ccd, utilizando como eluente CH_2Cl_2 . A mistura reacional foi filtrada através de uma coluna contendo celite, usando CH_2Cl_2 como eluente. O produto da reação, foi isolado por cromatografia *flash*, usando como eluente CHCl_3 , tendo-se obtido 1.75 g ($\eta = 90\%$).

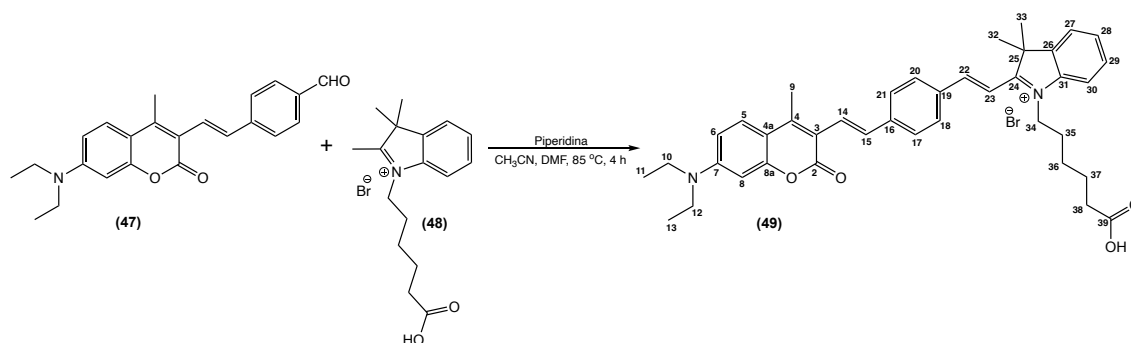
^1H RMN (400 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 1.22 (6H, t, $J = 7.1$, H-11, H-13), 2.54 (3H, s, H-9), 3.42 (4H, q, $J = 7.1$, H-10, H-12), 6.49 (1H, d, $J_{8,6} = 2.5$, H-8), 6.61 (1H, dd, $J_{6,8} = 2.5$, $J_{6,5} = 9.3$, H-6), 7.32 (1H, d, $J_{2',1'} = 16.1$, H-2'), 7.50 (1H, d, $J_{5,6} = 9.3$, H-5), 7.65 (2H, d, $J_{4',5'} = J_{8',7'} = 8.2$, H-4', H-8'), 7.78 (1H, d, $J_{1',2'} = 16.1$, H-1'), 7.84 (2H, d, $J_{5',4'} = J_{7',8'} = 8.2$, H-5', H-7'), 9.97 (1H, s, CHO). ^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 12.6 (C-11, C-13), 15.1 (C-9), 44.9 (C-10, C-12), 97.3 (C-8), 109.1 (C-6), 109.8 (C-3), 115.0 (C-4a), 125.0 (C-2'), 126.5 (C-5), 127.0 (C-5', C-7'), 130.3 (C-4', C-8'), 131.9 (C-1'), 135.2 (C-6'), 144.8 (C-3'), 148.9 (C-7), 150.6 (C-4), 154.9 (C-8a), 160.8 (C-2), 191.9 (CHO). UV λ_{max} (CH_3CN , nm): 203, 252, 312, 435. FTMS(+) - ESI calculado para $\text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{NO}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 362.1751 encontrado 362.1751.

IV.1.2.63. Síntese do brometo de 1-(5-carboxipentil)-2,3,3-trimetil-3*H*-indol-1-íio (48)

Num balão de fundo redondo, colocaram-se 500 mg de 2,3,3-trimetil-3*H*-indole (3.14×10^{-4} mol, 1.0 eq), 919 mg de ácido 6-bromo-hexanóico (4.71×10^{-3} mol, 1.5 eq), em 10 mL de DMF (seco). A mistura reacional foi colocada sob agitação magnética a 100 °C durante 24 h. A reação foi monitorizada através de ccd, utilizando como eluente $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (8:2). O produto da reação foi isolado por cromatografia *flash*, usando como eluentes CHCl_3 , $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (9:1) e $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (8:2), tendo-se obtido 700 mg ($\eta = 63\%$).

^1H RMN (400 MHz, CD_3OD , δ , ppm): 1.50-1.57 (2H, m, H-13), 1.62 (6H, s, H-8, H-9), 1.66-1.74 (2H, m, H-14), 1.95-2.03 (2H, m, H-12), 2.33 (2H, t, $J = 7.3$, H-15), 2.71 (3H, s, H-10), 4.53 (2H, t, $J = 7.3$, H-11), 7.63-7.68 (2H, m, H-5, H-6), 7.77-7.79 (1H, m, H-7), 7.88-7.92 (1H, m, H-4). ^{13}C RMN (100 MHz, CD_3OD , δ , ppm): 22.8 (C-10), 25.4 (C-14), 27.1 (C-13), 28.6 (C-8, C-9), 34.4 (C-12), 35.4 (C-15), 49.2 (C-11), 55.9 (C-3), 116.6 (C-7), 124.7 (C-4), 130.5 (C-5), 131.2 (C-6), 142.5 (C-7a), 143.4 (C-3a), 177.1 (C-2), 197.9 (COOH).

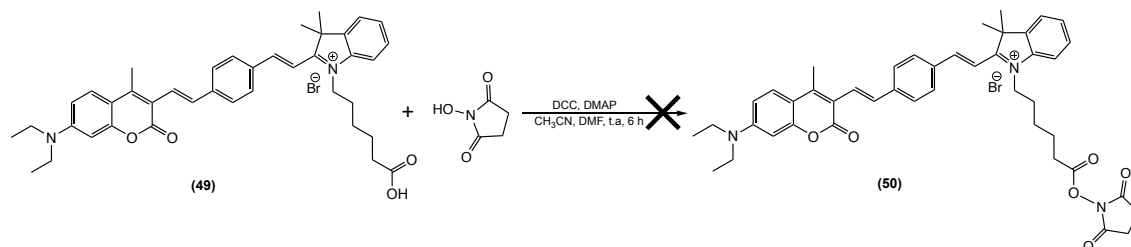
IV.1.2.64. Síntese do brometo de 1-(5-carboxipentil)-2-((*E*)-4-((*E*)-2-(7-dietilamino-4-metil-2-oxo-2*H*-cromen-3-il)vinil)estiril)-3,3-dimetil-3*H*-indol-1-íio (49)



Num balão de fundo redondo, colocaram-se 150 mg de (*E*)-4-(2-(7-dietilamino-4-metilcoumarina-3-il)vinil)benzaldeído (4.15×10^{-4} mol, 1.0 eq), 147 mg brometo de 1-(5-carboxipentil)-2,3,3-trimetil-3*H*-indol-1-íio (4.15×10^{-4} mol, 1.0 eq), 82 μ L de piperidina (8.3×10^{-4} mol, 2.0 eq) em 1 mL de DMF (seco) e 5 mL de CH₃CN (seco). A mistura reacional foi colocada sob agitação magnética a uma temperatura de 85 °C durante 4 h. A reação foi continuamente monitorizada através de ccd, utilizando como eluente CHCl₃/CH₃OH/H₂O (65:20:2). O produto da reação, foi isolado por cromatografia *flash*, usando como eluentes CHCl₃, CHCl₃/CH₃OH (8:2), CHCl₃/CH₃OH/H₂O (65:20:2) e CHCl₃/CH₃OH/H₂O (65:35:5), tendo-se obtido 230 mg (η = 76%).

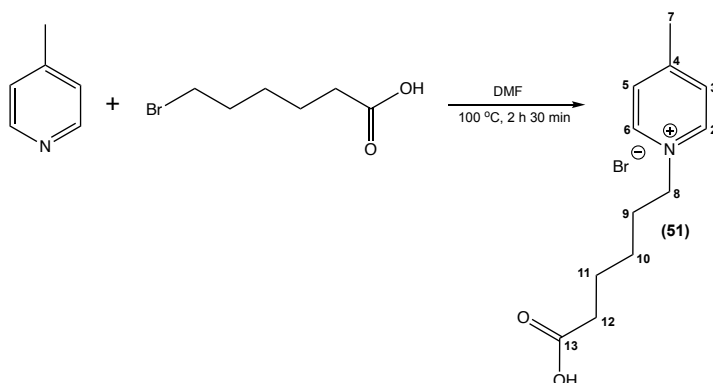
¹H RMN (400 MHz, CDCl₃, δ , ppm): 1.19 (6H, t, J = 7.0, N(CH₂CH₃)₂), 1.55-1.60 (2H, m, H-36), 1.70-1.74 (2H, m, H-37), 1.84 (6H, s, H-32, H-33), 1.95-2.00 (2H, m, H-35), 2.29 (2H, t, J = 7.2, H-38), 2.56 (3H, s, H-9), 3.43 (4H, q, J = 7.0, N(CH₂CH₃)₂), 4.67 (2H, t, H-34), 6.41 (1H, d, $J_{8,6}$ = 2.5, H-8), 6.73 (1H, dd, $J_{6,5}$ = 9.2, $J_{6,8}$ = 2.5, H-6), 7.40 (1H, d, $J_{14,15}$ = 16.0, H-14), 7.59 (1H, d, $J_{23,22}$ = 16.2, H-23), 7.62 (1H, d, J = 7.4, H-30), 7.63 (1H, d, $J_{5,6}$ = 9.2, H-5), 7.64 (1H, d, J = 5.4, H-27), 7.68 (2H, d, $J_{18,17}$ = 8.5, H-18, H-20), 7.69 (1H, d, $J_{15,14}$ = 16.0, H-15), 7.75-7.77 (1H, m, H-29), 7.82-7.83 (1H, m, H-28), 8.03 (2H, d, $J_{17,18}$ = 8.5, H-17, H-21), 8.41 (1H, $J_{22,23}$ = 16.2, H-22). ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃, δ , ppm): 12.9 (C-11, C-13), 15.2 (C-9), 26.4 (C-37), 26.7 (C-32, C-33), 27.4 (C-36), 29.5 (C-35), 36.9 (C-38), 45.7 (C-10, C-12), 47.9 (C-34), 53.8 (C-25), 97.6 (C-8), 110.7 (C-6), 110.8 (C-3), 112.1 (C-23), 115.2 (C-4a), 116.1 (C-28), 124.1 (C-29), 126.4 (C-14), 128.1 (C-5), 128.5 (C-18, C-20), 130.7 (C-27), 130.9 (C-30), 132.3 (C-17, C-21), 132.4 (C-15), 134.6 (C-19), 142.2 (C-31), 145.2 (C-26), 145.8 (C-16), 151.9 (C-4), 152.4 (C-7), 155.6 (C-22), 156.1 (C-8a), 162.5 (C-2), 181.0 (COOH), 183.2 (C-24).

IV.1.2.65. Tentativa de síntese do brometo de 2-((*E*)-4-((*E*)-2-(7-dietilamino-4-metil-2-oxo-2*H*-cromen-3-il)vinil)estiril)-1-(6-((2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi)-6-oxo-hexil)-3,3-dimetil-3*H*-indol-1-io (50)



Num balão de fundo redondo, colocaram-se 670 mg de brometo de 1-(5-carboxipentil)-2-((*E*)-4-((*E*)-2-(7-dietilamino-4-metil-2-oxo-2*H*-cromen-3-il)vinil)estiril)-3,3-dimetil-3*H*-indol-1-io (9.60×10^{-4} mol, 1.0 eq), 237 mg de DCC (1.15×10^{-3} mol, 1.2 eq) e 12 mg de DMAP (9.60×10^{-5} mol, 0.1 eq) em 2 mL de DMF (seco) e 8 mL de CH₃CN (seco), e após 5 min adicionou-se 132 mg de *N*-hidroxisuccinimida (1.15×10^{-3} mol, 1.2 eq). A mistura reacional foi colocada sob agitação magnética a temperatura ambiente durante 6 h. A reação foi monitorizada através de ccd, utilizando como eluente CHCl₃/CH₃OH (8:2). O produto da reação foi isolado por cromatografia *flash*, usando como eluentes CHCl₃, CHCl₃/CH₃OH (99:1), CHCl₃/CH₃OH (95:5), CHCl₃/CH₃OH (9:1) e CHCl₃/CH₃OH (8:2).

IV.1.2.66. Síntese do brometo de 1-(5-carboxipentil)-4-metilpiridín-1-io (51)

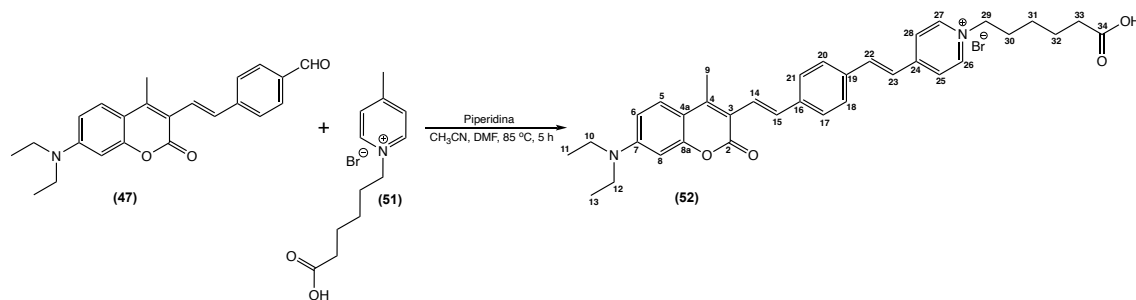


Num balão de fundo redondo, colocaram-se 500 mg de 4-metilpiridina (5.37×10^{-3} mol, 1.0 eq), 1.6 g de ácido 6-bromo-hexanóico (8.05×10^{-3} mol, 1.5 eq), em 10 mL de DMF (seco). A mistura reacional foi colocada sob agitação magnética a 100 °C durante 2 h e 30 min. A reação foi monitorizada através de ccd, utilizando como eluente CHCl₃/CH₃OH

(8:2). O produto da reação foi isolado por cromatografia *flash*, usando como eluentes CHCl_3 , $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (9:1) e $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (8:2), tendo-se obtido 1.3 g ($\eta = 84\%$).

^1H RMN (400 MHz, CD_3OD , δ , ppm): 1.38-1.46 (2H, m, H-10), 1.64-1.71 (2H, m, H-11), 1.99-2.07 (2H, m, H-9), 2.32 (2H, t, $J = 7.2$, H-12), 2.69 (3H, s, H-7) 4.61 (2H, t, $J = 7.4$, H-8), 7.95 (2H, d, $J_{3,2} = 6.9$, H-3, H-5), 8.85 (2H, d, $J_{2,3} = 6.9$, H-2, H-6). ^{13}C RMN (100 MHz, CD_3OD , δ , ppm): 22.0 (C-7), 25.2 (C-11), 26.5 (C-10), 32.0 (C-9), 34.4 (C-12), 61.9 (C-8), 129.9 (C-3, C-5), 144.9 (C-2, C-6) 161.2 (C-4), 177.1 (COOH).

IV.1.2.67. Síntese do brometo de 1-(5-carboxipentil)-4-((*E*)-4-((*E*)-2-(7-dietilamino-4-metil-2-oxo-2*H*-cromen-3-il)vinil)estiril)piridín-1-io (52)

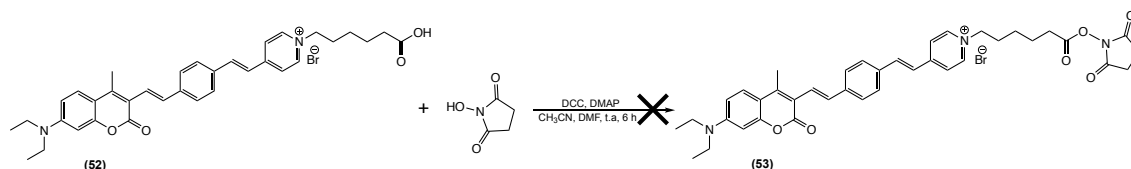


Num balão de fundo redondo, colocaram-se 80 mg de (*E*)-4-(2-(7-dietilamino-4-metil-coumarina-3-il)vinil)benzaldeído (2.21×10^{-4} mol, 1.0 eq), 239 mg do brometo de 1-(5-carboxipentil)-4-metilpiridín-1-io (2.21×10^{-4} mol, 1.0 eq), 65 μL de piperidina (6.63×10^{-4} mol, 2.0 eq) em 1 mL de DMF (seco) e 5 mL de CH_3CN (seco). A mistura reacional foi colocada sob agitação magnética a uma temperatura de 85 °C durante 5 h. A reação foi continuamente monitorizada através de ccd, utilizando como eluente $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ (65:10:1). O produto da reação, foi isolado por cromatografia *flash*, usando como eluentes $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (8:2) e $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ (65:35:5), tendo-se obtido 110 mg ($\eta = 80\%$).

^1H RMN (400 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 1.20 (6H, t, $J = 7.1$, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$), 1.36-1.41 (2H, m, H-31), 1.62-1.69 (2H, m, H-32), 1.95-2.00 (2H, m, H-30), 2.19 (2H, t, $J = 7.5$, H-33), 2.52 (3H, s, H-9), 3.44 (4H, q, $J = 7.1$, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$), 4.45 (2H, t, H-29), 6.43 (1H, d, $J_{8,6} = 2.5$, H-8), 6.71 (1H, dd, $J_{6,5} = 9.2$, $J_{6,8} = 2.5$, H-6), 7.22 (1H, d, $J_{14,15} = 16.0$, H-14), 7.31 (1H, d, $J_{23,22} = 16.2$, H-23), 7.52 (2H, d, $J_{17,18} = 8.4$, H-17, H-21), 7.57 (1H, d, $J_{15,14} = 16.0$, H-15), 7.59 (1H, d, $J_{5,6} = 9.2$, H-5), 7.64 (2H, d, $J_{18,17} = 8.4$, H-18, H-20), 7.82 (1H, d,

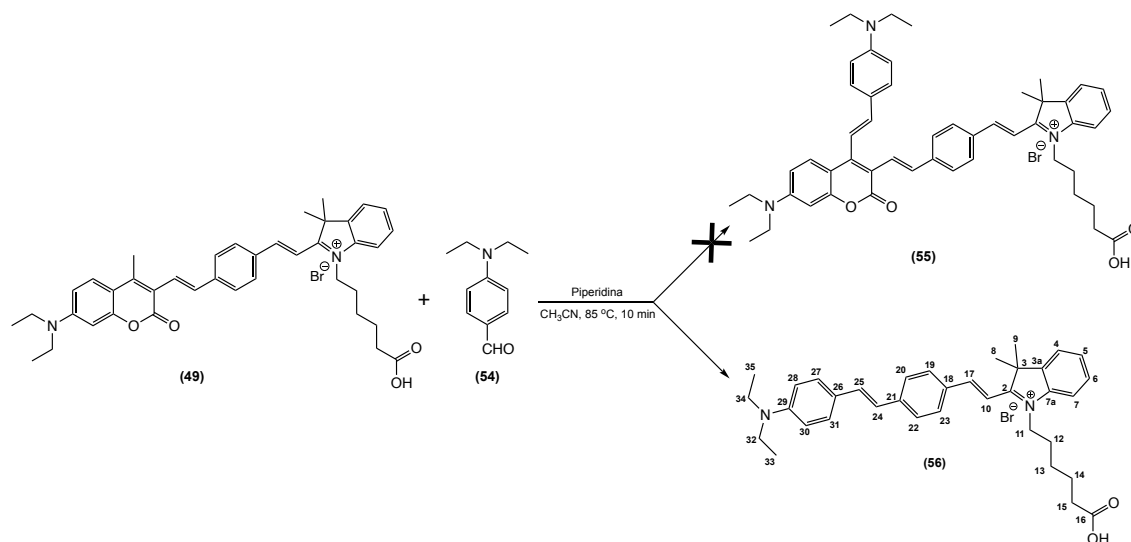
$J_{22,23} = 16.2$, H-22), 8.08 (2H, d, $J_{25,26} = 6.9$, H-25, H-28), 8.72 (2H, d, $J_{26,25} = 6.9$, H-26, H-27). ^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 12.9 (C-11, C-13), 15.2 (C-9), 26.4 (C-32), 26.8 (C-31), 31.9 (C-30), 38.1 (C-33), 45.7 (C-10, C-12), 61.6 (C-29), 97.6 (C-8), 110.7 (C-6), 110.8 (C-3), 115.6 (C-4a), 123.2 (C-23), 124.3 (C-14), 125.1 (C-25, C-28), 127.9 (C-5), 128.1 (C-17, C-21), 130.0 (C-18, C-20), 133.1 (C-15), 135.5 (C-19), 142.3 (C-16), 142.6 (C-22), 145.1 (C-26, C-27), 151.0 (C-4), 152.1 (C-7), 155.3 (C-24), 155.9 (C-8a), 162.7 (C-2), 181.7 (COOH).

IV.1.2.68. Tentativa de síntese do brometo de 4-((*E*)-4-((*E*)-2-(7-dietilamino-4-metil-2-oxo-2*H*-cromen-3-il)vinil)estiril)-1-(6-((2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi)-6-oxo-hexil)-piridín-1-io (53)



Num balão de fundo redondo, colocaram-se 760 mg de brometo de 1-(5-carboxipentil)-4-((*E*)-4-((*E*)-2-(7-dietilamino-4-metil-2-oxo-2*H*-cromen-3-il)vinil)estiril)piridín-1-io (1.21×10^{-3} mol, 1.0 eq), 299 mg de DCC (1.45×10^{-3} mol, 1.2 eq) e 15 mg de DMAP (1.21×10^{-4} mol, 0.1 eq) em 2 mL de DMF (seco) e 8 mL de CH_3CN (seco), e após 5 min adicionou-se 167 mg de *N*-hidroxissuccinimida (1.45×10^{-3} mol, 1.2 eq). A mistura reacional foi colocada sob agitação magnética a temperatura ambiente durante 6 h. A reação foi monitorizada através de ccd, utilizando como eluente $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (8:2). O produto da reação foi isolado por cromatografia *flash*, usando como eluentes CHCl_3 , $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (99:1), $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (95:5), $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (9:1) e $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (8:2).

IV.1.2.69. Tentativa de síntese do brometo de 1-(5-carboxipentil)-2-((*E*)-4-((*E*)-2-(7-dietilamino-4-((*E*)-4-(dietilamino)estiril)-2-oxo-2*H*-cromen-3-il)vinil)estiril)-3,3-dimetil-3*H*-indol-1-io (55)

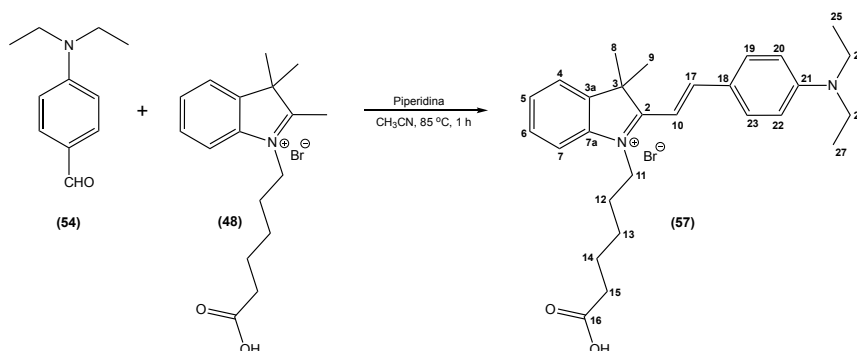


Num balão de fundo redondo, colocaram-se 29 mg de brometo de 1-(5-carboxipentil)-2-((*E*)-4-((*E*)-2-(7-dietilamino-4-metil-2-oxo-2*H*-cromen-3-il)vinil)estiril)-3,3-dimetil-3*H*-indol-1-io (4.16×10^{-5} mol, 1.0 eq), 7.4 mg de 4-dietilaminobenzaldeído (4.16×10^{-5} mol, 1.0 eq) em 5 mL de CH₃CN (seco) e adicionou-se 8.2 μ L de piperidina (8.31×10^{-5} mol, 2.0 eq). A mistura reacional foi colocada sob agitação magnética a uma temperatura de 85 °C durante 10 min. A reação foi monitorizada através de ccd, utilizando como eluente CHCl₃/CH₃OH (8:2). O produto da reação, foi isolado por cromatografia *flash*, usando como eluentes CHCl₃, CHCl₃/CH₃OH (99:1), CHCl₃/CH₃OH (95:5) e CHCl₃/CH₃OH (8:2).

Produto isolado da reação: brometo de 1-(5-carboxipentil)-2-((*E*)-4-((*E*)-4-(dietilamino)-estiril)estiril)-3,3-dimetil-3*H*-indol-1-io (**56**)

¹H RMN (400 MHz, CD₃OD, δ , ppm): 1.29 (6H, t, $J = 7.1$, N(CH₂CH₃)₂), 1.51-1.57 (2H, m, H-13), 1.67-1.72 (2H, m, H-14), 1.80 (6H, s, H-8, H-9), 1.91-1.96 (2H, m, H-12), 2.22 (2H, t, $J = 7.3$, H-15), 3.60 (4H q, $J = 7.1$, N(CH₂CH₃)₂), 4.45 (2H, t, $J = 7.3$, H-11), 6.88-6.96 (4H, m, H-20, H-22, H-24, H-25), 7.16 (1H, d, $J_{10,17} = 15.5$, H-10), 7.47 (1H, dt, $J_{5,4} = 7.4$, H-5), 7.54 (1H, dt, $J_{6,7} = 7.9$, H-6), 7.61 (1H, d, $J_{7,6} = 7.9$, H-7), 7.65 (1H, dd, $J_{4,5} = 7.4$, H-4), 7.93 (2H, d, $J_{19,20} = 8.4$, H-19, H-23), 8.07-8.12 (4H, m, H-27, H-28, H-30, H-31), 8.29 (1H, d, $J_{17,16} = 15.5$, H-17).

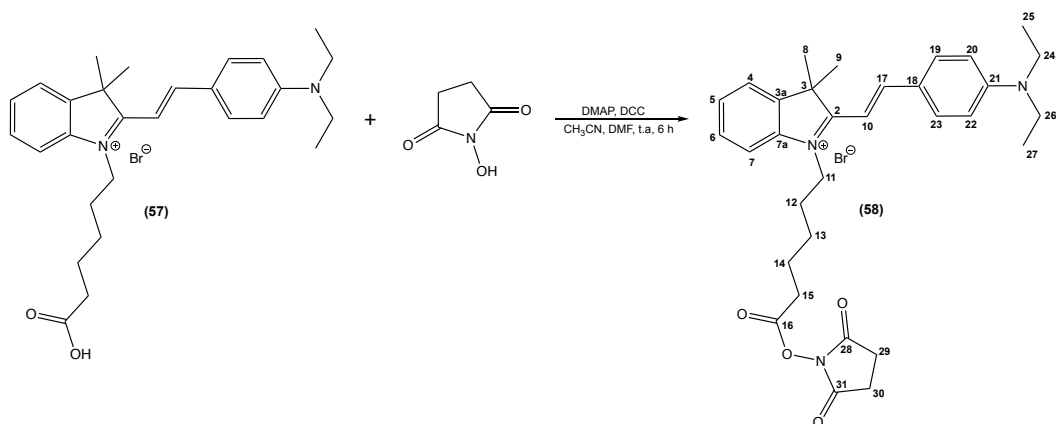
IV.1.2.70. Síntese do brometo de (*E*)-1-(5-carboxipentil)-2-(4-(dietilamino)estiril)-3,3-dimetil-3*H*-indol-1-íio (57)



Num balão de fundo redondo, colocaram-se 50 mg do brometo de 1-(5-carboxipentil)-2,3,3-trimetil-3*H*-indol-1-íio (1.41×10^{-4} mol, 1.0 eq), 25 mg de 4-dietilaminobenzaldeído (1.41×10^{-4} mol, 1.0 eq), 28 μ L de piperidina (2.82×10^{-4} mol, 2.0 eq) em 5 mL de CH₃CN (seco). A mistura reacional foi colocada sob agitação magnética a 85 °C durante 1 h. A reação foi monitorizada através de ccd, utilizando como eluente CHCl₃/CH₃OH/H₂O (65:20:2). O produto da reação foi isolado por cromatografia *flash*, usando como eluente CHCl₃/CH₃OH/H₂O (65:20:2), tendo-se obtido 59 mg (η = 82%).

¹H RMN (400 MHz, CD₃OD, δ , ppm): 1.27 (6H, t, J = 7.1, N(CH₂CH₃)₂), 1.49-1.57 (2H, m, H-13), 1.67-1.74 (2H, m, H-14), 1.80 (6H, s, H-8, H-9), 1.89-1.97 (2H, m, H-12), 2.23 (2H, t, J = 7.3, H-15), 3.60 (4H q, J = 7.1, N(CH₂CH₃)₂), 4.45 (2H, t, J = 7.3, H-11), 6.91 (2H, d, $J_{20,19}$ = 9.2, H-20, H-22), 7.16 (1H, d, $J_{10,17}$ = 15.5, H-10), 7.47 (1H, dt, $J_{5,4}$ = 7.4, H-5), 7.54 (1H, dt, $J_{6,7}$ = 7.9, H-6), 7.61 (1H, d, $J_{7,6}$ = 7.9, H-7), 7.65 (1H, dd, $J_{4,5}$ = 7.4, H-4), 7.93 (2H, d, $J_{19,20}$ = 8.4, H-19, H-23), 8.29 (1H, d, $J_{17,16}$ = 15.5, H-17). ¹³C RMN (100 MHz, CD₃OD, δ , ppm): 12.9 (C-25, C-27), 26.6 (C-14), 27.4 (C-13), 27.5 (C-8, C-9), 28.9 (C-12), 37.3 (C-15), 46.1 (C-24, C-26), 46.3 (C-11), 52.4 (C-3), 104.6 (C-10), 113.6 (C-20, C-22), 114.3 (C-7), 123.6 (C-18), 123.8 (C-4), 128.8 (C-5), 130.2 (C-6), 135.1 (C-19, C-23), 142.7 (C-7a), 144.0 (C-3a), 155.0 (C-21), 156.3 (C-17), 180.7 (C-2, COOH). UV λ_{\max} (nm, CH₃CN): 280, 556. ϵ (cm⁻¹ M⁻¹): 90000. Φ_F = 0.57.

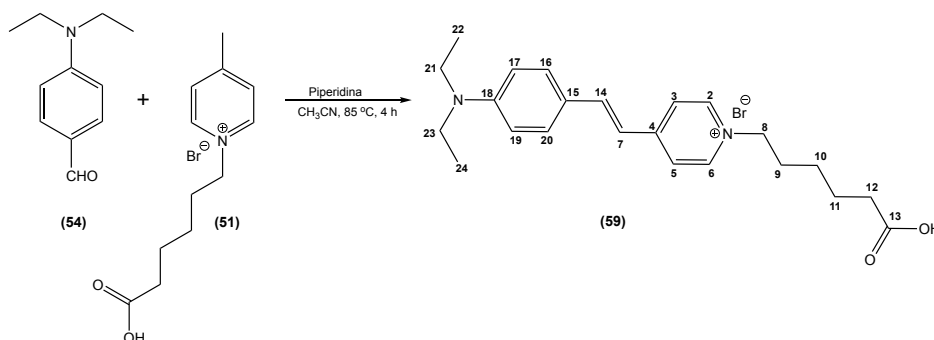
IV.1.2.71. Síntese do brometo de (*E*)-2-(4-(dietilamino)estiril)-1-(6-((2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi)-6-oxo-hexil)-3,3-dimetil-3*H*-indol-1-io (58)



Num balão de fundo redondo, colocaram-se 117 mg de brometo de (*E*)-1-(5-carboxipentil)-2-(4-(dietilamino)estiril)-3,3-dimetil-3*H*-indol-1-io (2.28×10^{-4} mol, 1.0 eq), 56 mg de DCC (2.73×10^{-4} mol, 1.2 eq) e 3 mg de DMAP (2.28×10^{-5} mol, 0.1 eq) em 2 mL de DMF (seco) e 8 mL de CH₃CN (seco), e após 5 min adicionou-se 31 mg de *N*-hidroxisuccinimida (2.73×10^{-4} mol, 1.2 eq). A mistura reacional foi colocada sob agitação magnética a temperatura ambiente durante 6 h. A reação foi monitorizada através de ccd, utilizando como eluente CHCl₃/CH₃OH/H₂O (65:20:2). O produto da reação foi isolado por cromatografia *flash*, usando como eluentes CHCl₃, CHCl₃/CH₃OH (99:1), CHCl₃/CH₃OH (95:5), CHCl₃/CH₃OH (9:1) e CHCl₃/CH₃OH (8:2), tendo-se obtido 131 mg (η = 94%).

¹H RMN (400 MHz, CD₃OD, δ , ppm): 1.27 (6H, t, J = 7.1, N(CH₂CH₃)₂), 1.63-1.69 (2H, m, H-13), 1.80 (6H, s, H-8, H-9), 1.82-1.89 (2H, m, H-14), 1.93-2.00 (2H, m, H-12), 2.67 (2H, t, J = 7.3, H-15), 2.78 (4H, s, H-29, H-30), 3.61 (4H q, J = 7.1, N(CH₂CH₃)₂), 4.47 (2H, t, J = 7.3, H-11), 6.90 (2H, d, $J_{20,19}$ = 9.2, H-20, H-22), 7.16 (1H, d, $J_{10,17}$ = 15.5, H-10), 7.47 (1H, dt, $J_{5,4}$ = 7.4, H-5), 7.54 (1H, dt, $J_{6,7}$ = 7.9, H-6), 7.61 (1H, d, $J_{7,6}$ = 7.9, H-7), 7.65 (1H, dd, $J_{4,5}$ = 7.4, H-4), 7.94 (2H, d, $J_{19,20}$ = 8.4, H-19, H-23), 8.29 (1H, d, $J_{17,16}$ = 15.5, H-17). ¹³C RMN (100 MHz, CD₃OD, δ , ppm): 12.9 (C-25, C-27), 26.5 (C-29, C-30), 26.8 (C-14), 27.5 (C-13, C-8, C-9), 28.5 (C-12), 31.4 (C-15), 46.1 (C-24, C-26), 46.2 (C-11), 52.4 (C-3), 104.7 (C-10), 113.5 (C-20, C-22), 114.3 (C-7), 123.6 (C-18), 123.8 (C-4), 128.8 (C-5), 130.2 (C-6), 135.8 (C-19, C-23), 142.6 (C-7a), 143.9 (C-3a), 155.0 (C-21), 156.4 (C-17), 170.2 (C-16), 171.8 (C-28, C-31). FTMS(+) - ESI calculado para C₃₂H₄₀O₄N₃ [M+H]⁺ 530.3013 encontrado 530.3012. UV λ_{\max} (nm, CH₃CN): 280, 556. ϵ (cm⁻¹ M⁻¹): 90000. Φ_F = 0.57.

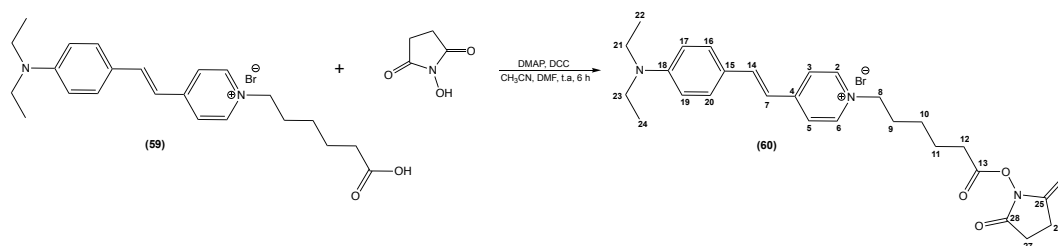
IV.1.2.72. Síntese do brometo de (*E*)-1-(5-carboxipentil)-4-(4-(dietilamino)estiril)-piridín-1-io (59)



Num balão de fundo redondo, colocaram-se 100 mg do brometo de 1-(5-carboxipentil)-4-metilpiridín-1-io (3.47×10^{-4} mol, 1.0 eq), 62 mg de 4-dietilaminobenzaldeído (3.47×10^{-4} mol, 1.0 eq), 69 μ L de piperidina (6.94×10^{-4} mol, 2.0 eq) em 10 mL de CH_3CN (seco). A mistura reacional foi colocada sob agitação magnética a 85 °C durante 4 h. A reação foi monitorizada através de ccd, utilizando como eluente $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ (65:20:2). O produto da reação foi isolado por cromatografia *flash*, usando como eluentes $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (8:2) e $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ (65:35:5), tendo-se obtido 146 mg ($\eta = 94\%$).

^1H RMN (400 MHz, CD_3OD , δ , ppm): 1.20 (6H, t, $J = 7.1$, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$), 1.35-1.41 (2H, m, H-10), 1.62-1.70 (2H, m, H-11), 1.92-2.00 (2H, m, H-9), 2.24 (2H, t, $J = 7.2$, H-12), 3.47 (4H q, $J = 7.1$, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$), 4.39 (2H, t, $J = 7.4$, H-8), 6.74 (2H, d, $J_{17,16} = 9.0$, H-17, H-19), 7.03 (1H, d, $J_{7,14} = 15.9$, H-7), 7.58 (2H, d, $J_{16,17} = 9.0$, H-16, H-20), 7.80 (1H, d, $J_{14,7} = 15.9$, H-14), 7.94 (2H, d, $J_{3,2} = 6.9$, H-3, H-5), 8.55 (2H, d, $J_{2,3} = 6.9$, H-2, H-6). ^{13}C RMN (100 MHz, CD_3OD , δ , ppm): 12.9 (C-22, C-24), 26.0 (C-11), 26.8 (C-10), 31.9 (C-9), 36.8 (C-12), 45.5 (C-21, C-23), 60.9 (C-8), 112.6 (C-17, C-19), 117.1 (C-7), 123.4 (C-15), 123.6 (C-3, C-5), 132.0 (C-16, C-20), 144.4 (C-2, C-6), 144.4 (C-14), 151.5 (C-18), 156.3 (C-4), 180.2 (COOH). UV λ_{max} (nm, CH_3CN): 273, 490. ϵ ($\text{cm}^{-1} \text{M}^{-1}$): 64000. $\Phi_F = 0.30$.

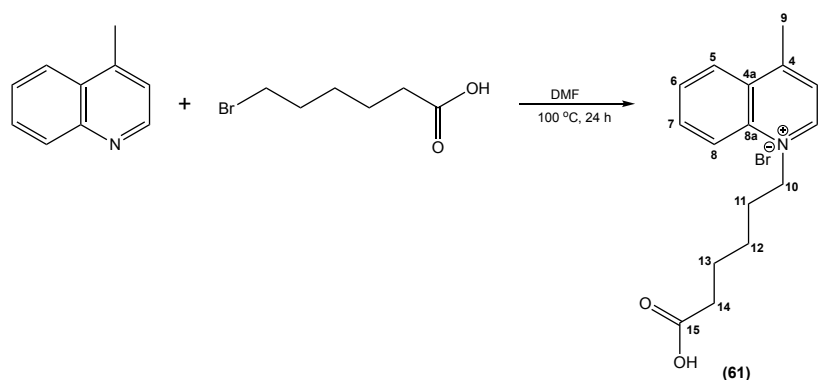
IV.1.2.73. Síntese do brometo de (*E*)-4-(4-(diethylamino)estiril)-1-(6-((2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi)-6-oxo-hexil)piridín-1-io (60)



Num balão de fundo redondo, colocaram-se 188 mg de brometo de (*E*)-1-(5-carboxipentil)-4-(4-(diethylamino)estiril)piridín-1-io (4.20×10^{-4} mol, 1.0 eq), 104 mg de DCC (5.04×10^{-4} mol, 1.2 eq) e 5 mg de DMAP (4.20×10^{-5} mol, 0.1 eq) em 2 mL de DMF (seco) e 8 mL de CH₃CN (seco), e após 5 min adicionou-se 58 mg de *N*-hidroxisuccinimida (5.04×10^{-4} mol, 1.2 eq). A mistura reacional foi colocada sob agitação magnética a temperatura ambiente durante 6 h. A reação foi monitorizada através de ccd, utilizando como eluente CHCl₃/CH₃OH/H₂O (65:20:2). O produto da reação foi isolado por cromatografia *flash*, usando como eluentes CHCl₃, CHCl₃/CH₃OH (99:1), CHCl₃/CH₃OH (95:5), CHCl₃/CH₃OH (9:1) e CHCl₃/CH₃OH (8:2), tendo-se obtido 217 mg (η = 95%).

¹H RMN (400 MHz, CD₃OD, δ , ppm): 1.20 (6H, t, J = 7.1, N(CH₂CH₃)₂), 1.45-1.54 (1H, m, H-10), 1.77-1.85 (1H, m, H-11), 1.94-2.04 (2H, m, H-9), 2.68 (2H, t, J = 7.0, H-12), 2.82 (3H, s, H-26, H-27), 3.47 (4H q, J = 7.1, N(CH₂CH₃)₂), 4.43 (2H, t, J = 7.3, H-8), 6.76 (2H, d, $J_{17,16}$ = 8.8, H-17, H-19), 7.06 (1H, d, $J_{7,14}$ = 16, H-7), 7.59 (2H, d, $J_{16,17}$ = 8.9, H-16, H-20), 7.83 (1H, d, $J_{14,7}$ = 16, H-14), 7.96 (2H, d, $J_{3,2}$ = 7.2, H-3, H-5), 8.56 (1H, d, $J_{2,3}$ = 7.2, H-2, H-6). ¹³C RMN (100 MHz, CD₃OD, δ , ppm): 12.9 (C-22, C-24), 25.2 (C-26, C-27), 26.0 (C-11), 26.9 (C-10), 31.9 (C-9), 34.3 (C-12), 45.5 (C-21, C-23), 60.8 (C-8), 112.7 (C-17, C-19), 117.1 (C-7), 123.4 (C-15), 123.5 (C-3, C-5), 132.0 (C-16, C-20), 144.2 (C-2, C-6), 144.5 (C-14), 151.6 (C-18), 156.4 (C-4), 170.1 (C-13), 171.8 (C-25, C-28). FTMS(+) - ESI calculado para C₂₇H₃₄O₄N₃ [M+H]⁺ 464.2544 encontrado 464.2540. UV λ_{\max} (nm, CH₃CN): 273, 490. ϵ (cm⁻¹ M⁻¹): 64000. Φ_F = 0.30.

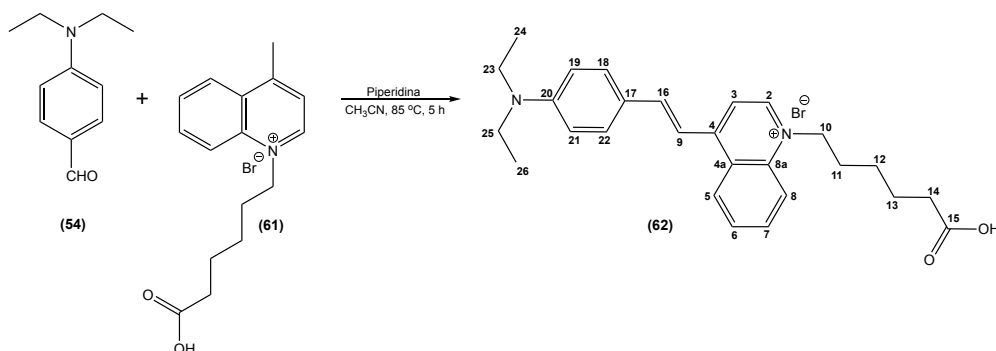
IV.1.2.74. Síntese do brometo de 1-(5-carboxipentil)-4-metilquinolín-1-íio (61)



Num balão de fundo redondo, colocaram-se 250 mg de 4-metilquinolina (1.75×10^{-3} mol, 1.0 eq), 513 mg de ácido 6-bromo-hexanóico (2.63×10^{-3} mol, 1.5 eq), em 5 mL de DMF (seco). A mistura reacional foi colocada sob agitação magnética a 100 °C durante 24 h. A reação foi monitorizada através de ccd, utilizando como eluente $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (8:2). O produto da reação foi isolado por cromatografia *flash*, usando como eluentes CHCl_3 e $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (8:2), tendo-se obtido 560 mg ($\eta = 95\%$).

^1H RMN (400 MHz, CD_3OD , δ , ppm): 1.48-1.56 (2H, m, H-12), 1.66-1.73 (2H, m, H-13), 2.07-2.14 (2H, m, H-11), 2.33 (2H, t, $J = 7.2$, H-14), 3.07 (3H, s, H-9), 5.06 (2H, t, $J = 7.4$, H-10), 7.98 (1H, d, $J_{3,2} = 6.0$, H-3), 8.06 (1H, dt, $J_{6,7} = 8.4$, H-6), 8.28 (1H, dt, $J_{7,6} = 8.4$, H-7), 8.57 (2H, dt, $J = 9.6$, H-5, H-7), 9.28 (1H, d, $J_{2,3} = 6.0$, H-2). ^{13}C RMN (100 MHz, CD_3OD , δ , ppm): 20.3 (C-9), 25.3 (C-13), 26.9 (C-12), 30.7 (C-11), 34.5 (C-14), 58.7 (C-10), 120.2 (C-3), 123.9 (C-5), 128.3 (C-8), 131.0 (C-6), 136.6 (C-7), 138.7 (C-4a), 149.2 (C-11, C-12), 160.8 (C-9), 177.3 (COOH).

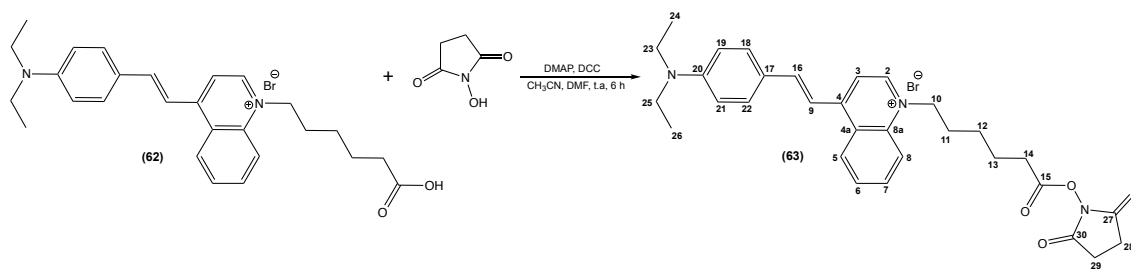
IV.1.2.75. Síntese do brometo de (*E*)-1-(5-carboxipentil)-4-(4-(dietilamino)estiril)-quinolín-1-io (62)



Num balão de fundo redondo, colocaram-se 120 mg do brometo de 1-(5-carboxipentil)-4-metilquinolín-1-io (3.55×10^{-4} mol, 1.0 eq), 63 mg de 4-dietilaminobenzaldeído (3.55×10^{-4} mol, 1.0 eq), 70 μ L de piperidina (7.10×10^{-4} mol, 2.0 eq) em 10 mL de CH_3CN (seco). A mistura reacional foi colocada sob agitação magnética a 85 °C durante 5 h. A reação foi monitorizada através de ccd, utilizando como eluente $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ (65:20:2). O produto da reação foi isolado por cromatografia *flash*, usando como eluentes $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ (65:10:1) e $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ (65:20:2), tendo-se obtido 105 mg ($\eta = 60\%$).

^1H RMN (400 MHz, CD_3OD , δ , ppm): 1.23 (6H, t, $J = 7.1$, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$), 1.46-1.50 (2H, m, H-12), 1.66-1.70 (2H, m, H-13), 2.00-2.05 (2H, m, H-11), 2.25 (2H, t, $J = 7.2$, H-14), 3.51 (4H q, $J = 7.1$, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$), 4.79 (2H, t, $J = 7.4$, H-10), 6.78 (2H, d, $J_{19,18} = 9.0$, H-19, H-21), 7.71 (2H, d, $J_{18,19} = 9.0$, H-18, H-22), 7.80 (1H, d, $J_{9,16} = 15.5$, H-9), 7.91 (1H, t, $J_{6,(5,7)} = 8.7$, H-6), 7.98 (1H, d, $J_{16,9} = 15.5$, H-16), 8.12 (1H, d, $J_{3,2} = 6.8$, H-3), 8.13 (1H, t, $J_{7,8} = 8.7$, H-7), 8.29 (1H, d, $J_{5,6} = 8.8$, H-5), 8.78 (1H, d, $J_{8,7} = 8.8$, H-8), 8.84 (1H, d, $J_{2,3} = 6.8$, H-2). ^{13}C RMN (100 MHz, CD_3OD , δ , ppm): 12.9 (C-24, C-26), 26.1 (C-13), 27.2 (C-12), 30.4 (C-11), 36.7 (C-14), 45.6 (C-23, C-25), 57.5 (C-10), 112.8 (C-19, C-21), 113.2 (C-9), 114.8 (C-3), 119.6 (C-5), 124.1 (C-17), 127.5 (C-8), 127.9 (C-4a), 129.7 (C-6), 132.9 (C-18, C-22), 136.0 (C-7), 139.6 (C-8a), 146.6 (C-2), 146.7 (C-16), 152.1 (C-20), 155.6 (C-4), 179.9 (COOH). UV λ_{max} (nm, CH_3CN): 307, 557. ϵ ($\text{cm}^{-1} \text{M}^{-1}$): 60000. $\Phi_F = 0.02$.

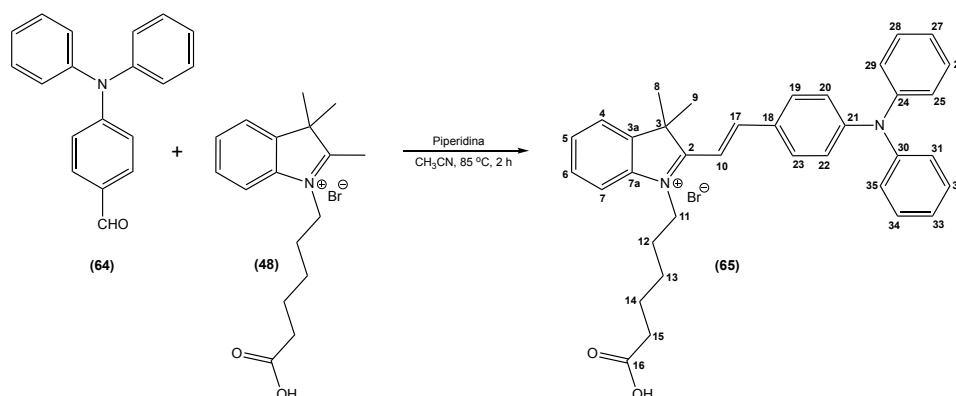
IV.1.2.76. Síntese do brometo de (*E*)-1-(5-carboxipentil)-4-(4-(dietilamino)estiril)-quinolín-1-íio (63)



Num balão de fundo redondo, colocaram-se 62 mg de brometo de (*E*)-1-(5-carboxipentil)-4-(4-(dietilamino)estiril)quinolín-1-íio (1.25×10^{-4} mol, 1.0 eq), 31 mg de DCC (1.50×10^{-4} mol, 1.2 eq) e 2 mg de DMAP (1.25×10^{-5} mol, 0.1 eq) em 1 mL de DMF (seco) e 4 mL de CH₃CN (seco), e após 5 min adicionou-se 17 mg de *N*-hidroxisuccinimida (1.50×10^{-4} mol, 1.2 eq). A mistura reacional foi colocada sob agitação magnética a temperatura ambiente durante 6 h. A reação foi monitorizada através de ccd, utilizando como eluente CHCl₃/CH₃OH/H₂O (65:20:2). O produto da reação foi isolado por cromatografia *flash*, usando como eluentes CHCl₃, CHCl₃/CH₃OH (99:1), CHCl₃/CH₃OH (95:5), CHCl₃/CH₃OH (9:1) e CHCl₃/CH₃OH (8:2), tendo-se obtido 70 mg ($\eta = 94\%$).

¹H RMN (400 MHz, CD₃OD, δ , ppm): 1.23 (6H, t, $J = 7.1$, N(CH₂CH₃)₂), 1.53-1.61 (2H, m, H-12), 1.77-1.85 (2H, m, H-13), 2.01-2.09 (2H, m, H-11), 2.66 (2H, t, $J = 7.0$, H-14), 2.81 (3H, s, H-28, H-30), 3.51 (4H q, $J = 7.1$, N(CH₂CH₃)₂), 4.81 (2H, t, $J = 7.4$, H-10), 6.78 (2H, d, $J_{19,18} = 9.0$, H-19, H-21), 7.72 (2H, d, $J_{18,19} = 9.0$, H-18, H-22), 7.80 (1H, d, $J_{9,16} = 15.5$, H-9), 7.91 (1H, t, $J_{6,(5,7)} = 9.2$, H-6), 8.03 (1H, d, $J_{16,7} = 15.5$, H-16), 8.13 (1H, dt, $J_{7,8} = 8.7$, H-7), 8.14 (1H, d, $J_{3,2} = 6.8$, H-3), 8.29 (1H, d, $J_{5,6} = 8.9$, H-5), 8.79 (1H, dd, $J_{8,7} = 8.7$, H-8), 8.84 (1H, d, $J_{2,3} = 6.8$, H-2). ¹³C RMN (100 MHz, CD₃OD, δ , ppm): 12.9 (C-24, C-26), 25.1 (C-28, C-29), 26.4 (C-13), 26.5 (C-12), 30.0 (C-11), 31.3 (C-14), 45.6 (C-23, C-25), 57.4 (C-10), 112.8 (C-19, C-21), 113.2 (C-9), 114.9 (C-3), 119.5 (C-5), 124.1 (C-17), 127.5 (C-8), 127.9 (C-4a), 129.7 (C-6), 132.9 (C-18, C-22), 136.0 (C-7), 139.6 (C-8a), 146.6 (C-2), 146.7 (C-16), 152.1 (C-20), 155.7 (C-4), 170.1 (C-15), 171.8 (C-27, C-30). FTMS(+) - ESI calculado para C₃₁H₃₆O₄N₃ [M+H]⁺ 514.2700 encontrado 514.2696. UV λ_{\max} (nm, CH₃CN): 307, 560. ϵ (cm⁻¹ M⁻¹): 60000. $\Phi_F = 0.02$.

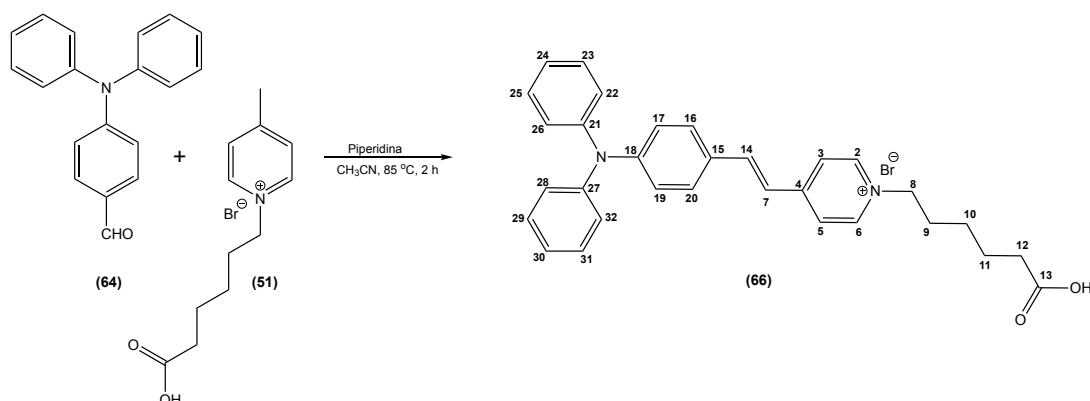
IV.1.2.77. Síntese do brometo de (*E*)-1-(5-carboxipentil)-2-(4-(difenilamino)estiril)-3,3-dimetil-3*H*-indol-1-íio (65)



Num balão de fundo redondo, colocaram-se 250 mg do brometo de 1-(5-carboxipentil)-2,3,3-trimetil-3*H*-indol-1-íio (7.06×10^{-4} mol, 1.0 eq), 193 mg de 4-difenilamino-benzaldeído (7.06×10^{-4} mol, 1.0 eq), 139 μ l de piperidina (1.41×10^{-3} mol, 2.0 eq) em 10 mL de CH₃CN (seco). A mistura reacional foi colocada sob agitação magnética a 85 °C durante 2 h. A reação foi monitorizada através de ccd, utilizando como eluente CHCl₃/CH₃OH/H₂O (65:10:1). O produto da reação foi isolado por cromatografia *flash*, usando como eluentes CHCl₃/CH₃OH/H₂O (65:10:1) e CHCl₃/CH₃OH/H₂O (65:20:2), tendo-se obtido 336 mg (η = 89%).

¹H RMN (400 MHz, CD₃OD, δ , ppm): 1.51-1.53 (2H, m, H-13), 1.64-1.69 (2H, m, H-14), 1.82 (6H, s, H-8, H-9), 1.93-1.98 (2H, m, H-12), 2.21 (2H, t, J = 7.2, H-15), 4.56 (2H, t, J = 7.4, H-11), 6.98 (2H, d, $J_{20,19}$ = 9.0, H-20, H-22), 7.22-7.25 (4H, m, H-26, H-28, H-32, H-34), 7.25-7.29 (2H, m, H-27, H-33), 7.37 (1H, d, $J_{10,17}$ = 15.9, H-10), 7.41-7.45 (4H, m, H-25, H-29, H-31, H-35), 7.56 (1H, dt, $J_{5,4}$ = 7.4, H-5), 7.60 (1H, dt, $J_{6,7}$ = 7.9, H-6), 7.71 (1H, d, $J_{7,6}$ = 7.9, H-7), 7.74 (1H, dd, $J_{4,5}$ = 7.4, H-4), 7.92 (2H, d, $J_{19,20}$ = 8.4, H-19, H-23), 8.35 (1H, d, $J_{17,16}$ = 15.9, H-17). ¹³C RMN (100 MHz, CD₃OD, δ , ppm): 26.6 (C-14), 27.1 (C-8, C-9), 27.4 (C-13), 29.3 (C-12), 37.1 (C-15), 47.2 (C-11), 53.3 (C-3), 108.6 (C-10), 115.4 (C-20, C-22), 119.9 (C-7), 123.9 (C-18), 127.3 (C-4), 127.9 (C-26, C-28, C-32, C-34), 130.0 (C-5), 130.5 (C-6), 131.1 (C-25, C-29, C-31, C-35), 134.1 (C-19, C-23), 142.4 (C-7a), 144.6 (C-3a), 146.8 (C-24, C-30), 155.1 (C-21), 156.0 (C-17), 180.4 (C-2), 182.4 (COOH). UV λ_{\max} (nm, CH₃CN): 293, 538.

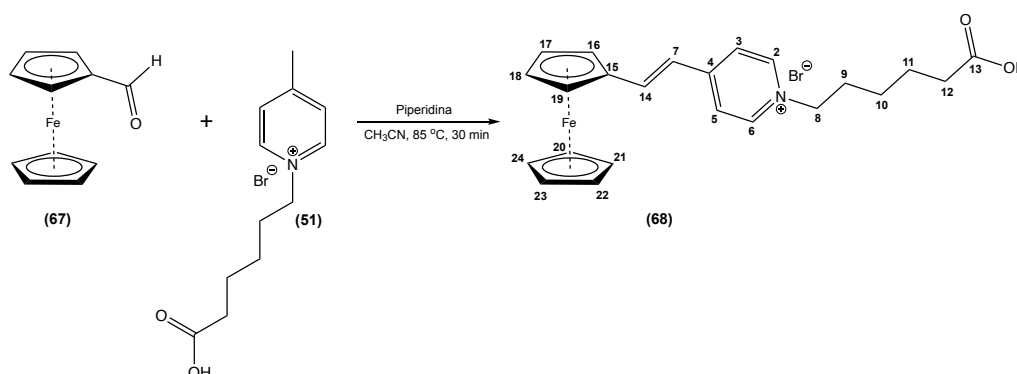
IV.1.2.78. Síntese do brometo de (*E*)-1-(5-carboxipentil)-4-(4-(difenilamino)estiril)-piridín-1-io (66)



Num balão de fundo redondo, colocaram-se 264 mg do brometo de 1-(5-carboxipentil)-4-metilpiridín-1-io (9.15×10^{-4} mol, 1.0 eq), 250 mg de 4-difenilaminobenzaldeído (9.15×10^{-4} mol, 1.0 eq), 181 μ L de piperidina (1.83×10^{-3} mol, 2.0 eq) em 10 mL de CH_3CN (seco). A mistura reacional foi colocada sob agitação magnética a 85 °C durante 2 h. A reação foi monitorizada através de ccd, utilizando como eluente $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ (65:20:2). O produto da reação foi isolado por cromatografia *flash*, usando como eluentes $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (8:2) e $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ (65:20:2), tendo-se obtido 400 mg ($\eta = 80\%$).

^1H RMN (400 MHz, CD_3OD , δ , ppm): 1.37-1.44 (2H, m, H-10), 1.64-1.71 (2H, m, H-11), 1.96-2.04 (2H, m, H-9), 2.25 (2H, t, $J = 7.2$, H-12), 4.49 (2H, t, $J = 7.4$, H-8), 6.98 (2H, d, $J_{17,16} = 8.8$, H-17, H-19), 7.10-7.13 (4H, m, H-23, H-25, H-29, H-31), 7.14-7.16 (2H, m, H-24, H-30), 7.24 (1H, d, $J_{7,14} = 16.2$, H-7), 7.32-7.36 (4H, m, H-22, H-26, H-28, H-32), 7.60 (2H, d, $J_{16,17} = 8.8$, H-16, H-20), 7.87 (1H, d, $J_{14,7} = 16.2$, H-14), 8.07 (2H, d, $J_{3,2} = 6.9$, H-3, H-5), 8.71 (2H, d, $J_{2,3} = 6.9$, H-2, H-6). ^{13}C RMN (100 MHz, CD_3OD , δ , ppm): 26.0 (C-11), 26.7 (C-10), 31.9 (C-9), 36.6 (C-12), 61.3 (C-8), 120.9 (C-7), 122.1 (C-17, C-19), 124.6 (C-3, C-5), 125.7 (C-24, C-30), 126.9 (C-23, C-25, C-29, C-31), 129.3 (C-15), 130.8 (C-22, C-26, C-28, C-32), 130.9 (C-16, C-20), 142.9 (C-14), 144.9 (C-2, C-6), 148.1 (C-21, C-27), 151.9 (C-18), 155.8 (C-4), 179.9 (COOH). UV λ_{max} (nm, CH_3CN): 302, 467.

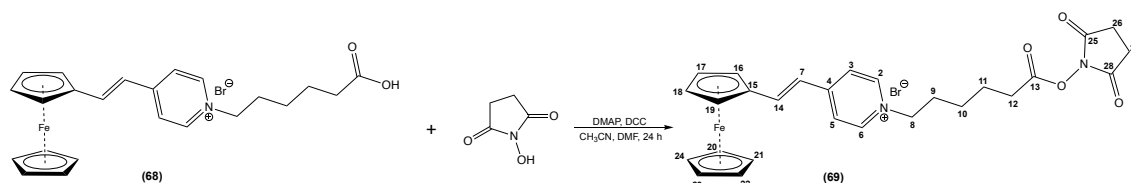
IV.1.2.79. Síntese do brometo (*E*)-1-(5-carboxipentil)-4-(2-(ferrocenil)vinil)piridín-1- -io (68)



Num balão de fundo redondo, colocaram-se 201 mg do brometo de 1-(5-carboxipentil)-4-metilpiridín-1-*io* (7.01×10^{-4} mol, 1.0 eq), 150 mg de ferrocenecarboxaldeído (7.01×10^{-4} mol, 1.0 eq), 138 μ L de piperidina (1.40×10^{-3} mol, 2.0 eq) em 10 mL de CH₃CN (seco). A mistura reacional foi colocada sob agitação magnética a 85 °C durante 30 min. A reação foi monitorizada através de ccd, utilizando como eluente CHCl₃/CH₃OH/H₂O (65:20:2). O produto da reação foi isolado por cromatografia *flash*, usando como eluentes CHCl₃/CH₃OH (8:2), CHCl₃/CH₃OH/H₂O (65:20:2) e CHCl₃/CH₃OH/H₂O (65:35:5), tendo-se obtido 226 mg (η = 65%).

¹H RMN (400 MHz, CD₃OD, δ , ppm): 1.35-1.42 (2H, m, H-10), 1.63-1.70 (2H, m, H-11), 1.95-2.04 (2H, m, H-9), 2.18 (2H, t, J = 7.2, H-12), 4.22 (5H, s, H-20 a H-24 (Cp)), 4.44 (2H, t, J = 7.3, H-8), 4.61 (2H, t, H-17, H-18), 4.75 (2H, t, H-16, H-19), 6.92 (1H, d, $J_{7,14}$ = 15.9, H-7), 7.87 (1H, d, $J_{14,7}$ = 15.9, H-14), 7.99 (2H, d, $J_{3,2}$ = 6.6, H-3, H-5), 8.65 (2H, d, $J_{2,3}$ = 6.6, H-2, H-6). ¹³C RMN (100 MHz, CD₃OD, δ , ppm): 26.6 (C-11), 26.8 (C-10), 31.8 (C-9), 38.5 (C-12), 61.3 (C-8), 70.1 (C-16, C-19), 70.9 (C-20 a C-24 (Cp)), 73.1 (C-17, C-18), 81.2 (C-15), 120.4 (C-7), 123.9 (C-3, C-5), 144.8 (C-2, C-6), 145.8 (C-14), 155.4 (C-4), 182.2 (COOH). UV λ_{max} (nm, CH₃CN): 365, 554. ϵ (cm⁻¹ M⁻¹): 16300.

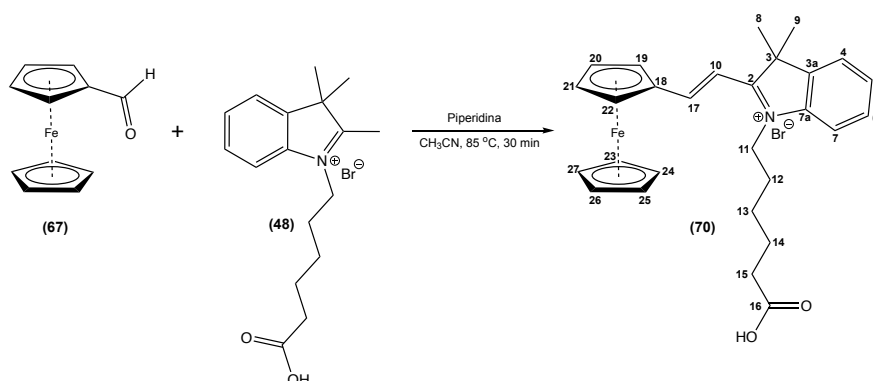
IV.1.2.80. Síntese do brometo de (*E*)-1-(6-((2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi)-6-oxo-hexil)-4-(2-(ferrocenil)vinil)piridín-1-íio (69)



Num balão de fundo redondo, colocaram-se 220 mg de brometo de (*E*)-1-(5-carboxipentil)-4-(2-(ferrocenil)vinil)piridín-1-íio (4.55×10^{-4} mol, 1.0 eq), 112 mg de DCC (5.46×10^{-4} mol, 1.2 eq) e 5.6 mg de DMAP (4.55×10^{-5} mol, 0.1 eq) em 2 mL de DMF (seco) e 8 mL de CH₃CN (seco), e após 5 min adicionou-se 63 mg de *N*-hidroxisuccinimida (5.46×10^{-4} mol, 1.2 eq). A mistura reacional foi colocada sob agitação magnética a temperatura ambiente durante 24 h. A reação foi monitorizada através de ccd, utilizando como eluente CHCl₃/CH₃OH (8:2). O produto da reação foi isolado por cromatografia *flash*, usando como eluentes CHCl₃, CHCl₃/CH₃OH (99:1), CHCl₃/CH₃OH (95:5), CHCl₃/CH₃OH (9:1) e CHCl₃/CH₃OH (8:2), tendo-se obtido 150 mg ($\eta = 57\%$).

¹H RMN (400 MHz, CD₃OD, δ , ppm): 1.37-1.45 (2H, m, H-10), 1.65-1.73 (2H, m, H-11), 1.96-2.04 (2H, m, H-9), 2.37 (2H, t, $J = 7.3$, H-12), 3.65 (4H, s, H-26, H-27), 4.23 (5H, s, H-20 a H-24 (Cp)), 4.46 (2H, t, $J = 7.4$, H-8), 4.62 (2H, t, $J_{17,16} = 1.9$, H-17, H-18), 4.76 (2H, t, $J_{16,17} = 1.9$, H-16, H-19), 6.93 (1H, d, $J_{7,14} = 16.0$, H-7), 7.90 (1H, d, $J_{14,7} = 16.0$, H-14), 8.01 (2H, d, $J_{3,2} = 6.9$, H-3, H-5), 8.66 (2H, d, $J_{2,3} = 6.9$, H-2, H-6). ¹³C RMN (100 MHz, CD₃OD, δ , ppm): 25.2 (C-11), 26.5 (C-10), 31.8 (C-9), 34.3 (C-12), 52.04 (C-26, C-27), 61.2 (C-8), 70.2 (C-16, C-19), 71.0 (C-20 a C-24 (Cp)), 73.2 (C-17, C-18), 81.1 (C-15), 120.3 (C-7), 123.9 (C-3, C-5), 144.8 (C-2, C-6), 146.1 (C-14), 155.5 (C-4), 175.6 (C-13), 179.3 (C-25, C-28). UV λ_{\max} (nm, CH₃CN): 365, 538. ϵ (cm⁻¹ M⁻¹): 16300.

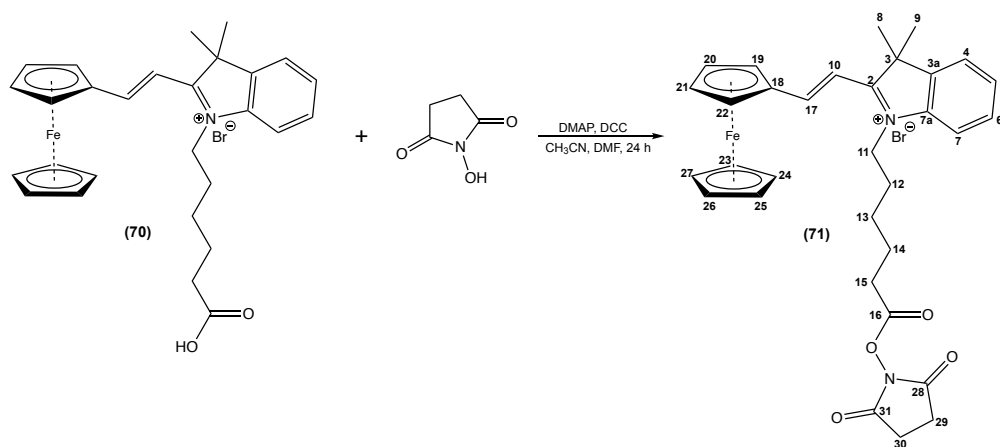
IV.1.2.81. Síntese do brometo (*E*)-1-(5-carboxipentil)-3,3-dimetil-2-(2-(ferrocenil)vinil)-3*H*-indol-1-íon (70)



Num balão de fundo redondo, colocaram-se 248 mg do brometo de 1-(5-carboxipentil)-2,3,3-trimetil-3*H*-indol-1-íon (7.01×10^{-4} mol, 1.0 eq), 150 mg de ferrocenecarboxaldeído (7.01×10^{-4} mol, 1.0 eq), 138 μ L de piperidina (1.40×10^{-3} mol, 2.0 eq) em 10 mL de CH₃CN (seco). A mistura reacional foi colocada sob agitação magnética a 85 °C durante 30 min. A reação foi monitorizada através de ccd, utilizando como eluente CHCl₃/CH₃OH (8:2). O produto da reação foi isolado por cromatografia *flash*, usando como eluentes CHCl₃, CHCl₃/CH₃OH (99:1), CHCl₃/CH₃OH (95:5) e CHCl₃/CH₃OH (8:2), tendo-se obtido 190 mg (η = 49%).

¹H RMN (400 MHz, CD₃OD, δ , ppm): 1.52-1.54 (2H, m, H-13), 1.68-1.72 (2H, m, H-14), 1.85 (6H, s, H-8, H-9), 1.92-1.96 (2H, m, H-12), 2.28 (2H, t, J = 6.4, H-15), 4.38 (5H, s, H-23 a H-27 (Cp)), 4.50 (2H, t, J = 7.1, H-11), 5.11 (2H, sl, H-20, H-21), 5.20 (2H, sl, H-19, H-22), 7.06 (1H, d, $J_{10,17}$ = 15.6, H-10), 7.59 (2H, m, H-5, H-6), 7.74 (2H, m, H-4, H-7), 8.61 (1H, d, $J_{17,10}$ = 15.6, H-17). ¹³C RMN (100 MHz, CD₃OD, δ , ppm): 26.3 (C-14), 26.8 (C-8, C-9), 27.3 (C-13), 28.9 (C-12), 36.3 (C-15), 47.0 (C-11), 53.2 (C-3), 72.7 (C-19, C-22), 72.9 (C-23 a C-27 (Cp)), 77.8 (C-20, C-21), 81.0 (C-18), 108.4 (C-10), 115.1 (C-7), 124.1 (C-4), 129.6 (C-5), 130.5 (C-6), 142.6 (C-7a), 144.2 (C-3a), 161.8 (C-17), 179.4 (C-2), 180.9 (COOH). UV λ_{\max} (nm, CH₃CN): 418, 614. ϵ (cm⁻¹ M⁻¹): 24200.

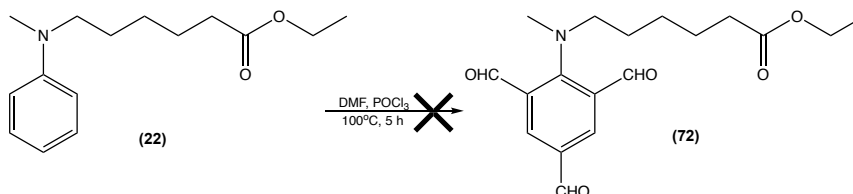
IV.1.2.82. Síntese do brometo (*E*)-1-(6-((2,5-dioxociclopentil)oxi)-6-oxo-hexil)-3,3-dimetil-2-(2-(ferrocenil)vinil)-3*H*-indol-1-io (71)



Num balão de fundo redondo, colocaram-se 250 mg de brometo de (*E*)-1-(5-carboxipentil)-3,3-dimetil-2-(2-(ferrocenil)vinil)-3*H*-indol-1-io (4.54×10^{-4} mol, 1.0 eq), 112 mg de DCC (5.45×10^{-4} mol, 1.2 eq) e 5.5 mg de DMAP (4.54×10^{-5} mol, 0.1 eq) em 2 mL de DMF (seco) e 8 mL de CH₃CN (seco), e após 5 min adicionou-se 63 mg de *N*-hidroxisuccinimida (5.45×10^{-4} mol, 1.2 eq). A mistura reacional foi colocada sob agitação magnética a temperatura ambiente durante 24 h. A reação foi monitorizada através de ccd, utilizando como eluente CHCl₃/CH₃OH (8:2). O produto da reação foi isolado por cromatografia *flash*, usando como eluentes CHCl₃, CHCl₃/CH₃OH (99:1), CHCl₃/CH₃OH (95:5) e CHCl₃/CH₃OH (8:2), tendo-se obtido 190 mg (η = 65%).

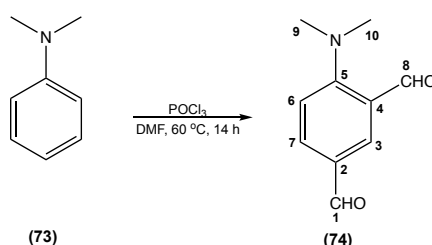
¹H RMN (400 MHz, CD₃OD, δ , ppm): 1.46-1.49 (2H, m, H-13), 1.61-1.67 (2H, m, H-14), 1.84 (6H, s, H-8, H-9), 1.87-1.98 (2H, m, H-12), 2.40 (1H, t, J = 7.1, H-15a), 2.69 (1H, t, J = 6.9, H-15b), 2.80 (2H, s, H-29/H-30), 3.40 (1H, t, H-29/H-30), 3.47 (1H, t, H-29/H-30), 4.36 (5H, s, H-23 a H-27 (Cp)), 4.48 (2H, t, J = 6.8, H-11), 5.10 (2H, sl, H-20, H-21), 5.18 (2H, sl, H-19, H-22), 7.05 (1H, d, $J_{10,17}$ = 15.6, H-10), 7.58 (2H, m, H-5, H-6), 7.72 (2H, m, H-4, H-7), 8.60 (1H, d, $J_{17,10}$ = 15.6, H-17). ¹³C RMN (100 MHz, CD₃OD, δ , ppm): 26.5 (C-14), 26.8 (C-8, C-9), 27.3 (C-13), 29.1 (C-12), 33.4 (C-15), 43.9 (C-29/C-30), 47.0 (C-11), 47.9 (C-29/C-30), 53.3 (C-3), 72.7 (C-19, C-22), 72.9 (C-23 a C-27 (Cp)), 77.8 (C-20, C-21), 81.0 (C-18), 108.5 (C-10), 115.2 (C-7), 124.1 (C-4), 129.6 (C-5), 130.5 (C-6), 142.6 (C-7a), 144.3 (C-3a), 161.9 (C-17), 170.2 (C-28/C-31), 171.8 (C-28/C-31), 173.1 (C-2), 181.1 (C-16). UV λ_{\max} (nm, CH₃CN): 409, 614. ϵ (cm⁻¹ M⁻¹): 24200.

IV.1.2.83. Tentativa de síntese do ácido 6-(metil(2,4,6-triformilfenil)amino)hexanoico (72)



Num balão de fundo redondo, colocaram-se 335 μL de DMF (4.33×10^{-3} mol; 12.0 eq) e 135 μL de POCl_3 (1.44×10^{-3} mol; 4.0 eq) em banho de gelo. A mistura reacional foi agitada durante 5 min, retirou-se o banho de gelo e de seguida adicionou-se 90 mg de 6-(metil(fenil)amino)hexanoato de etilo (3.61×10^{-4} mol; 1.0 eq). A mistura reacional foi colocada sob agitação magnética a uma temperatura de 100 $^{\circ}\text{C}$ durante 3 h. Após o tempo referido deixou-se arrefecer à temperatura ambiente e adicionou-se uma solução aquosa saturada de NaCO_2CH_3 , permanecendo em agitação à temperatura ambiente durante 2 h. A reação foi monitorizada através de ccd, utilizando como eluente CH_2Cl_2 .

IV.1.2.84. Síntese do 4-(dimetilamino)isoftalaldeído (74)

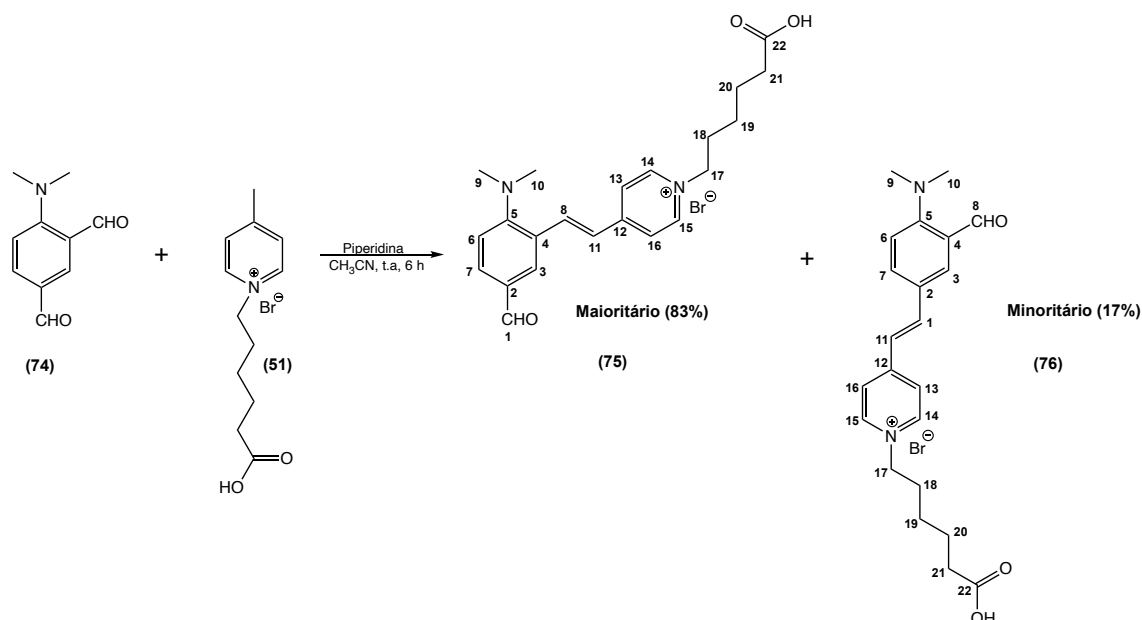


Num balão de fundo redondo, colocaram-se 15.5 mL de DMF (1 mol; 10.0 eq) e 18.6 mL de POCl_3 (1 mol; 10.0 eq) em banho de gelo. A mistura reacional foi agitada até solidificar, retirou-se o banho de gelo e de seguida adicionou-se 2.5 mL de *N,N*-dimetil-anilina (0.1 mol; 1.0 eq). A mistura reacional foi colocada sob agitação magnética a uma temperatura de 60 $^{\circ}\text{C}$ durante 10 h. Após o tempo referido deixou-se arrefecer à temperatura ambiente e adicionou-se a mistura reacional a um *erlenmeyer* com 60 mL de água gelada, a mistura reacional permaneceu em agitação durante 4 h. Neutralizou-se uma solução aquosa de NaOH (30%). A reação foi monitorizada através de ccd, utilizando como eluente *n*-hexano/ AcOEt (3:1). Seguidamente procedeu-se à extração líquido/líquido da mistura reacional através sistema $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{H}_2\text{O}$. Secou-se a fase orgânica com sulfato de sódio anidro e evaporou-se à secua no evaporador rotativo. O

produto da reação, foi isolado por cromatografia *flash*, usando como eluente um gradiente *n*-hexano/AcOEt (3:1) e CH₂Cl₂, tendo-se obtido 4.5 g (η = 25%).

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃, δ , ppm): 3.12 (6H, s, H-9, H-10), 7.00 (1H, d, $J_{6,7}$ = 8.8, H-6), 7.90 (1H, dd, $J_{7,6}$ = 8.8, $J_{7,3}$ = 2.2, H-7), 8.18 (1H, $J_{3,7}$ = 2.2, H-3), 9.84 (1H, s, H-1), 10.02 (1H, s, H-8).

IV.1.2.85. Síntese do brometo de (*E*)-1-(5-carboxipentil)-4-(2-(dimetilamino)-5-formilestiril)piridín-1-io (75) e brometo de (*E*)-1-(5-carboxipentil)-4-(4-(dimetilamino)-3-formilestiril)piridín-1-io (76)



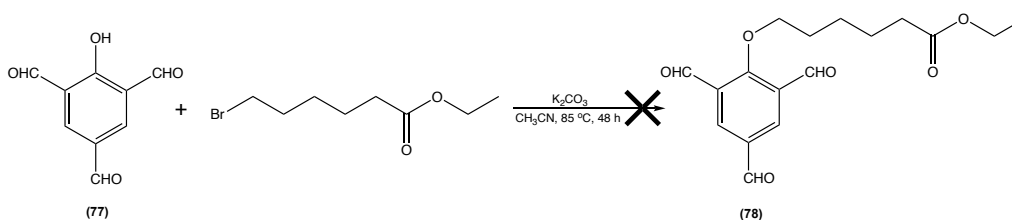
Num balão de fundo redondo, colocaram-se 100 mg de 4-(dimetilamino)isofalaldeído (5.64×10^{-4} mol; 1.0 eq), 145 mg de brometo de 1-(5-carboxipentil)-4-metilpiridín-1-io (5.08×10^{-4} mol; 0.9 eq) e 111 μ L de piperidina (1.13×10^{-3} mol; 1.0 eq) em 10 mL de CH₃CN (seco). A mistura reacional foi colocada sob agitação magnética a uma temperatura ambiente durante 6 h. A reação foi monitorizada através de ccd, utilizando como eluente CHCl₃/CH₃OH (8:2). Os dois produtos da reação, foram isolados em conjunto por cromatografia *flash*, usando como eluentes CHCl₃, CHCl₃/CH₃OH (85:15) e CHCl₃/CH₃OH/H₂O (65:35:5) e quantificados por ¹H-RMN.

Composto **75** (83%)

^1H RMN (400 MHz, CD_3OD , δ , ppm): 1.38-1.45 (2H, m, H-19), 1.64-1.70 (2H, m, H-20), 1.99-2.06 (2H, m, H-18), 2.19 (2H, t, $J = 7.2$, H-21), 2.99 (6H, s, H-9, H-10), 4.54 (2H, t, $J = 7.4$, H-17), 7.21 (1H, d, $J_{6,7} = 8.6$, H-6), 7.41 (1H, d, $J_{11,8} = 16.3$, H-11), 7.86 (1H, dd, $J_{7,6} = 8.6$, $J_{7,3} = 2.0$, H-7), 8.03 (1H, d, $J_{8,11} = 16.3$, H-8), 8.19 (1H, $J_{3,7} = 2.0$, H-3), 8.20 (2H, d, $J_{13,14} = 6.9$, H-13, H-16), 8.81 (2H, d, $J_{14,13} = 6.9$, H-14, H-15), 9.86 (1H, s, H-1).

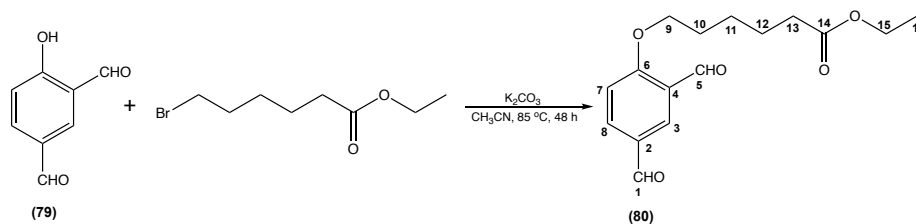
Composto **76** (17%)

^1H RMN (400 MHz, CD_3OD , δ , ppm): 1.38-1.45 (2H, m, H-19), 1.64-1.70 (2H, m, H-20), 1.82-1.84 (2H, m, H-18), 2.19 (2H, t, $J = 7.2$, H-21), 2.99 (6H, s, H-9, H-10), 4.50 (2H, t, $J = 7.4$, H-17), 7.16 (1H, d, $J_{6,7} = 8.9$, H-6), 7.27 (1H, d, $J_{11,1} = 16.2$, H-11), 7.87 (1H, dd, $J_{7,6} = 8.9$, $J_{7,3} = 2.0$, H-7), 7.90 (1H, d, $J_{1,11} = 16.2$, H-1), 8.09 (2H, d, $J_{13,14} = 7.0$, H-13, H-16), 8.19 (1H, $J_{3,7} = 2.0$, H-3), 8.73 (2H, d, $J_{14,13} = 7.0$, H-14, H-15), 10.08 (1H, s, H-8).

IV.1.2.86. Tentativa de síntese do 6-(2,4,6-triformilfenoxi)hexanoato de etilo (**78**)

Num balão de fundo redondo, colocaram-se 500 mg de 2-hidroxibenzeno-1,3,5-tricarbaldeído (2.80×10^{-3} mol; 1.0 eq), 552 μL de 6-bromo-hexanoato de etilo (3.10×10^{-3} mol; 1.1 eq), 235 mg de carbonato de potássio (1.70×10^{-3} mol; 0.6 eq) em 12 mL de CH_3CN (seco). A mistura reacional foi colocada sob agitação magnética a uma temperatura de 85°C durante 48 h. A reação foi monitorizada através de ccd, utilizando como eluente $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (95:5).

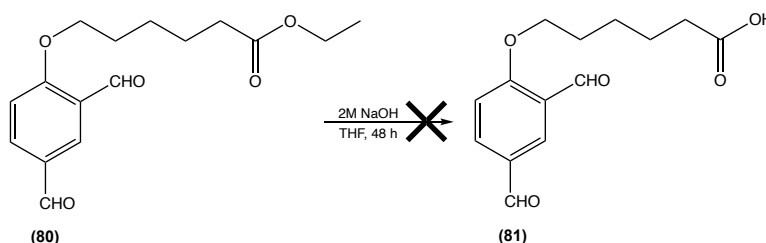
IV.1.2.87. Síntese do 6-(2,4-diformilfenoxi)hexanoato de etilo (80)



Num balão de fundo redondo, colocaram-se 500 mg de 4-hidroxi-isoftalaldeído (3.33×10^{-3} mol; 1.0 eq), 652 μ L de 6-bromo-hexanoato de etilo (3.66×10^{-3} mol; 1.1 eq), 277 mg de carbonato de potássio (2.00×10^{-2} mol; 0.6 eq) em 12 mL de CH_3CN (seco). A mistura reacional foi colocada sob agitação magnética a uma temperatura de 85 °C durante 48 h. A reação foi monitorizada através de ccd, utilizando como eluente CH_2Cl_2 . O produto da reação, foi isolado por cromatografia *flash*, usando como eluente CH_2Cl_2 , tendo-se obtido 970 g ($\eta = 99\%$).

^1H RMN (400 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 1.25 (3H, t, $J_{16,15} = 7.2$, H-16), 1.51-1.59 (2H, m, H-11), 1.69-1.76 (2H, m, H-12), 1.88-1.95 (2H, m, H-10), 2.35 (2H, t, $J = 7.4$, H-13), 4.12 (2H, q, $J_{15,16} = 7.2$, H-15), 4.20 (2H, t, $J = 6.4$, H-9), 7.11 (1H, d, $J_{7,8} = 8.8$, H-7), 8.50 (1H, dd, $J_{8,7} = 8.8$, $J_{8,3} = 2.2$, H-8), 8.32 (1H, $J_{3,8} = 2.2$, H-3), 9.94 (1H, s, H-1), 10.50 (1H, s, H-5). ^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 14.4 (C-16), 24.7 (C-12), 25.6 (C-11), 28.8 (C-10), 34.2 (C-13), 60.5 (C-15), 69.1 (C-9), 113.2 (C-7), 125.0 (C-4), 129.6 (C-2), 132.1 (C-3), 135.8 (C-8), 165.5 (C-6), 173.6 (C-14), 188.8 (C-5), 190.4 (C-1).

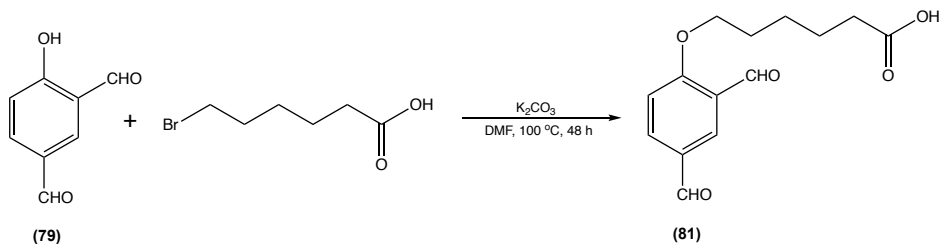
IV.1.2.88. Tentativa de síntese do ácido 6-(2,4-diformilfenoxi)hexanóico (81)



Num balão de fundo redondo, colocaram-se 973 g de 6-(2,4-diformilfenoxi)hexanoato de etilo (3.30×10^{-2} mol; 1.0 eq) solubilizou-se em 10 mL de THF e adicionou-se 8.5 mL de uma solução de NaOH 2M (1.67×10^{-2} mol, 5.0 eq). A mistura reacional foi colocada sob agitação magnética a temperatura ambiente durante 48 h. Após esse tempo

reacional neutralizou-se com HCl 6M. A reação foi monitorizada através de ccd, utilizando como eluente $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (95:5). Os possíveis produtos da reação, foram isolados por cromatografia *flash*, e agrupados em três frações distintas usando como eluente $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (95:5).

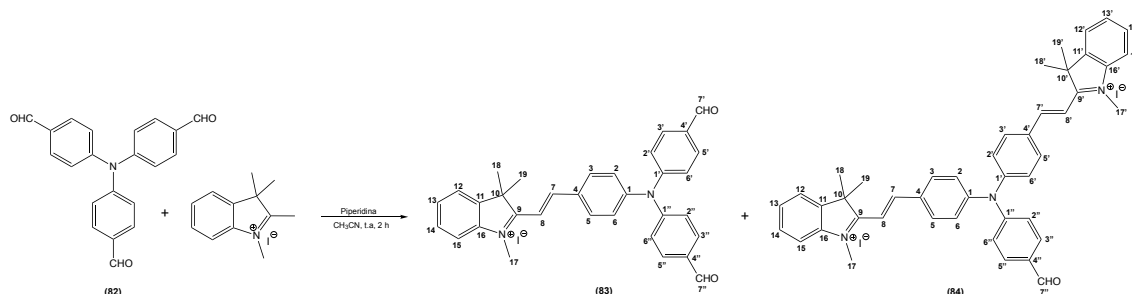
IV.1.2.89. Tentativa de síntese do ácido 6-(2,4-diformilfenoxi)hexanóico (81)



Num balão de fundo redondo, colocaram-se 100 mg de 4-hidroxi-isoftalaldeído (6.66×10^{-4} mol; 1.0 eq), 195 μL de ácido 6-bromo-hexanóico (9.99×10^{-4} mol; 1.5 eq), 55 mg de carbonato de potássio (3.95×10^{-4} mol; 0.6 eq) em 13 mL de DMF (seco). A mistura reacional foi colocada sob agitação magnética a uma temperatura de 100°C durante 48 h. A reação foi monitorizada através de ccd, utilizando como eluente CH_2Cl_2 . O possível produto da reação, foi isolado por cromatografia *flash*, usando como eluente $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (95:5), tendo-se obtido o produto em quantidades vestigiais ($\eta \ll 5\%$).

^1H RMN (400 MHz, CD_3OD , δ , ppm): 1.40-1.45 (2H, m, H-11), 1.62-1.72 (2H, m, H-12), 1.91-1.95 (2H, m, H-10), 2.35 (2H, t, $J = 7.2$, H-13), 4.28 (2H, t, $J = 6.3$, H-9), 7.36 (1H, d, $J_{6,7} = 8.7$, H-6), 8.15 (1H, dd, $J_{7,6} = 8.7$, $J_{7,3} = 2.2$, H-7), 8.29 (1H, $J_{3,7} = 2.2$, H-3), 9.91 (1H, s, H-1), 10.46 (1H, s, H-8).

IV.1.2.90. Síntese do iodeto de (*E*)-2-(4-(bis(4-formilfenil)amino)estiril)-1,3,3-trimetil-3*H*-indol-1-íio (83**) e do iodeto de 2,2'-((1*E*,1'*E*)-(((4-formilfenil)azanedi-il)bis(4,1-fe-nileno))bis(eteno-2,1-diil))bis(1,3,3-trimetil-3*H*-indol-1-íio) (**84**)**



Num balão de fundo redondo, colocaram-se 400 mg de 4,4',4''-nitritotribenzaldeído (6.07×10^{-4} mol, 1.0 eq), 732 mg do iodeto de 1,2,3,3-tetrametil-3*H*-indol-1-íio (1.21×10^{-3} mol, 2.0 eq), 480 μ l de piperidina (2.43×10^{-3} mol, 4.0 eq) em 10 mL de CH₃CN (seco). A mistura reacional foi colocada sob agitação magnética a temperatura ambiente durante 2 h. A reação foi monitorizada através de ccd, utilizando como eluente CHCl₃/CH₃OH (9:1). Os produtos da reação foram isolados por cromatografia *flash*, usando como eluentes CHCl₃/CH₃OH (95:5), CHCl₃/CH₃OH (9:1) e CHCl₃/CH₃OH (8:2), tendo-se obtido 382 mg (η = 54%) do produto **83** e 268 mg (η = 38%) do produto **84**.

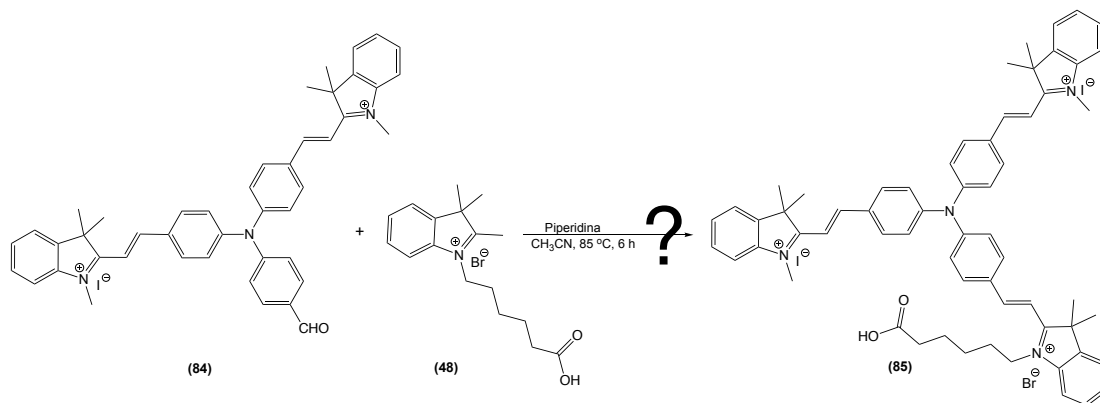
Composto 83 (54%)

¹H RMN (400 MHz, (CD₃)₂SO, δ , ppm): 1.80 (6H, s, H-18, H-19), 4.14 (3H, s, H-17), 7.26 (2H, d, $J_{2,3} = 8.8$, H-2, H-6), 7.30 (4H, d, $J_{2',3'} = J_{2'',3''} = 8.6$, H-2', H-2'', H-6', H-6''), 7.59-7.66 (3H, m, H-8, H-13, H-14), 7.87-7.91 (2H, m, H-12, H-15), 7.93 (4H, d, $J_{3',2'} = J_{3'',2''} = 8.6$, H-3', H-3'', H-5', H-5''), 8.24 (2H, d, $J_{3,2} = 8.8$, H-3, H-5), 8.42 (1H, d, $J_{7,8} = 16.3$, H-7), 9.95 (2H, s, H-7', H-7'').

Composto 84 (38%)

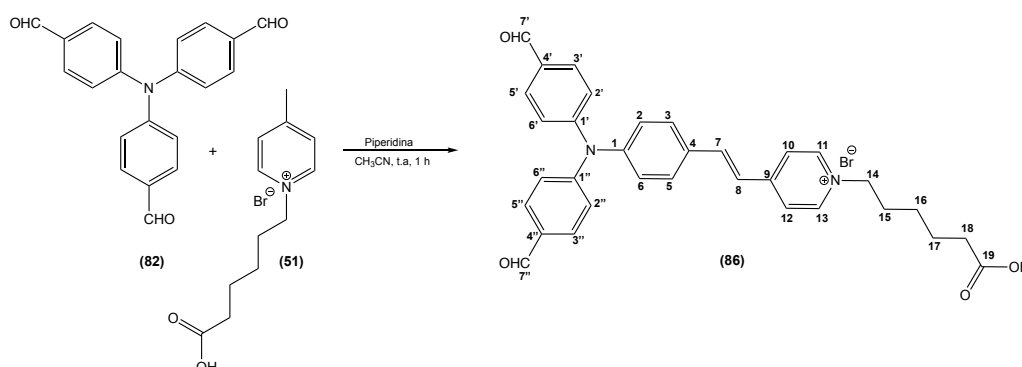
¹H RMN (400 MHz, (CD₃)₂SO, δ , ppm): 1.80 (12H, s, H-18, H-18', H-19, H-19'), 4.14 (6H, s, H-17, H-17'), 7.30 (4H, d, $J_{2,3} = J_{2',3'} = 8.8$, H-2, H-2', H-6, H-6'), 7.33 (2H, d, $J_{2'',3''} = 8.6$, H-2'', H-6''), 7.60-7.66 (6H, m, H-8, H-8', H-13, H-13', H-14, H-14'), 7.87-7.91 (4H, m, H-12, H-12', H-15, H-15'), 7.96 (2H, d, $J_{3'',2''} = 8.6$, H-3'', H-5''), 8.26 (4H, d, $J_{3,2} = J_{3',2'} = 8.8$, H-3, H-3', H-5, H-5'), 8.42 (2H, d, $J_{7,8} = 16.2$, H-7, H-7'), 9.98 (1H, s, H-7'').

IV.1.2.91. Síntese do brometo (iodeto) de 2,2'-((1*E*,1'*E*)-(((4-((*E*)-2-(1-(5-carboxipentil)-3,3-dimetil-3*H*-indol-1-ilo-2-il)vinil)fenil)azanediil)bis(4,1-fenileno))-bis(etene-2,1-diil))bis(1,3,3-trimetil-3*H*-indol-1-ilo) (85)



Num balão de fundo redondo, colocaram-se 215 mg do iodeto de 2,2'-((1*E*,1'*E*)-(((4-formilfenil)azanediil)bis(4,1-fenileno))bis(etene-2,1-diil))bis(1,3,3-trimetil-3*H*-indol-1-ilo) (2.40×10^{-4} mol, 1.0 eq), 102 mg do brometo de 1-(5-carboxipentil)-2,3,3-trimetil-3*H*-indol-1-ilo (1.21×10^{-3} mol, 1.2 eq), 57 μ L de piperidina (5.76×10^{-3} mol, 2.4 eq) em 10 mL de CH₃CN (seco). A mistura reacional foi colocada sob agitação magnética a 85 °C durante 6 h. A reação foi monitorizada através de ccd, utilizando como eluente CHCl₃/CH₃OH/H₂O (65:10:1).

IV.1.2.92. Síntese do brometo de (*E*)-4-(4-(bis(4-formilfenil)amino)estiril)-1-(5-carboxipentil)piridín-1-ilo (86)

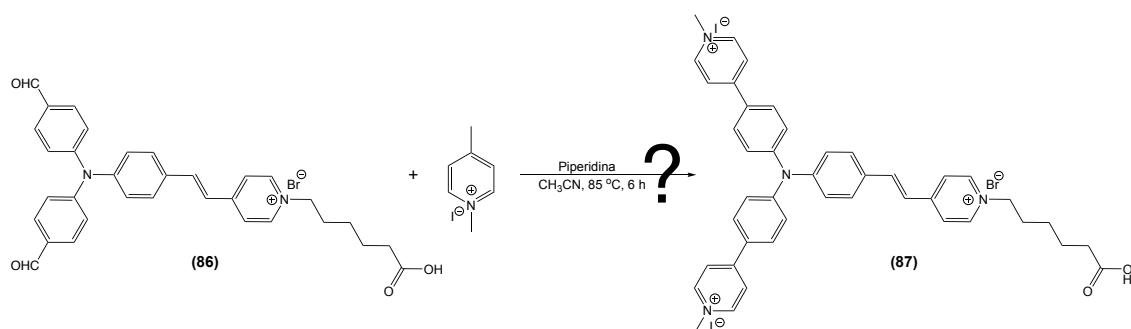


Num balão de fundo redondo, colocaram-se 219 mg do brometo de 1-(5-carboxipentil)-4-metilpiridín-1-ilo (7.59×10^{-4} mol, 1.0 eq), 250 mg de 4,4',4''-nitriлотribenzaldeído (7.59×10^{-4} mol, 1.0 eq), 150 μ L de piperidina (1.52×10^{-3} mol, 2.0 eq) em 10 mL de CH₃CN

(seco). A mistura reacional foi colocada sob agitação magnética a temperatura ambiente durante 1 h. A reação foi monitorizada através de ccd, utilizando como eluente $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ (65:20:2). O produto da reação foi isolado por cromatografia *flash*, usando como eluente $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ (65:20:2), tendo-se obtido 250 mg (η = 68%).

^1H RMN (400 MHz, CD_3OD , δ , ppm): 1.39-1.47 (2H, m, H-16), 1.65-1.70 (2H, m, H-17), 2.00-2.05 (2H, m, H-15), 2.27 (2H, t, J = 7.2, H-18), 4.55 (2H, t, J = 7.3, H-14), 7.21 (2H, d, $J_{2,3}$ = 8.6, H-2, H-6), 7.24 (4H, d, $J_{2',3'} = J_{2'',3''} = 8.8$, H-2', H-2'', H-6', H-6''), 7.41 (1H, d, $J_{8,7} = 16.2$, H-8), 7.79 (2H, d, $J_{3,2} = 8.6$, H-3, H-5), 7.85 (4H, d, $J_{3',2'} = J_{3'',2''} = 8.8$, H-3', H-3'', H-5', H-5''), 7.95 (1H, d, $J_{7,8} = 16.2$, H-7), 8.18 (2H, d, $J_{10,11} = 6.9$, H-10, H-12), 8.81 (2H, d, $J_{11,10} = 6.9$, H-11, H-13), 9.87 (2H, s, H-7', H-7'').

IV.1.2.93. Síntese do brometo (iodeto) de (*E*)-4,4'-(((4-(2-(1-(5-carboxipentil)piridín-1-io-4-il)vinil)fenil)azanediil)bis(4,1-fenileno))bis(1-metilpiridín-1-io) (87)



Num balão de fundo redondo, colocaram-se 140 mg do brometo de (*E*)-4-(4-(bis(4-formilfenil)amino)estiril)-1-(5-carboxipentil)piridín-1-io (2.01×10^{-4} mol, 1.0 eq), 104 mg de iodeto 1,4-dimetilpiridín-1-io (4.42×10^{-4} mol, 1.0 eq), 87 μL de piperidina (8.84×10^{-4} mol, 2.0 eq) em 2 mL de DMF (seco) e 8 mL de CH_3CN (seco). A mistura reacional foi colocada sob agitação magnética a 85 °C durante 6 h. A reação foi monitorizada através de ccd, utilizando como eluente $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ (65:35:5).

IV.2. Cálculos DFT e TDDFT

Para interpretar as propriedades fotofísicas observadas, foram efetuados cálculos da teoria do funcional da densidade (DFT) e da teoria do funcional da densidade dependente do tempo (TDDFT), utilizando o programa informático Gaussian 16.^[227] O funcional híbrido meta-GGA M062X e o conjunto de bases padrão 6-31G(d,p) foram utilizados para otimizar as geometrias do estado fundamental.^[228] As geometrias do estado excitado foram otimizadas utilizando TDDFT com o mesmo funcional e conjunto de bases. Os efeitos do solvente foram incorporados através do modelo contínuo polarizado implícito (PCM).^[233, 234] A análise vibracional não mostrou frequências imaginárias, confirmando que as estruturas representam os mínimos verdadeiros. Nos cálculos espectrais TDDFT, foi utilizado o conjunto de bases triple-zeta 6-311+G(d,p).

IV.3. Técnica de Hibridação *in situ* fluorescente (FISH)

IV.3.1. Sondas oligonucleotídicas

Os oligonucleótidos amino-modificados 5'-AC6, EUK516-mod (5'-ACCAGACTTGCCCTCC-3') e EUB338-mod (5'-GCTGCCTCCCGTAGGAGT-3'), e direcionados às regiões de ARNr de células eucarióticas (leveduras) e procarióticas (bactérias), respetivamente, foram adquiridos à Eurofins Scientific e STAB Vida (Portugal) e estão representadas na Figura IV.1.

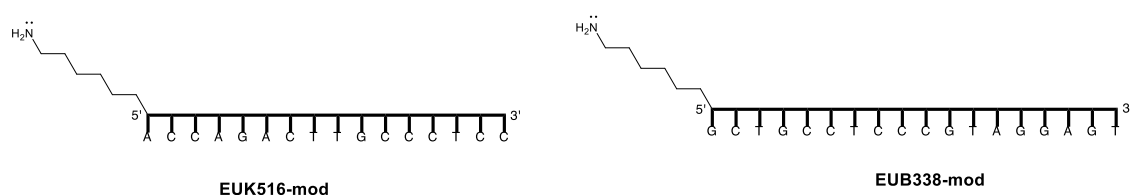


Figura IV.1. Sequências de oligonucleótidos amino-modificados 5'-AC6 comerciais EUK516-mod (5'-ACCAGACTTGCCCTCC-3') e EUB338-mod (5'-GCTGCCTCCCGTAGGAGT-3').

Para o desenvolvimento destas novas sondas oligonucleotídicas fluorescentes foi utilizado um protocolo experimental descrito na literatura baseado na marcação química de oligonucleótidos com marcadores fluorescentes.^[23] Esta marcação consiste numa ligação covalente entre os marcadores fluorescentes (**11**, **26**, **36**, **38**, **42**, **44**, **58**,

60, 63, 69 ou **71**) e as sequências de oligonucleótidos amino-modificados 5'-AC6 comerciais (EUK516-mod ou EUB338-mod) através do grupo amino posicionado na extremidade 5'. É importante referir que, a utilização de espaçadores de carbono para acoplar os marcadores fluorescentes aos oligonucleótidos, para além de permitir aumentar a intensidade do sinal de fluorescência quando comparado com o obtido utilizando uma sonda diretamente conjugada, também permite que reação entre marcador fluorescente e a sequência de oligonucleótidos seja mais facilitada devido ao superior desimpedimento estereoquímico.^[235, 236]

Neste trabalho foi utilizado uma metodologia (descrita na secção IV.3.4) para a produção de novas sondas oligonucleotídicas, tendo-se obtido onze sondas dirigidas à região de ARNr de células eucarióticas (EUK516-(**11**), EUK516-(**26**), EUK516-(**36**), EUK516-(**38**), EUK516-(**42**), EUK516-(**44**), EUK516-(**58**), EUK516-(**60**), EUK516-(**63**), EUK516-(**69**) e EUK516-(**71**)) e outras onze sondas dirigidas à região de ARNr de células procarióticas (EUB338-(**11**), EUB338-(**26**), EUB338-(**36**), EUB338-(**38**), EUB338-(**42**), EUB338-(**44**), EUB338-(**58**), EUB338-(**60**), EUB338-(**63**), EUB338-(**69**) e EUB338-(**71**)) (Figura IV.2).

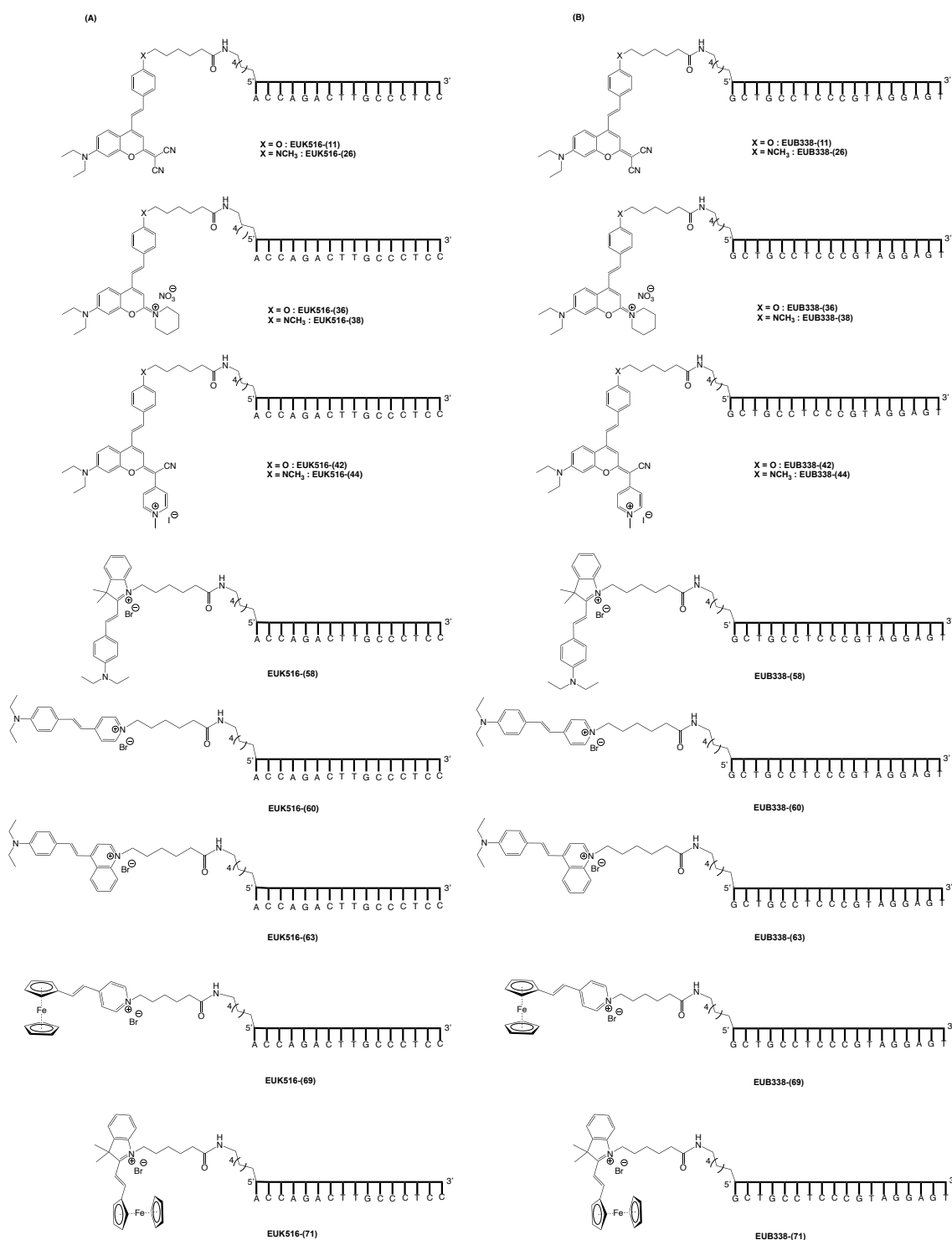


Figura IV.2. Sondas oligonucleotídicas fluorescentes: **(A)** Sondas oligonucleotídicas complementares ao ARN de células eucarióticas; **(B)** Sondas oligonucleotídicas complementares ao ARN de células procarióticas.

As sondas universais EUB338-Cy3 (5'Cy3-GCTGCCTCCCGTAGGAGT-3') e EUK516-Cy3 (5'Cy3-ACCAGACTTGCCCTCC-3') direcionado às regiões ARNr de células procarióticas (bactérias) e eucarióticas (leveduras), respetivamente, foram

usadas como controlos da hibridação. Estas sondas têm como marcadores fluorescentes uma cianina (Cy3[®], Figura IV.3) ligada à extremidade 5' do oligonucleótido.

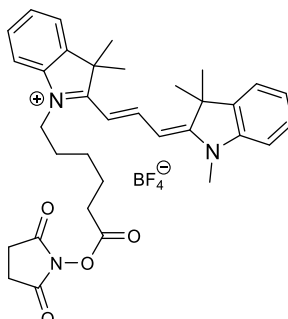


Figura IV.3. Estrutura da cianina Cy3[®].

IV.3.2. Cultura dos microrganismos envolvidos na técnica FISH

Foram selecionados dois microrganismos como modelos biológicos: **i)** levedura, *Saccharomyces cerevisiae* e **ii)** bactéria, *Bacillus sp.* pertencentes à coleção de culturas do Laboratório de Biodegradação e Biotecnologia do Laboratório HERCULES (Universidade de Évora). As células de leveduras e de bactérias foram cultivadas durante 2 dias (30 °C) utilizando YPD-agar (20.0 g/L de glucose, 20.0 g/L de peptona, 10.0 g/L de extrato de levedura e 20.0 g/L de ágar, pH 6.0) e ágar nutriente (5.0 g/L de peptona, 3.0 g/L de extrato de carne de vaca em pó e 15.0 g/L de ágar, pH 7.4), respetivamente. As referidas culturas foram posteriormente armazenadas a 4 °C. Para preparar os inóculos, as células foram ressuspensas em 2.0 mL de soro fisiológico. As culturas de células de leveduras e de bactérias foram inoculadas em frascos de *erlenmeyer* (250 mL) contendo 100 mL de YPD e NB, respetivamente, e posteriormente incubados a 30 °C com agitação contínua a 120 rpm. As células foram recolhidas durante as fases exponenciais de crescimento, que ocorreram 6 h após a inoculação, e posteriormente lavadas com uma solução tampão PBS 10X (NaCl 130 mM, NaH₂PO₄ 8 mM, KCl 2.7 mM, KH₂PO₄ 1.5 mM, pH 7.2).

IV.3.3. Soluções para a técnica de Hibridação *in situ* Fluorescente

Solução-tampão de bicarbonato de sódio NaHCO₃ [0.1 M]:

Num balão volumétrico, colocaram-se 84.0 mg de bicarbonato de sódio em 10.0 mL de água RNase free. A solução foi colocada em agitação à temperatura ambiente durante alguns minutos, e após a solubilização completa, adicionou-se lentamente uma solução de HCl [1 M] até se atingir um valor de pH entre 8.3 e 8.5.

Soluções dos marcadores fluorescentes:

As soluções dos marcadores fluorescentes (11, 26, 36, 38, 42, 44, 58, 60, 63, 69 ou 71) foram preparadas com uma concentração de 23 mM em DMSO anidro. As soluções dos marcadores foram guardadas no congelador (-20 °C).

Soluções dos oligonucleótidos EUK516-mod e EUB338-mod:

Adicionou-se ao microtubo de cada oligonucleótido uma solução-tampão de bicarbonato de sódio NaHCO₃ [0.1 M] para obtenção de uma concentração final de 200 µM.

IV.3.4. Marcação dos oligonucleótidos com os marcadores fluorescentes

A massa necessária do marcador fluorescente (éster NHS) foi calculada, considerando um excesso molar de 8 equivalentes de éster NHS: $\text{Massa do éster NHS [mg]} = 8 \times \text{Massa do oligonucleótido modificado [mg]} \times \text{Massa molar do éster NHS [g/mol]} / \text{Massa molar do oligonucleótido modificado [g/mol]}$. Determinou-se o volume total da mistura de reação, considerando uma concentração final de 200 µM (200×10^{-6} M). O éster NHS foi dissolvido, em 1/10 do volume total da reação em DMSO, e em seguida, dissolveu-se o oligonucleótido modificado em 9/10 do volume total da reação numa solução de bicarbonato de sódio 0.1 M. A solução do éster NHS foi adicionada à solução de oligonucleótido modificado e agitada vigorosamente durante 1 min com o auxílio de um agitador vortex. Deixou-se a reação em agitação durante 12 h num agitador orbital a 20 °C (150 rpm), protegida da luz. Adicionou-se à mistura reacional 1/10 do volume total de uma solução de NaCl [3 M] e 2.5 vezes o volume de EtOH absoluto a -20 °C. Agitou-se muito bem com o auxílio de um agitador vortex e incubou-se durante 30 min a -20 °C. Após a incubação, a mistura reacional foi centrifugada a 12000 g durante 30 min e o sobrenadante foi removido por decantação. O bioconjugado obtido, *pellet*, foi lavado 4 vezes com uma solução de 1 mL de EtOH a

70% e secou-se ao ar. Para o processo de Hibridação *in situ* Fluorescente os bioconjugados obtidos foram ressuspensos em água RNase *free* para concentrações finais de 120 ng/μL.^[23]

IV.3.5. Hibridação *in situ* Fluorescente

Após a síntese dos bioconjugados (sondas) e das culturas dos microrganismos, procedeu-se à avaliação da metodologia RNA-FISH, que inclui etapas bem definidas, tais como: **i)** fixação das células da amostra; **ii)** permeabilização celular; **iii)** hibridação com sondas específicas para detetar as respetivas sequências alvo; **iv)** lavagem para remover as sondas não ligadas; **v)** deteção e quantificação.^[237, 238]

Fixação e permeabilização das células:

As células foram fixadas e permeabilizadas pela adição de 2.0 mL de EtOH absoluto e incubadas à temperatura ambiente durante 1 h. Após a incubação, foram adicionados 2.0 ml de PBS 10X às células, sendo armazenadas em EtOH: PBS 10X (50:50) a - 20 °C.

Contagem de células:

As células fixadas de bactérias e de leveduras (1.0 mL) foram descongeladas e centrifugadas a 13000 rpm (15 min, 4 °C) e a 4500 rpm (5 min, 4 °C), respetivamente. Após descartar o sobrenadante, as células foram ressuspensas em 1.0 mL de PBS 10X. Num microtubo, foram adicionados 10 μL de suspensão celular a 990 μL de azul de metileno, agitados num agitador vortex e incubados à temperatura ambiente durante 20 min. As células foram contadas numa câmara de Neubauer, permitindo assim o cálculo da concentração celular em UFC/ml.

Hibridação:

Para a hibridação, foram preparados microtubos com concentrações celulares de 10⁶ UFC/ml para as células de leveduras *S. cerevisiae* e 10⁸ UFC/ml para as células bacterianas de *Bacillus sp.*, previamente fixadas. As amostras foram preparadas num volume final de 80.0 μL de tampão de hibridação, HB (NaCl 0.9 M, Tris-HCl 20 mM, dodecil sulfato de sódio 0.1% [p/v]) e uma solução de sonda com uma concentração de 100 pmol). Em seguida, as células foram hibridadas durante 2 h a 46 °C num banho termostaticado sob agitação moderada. Posteriormente, as amostras foram

centrifugadas a 4500 rpm (5 min, 4 °C) no caso das leveduras e a 13000 rpm (15 min, 4 °C) no caso das bactérias, e os sobrenadantes foram descartados.

Lavagem:

As células hibridadas foram lavadas com HB (100 µL) e incubadas num banho termostático sob agitação moderada (30 min, 46 °C). Após a centrifugação das leveduras hibridadas a 4500 rpm (5 min, 4 °C) e das bactérias hibridadas a 13000 rpm (15 min, 4 °C), descartou-se o sobrenadante e as células foram ressuspensas em 400 µL de PBS 10X.

Deteção e quantificação:

As células hibridadas foram analisadas por citometria de fluxo e observadas por microscopia de epifluorescência, de acordo com as instruções previamente descritas na secção seguinte (IV.3.6). Em cada ensaio, realizados em triplicado, foram analisadas 1000 células. Os valores representados nos gráficos de percentagem de células fluorescentes correspondem à média das medições e barras de erro ao desvio padrão (\pm SD).

IV.3.6. Análise por microscopia de epifluorescência e citometria de fluxo

As células de leveduras e bactérias foram observadas qualitativamente com o auxílio de um microscópio de epifluorescência (BA410E Motic equipado com um sistema de iluminação Koehler de halógeno de quartzo de 100 W com controlo de intensidade e um equipamento de Episcopia de Fluorescência EF-UPR-III e com uma fonte de alimentação MXH-100). Para facilitar este tipo de análise, utilizaram-se filtros Motic concebidos para TRITC (comprimento de onda de excitação: D540/40x; espelho dicróico: 565DCLP, emissão: D605/55m). Registaram-se fotografias através de uma câmara Moticam PRO 282B acoplada ao microscópio e, posteriormente, visualizaram-se as imagens utilizando o software Motic Images Plus 2.0^{LM} (Motic, Espanha).

O Muse® Cell Analyzer e o software MuseSoft 1.4.0.0 foram utilizados para a análise por citometria de fluxo. Para cada ensaio RNA-FISH, foi calculada a percentagem de células que se tornaram fluorescentes após a implementação da técnica FISH e as respetivas intensidades de fluorescência (FI), utilizando o detetor de fotodiodo vermelho (680/30). Foram adquiridos 1000 eventos, os valores de FI foram registados, definindo um gráfico de densidade de FI *versus* dispersão frontal (FSC), considerando os resultados dos ensaios em branco (células não marcadas), dos

controles (EUB338-Cy3 e EUK516-Cy3) e dos ensaios de teste. Cada amostra foi analisada em triplicado. Os dados obtidos foram analisados recorrendo ao programa *Flowing software* (Turku Bioscience).

IV.3.7. Análise estatística da percentagem de células fluorescentes

A análise da percentagem de células fluorescentes, foram avaliados estatisticamente utilizando o *software SPSS® 21.0 para Windows Copyright© (Microsoft Corporation)*, recorrendo a parâmetros de análise descritiva, como valores médios \pm desvio padrão (SD), e análise de variância (ANOVA *One-way*). A homogeneidade das variâncias foi confirmada pelo teste de *Levene* e a comparação múltipla de médias foi avaliada pelo teste de *Tukey*. O nível de significância foi estabelecido a $p < 0.05$ (nível de confiança estatístico de 95%).

V. BIBLIOGRAFIA

- [1] Steinbauer, M. J.; Gohlke, A.; Mahler, C.; Schmiedinger, A.; Beierkuhnlein, C. Quantification of wall surface heterogeneity and its influence on species diversity at medieval castles - implications for the environmentally friendly preservation of cultural heritage. *Journal of Cultural Heritage*. **2013**, 14(3), 219-228. (DOI:10.1016/j.culher.2012.06.003).
- [2] Santos, I.; Puglieri, T.; Barbosa, M.; Cardoso, A.; Rosado, T.; Gil, M.; Candeias, A.; Faria, D. Aspectos químicos na investigação de alguns tipos de florescências em bens culturais. *Química Nova*. **2019**, 42(9), 1056-1065. (DOI:10.21577/0100-4042.20170422).
- [3] Long, M.; Xu, Z.; Chen, Y.; Wu, K.; Yang, S. Conservation of stone heritage buildings: Exploring the algicidal properties of biologically-synthesized nano-silver. *International Biodeterioration and Biodegradation*. **2024**, 194. (DOI:10.1016/j.ibiod.2024.105878).
- [4] Rosado, T.; Silva, M.; Dias, L.; Candeias, A.; Gil, M.; Mirão, J.; Pestana, J.; Caldeira, A.T. Microorganisms and the integrated conservation-intervention process of the renaissance mural paintings from Casas Pintadas in Évora - Know to act, act to preserve. *Journal of King Saud University – Science*. **2017**, 29(4), 478-486. (DOI:10.1016/j.jksus.2017.09.001).
- [5] Salvador, C.; Silva, M.; Rosado, T.; Freire, R.V.; Bordalo, R.; Candeias, A.; Caldeira, A.T. Biodeterioração de pinturas de cavalete: Desenvolvimento de novas estratégias de mitigação. *Conservar Património*. **2016**, 23, 119-124. (DOI:10.14568/cp2015032).
- [6] Salvador, C.; Sandu, I.; Sandbakken, E.; Candeias, A.; Caldeira, A.T. Biodeterioration in art: a case study of Munch's paintings. *European Physical Journal Plus*. **2022**, 137(1). (DOI:10.1140/epjp/s13360-021-02187-0).
- [7] Dias, L.; Rosado, T.; Candeias, A.; Mirão, J.; Caldeira, A.T. A change in composition, a change in colour: The case of limestone sculptures from the Portuguese National Museum of Ancient Art. *Journal of Cultural Heritage*. **2019**, 42, 255-262. (DOI:10.1016/j.culher.2019.07.025).

- [8] Rosado, T.; Mirão, J.; Candeias, A.; Caldeira, A.T. Characterizing Microbial Diversity and Damage in Mural Paintings. *Microscopy and Microanalysis*. **2015**, 21(1), 78-83. (DOI:10.1017/S1431927614013439).
- [9] Sterflinger, K.; Piñar, G. Microbial deterioration of cultural heritage and works of art - tilting at windmills?. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **2013**, 97, 9637-9646. (DOI:10.1007/s00253-013-5283-1).
- [10] Sameiro, M.; Gonçalves, M. Fluorescent Labeling of Biomolecules with Organic Probes. *Chemical Reviews*. **2009**, 109, 190-212. (DOI:10.1021/cr0783840).
- [11] González, M.; Brinco, C.; Vieira, R.; Rosado, T.; Maura, G.; Pereira, A.; Candeias, A.; Caldeira, A.T. Dual phylogenetic staining protocol for simultaneous analysis of yeast and bacteria in artworks. *Applied Physics A*. **2017**, 123(2), 142. (DOI:10.1007/s00339-016-0725-0).
- [12] Huber, D.; Voithenberg, L.; Kaigala, G. Fluorescence in situ hybridization (FISH): History, limitations and what to expect from micro-scale FISH?. *Micro and Nano Engineering*. **2018**, 1, 15-24. (DOI:10.1016/j.mne.2018.10.006).
- [13] Pérez, M.G.; Martins, S.; Manhita, A.; Caldeira, A.T.; Pereira, A. Coumarin amine-reactive dye C392STP: an efficient building block to synthesize single-labeled oligonucleotides with application as FISH probes. *Applied Biochemistry and Microbiology*. **2020**, 56(1), 96-105. (DOI:10.1134/S0003683820010068).
- [14] González, M.; Vieira, R.; Nunes, P.; Rosado, T.; Martins, S.; Candeias, A.; Pereira, A.; Caldeira, A.T. Fluorescence in situ hybridization: a potentially useful technique for detection of microorganisms on mortars. *e-Conservation Journal*. **2014**, 2, 44-52. (DOI:10.18236/econs2.201409).
- [15] Vieira, R.; Nunes, P.; Martins, S.; González, M.; Rosado, T.; Pereira, A.; Candeias, A.; Caldeira, A.T. Fluorescence in situ hybridisation for microbiological detection in mortars. In *Science, Technology and Cultural Heritage*, Rogerio-Candelera (Ed), CRC Press/Balkema Taylor & Francis Group, London. **2014**. (ISBN:9781138027442).

- [16] González, M.; Vieira, R.; Nunes, P.; Pereira, A.; Candeias, A.; Caldeira, A.T. Optimization of fluorescence in situ hybridization technique for analyzing microorganisms involved in bioprocesses. *New Biotechnology*. **2016**, 33(3), 413-414. (DOI:10.1016/j.nbt.2015.10.077).
- [17] González, M.; Fernandes, R.; Vieira, R.; Pereira, A.; Candeias, A.; Caldeira, A.T. Development of a Fluorescence In Situ Hybridization protocol for analysis of Gram-positive and Gram-negative bacteria. *New Biotechnology*. **2016**, 33(3), 434. (DOI:10.1016/j.nbt.2015.10.055).
- [18] Ooi, S.Y.; Salvador, C.; Martins, S.; Pereira, A.; Caldeira, A.T. Development of a Simple Method for Labeling and Identification of Protein Binders in Art. *Heritage*. **2019**, 2(3), 2444-2456. (DOI:10.3390/heritage2030150).
- [19] Yin, O.S.; Ramalho, J.P.P.; Pereira, A.; Martins, S.; Salvador, C.; Caldeira, A. T. A simple method for labelling and detection of proteinaceous binders in art using fluorescent coumarin derivatives. *The European Physical Journal Plus*. **2019**, 134, 71. (DOI:10.1140/epjp/i2019-12478-4).
- [20] Holmes, K.; Lantz, L. Chapter 9 - Protein labeling with fluorescent probes. *Method Cell Biol.* **2019**, 63(A), 185-204. (DOI:10.1016/S0091-679X(01)63013-9).
- [21] Hu, W.; Zhang, K.; Zhang, H.; Zhang, B.; Rong, B. Analysis of polychromy binder on Qin Shihuang's Terracotta Warriors by immunofluorescence microscopy. *Journal of Cultural Heritage*. **2015**, 16(2), 244-248. (DOI:10.1016/j.culher.2014.05.003).
- [22] Dallongeville, S.; Garnier, N.; Rolando, C.; Tokarski, C. Proteins in Art, Archaeology, and Paleontology: From Detection to Identification. *Chemical Reviews*. **2016**, 116(1), 2-79. (DOI:10.1021/acs.chemrev.5b00037).
- [23] <https://www.lumiprobe.com/t/fluorophores> (consultado em 28 de janeiro de 2025).
- [24] Ul Abiden Malik, Z.; Taraq Waheed, D.; Shujeb Akhter, S.; Kasusar, Y.; Shabbir, S.; Ismail, R.; Bin Arif, M.; Fazeel. The Importance of Heritage Conservation, Preservation, And Restoration In Pakistan. *Journal of Positive School Psychology*. **2023**, 7(2), 223-239.

- [25] Mandal, S.; Kumar, P.; Satpathy, B.; Das, K.; Das, S. Nanostructured metal oxide based coating for the protection and conservation of cultural heritage: A comprehensive review. *Journal of Cultural Heritage*. **2024**, 69, 94-112. (DOI:10.1016/j.culher.2024.08.001).
- [26] Branysova, T.; Demnerova, K.; Durovic, M.; Stiborova, H. Microbial biodeterioration of cultural heritage and identification of the active agents over the last two decades. *Journal of Cultural Heritage*. **2022**, 55, 245-260. (DOI:10.1016/j.culher.2022.03.013).
- [27] Jiménez, Rios, A.L.; Petrou, M.; Ramirez, R.; Plevris, V.; Nogal, M. Industry 5.0, towards an enhanced built cultural heritage conservation practice. *Journal of Building Engineering*. **2024**, 96, 110542. (DOI:10.1016/j.jobee.2024.110542).
- [28] Mekonnen, H.; Bires, Z.; Berhanu, K. Practices and challenges of cultural heritage conservation in historical and religious heritage sites: evidence from North Shoa Zone, Amhara Region, Ethiopia. *Heritage Science*. **2022**, 10(1), 172. (DOI:10.1186/s40494-022-00802-6).
- [29] Hiswara, A.; Mohammad, Aziz A.; Pujowati, Y.; Ade, N.; Sari, R. Cultural Preservation in a Globalized World: Strategies for Sustaining Heritage. *West Science Social and Humanities Studies*. **2023**, 1(03), 98-106. (DOI:10.58812/wsshs.v1i03.250).
- [30] Otero, J. Heritage Conservation Future: Where We Stand, Challenges Ahead, and a Paradigm Shift. *Global Challenges*. **2022**, 6(1), 2100084. (DOI:10.1002/gch2.202100084).
- [31] Li, L.; Tang, Y. Towards the Contemporary Conservation of Cultural Heritages: An Overview of Their Conservation History. *Heritage*. **2024**, 7(1), 175-192. (DOI:10.3390/heritage7010009).
- [32] Reshma, M.R.; Kannan, B.; Jagathy, R.V.P.; Shailesh, S. Cultural heritage preservation through dance digitization: A review. *Digital Applications in Archaeology and Cultural Heritage*. **2023**, 28, 00257. (DOI:10.1016/j.daach.2023.e00257).
- [33] Čosović, M.; Amelio, A.; Junuz, E. Classification methods in cultural heritage. *CEUR Workshop Proceedings*. **2019**, 2320, 13-24.

- [34] Avdanina, D.A.; Zhgun, A.A.; Rainbow code of biodeterioration to cultural heritage objects. *Heritage Science*. **2024**, *12*(1). (DOI:10.1186/s40494-024-01298-y).
- [35] Banda L.O.L.; Banda C.V.; Banda J.T.; Singini, T. Preserving Cultural Heritage: A Community-Centric Approach to Safeguarding the Khulubvi Traditional Temple Malawi. *Heliyon*. **2024**, *10*(18), e37610. (DOI:10.1016/j.heliyon.2024.e37610).
- [36] Thuc, L.D.; Nguyen, M.V.; Duy K.H.; Van D.N. Prioritizing barriers to the conservation of cultural heritage buildings in adaptation to urbanization and climate change. *Journal of Cleaner Production*. **2024**, *473*, 143529. (DOI:10.1016/j.jclepro.2024.143529).
- [37] Mendoza M.A.D.; De La Hoz Franco E.; Gómez J.E.G. Technologies for the Preservation of Cultural Heritage - A Systematic Review of the Literature. *Sustainability (Switzerland)*. **2023**, *15*(2), 1059. (DOI:10.3390/su15021059).
- [38] Yu, Y.; Zhang, J.; Chen, R.; Coleine, C.; Liu, W.; Delgado-Baquerizo, M.; Feng, Y.; Unearthing the global patterns of cultural heritage microbiome for conservation. *International Biodeterioration and Biodegradation*. **2024**, *190*, 105784. (DOI:10.1016/j.ibiod.2024.105784).
- [39] Mendoza M.A.D.; De La Hoz Franco E.; Gómez J.E.G. Technologies for the Preservation of Cultural Heritage - A Systematic Review of the Literature. *Sustainability (Switzerland)*. **2023**, *15*(2), 1059. (DOI:10.3390/su15021059).
- [40] Cirone, M.; Figoli, A.; Galiano, F.; La Russa, M.F.; Macchia, A.; Mancuso, R.; Ricca, M.; Rovella, N.; Taverniti, M.; Ruffolo, S.A. Innovative Methodologies for the Conservation of Cultural Heritage against Biodeterioration: A Review. *Coatings*. **2023**, *13*(12), 1986. (DOI:10.3390/coatings13121986).
- [41] Geweely, N.S. New frontiers review of some recent conservation techniques of organic and inorganic archaeological artefacts against microbial deterioration. *Frontiers in Microbiology*. **2023**, *14*, 1146582. (DOI:10.3389/fmicb.2023.1146582).

- [42] Silva, I.; Salvador, C.; Arantes, S.; Miller, A.Z.; Candeias, A.; Caldeira, A.T. The Decorated Garden Grotto of Condes de Basto Palace in Évora, Portugal: Microbial Community Characterization and Biocide Tests for Conservation. *Micro*. **2024**, *4*(1), 117-131. (DOI:10.3390/micro4010008).
- [43] Schröder, V.; Turcanu Carutiu, D.; Honcea, A.; Ion, R.M. Microscopical Methods for the *In Situ* Investigation of Biodegradation on Cultural Heritage. In Turcanu-Carutiu, D., Ion, R.M (Eds.), *Advanced Methods and New Materials for Cultural Heritage Preservation*, IntechOpen, London. **2019**. (DOI:10.5772/intechopen.80684).
- [44] Ceres, G.; Shindler, L.; Mercuri, F.; Zammit, U. Development and application of affordable microclimate and indoor air quality monitoring platforms for historic libraries in cultural heritage preservation. *Journal of Cultural Heritage*. **2024**, *70*, 203-212. (DOI:10.1016/j.culher.2024.09.007).
- [45] Villar-dePablo, M.; Ascaso, C.; Rodríguez-Pérez, E.; Urizal, M.; Wierzechos, J.; Pérez-Ortega, S.; de los Ríos, A. Innovative approaches to accurately assess the effectiveness of biocide-based treatments to fight biodeterioration of Cultural Heritage monuments. *Science of the Total Environment*. **2023**, *897*, 165318. (DOI:10.1016/j.scitotenv.2023.165318).
- [46] Liu, X.; Meng, H.; Wang, Y.; Katayama, Y.; Gu, J.D. Water is a critical factor in evaluating and assessing microbial colonization and destruction of Angkor sandstone monuments. *International Biodeterioration & Biodegradation*. **2018**, *133*, 9-16. (DOI:10.1016/j.ibiod.2018.05.011).
- [47] Pinna, D.; Salvadori, O. Processes of biodeterioration general mechanisms. Chapter 1. In: Plant Biology for Cultural Heritage. Caneva, G., Nugari, M.P., Salvadori, O. (Eds.), *Biodeterioration and Conservation*. The getty conservation institute, Los Angeles. **2008**, 15-34.
- [48] Szczepanowska, H.M. Biodeterioration of Cultural Heritage Dynamic Interfaces Between Fungi, Fungal Pigments and Paper. *MDPI:Basel*. **2023**. (DOI:10.3390/books978-3-0365-2093-3).

- [49] Ding, Y.; Salvador, C.S.C.; Caldeira, A.T.; Angelini, E.; Schiavon, N.; Biodegradation and Microbial Contamination of Limestone Surfaces: An Experimental Study from Batalha Monastery, Portugal. *Corrosion and materials degradation*. **2021**, 2, 31-45. (DOI:10.3390/cmd2010002).
- [50] Rosado, T.; Gil, M.; Caldeira, A.T.; Martins, M.R.; Dias, C.B.; Carvalho, L.; Mirão, J.; Candeias, A.E. Material characterization and biodegradation assessment of mural paintings: Renaissance frescoes from Santo Aleixo Church, Southern Portugal. *International Journal of Architectural Heritage*. **2014**, 8(6), 835-852. (DOI:10.1080/15583058.2012.751466).
- [51] Rahmani TPD, Ismail I, Aziz IR. Biodeterioration and Biodeterioration of cultural & Religious Heritage Made of Paper as a Wood Derivative. *Journal of Islam and Science*. **2022**, 9(1), 52-57. (DOI:10.24252/jis.v9i1.30285).
- [52] Pyzik, A.; Ciuchcinski, K.; Dziurzynski, M.; Dziewit, L. The bad and the good-microorganisms in cultural heritage environments-an update on biodeterioration and biotreatment approaches. *Materials*. **2021**, 14(1), 1-15. (DOI:10.3390/ma14010177).
- [53] Dán, K.; Kocsubé, S.; Tóth, L.; Farkas, A.; Rákhely, G.; Galgóczy, L. Isolation and identification of fungal biodeteriogens from the wall of a cultural heritage church and potential applicability of antifungal proteins in protection. *Journal of Cultural Heritage*. **2024**, 67, 194-202. (DOI:10.1016/j.culher.2024.03.002).
- [54] Arantes, S.; Branco, P.; Caldeira, A.T. Design and Experimental Evaluation of a New RNA-FISH Probe to Detect and Identify *Paenibacillus* sp. *Applied Sciences*. **2022**, 12(5), 2348. (DOI:10.3390/app12052348).
- [55] Macielag, M.J. Chemical Properties of Antimicrobials and Their Uniqueness. In: Dougherty, T., Pucci, M. (eds) *Antibiotic Discovery and Development*. Springer, Boston, MA. **2012**, 793-820. (DOI:10.1007/978-1-4614-1400-1_24).

- [56] Gyuhyung, J.; Sean, P. Palecek, Chapter 6 - Inductive factors for generation of pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes, Editor(s): Tiago G. Fernandes, Maria Margarida Diogo, Joaquim M.S. Cabral, *Engineering Strategies for Regenerative Medicine*, Academic Press. **2020**, 177-242. (DOI:10.1016/B978-0-12-816221-7.00006-9).
- [57] Péter, B.; Szekacs, I.; Horvath, R. Label-free biomolecular and cellular methods in small molecule epigallocatechin-gallate research. *Heliyon*. **2024**, 10(3), e25603. (DOI:10.1016/j.heliyon.2024.e25603).
- [58] Yang, Y.; Gao, F.; Wang, Y.; Li, H.; Zhang, J.; Sun, Z.; Jiang, Y. Fluorescent Organic Small Molecule Probes for Bioimaging and Detection Applications. *Molecules*. **2022**, 27(23). (DOI:10.3390/molecules27238421).
- [59] Grover, K.; Koblova, A.; Pezacki, A.T.; Chang, C.J.; New, E.J. Small-Molecule Fluorescent Probes for Binding- and Activity-Based Sensing of Redox-Active Biological Metals. *Chemical Reviews*. **2024**, 124(9), 5846-5929. (DOI:10.1021/acs.chemrev.3c00819).
- [60] Hermanson T. Bioconjugate Techniques. 3rd Ed. London. *Elsevier*. **2013**. (ISBN:9780123822390).
- [61] Johnson, I.; Spence, Molecular Probes™ Handbook-A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies, 11th Edition, Life Technologies: Carlsbad, CA, USA; Thermo Fischer Scientific: Waltham, MA USA, **2010**.
- [62] Fang, X.; Zheng, Y.; Duan, Y.; Liu, Y.; Zhong, W. Recent Advances in Design of Fluorescence-Based Assays for High-Throughput Screening. *Analytical Chemistry*. **2019**, 91, 482-504. (DOI: 10.1021/acs.analchem.8b05303).
- [63] Das, S.; Indurthi, H.K.; Saha, P.; Sharma, D.K. Coumarin-based fluorescent probes for the detection of ions, biomolecules and biochemical species responsible for diseases. *Dyes and Pigments*. **2024**, 228, 112257. (DOI:10.1016/j.dyepig.2024.112257).
- [64] Lavis, L.D.; Raines, R.T. Bright building blocks for chemical biology. *ACS Chemical Biology*. **2014**, 9(4), 855-866. (DOI:10.1021/cb500078u).

- [65] Lavis, L.D.; Raines, R.T. Bright ideas for chemical biology. *ACS Chemical Biology*. **2008**, 3, 142-155. (DOI: 10.1021/cb700248m).
- [66] Jun, J.V.; Chenoweth, D.M.; Petersson, E.J. Rational design of small molecule fluorescent probes for biological applications. *Organic and Biomolecular Chemistry*. **2020**, 18(30), 5747-5763. (DOI:10.1039/d0ob01131b).
- [67] Pang, H.; Zhao, Q. Antibody-Bridged DNzyme Walker for Sensitive Detection of Small Molecules. *Analytical Chemistry*. **2024**, 96(16), 6366-6372. (DOI:10.1021/acs.analchem.4c00250).
- [68] Fu, Y.; Finney, N.S. Small-molecule fluorescent probes and their design. *RSC Advances*. **2018**, 8(51), 29051-29061. (DOI:10.1039/c8ra02297f).
- [69] Silva, A.P.; Gunaratne, H.Q.N.; Gunnlaugsson, T.; Huxley, A.J.M.; McCoy, C.P.; Rademacher, J.T.; Rice, T.E. Signaling Recognition Events with Fluorescent Sensors and Switches. *Chemical Reviews*. **1997**, 97, 1515-1566. (DOI:10.1021/cr960386p).
- [70] Johnson, I.; Fluorescent probes for living cells. *Histochemical Journal*. **1998**, 30, 123-140. (DOI:10.1023/a:1003287101868).
- [71] Staderini, M.; Martín, M.A.; Bolognesi, M.L.; Menéndez, J.C. Imaging of β -amyloid plaques by near infrared fluorescent tracers: a new frontier for chemical neuroscience. *Chemical Society Reviews*. **2015**, 44, 1807-1819. (DOI:10.1039/C4CS00337C).
- [72] Tipirneni, K.E.; Rosenthal, E.L.; Moore, L.S.; Haskins, A.D.; Udayakumar, N.; Jani, A.H.; Carroll, W.R.; Morlandt, A.B.; Bogyo, M.; Rao, J.; Warram, J. M. Fluorescence Imaging for Cancer Screening and Surveillance. *Molecular Imaging and Biology*. **2017**, 19, 645-655. (DOI:10.1007/s11307-017-1050-5).
- [73] Garland, M.; Yim, J.J.; Bogyo, M.A. Bright Future for Precision Medicine: Advances in Fluorescent Chemical Probe Design and Their Clinical Application. *Cell Chemical Biology*. **2016**, 23, 122-136. (DOI:10.1016/j.chembiol.2015.12.003).

- [74] Newton, A.D.; Predina, J.D.; Corbett, C.J.; Frenzel-Sulyok, L.G.; Xia, L.; Petersson, E.J.; Tsourkas, A.; Nie, S.; Delikatny, E.J.; Singhal, S. Optimization of Second Window Indocyanine Green for Intraoperative Near-Infrared Imaging of Thoracic Malignancy. *Journal of the American College of Surgeons*. **2019**, *228*, 188-197. (DOI:10.1016/j.jamcollsurg.2018.11.003).
- [75] Kobayashi, H.; Ogawa, M.; Alford, R.; Choyke, P.; Urano, Y. New Strategies for Fluorescent Probe Design in Medical Diagnostic Imaging. *Chemical Reviews* **2010**, *110*, 2620-2640. (DOI:10.1021/cr900263j).
- [76] Hanson, G.T.; Hanson, B.J. Fluorescent Probes for Cellular Assays. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*. **2008**, *11*, 505-513. (DOI:10.2174/138620708785204090).
- [77] Maurel, D.; Comps-Agrar, L.; Brock, C.; Rives, M.; Bourrier, E.; Ayoub, M. A.; Bazin, H.; Tinel, N.; Durroux, T.; Prézeau, L.; Trinquet, E.; Pin, J.P. Cell-surface protein-protein interaction analysis with time-resolved FRET and snap-tag technologies: application to GPCR oligomerization. *Nature Methods*. **2008**, *5*, 561-567. (DOI:10.1038/nmeth.1213).
- [78] Yin, J.; Straight, P.; McLoughlin, S.; Zhou, Z.; Lin, A.; Golan, D.; Kelleher, N.; Kolter, R.; Walsh, C. Genetically encoded short peptide tag for versatile protein labeling by Sfp phosphopantetheinyl transferase. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. **2005**, *102*, 15815-15820. (DOI:10.1073/pnas.0507705102).
- [79] Shaya, J.; Fontaine-Vive, F.; Michel, B.Y.; Burger, A. Rational Design of Push-Pull Fluorene Dyes: Synthesis and Structure-Photophysics Relationship. *Chemistry A European Journal*. **2016**, *22*, 10627-10637. (DOI:10.1002/chem.201600581).
- [80] Thirion, D.; Rault-Berthelot, J.; Vignau, L.; Poriol, C. Synthesis and Properties of a Blue Bipolar Indenofluorene Emitter Based on a D- π -A Design. *Organic Letters*. **2011**, *13*, 4418-4421. (DOI:10.1021/ol201751p).
- [81] Starnovskaya, E.S.; Valieva, M.I.; Aluru, R.; Kopchuk, D.S.; Khasanov, A.F.; Taniya, O.S.; Novikov, A.S.; Kalinichev, A.A.; Santra, S.; Zyryanov, G.V.; Ranu, Brindban C. Carbazole/fluorene-substituted 5-phenyl-2,2'-bipyridine D- π -A fluorophores: photophysical data, hyperpolarizability and CT-indices. *New Journal of Chemistry*. **2023**, *47*(26), 12393-12402. (DOI:10.1039/d3nj00394a).

- [82] Eustáquio, R.; Ramalho, J.P.P.; Caldeira, A.T.; Pereira, A. Rational Design of Cost-Effective 4-Styrylcoumarin Fluorescent Derivatives for Biomolecule Labeling. *Molecules*. **2023**, *28*, 6822. (DOI:10.3390/molecules28196822).
- [83] Eustáquio, R.; Ramalho, J.P.P.; Caldeira, A.T.; Pereira, A. Development of new 2-piperidinium-4-styrylcoumarin derivatives with large Stokes shifts as potential fluorescent labels for biomolecules. *RSC Advances*. **2022**, *12*, 8477-8484. (DOI:10.1039/d2ra00716a).
- [84] Eustáquio, R.; Ramalho, J.P.P.; Caldeira, A.T.; Pereira, A. New Red-Shifted 4-Styrylcoumarin Derivatives as Potential Fluorescent Labels for Biomolecules. *Molecules*. **2022**, *27*, 1461. (DOI:10.3390/molecules27051461).
- [85] Suzuki, T.; Matsuzaki, T.; Hagiwara, H.; Aoki, T.; Takata, K. Recent advances in fluorescent labeling techniques for fluorescence microscopy. *Acta Histochemica et Cytochemica*. **2007**, *40*(5), 131-139. (DOI:10.1267/ahc.07023).
- [86] Sahoo, H. Fluorescent labeling techniques in biomolecules: A flashback. *RSC Advances*. **2012**, *2*(18), 7017-7029. (DOI:10.1039/c2ra20389h).
- [87] Tsivileva, O.M.; Koftin, O.V.; Evseeva, N.V. Coumarins as Fungal Metabolites with Potential Medicinal Properties. *Antibiotics*. **2022**, *11*, 1156. (DOI:10.3390/antibiotics11091156).
- [88] Zaynab, M.; Khan, J.; Al-Yahyai, R.; Saddar, M.; Li, S. Toxicity of coumarins in plant defense against pathogens. *Toxicon*. **2024**, *250*, 108118. (DOI:10.1016/j.toxicon.2024.108118).
- [89] Ando, T.; Nagumo, M.; Ninomiya, M.; Tanaka, K.; Linhardt, R.J.; Koketsu, M. Synthesis of coumarin derivatives and their cytoprotective effects on t-BHP-induced oxidative damage in HepG2 cells. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. **2018**, *28*(14), 2422-2425. (DOI:10.1016/j.bmcl.2018.06.018).
- [90] Matos, M. J.; Santana, L.; Uriarte, E.; Abreu, O. A.; Molina, E.; Yordi, E. G. Coumarins - An Important Class of Phytochemicals. In Rao, A. V.; Rao, L. G. (Eds.), *Phytochemicals - Isolation, Characterisation and Role in Human Health*, IntechOpen, London, **2015**. (DOI:10.5772/59982).

- [91] Zeydi, M.M.; Kalantarian, S.J.; Kazeminejad, Z. Overview on developed synthesis procedures of coumarin heterocycles. *Journal of the Iranian Chemical Society*. **2020**, 17(12), 3031-3094. (DOI:10.1007/s13738-020-01984-1).
- [92] Ahmad, Bhat, A.; Kaur, G.; Tandon, N.; Tandon, R.; Singh, I. Current advancements in synthesis, anticancer activity, and structure–activity relationship (SAR) of coumarin derivatives. *Inorganic Chemistry Communications*. **2024**, 167, 112605. (DOI:10.1016/j.inoche.2024.112605).
- [93] Loncaric, M.; Gaso-Sokac, D.; Jokic, S.; Molnar, M. Recent Advances in the Synthesis of Coumarin Derivatives from Different Starting Materials. *Biomolecules*. **2020**, 10, 151. (DOI:10.3390/biom10010151).
- [94] Cao, D.; Liu, Z.; Verwilst, P.; Koo, S.; Jangjili, P.; Kim, J.S.; Lin, W. Coumarin-Based Small-Molecule Fluorescent Chemosensors. *Chemical Reviews*. **2019**, 119(18), 10403-10519. (DOI:10.1021/acs.chemrev.9b00145).
- [95] Annunziata, F.; Pinna, C.; Dallavalle, S.; Tamborini, L.; Pinto, A. An Overview of Coumarin as a Versatile and Readily Accessible Scaffold with Broad-Ranging Biological Activities. *International Journal of Molecular Sciences*. **2020**, 21(13), 4618. (DOI:10.3390/ijms21134618).
- [96] Flores-Morales, V.; Villasana-Ruíz, A.P.; Garza-Veloz, I.; González-Delgado, S.; Martinez-Fierro, M.L. Therapeutic Effects of Coumarins with Different Substitution Patterns. *Molecules*. **2023**, 28(5), 2413. (DOI:10.3390/molecules28052413).
- [97] Rohini, K.; Srikumar, P.S. Therapeutic Role of Coumarins and Coumarin-Related Compounds. *Journal of Thermodynamics & Catalysis*. **2014**, 05(2), 1-3. (DOI:10.4172/2157-7544.1000130).
- [98] Rahama, M.S.; Khairuddean, M.; Ismail, N.Z.; Al-Amin, M.; Salhimi, S.M. Synthesis, characterization and in silico studies of coumarin-chalcone derivatives and their cytotoxicity activity against breast cancer cells. *Journal of Molecular Structure*. **2025**, 1322, 140341. (DOI:10.1016/j.molstruc.2024.140341).
- [99] Clark, G.S. Coumarin. An Aroma Chemical Profile Coumarin. *Perfumer and Flavorist*. **1995**, 20, 23-34.

- [100] Borges, F.; Roleira, F.; Milhazes, N.; Santana, L.; Uriarte, E. Simple coumarins and analogues in medicinal chemistry: occurrence, synthesis and biological activity. *Current medicinal chemistry*. **2005**, 12(8), 887-917. (DOI:10.2174/0929867053507315).
- [101] Matos, M.J. Coumarin and Its Derivatives-Editorial. *Molecules*. **2021**, 26(20), 6320. (DOI:10.3390/molecules26206320).
- [102] Medina, F.G.; Marrero, J.G.; Macías-Alonso, M.; González, M.C.; Córdova-Guerrero, I.; Teissier García, A.G.; Osegueda-Robles, S. Coumarin heterocyclic derivatives: Chemical synthesis and biological activity. *Natural Product Reports*. **2015**, 32(10), 1472-1507. (DOI:10.1039/c4np00162a).
- [103] Gaudino, E., Tagliapietra, S., Martina, K., Palmisano, G., Cravotto, G., ChemInform Abstract: Recent Advances and Perspectives in the Synthesis of Bioactive Coumarins. *RSC Advances*. Dip. Sci. Tecnol. Farm, Univ. Torino, I-10125 Torino, Italy, Eng., **2016**, 6(52), 46394-46405. (DOI: 10.1039/C6RA07071J).
- [104] Safavi-Mirmahalleh, S.A., Golshan, M.; Gheitarani, B.; Salami Hosseini M.; Salami-Kalajahi, M. A review on applications of coumarin and its derivatives in preparation of photo-responsive polymers. *European Polymer Journal*. **2023**, 198, 112430. (DOI:10.1016/j.eurpolymj.2023.112430).
- [105] Breidenbach, J.; Bartz, U.; Gütschow, M. Coumarin as a structural component of substrates and probes for serine and cysteine proteases. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*. **2020**, 1868(9), 140445. (DOI:10.1016/j.bbapap.2020.140445).
- [106] Citarella, A.; Vittorio, S.; Dank, C.; Ielo, L. Syntheses, reactivity, and biological applications of coumarins. *Frontiers in Chemistry*. **2024**, 12, 1362992. (DOI:10.3389/fchem.2024.1362992).
- [107] Todorov, L.T.; Kostova, I.P. Coumarin-transition metal complexes with biological activity: current trends and perspectives. *Frontiers in Chemistry*. **2024**, 12, 1342772. (DOI:10.3389/fchem.2024.1342772).

- [108] Ikemura, A.; Karuo, Y.; Uehashi, Y.; Ago, T.; Ebihara, M.; Kubota, Y.; Inuzuka, T.; Omote, M.; Funabiki, K. 3-Perfluoroalkylated fluorescent coumarin dyes: rational molecular design and photophysical properties. *Molecular Systems Design & Engineering*. **2024**, 9, 332-344. (DOI:10.1039/D4ME00006D).
- [109] Khan, R.; Pitchumani, K.; β -Cyclodextrin included coumarin derivatives as selective fluorescent sensors for Cu²⁺ ions in HeLa cells. *RSC Advances*. **2016**, 6(24), 20269-20275. (DOI:10.1039/C6RA01522K).
- [110] Geng, Y.; Wang, Z.; Zhou, J.; Zhu, M.; Liu, J.; James, T.D. Recent progress in the development of fluorescent probes for imaging pathological oxidative stress. *Chemical Society Reviews*. **2023**, 52(11), 3873-3926. (DOI:10.1039/d2cs00172a)
- [111] Li, C.; Wang, D.; Xue, W.; Peng, J.; Wang, T.; Zhang, Z. Synthesis and photophysical properties of vertically π -expanded coumarins. *Dyes and Pigments*. **2021**, 186, 108956. (DOI:10.1016/j.dyepig.2020.108956).
- [112] Soni, R.; Soman, S.S. Coumarin containing hetero[5/6]helical donor-acceptor molecules: Synthesis, photophysical properties and DFT studies. *Journal of Molecular Liquids*. **2024**, 407, 125273. (DOI: 10.1016/j.molliq.2024.125273).
- [113] Manjunatha, B.; Bodke, Y.D.; Mounesh, N.; Nagaraja, O.; Navaneethgowda, P.V. Coumarin-pyridone conjugate as a fluorescent tag for LFPs visualization and electrochemical sensor for nitrite detection†. *New Journal of Chemistry*. **2022**, 46(11), 5393-5404. (DOI:10.1039/d1nj04751e).
- [114] Hua, C.J.; Zhang, K.; Xin, M.; Ying, T.; Gao, J.R.; Jia, J.H.; Li, Yu, J. High quantum yield and pH sensitive fluorescence dyes based on coumarin derivatives: Fluorescence characteristics and theoretical study. *RSC Advances*. **2016**, 6(54), 49221-49227. (DOI:10.1039/c6ra05996a).
- [115] Fan, Y.; Wu, Y.; Hou, J.; Wang, P.; Peng, X.; Ge, G. Coumarin-based near-infrared fluorogenic probes: Recent advances, challenges and future perspectives. *Coordination Chemistry Reviews*. **2023**, 480, 215020. (DOI:10.1016/j.ccr.2023.215020).

- [116] Kolbus, A.; Danel, A.; Grabka, D.; Kucharek, M.; Szary, K. Spectral Properties of Highly Emissive Derivative of Coumarin with *N,N*-Diethylamino, Nitrile and Thiophenecarbonyl Moieties in Water-Methanol Mixture. *Journal of Fluorescence*. **2019**, 29(6), 1393-1399. (DOI:10.1007/s10895-019-02446-5).
- [117] Laskova, J.; Serdyukov, A.; Kosenko, I.; Ananyev, I.; Titova, E.; Druzina, A.; Sivaev, I.; Antonets, A.A.; Nazarov, A.A.; Bregadze, V.I. New Azido Coumarins as Potential Agents for Fluorescent Labeling and Their "Click" Chemistry Reactions for the Conjugation with *closo*-Dodecaborate Anion. *Molecules*. **2022**, 27, 8575. (DOI:10.3390/molecules27238575).
- [118] Gandioso, A.; Contreras, S.; Melnyk, I.; Oliva, J.; Nonell, S.; Velasco, D.; García-Amorós, J.; Marchán, V. Development of Green/Red-Absorbing Chromophores Based on a Coumarin Scaffold That Are Useful as Caging Groups. *Journal of Organic Chemistry*. **2017**, 82(10), 5398-5408. (DOI:10.1021/acs.joc.7b00788).
- [119] Dai, M.; Yang, Y.J.; Sarkar, S.; Ahn, K.H. Strategies to convert organic fluorophores into red/near-infrared emitting analogues and their utilization in bioimaging probes. *Chemical Society Reviews*. **2023**, 52(18), 6344-6358. (DOI:10.1039/d3cs00475a).
- [120] Sun, Y.; Sun, P.; Li, Z.; Qu, L.; Guo, W. Natural flavylum-inspired far-red to NIR-II dyes and their applications as fluorescent probes for biomedical sensing. *Chemical Society Reviews*. **2022**, 51(16), 7170-7205. (DOI:10.1039/d2cs00179a).
- [121] Sun, Q.; He, D.; Zhang, L.; Li, Z.; Qu, L.; Sun, Y. Coumarin-hemicyanine-based far-red to near-infrared fluorescent probes: A new generation of fluorescent probe design platform. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. **2023**, 167, 117272. (DOI:10.1016/j.trac.2023.117272).
- [122] Pereira, A.; Martins, S.; Teresa Caldeira, A. Coumarins as Fluorescent Labels of Biomolecules. In: *Phytochemicals in Human Health*. IntechOpen, **2020**. (DOI:10.5772/intechopen.85973).
- [123] Martins, S.; Candeias, A.; Caldeira, A.T.; Pereira, A. 7-(diethylamino)-4-methyl-3-vinylcoumarin as a new important intermediate to the synthesis of photosensitizers for DSSCs and fluorescent labels for biomolecules. *Dyes and Pigments*. **2020**, 174, 108026. (DOI:10.1016/j.dyepig.2019.108026).

- [124] Zhou, X.; Xu, T.; Du, W.; Liang, Y.; Gong, S.; Meng, Z.; Xu, X.; Wang, S.; Wang, Z. A highly efficient coumarin-based turn-on fluorescent probe for specific and sensitive detection of exogenous and endogenous Nitroxyl in vivo and in vitro. *Journal of Molecular Structure*. **2025**, 1319, 139412. (DOI:10.1016/j.molstruc.2024.139412).
- [125] González-Pérez, M.; Ooi, S. Y.; Martins, S.; Prates Ramalho, J. P.; Pereira, A.; Caldeira, A. T. Gaining insight into the photophysical properties of a coumarin STP ester with potential for bioconjugation. *New Journal of Chemistry*. **2018**, 42, 16635-16645. (DOI:10.1039/C8NJ03548B).
- [126] Wannas, F.A.; Abd, R.; Gafel, A.; Jaffer, N.D.; Sahib, N.; Husien, M. A Literature Review on the Fluorescence and Phosphorescent. *American International Journal of Sciences and Engineering Research*. **2019**, 2(1). (DOI:10.46545/aijser.v2i1.53).
- [127] Valeur, B.; Berberan-Santos, M.N.; A brief history of fluorescence and phosphorescence before the emergence of quantum theory. *Journal of Chemical Education*. **2011**, 88(6), 731-738. (DOI:10.1021/ed100182h).
- [128] Kumar, P.; Singh, S.; Gupta, B.K. Future prospects of luminescent nanomaterial based security inks: From synthesis to anti-counterfeiting applications. *Nanoscale*. **2016**, 8(30), 14297-14340. (DOI:10.1039/c5nr06965c).
- [129] Acuña, A.U.; Amat-Guerri, F. Early History of Solution Fluorescence: The *Lignum nephriticum* of Nicolás Monardes. *Springer Series on Fluorescence*. **2007**, 4, 3-20. (DOI:10.1007/4243_2007_006).
- [130] Stokes, G.G.; On the Change of Refrangibility of Light. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*. **1852**, 142, 463-562. (<https://www.jstor.org/stable/108550>).
- [131] Lakowicz, J.R (Ed.). *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 3rd ed., Springer Science & Business Media, Berlin. **2006**, 954. (DOI:10.1007/978-0-387-46312-4).
- [132] Ma, J.; Sun, R.; Xia, K.; Xia, Q.; Liu, Y.; Zhang, X. Design and Application of Fluorescent Probes to Detect Cellular Physical Microenvironments. *Chemical Reviews*. **2024**, 124(4), 1738-1861. (DOI:10.1021/acs.chemrev.3c00573).

- [133] Duan, Y.; Liu, M.; Sun, W.; Wang, M.; Liu, S.; Li, Q.X. Recent Progress on Synthesis of Fluorescein Probes. *Mini-Reviews in Organic Chemistry*. **2009**, 6, 35-43. (DOI:10.2174/157019309787316111).
- [134] Aruna, Verma, V.P.; Singh, A.P.; Shrivastava, R. Recent advancement in development of fluorescein based molecular probes for analytes sensing. *Journal of Molecular Structure*. **2024**, 1295, 136549. (DOI:10.1016/j.molstruc.2023.136549).
- [135] le Guern, F.; Mussard, V.; Gaucher, A.; Rottman, M.; Prim, D. Fluorescein derivatives as fluorescent probes for pH monitoring along recent biological applications. *International Journal of Molecular Sciences*. **2020**, 21(23), 1-23. (DOI:10.3390/ijms21239217).
- [136] Hu, X.L.; Gan, H.Q.; Meng, F.D.; Han, H.H.; Shi, D.T.; Zhang, S.; Zou, L.; He, X.P.; James, T.D. Fluorescent probes and functional materials for biomedical applications. *Frontiers of Chemical Science and Engineering*. **2022**, 16(10), 1425-1437. (DOI:10.1007/s11705-022-2163-1).
- [137] Sarkar, I.; Mishra, A.K. Fluorophore tagged bio-molecules and their applications: A brief review. *Applied Spectroscopy Reviews*. **2018**, 53(7), 552-601. (DOI:10.1080/05704928.2017.1376680).
- [138] Afrin, A.; Jayaraj, A.; Gayathri, M.S.; Chinna Ayya Swamy P. An overview of Schiff base-based fluorescent turn-on probes: a potential candidate for tracking live cell imaging of biologically active metal ions. *Sensors and Diagnostics*. **2023**, 2(5), 988-1076. (DOI:10.1039/d3sd00110e).
- [139] Jiang, G.; Liu, H.; Liu, H.; Ke, G.; Ren, T.B.; Xiong, B.; Zhang, X.B.; Yuan, L. Chemical Approaches to Optimize the Properties of Organic Fluorophores for Imaging and Sensing. *Angewandte Chemie - International Edition*. **2024**, 63(11). (DOI:10.1002/anie.202315217).
- [140] Lakowicz, J.R. Principles of Fluorescence Spectroscopy, 3rd ed., Springer, Berlin, **2006**. (DOI:10.1007/978-0-387-46312-4).

- [141] Cavazos-Elizondo, D.; Aguirre-Soto, A. Photophysical Properties of Fluorescent Labels: A Meta-Analysis to Guide Probe Selection Amidst Challenges with Available Data. *Analysis and Sensing*. **2022**, 2(5), e202200004. (DOI:10.1002/anse.202200004).
- [142] Toseland, C.P. Fluorescent labeling and modification of proteins. *Journal of Chemical Biology*. **2013**, 6(3), 85-95. (DOI:10.1007/s12154-013-0094-5).
- [143] Nishi, K.; Isobe, S.I.; Zhu, Y.; Kiyama, R. Fluorescence-based bioassays for the detection and evaluation of food materials. *Sensors*. **2015**, 15(10), 25831-25867. (DOI:10.3390/s151025831).
- [144] Rajasekar, M. Recent development in fluorescein derivatives. *Journal of Molecular Structure*. **2021**, 1224, 129085. (DOI:10.1016/j.molstruc.2020.129085).
- [145] Valeur, B.; Berberan-Santos, M. N. Structural Effects on Fluorescence Emission. *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*, 2nd ed.; John Wiley & Sons, Hoboken. **2012**, 75-107. (DOI:10.1002/9783527650002).
- [146] Valeur, B.; Berberan-Santos, M. Environmental Effects on Fluorescence Emission. *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*, 2nd ed.; John Wiley & Sons, Hoboken. **2012**, 109-140. (DOI:10.1002/9783527650002).
- [147] Sun, X.Y.; Liu, T.; Sun, J.; Wang, X.J. Synthesis and application of coumarin fluorescence probes. *RSC Advances*. **2020**, 10(18), 10826-10847. (DOI:10.1039/c9ra10290f).
- [148] Chen, H.; Hu, Q.; Li, W.; Cai, X.; Mao, L.; Li, R. Approaches to Nanoparticle Labeling: A Review of Fluorescent, Radiological, and Metallic Techniques. *Environment and Health*. **2023**, 1(2), 75-89. (DOI:10.1021/envhealth.3c00034)
- [149] Hanson, G.T.; Hanson, B.J. Fluorescent Probes for Cellular Assays. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*. **2008**, 11, 505-513. (DOI: 10.2174/138620708785204090).
- [150] Karthik, C.S.; Skorjanc, T.; Shetty, D. Fluorescent covalent organic frameworks - promising bioimaging materials. *Materials Horizons*. **2024**, 11(9), 2077-2094. (DOI:10.1039/d3mh01698f).

- [151] Mir, M.H.; Parmar, S.; Singh, C.; Kalia, D. Location-agnostic site-specific protein bioconjugation via Baylis Hillman adducts. *Nature Communications*. **2024**, *15*(1). (DOI:10.1038/s41467-024-45124-2).
- [152] Wang, H.; Zhang, Y.; wang, W.; Chao, J.; Khan, R.U.; Zeng, S.; Qian, L. Fluorescent labeling of live-cell surfaceome and its application in antibody-target interaction analysis. *Analytica Chimica Acta*. **2024**, *1330*, 343296. (DOI:10.1016/j.aca.2024.343296).
- [153] Boutureira, O.; Bernardes, G.J.L. Advances in chemical protein modification. *Chemical Reviews*. **2015**, *115*(5), 2174-2195. (DOI:10.1021/cr500399p).
- [154] Im, K.; Mareninov, S.; Diaz, M.F.P.; Yong, W.H. An introduction to performing immunofluorescence staining. *Methods in Molecular Biology*. Humana Press Inc.; **2019**, *1897*, 299-311. (DOI:10.1007/978-1-4939-8935-5_26).
- [155] Joshi, S., Yu, D. Immunofluorescence. In: *Basic Science Methods for Clinical Researchers*. Elsevier Inc.; **2017**, 135-150. (DOI:10.1016/B978-0-12-803077-6.00008-4).
- [156] Gu, J.; Wang, H.; Zhang, M.; Xiong, Y.; Yang, L.; Ren, B.; Huang, R. Application of Fluorescence *In Situ* Hybridization (FISH) in Oral Microbial Detection. *Pathogens*. **2022**, *11*(12). (DOI:10.3390/pathogens11121450).
- [157] Cui, C.; Shu, W.; Li, P. Fluorescence in situ hybridization: Cell-based genetic diagnostic and research applications. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. **2016**, *4*, 89. (DOI:10.3389/fcell.2016.00089).
- [158] Ehtisham, M.; Wani, F.; Wani, I.; Kaur, P.; Nissar, S. *Fundamentals of In Situ Hybridization: A Review*. **2016**, *1*(4), 23-29.
- [159] Moter, A.; Göbel, U.B. Invited Review Fluorescence in Situ Hybridization (FISH) for Direct Visualization of Microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*. **2000**, *41*, 85-112. (DOI:10.1016/S0167-7012(00)00152-4).

- [160] Huber, D.; Voith, V.V.L.; Kaigala, G.V. Fluorescence in situ hybridization (FISH): History, limitations and what to expect from micro-scale FISH? *Micro and Nano Engineering*. **2018**, *1*, 15-24. (DOI:10.1016/j.mne.2018.10.006).
- [161] Young, A.P.; Jackson, D.J.; Wyeth, R.C. A technical review and guide to RNA fluorescence in situ hybridization. *PeerJ*. **2020**, *8*, e8806. (DOI:10.7717/peerj.8806).
- [162] Park, H.W.; Sevileno, S.S.; Ha, M.K.T.T.; Cabahug-Braza, R.A.; Yi, J.H.; Lim, K.B.; Cho, W.; Hwang, Yoon J. The Application of Fluorescence *In Situ* Hybridization in the Prescreening of Veronica Hybrids. *Plants*. **2024**, *13*(9), 1264. (DOI:10.3390/plants13091264).
- [163] Cui, C.; Shu, W.; Li, P. Fluorescence in situ hybridization: Cell-based genetic diagnostic and research applications. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. **2016**, *43*(3), 263-293. (DOI:10.3389/fcell.2016.00089).
- [164] Pernthaler, J.; Glöckner, F.O.; Schönhuber, W.; Amann, R. Fluorescence in situ Hybridization (FISH) with rRNA-targeted Oligonucleotide Probes *Methods in Microbiology*. **2001**, *30*, 207-226. (DOI:10.1016/S0580-9517(01)30046-6).
- [165] Amann, R.; Fuchs, B.M.; Behrens, S. The identification of microorganisms by fluorescence in situ hybridisation. *Current Opinion in Biotechnology*. **2001**, *12*(3), 231-6. (DOI:10.1016/s0958-1669(00)00204-4).
- [166] Lukumbuzya, M.; Schmid, M.; Pjevac, P.; Daims, H. A multicolor fluorescence in situ hybridization approach using an extended set of fluorophores to visualize microorganisms. *Frontiers in Microbiology*. **2019**, *10*, 1383. (DOI:10.3389/fmicb.2019.01383).
- [167] Wagner, M.; Haider, S. New trends in fluorescence in situ hybridization for identification and functional analyses of microbes. *Current Opinion in Biotechnology*. **2012**, *23*(1), 96-102. (DOI:10.1016/j.copbio.2011.10.010).
- [168] Tsui, C.K.M.; Woodhall, J.; Chen, W. Lévesque, C.A.; Lau, A.; Schoen, C.D.; Baschien, C.; Najafzadeh, M.J.; de Hoog, G.S. Molecular techniques for pathogen identification and fungus detection in the environment. *IMA Fungus*. **2011**, *2*(2), 177-189. (DOI:10.5598/ima fungus.2011.02.02.09).

- [169] Shakoori, A.R. Fluorescence In Situ hybridization (FISH) and its applications. In: *Chromosome Structure and Aberrations*. Springer India. **2017**, 343-367. (DOI:10.1007/978-81-322-3673-3_16).
- [170] Rolph, M.J.; Bolfa, P.; Cavanaugh, S.M.; Rolph, K.E. Fluorescent In Situ Hybridization for the Detection of Intracellular Bacteria in Companion Animals. *Veterinary Sciences*. **2024**, 11(1), 52. (DOI:10.3390/vetsci11010052).
- [171] Chrzanowska, N.M.; Kowalewski, J.; Lewandowska, M.A. Use of fluorescence in situ hybridization (FISH) in diagnosis and tailored therapies in solid tumors. *Molecules*. **2020**, 25(8), 1864. (DOI:10.3390/molecules25081864).
- [172] Onozato, M.L.; Yapp, C.; Richardson, D.; Sundaresan, T.; Chahal, V.; Lee, J.; Sullivan, J.P.; Madden, M.W.; Shim, H.S.; Liebers, M.; Ho, Q.; Maheswaran, S.; Haber, D.A.; Zheng, Z.; Clancy, B.; Elliott, H.L.; Lennerz, J.K.; Iafrate, A.J. Highly Multiplexed Fluorescence in Situ Hybridization for in Situ Genomics. *Journal of Molecular Diagnostics*. **2019**, 21(3), 390-407. (DOI:10.1016/j.jmoldx.2019.01.010).
- [173] Liehr, T.; Starke, H.; Weise, A.; Lehrer, H.; Claussen, U. Multicolor FISH probe sets and their applications. *Histology and Histopathology*. **2004**, 19(1), 229-37. (DOI:10.14670/HH-19.229. PMID: 14702191).
- [174] Cullander, C. Fluorescent probes for confocal microscopy. *Methods in Molecular Biology*. **1999**, 122, 59-73. (DOI:10.1385/1-59259-722-x:59).
- [175] Amann, R.; Fuchs, B.M. Single-cell identification in microbial communities by improved fluorescence in situ hybridization techniques. *Nature Reviews Microbiology*. **2008**, 6(5), 339-348. (DOI:10.1038/nrmicro1888).
- [176] Bottari, B.; Ercolini, D.; Gatti, M.; Neviani, E. Application of FISH technology for microbiological analysis: Current state and prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **2006**, 73(3), 485-494. (DOI:10.1007/s00253-006-0615-z).
- [177] Roller, C.; Wagner, M.; Amann, R.; Ludwig, W.; Schleifer, K.H. In situ probing of gram-positive bacteria with high DNA G+C content using 23S rRNA-targeted oligonucleotides. *Microbiology*. **1994**, 140(10), 2849-2858. (DOI:10.1099/00221287-140-10-2849).

- [178] Khatoon, H.; Abdulmalek, E. A focused review of synthetic applications of Lawesson's reagent in organic synthesis. *Molecules*. **2021**, 26(22), 6937. (DOI:10.3390/molecules26226937).
- [179] Cava, M.P.; Levinson M.I. Thionation reactions of Lawesson's reagents. *Tetrahedron Report Number 192*. **1985**, 41(22), 5061-5087.
- [180] Saeed, A.; Mehfooz, H.; Larik, F.A.; Faisal, M.; Channar, P.A. Applications of Lawesson's reagent in the synthesis of naturally occurring steroids and terpenoids. *Journal of Asian Natural Products Research*. **2017**, 19(11), 1114-1123. (DOI:10.1080/10286020.2017.1295229).
- [181] Pogorilyy, V.; Ostroverkhov, P.; Efimova, V.; Plotnikova, E.; Bezborodova, O.; Diachkova, E.; Vasil'ev, Y.; Pankratov, A.; Grin, M. Thiocarbonyl Derivatives of Natural Chlorins: Synthesis Using Lawesson's Reagent and a Study of Their Properties. *Molecules*. **2023**, 28(10), 4215. (DOI:10.3390/molecules28104215).
- [182] Ozturk, T.; Ertas, E.; Mert, O. Use of Lawesson's reagent in organic syntheses. *Chemical Reviews*. **2007**, 107(11), 5210-5278. (DOI:10.1021/cr040650b).
- [183] Ali Larik, F.; Saeed, A.; Muqadar, U.; El-Seedib, H.; Faisala, M.; Ali Channara, P.; Mehfooza, C. The Role of Lawesson's Reagent in the Total Synthesis of Macrocyclic Natural Products. *Phosphorus, Sulfur, and Silicon the Related Elements*. **2017**, 192(5), 490–502. (DOI:10.1080/10426507.2016.1259236).
- [184] Corsaro, A.; Pistar, V. Tetrahedron Report Number 475 - Conversion of the Thiocarbonyl Group into the Carbonyl Group. *Tetrahedron* 54. **1998**, 15027-15062.
- [185] Mandal, S.; Mandal, S.; Ghosh, S.K.; Ghosh, A.; Saha, R.; Banerjee, S.; Saha, B. Review of the aldol reaction. *Synthetic Communications*. **2016**, 46(16), 1327-1342. (DOI:10.1080/00397911.2016.1206938).
- [186] Ouellette, R.J.; Rawn, J.D. Condensation Reactions of Carbonyl Compounds. *Organic Chemistry Study Guide*. **2015**, 419-463. (DOI:10.1016/b978-0-12-801889-7.00022-4).

- [187] Perrin, C.L.; Chang, K.L. The Complete Mechanism of an Aldol Condensation. *Journal of Organic Chemistry*. **2016**, 81(13), 5631-5635. (DOI:10.1021/acs.joc.6b00959).
- [188] Zhang, X.; Li, Y.Q.; Qian, C.; An, L.; Wang, W.; Li, X.F.; Shao, X.Z.; Li, Z. Research progress of catalysts for aldol condensation of biomass based compounds. *RSC Advances*. **2023**, 13(14), 9466-9478. (DOI:10.1039/d3ra00906h).
- [189] Kanwal, I.; Mujahid, A.; Rasool, N.; Rizwan, K.; Malik, A.; Ahmad, G.; Shah, S.A.A.; Rashid, U.; Nasir, N.M. Palladium and copper catalyzed Sonogashira cross coupling has been an excellent methodology for C-C bond formation for 17 years: A review. *Catalysts*. **2020**, 10(4), 443. (DOI:10.3390/catal10040443).
- [190] Thomas, A.M.; Sujatha, A.; Anilkumar, G. Recent advances and perspectives in copper-catalyzed Sonogashira coupling reactions. *RSC Advances*. **2014**, 4(42), 21688-21698. (DOI:10.1039/c4ra02529f).
- [191] Johansson Seechurn, C.C.C.; Kitching, M.O.; Colacot, T.J.; Snieckus, V. Palladium-catalyzed cross-coupling: A historical contextual perspective to the 2010 nobel prize. *Angewandte Chemie - International Edition*. **2012**, 51(21), 5062-5085. (DOI:10.1002/anie.201107017).
- [192] Rajalakshmi, C.; Jibin, S.S.; Sulay, R.; Asha, S.; Ipe Thomas, V.; Anilkumar, G. Theoretical investigation into the mechanism of copper-catalyzed Sonogashira coupling using trans-1,2-diamino cyclohexane ligand. *Polyhedron*. **2021**, 193, 114869. (DOI:10.1016/j.poly.2020.114869).
- [193] Jagtap, S. Heck reaction-State of the art. *Catalysts*. **2017**, 7(9), 267. (DOI:10.3390/catal7090267).
- [194] Oestreich, M.; The Mizoroki-Heck Reaction. Wiley. 1st ed.; John Wiley & Sons, Ltd. **2009**. (DOI:10.1002/9780470716076).
- [195] Koranne, A.; Turakhia, S.; Jha, V.K, Gupta, S.; Ravi, R.; Mishra, A.; Aggarwal, A.K.; Jha, C.K.; Dheer, N.; Jha, A.K. The Mizoroki-Heck reaction between in situ generated alkenes and aryl halides: cross-coupling route to substituted olefins. *RSC Advances*. **2023**, 13(32), 22512-22528. (DOI:10.1039/d3ra03533f).

- [196] Whitcombe, N.J.; Kuok, K.; Hii, M.; Gibson, S.E. Tetrahedron Report Number 582 - Advances in the Heck Chemistry of Aryl Bromides and Chlorides. *Tetrahedron* **2001**, 57, 7449-7476.
- [197] Oxtoby, L.J.; Gurak, J.A.; Wisniewski, S.R.; Eastgate, M.D.; Engle, K.M. Palladium-Catalyzed Reductive Heck Coupling of Alkenes. *Trends in Chemistry*. **2019**, 1(6), 572-587. (DOI:10.1016/j.trechm.2019.05.007).
- [198] Mc Cartney, D.; Guiry, P.J. The asymmetric Heck and related reactions. *Chemical Society Reviews*. **2011**, 40(10), 5122-5150. (DOI:10.1039/c1cs15101k).
- [199] Dounay, A.B.; Overman, L.E. The asymmetric intramolecular Heck reaction in natural product total synthesis. *Chemical Reviews*. **2003**, 103(8), 2945-2963. (DOI:10.1021/cr020039h).
- [200] Dieck, H.A.; Heck, R.F. Organophosphinepalladium Complexes as Catalysts for Vinylic Hydrogen Substitution Reactions. *Journal of the American Chemical Society*. **1974**, 96(4), 1133-1136. (DOI:10.1021/ja00811a029).
- [201] Lee, G.S.; Kim, D.; Hong, S.H. Pd-catalyzed formal Mizoroki–Heck coupling of unactivated alkyl chlorides. *Nature Communications*. **2021**, 12(1), 991. (DOI:10.1038/s41467-021-21270-9).
- [202] Rayadurgam, J.; Sana, S.; Sasikumar, M.; Gu, Q. Palladium Catalyzed C-C and C-N Bond Forming Reactions: An Update on Synthesis of 2020-2015 Pharmaceuticals. *Organic Chemistry Frontiers*. **2021**, 8, 384-414 (DOI:10.1039/d0qo01146k).
- [203] Farhang, M.; Akbarzadeh, A.R.; Rabbani, M.; Ghadiri, A.M. A retrospective-prospective review of Suzuki–Miyaura reaction: From cross-coupling reaction to pharmaceutical industry applications. *Polyhedron*. **2022**, 227, 116124. (DOI:10.1016/j.poly.2022.116124).
- [204] Miyaura, N.; Yamada, K.; Suzuki, A. A new stereospecific cross-coupling by the palladium-catalyzed reaction of 1-alkenylboranes with 1-alkenyl or 1-alkynyl halides. *Tetrahedron Letters*. **1979**, 20(36), 3437-3440. (DOI:10.1016/s0040-4039(01)95429-2).

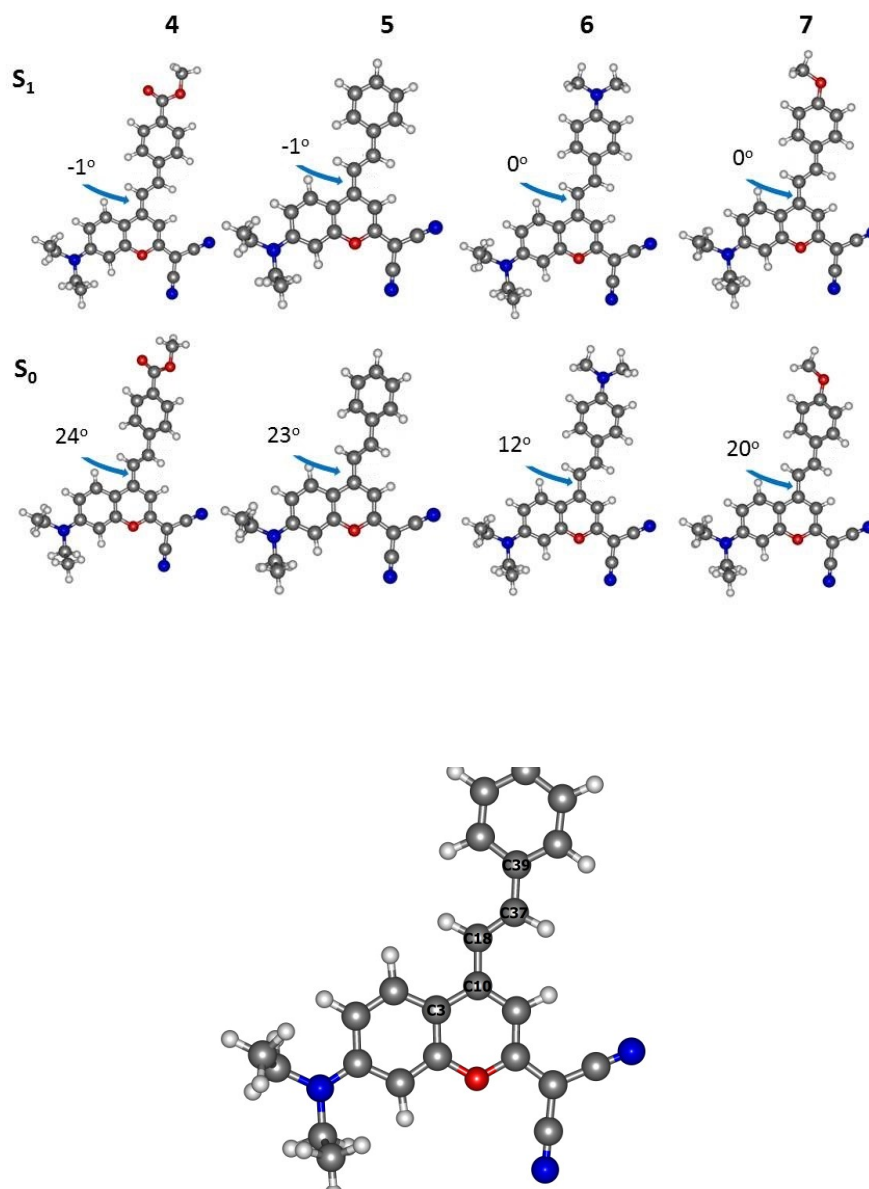
- [205] Miyaura, N.; Suzuki, A. Stereoselective synthesis of arylated (*E*)-alkenes by the reaction of alk-1-enylboranes with aryl halides in the presence of palladium catalyst. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*. **1979**, 866-867. (DOI:10.1039/c39790000866).
- [206] Barnard, B. C. Palladium-Catalysed C-C Coupling: Then and Now. *Platinum Metals Review*. **2008**, 52(1), 38-45. (DOI:10.1595/147106708x256634).
- [207] Miyaura, N.; Yanagi, T.; Suzuki, A. The Palladium-Catalyzed Cross-Coupling Reaction of Phenylboronic Acid with Haloarenes in the Presence of Bases. *Synthetic Communications*. **1981**, 11(7), 513-519. (DOI:10.1080/00397918108063618).
- [208] Miyaura, N.; Suzuki, A. Palladium-Catalyzed Cross-Coupling Reactions of Organoboron Compounds. *Chemical Reviews*. **1995**, 95(7), 2457-2483. (DOI:10.1021/cr00039a007).
- [209] Molander, G. A.; Jean-Gérard, L. Cross-Coupling Reactions of Organotrifluoroborate Salts. Denmark, S.E. (Ed.), *Organic Reactions*, John Wiley & Sons, **2013**, 79, 1-316. (DOI:10.1002/0471264180.or079.01).
- [210] Kadu, B.S. Suzuki-Miyaura cross coupling reaction: recent advancements in catalysis and organic synthesis. *Catalysis Science and Technology*. **2021**, 11(4), 1186-1221. (DOI:10.1039/d0cy02059a).
- [211] Ahmed, A.; Mushtaq, I.; Chinnam, S. Suzuki-Miyaura cross-couplings for alkyl boron reagent: recent developments-a review. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*. **2023**, 9(1). (DOI:10.1186/s43094-023-00520-1).
- [212] Vedejs, E.; Chapman, R. W.; Fields, S. C.; Lin, S.; Schrimpf, M. R. Conversion of Arylboronic Acids into Potassium Aryltrifluoroborates: Convenient Precursors of Arylboron Difluoride Lewis Acids. *The Journal of Organic Chemistry*. **1995**, 60(10), 3020-3027. (DOI:10.1021/jo00115a016).
- [213] Molander, G. A.; Jean-Gérard, L. Scope of the Suzuki-Miyaura Aminoethylation Reaction Using Organotrifluoroborates. *The Journal of Organic Chemistry*. **2007**, 72(22), 8422-8426. (DOI:10.1021/jo7015955).

- [214] Molander, G. A.; Bernardi, C. R. Suzuki–Miyaura Cross-Coupling Reactions of Potassium Alkenyltrifluoroborates. *The Journal of Organic Chemistry*. **2002**, 67(24), 8424-8429. (DOI:10.1021/jo026236y).
- [215] Molander, G. A.; Rivero, M. R. Suzuki Cross-Coupling Reactions of Potassium Alkenyltrifluoroborates. *Organic Letters*. **2002**, 4(1), 107-109. (DOI:10.1021/ol0169729).
- [216] Joo, J.; Won, M.; Park, S.; Park, K.; Shin, D.S.; Kim, J.; Lee, M. A dicyanocoumarin-fused quinolinium based probe for NAD(P)H and its use for detecting glycolysis and hypoxia in living cells and tumor spheroids. *Sensors and Actuators B: Chemical*. **2020**, 320, 128360. (DOI:10.1016/j.snb.2020.128360).
- [217] Chen, Y.; Zhao, J.; Guo, H.; Xie, L. Geometry Relaxation-Induced Large Stokes Shift in Red-Emitting Borondipyrromethenes (BODIPY) and Applications in Fluorescent Thiol Probes. *The Journal of Organic Chemistry*. **2012**, 77, 2192-2206. (DOI:10.1021/jo202215x).
- [218] Ma, J.; Zhang, Y.; Zhang, H.; He, X. Near infrared absorption/emission perylenebisimide fluorophores with geometry relaxation- induced large Stokes shift. *RSC Advances*. **2020**, 10, 35840-35847. (DOI:10.1039/D0RA07050E).
- [219] Jaggi, M.; Blum, C.; Marti, B.S.; Liu, S.X.; Leutwyler, S.; Decurtins, S. Annulation of Tetrathiafulvalene to the Bay Region of Perylenediimide. *Organic Letters*. **2010**, 12, 1344-1347. (DOI:10.1021/ol1002708).
- [220] Sednev, M.V.; Belov, V.N.; Hell, S.W. Fluorescent dyes with large Stokes shifts for super-resolution optical microscopy of biological objects: A review. *Methods and Applications in Fluorescence*. **2015**, 3, 042004. (DOI:10.1088/2050-6120/3/4/042004).
- [221] Cisse, L.; Djande, A.; Capo-Chichi, M.; Khonté, A.; Bakhoum, J.; Delattre, F.; Yoda, J.; Saba, A.; Tine, A.; Aaron, J. Quantitative study of the substituent effects on the electronic absorption and fluorescence spectra of coumarins. *Journal of Physical Organic Chemistry*. **2019**, 33, e4014. (DOI:10.1002/poc.4014).
- [222] Guido, C.; Cortona, P.; Mennucci, B.; Adamo, C. On the Metric of Charge Transfer Molecular Excitations: A Simple Chemical Descriptor. *Journal of Chemical Theory and Computation*. **2013**, 9, 3118-3126. (DOI:10.1021/ct400337e).

- [223] Kasha, M. Characterization of electronic transitions in complex molecules, *Discussions of the Faraday Society*. **1950**, 9, 14-19. (DOI:10.1039/DF9500900014).
- [224] Eustáquio, R.; Caldeira, A.T.; Arantes, S.; Candeias, A.; Pereira, A. New 4-styrylcoumarin derivatives as potentials fluorescent labels for biomolecules: application in RNA-FISH probes. *Applied Biochemistry and Microbiology*, **2024**, 60, 1118-1130. (DOI:10.1134/S000368382360286X).
- [225] Xiao, Y.; Qian, X. Substitution of oxygen with silicon: A big step forward for fluorescent dyes in life science. *Coordination Chemistry Reviews*, **2020**, 423, 213513. (DOI:10.1016/j.ccr.2020.213513).
- [226] Eustáquio, R.; Ramalho, J.P.P.; Arantes, S.; Candeias, A.; Caldeira, A.T.; Pereira, A. Affordable Small Molecules as Promising Fluorescent Labels for Biomolecules. *Molecules*. **2024**, 29, 5237. (DOI:10.3390/molecules29225237).
- [227] Frisch, M.J.; Trucks, G.W.; Schlegel, H.B.; Scuseria, G.E.; Robb, M.A.; Cheeseman, J.R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Petersson, G.A.; Nakatsuji, H.; et al. *Gaussian 16*; Revision B.01; Gaussian, Inc.: Wallingford, CT, USA, **2016**.
- [228] Zhao, Y.; Truhlar, D.G. The M06 suite of density functionals for main group thermochemistry, thermochemical kinetics, noncova- lent interactions, excited states, and transition elements: Two new functionals and systematic testing of four M06-class functionals and 12 other functionals. *Theor. Chem. Acc.* **2008**, 120, 215-241. (DOI:10.1007/s00214-007-0310-x).
- [229] Sun, S.; Yuan, Y.; Li, Z.; Zhang, S.; Zhang, H.; Peng, X. Interaction of a hemicyanine dye and its derivative with DNA and cucurbit[7]uril. *New Journal of Chemistry*. **2014**, 38(8), 3600-3605. (DOI:10.1039/c4nj00068d).
- [230] Still, W. C.; Kahn, M.; Mitra, A. Rapid chromatographic technique for preparative separations with moderate resolution. *The Journal of Organic Chemistry*. **1978**, 43(14), 2923-2925. (DOI:10.1021/jo00408a041).
- [231] E. Merck *Dyeing Reagents for Thin Layer and Paper Chromatography*, Merk, Darmstadt, **1978**, 118.

- [232] Gandioso, A.; Bresolí-Obach, R.; Nin-Hill, A.; Bosch, M.; Palau, M.; Galindo, A.; Contreras, S.; Rovira, A.; Rovira, C.; Nonell, S.; Marchań, V. Redesigning the coumarin scaffold into small bright fluorophores with far-red to NIR emission and large Stokes shifts useful for cell imaging. *The Journal of Organic Chemistry*. **2018**, 83, 1185-1195. (DOI:10.1021/acs.joc.7b02660).
- [233] Amovilli, C.; Barone, V.; Cammi, R.; Cancès, E.; Cossi, M.; Mennucci, B.; Pomelli, C.S.; Tomasi, J. Recent Advances in the Description of Solvent Effects with the Polarizable Continuum Model. *Journal Advances in Quantum Chemistry*. **1998**, 32, 227-261. (DOI:10.1016/S0065-3276(08)60416-5).
- [234] Cossi, M.; Barone, V. Time-dependent density functional theory for molecules in liquid solutions. *The Journal of Chemical Physics*. **2001**, 115, 4708-4717. (DOI:10.1063/1.1394921).
- [235] Deere, D.; Vesey, G.; Ashbolt, N.; Davies, K. A.; Williams, K. L.; Veal, D. Evaluation of fluorochromes for flow cytometric detection of *Cryptosporidium parvum* oocysts labelled by fluorescent *in situ* hybridization. *Letters in Applied Microbiology*. **1998**, 27(6), 352-356. (DOI:10.1046/j.1472-765x.1998.00446.x).
- [236] Spear, R. N.; Li, S.; Nordheim, E. V.; Andrews, J. H., "Quantitative imaging and statistical analysis of fluorescence *in situ* hybridization (FISH) of *Aureobasidium pullulans*", *Journal Microbiological Methods*. **1999**, 35(2), 101-110. (DOI:10.1016/s0167-7012(98)00100-6).
- [237] *Methods in Molecular Biology*, Fan, Y.S., Ed., New Jersey: Humana, **2002**, 204, 41-49.
- [238] González-Pérez, M.; Brinco, C.; Vieira, R.; Rosado, T.; Mauran, G.; Pereira, A., Candeias, A.; Caldeira, A. T. Dual phylogenetic staining protocol for simultaneous analysis of yeast and bacteria in artworks. *Applied Physics A*. **2017**, 123(2), 123-142. (DOI:10.1007/s00339-016-0725-0).

VI. ANEXOS



Numeração adotada para os compostos 4 a 7.

Figura VI.1. Estruturas otimizadas dos compostos 4 a 7 no estado fundamental S_0 e no estado excitado S_1 .

Tabela VI.1. Distâncias de ligação selecionadas (Å) e ângulo diedro (°) dos compostos **4** a **7** no estado fundamental S_0 e excitado S_1 .

	r[C10-C18]	r[C18-C37]	r[C37-C39]	BLA	D _h [C3-C10-C18-C37]
S_0					
4	1.456	1.348	1.459	0.11	24.5
5	1.454	1.349	1.458	0.11	23.0
6	1.442	1.359	1.440	0.08	11.9
7	1.450	1.353	1.451	0.10	19.8
S_1					
4	1.409	1.382	1.432	0.04	-0.9
5	1.409	1.380	1.440	0.04	-0.6
6	1.417	1.385	1.430	0.04	-0.3
7	1.406	1.383	1.436	0.04	-0.5

Tabela VI.2. Comprimentos de onda de absorção calculados para os compostos **4** a **7** e orbitais envolvidas nas transições.

Composto 4

Estado	λ (nm)	f	Transições das orbitais moleculares
S_1	534.7	0.542	HOMO→LUMO (99%)
S_2	417.4	1.203	H-1→LUMO (98%)
S_3	355.4	0.302	H-2→LUMO (95%)
S_4	344.8	0.314	HOMO→L+1 (97%)
S_5	303.9	0.037	H-3→LUMO (93%)
S_6	300.1	0.065	H-4→LUMO (71%), HOMO→L+2 (21%)
S_7	289.6	0.231	H-1→L+1 (41%), HOMO→L+2 (42%)
S_8	280.3	0.028	H-4→LUMO (17%), H-1→L+1 (53%), HOMO→L+2 (22%)
S_9	270.7	0.001	H-1→L+5 (17%), HOMO→L+5 (77%)
S_{10}	270.6	0.000	H-5→LUMO (78%), H-5→L+1 (17%)

Composto 5

Estado	λ (nm)	f	Transições das orbitais moleculares
S ₁	513.3	0.618	HOMO→LUMO (99%)
S ₂	415.0	1.140	H-1→LUMO (98%)
S ₃	349.3	0.164	H-2→LUMO (96%)
S ₄	316.2	0.244	HOMO→L+1 (94%)
S ₅	304.1	0.023	H-3→LUMO (95%)
S ₆	292.8	0.062	H-4→LUMO (76%), HOMO→L+2 (17%)
S ₇	278.8	0.347	H-4→LUMO (14%), H-1→L+1 (15%), HOMO→L+2 (61%)
S ₈	271.8	0.002	H-1→L+5 (15%), HOMO→L+5 (76%)
S ₉	267.3	0.045	H-1→L+1 (65%), HOMO→L+2 (15%)
S ₁₀	262.2	0.083	H-1→L+1 (16%), HOMO→L+3 (10%), HOMO→L+4 (64%)

Composto 6

Estado	λ (nm)	f	Transições das orbitais moleculares
S ₁	543.9	1.442	HOMO→LUMO (98%)
S ₂	495.6	0.712	H-1→LUMO (99%)
S ₃	360.1	0.017	H-2→LUMO (95%)
S ₄	317.1	0.130	H-3→LUMO (24%), HOMO→L+1 (65%)
S ₅	310.8	0.054	H-3→LUMO (39%), H-1→L+1 (25%), HOMO→L+1 (23%)
S ₆	306.1	0.242	H-3→LUMO (31%), H-1→L+1 (63%)
S ₇	299.1	0.022	H-4→LUMO (65%), HOMO→L+3 (20%)
S ₈	284.6	0.106	H-4→LUMO (26%), HOMO→L+2 (40%), HOMO→L+3 (29%)
S ₉	280.6	0.272	H-1→L+2 (13%), HOMO→L+2 (42%), HOMO→L+3 (31%)
S ₁₀	278.7	0.003	H-2→L+5 (13%), H-1→L+5 (42%), HOMO→L+5 (38%)

Composto 7

Estado	λ (nm)	f	Transições das orbitais moleculares
S ₁	507.2	0.634	HOMO→LUMO (99%)
S ₂	452.3	1.324	H-1→LUMO (99%)
S ₃	354.3	0.034	H-2→LUMO (96%)
S ₄	312.7	0.209	HOMO→L+1 (88%)
S ₅	297.9	0.049	H-3→LUMO (83%)
S ₆	293.6	0.031	H-4→LUMO (78%)
S ₇	283.6	0.212	H-4→LUMO (10%), H-1→L+1 (70%), HOMO→L+2 (15%)
S ₈	275.0	0.179	H-1→L+1 (17%), HOMO→L+2 (66%)
S ₉	273.6	0.005	H-2→L+5 (11%), HOMO→L+5 (75%)
S ₁₀	263.5	0.078	H-1→L+2 (13%), HOMO→L+3 (31%), HOMO→L+4 (43%)

Tabela V.3. Comprimentos de onda de emissão calculados para os compostos **4** a **7** e orbitais envolvidas nas transições. S₁→S₀.

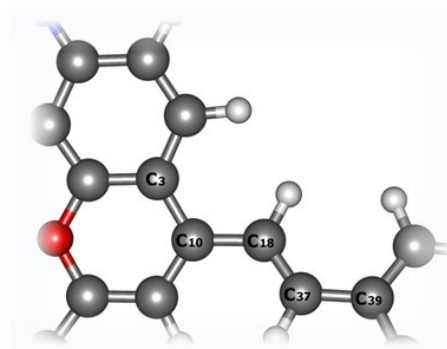
Composto	λ (nm)	f	Transições das orbitais moleculares
4	630.2	0.438	HOMO→LUMO (99%)
5	590.0	0.505	HOMO→LUMO (99%)
6	583.0	1.512	HOMO→LUMO (99%)
7	577.1	0.539	HOMO→LUMO (99%)

Tabela VI.4. Comprimentos de onda de absorção calculados nas transições de mais baixa energia dos compostos **11** e **26**.

Composto		Comprimento de onda (nm)	f	Composição	Δr (Å)
11	S ₀ →S ₁	507.6	0.637	HOMO→LUMO (99%)	2.287
	S ₀ →S ₂	455.9	1.352	H-1→LUMO (99%)	1.609
26	S ₀ →S ₁	543.6	1.467	HOMO→LUMO (98%)	3.753
	S ₀ →S ₂	495.2	0.709	H-1→LUMO (99%)	3.048

Tabela VI.5. Distâncias de ligação selecionadas (Å), ângulo diedro (°) e BLA (Å) dos compostos **11** e **26** no estado fundamental S_0 e no estado excitado S_1 .

Composto	r[10-18]		r[18-37]		r[37-39]		BLA		D[3-10-18-37]	
	S_0	S_1	S_0	S_1	S_0	S_1	S_0	S_1	S_0	S_1
11	1.450	1.405	1.353	1.383	1.451	1.436	0.10	0.04	18.9	0.7
26	1.442	1.417	1.359	1.385	1.440	1.430	0.08	0.04	12.6	0.1



Numeração adotada para os marcadores fluorescentes **11**, **26**, **36**, **38**, **51** e **53**.

Tabela VI.6. Comprimentos de onda de emissão calculados nas transições de mais baixa energia dos compostos **11** e **26**.

Composto		Comprimento de onda (nm)	f	Composição	τ (ns)
11	$S_1 \rightarrow S_0$	576.2	0.546	HOMO \rightarrow LUMO (99%)	9.11
26	$S_1 \rightarrow S_0$	583.2	1.543	HOMO \rightarrow LUMO (99%)	3.30

Tabela VI.7. Dados de absorção calculados para os compostos **31** a **34** e orbitais envolvidas nas transições.

Composto 31

Estado	λ (nm)	f	Transições das orbitais moleculares
S_1	494	0.534	HOMO \rightarrow LUMO (99%)
S_2	389	1.377	H-1 \rightarrow LUMO (99%)
S_3	333	0.087	H-2 \rightarrow LUMO (94%)
S_4	324	0.271	HOMO \rightarrow L+1 (94%)
S_5	304	0.041	H-3 \rightarrow LUMO (93%)

Composto 32

Estado	λ (nm)	f	Transições das orbitais moleculares
S ₁	473	0.618	HOMO→LUMO (99%)
S ₂	391	1.163	H-1→LUMO (99%)
S ₃	324	0.057	H-2→LUMO (95%)
S ₄	304	0.026	H-3→LUMO (95%)
S ₅	300	0.196	HOMO→L+1 (89%)

Composto 33

Estado	λ (nm)	f	Transições das orbitais moleculares
S ₁	526	1.535	HOMO→LUMO (98%)
S ₂	457	0.518	H-1→LUMO (98%)
S ₃	324	0.072	H-3→LUMO (11%), H-2→LUMO (82%)
S ₄	309	0.113	H-3→LUMO (29%), HOMO→L+1 (56%)
S ₅	305	0.036	H-3→LUMO (48%), H-2→LUMO (15%), H→L+1 (17%)

Composto 34

Estado	λ (nm)	f	Transições das orbitais moleculares
S ₁	468	0.714	HOMO→LUMO (98%)
S ₂	429	1.141	H-1→LUMO (98%)
S ₃	322	0.047	H-2→LUMO (93%)
S ₄	296	0.150	HOMO→L+1 (83%), HOMO→L+2 (10%)
S ₅	292	0.012	H-3→LUMO (85%)

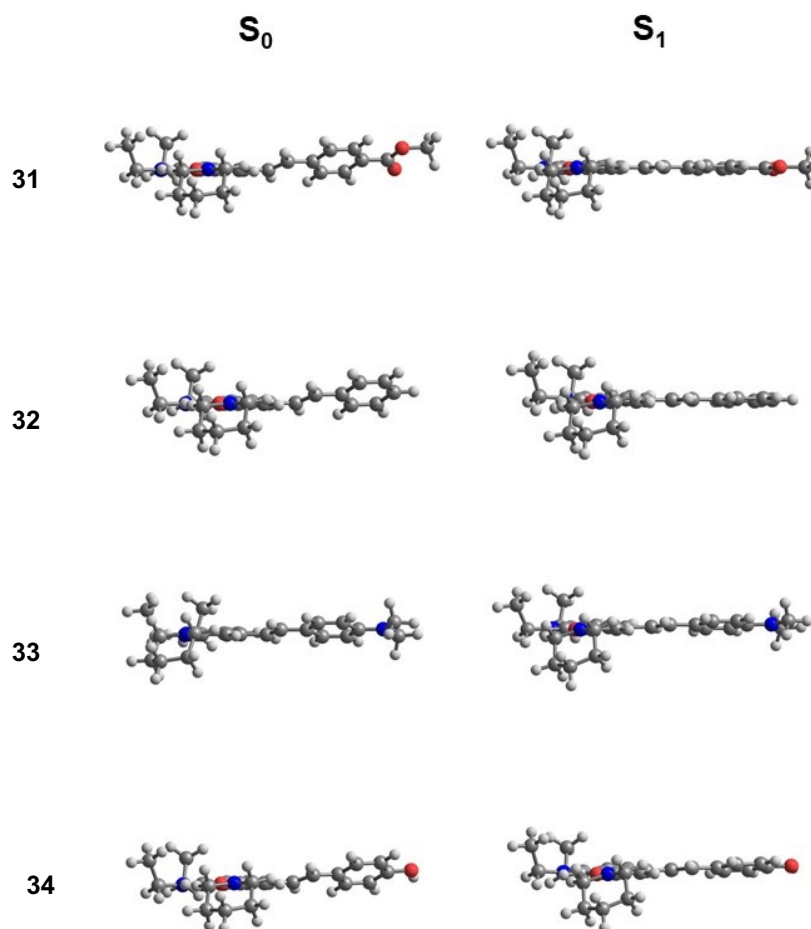
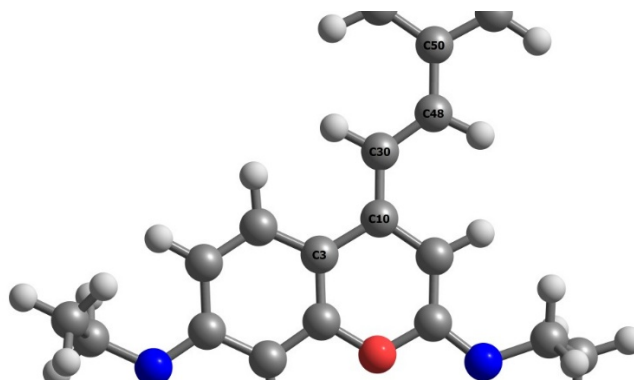


Figura VI.2. Estruturas otimizadas dos compostos no estado fundamental S_0 e no estado excitado S_1 , dos compostos **31** a **34**.

Tabela VI.8. Distâncias de ligação selecionadas (Å) e ângulo diedro ($^\circ$) dos compostos **31** a **34** no estado fundamental S_0 e no estado excitado S_1 .

Composto	r[C10-C30]		r[C30-C48]		r[C48-C50]		BLA		D _h [C3-C10-C30-C48]	
	S ₀	S ₁	S ₀	S ₁	S ₀	S ₁	S ₀	S ₁	S ₀	S ₁
31	1.456	1.408	1.349	1.384	1.459	1.431	0.11	0.04	25.5	2.1
32	1.454	1.408	1.350	1.381	1.457	1.439	0.11	0.04	23.9	3.1
33	1.440	1.430	1.360	1.378	1.438	1.438	0.08	0.06	14.5	6.8
34	1.449	1.407	1.353	1.383	1.450	1.436	0.10	0.04	20.9	5.1



Numeração adotada para os compostos **31** a **34**.

Tabela VI.9. Comprimentos de onda de emissão calculados para os compostos **31** a **34** e orbitais envolvidas nas transições $S_1 \rightarrow S_0$.

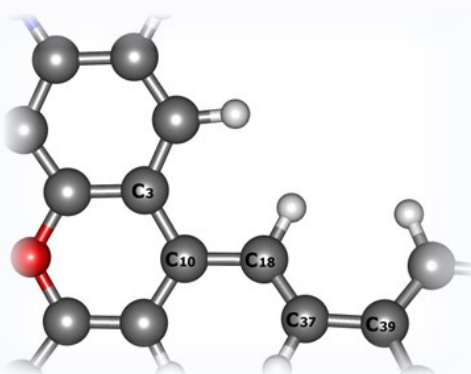
Composto	λ (nm)	f	Transições das orbitais moleculares
31	578	0.450	HOMO \rightarrow LUMO (99%)
32	539	0.530	HOMO \rightarrow LUMO (99%)
33	558	1.655	HOMO \rightarrow LUMO (99%)
34	525	0.647	HOMO \rightarrow LUMO (99%)

Tabela VI.10. Comprimentos de onda de absorção calculados nas transições de mais baixa energia dos compostos **36** e **38**.

Composto		Comprimento de onda (nm)	f	Composição	Δr (Å)
36	$S_0 \rightarrow S_1$	467.3	0.772	HOMO \rightarrow LUMO (97%)	8.836
	$S_0 \rightarrow S_2$	434.8	1.166	H-1 \rightarrow LUMO (97%)	4.706
38	$S_0 \rightarrow S_1$	525.3	1.546	HOMO \rightarrow LUMO (98%)	4.045
	$S_0 \rightarrow S_2$	456.8	0.518	H-1 \rightarrow LUMO (98%)	3.694

Tabela VI.11. Distâncias de ligação selecionadas (Å), ângulo diedro (°) e BLA (Å) dos compostos **36** e **38** no estado fundamental S_0 e no estado excitado S_1 .

Composto	r[10-18]		r[18-37]		r[37-39]		BLA		D[3-10-18-37]	
	S_0	S_1	S_0	S_1	S_0	S_1	S_0	S_1	S_0	S_1
36	1.449	1.408	1.353	1.383	1.449	1.436	0.10	0.04	19.9	3.6
38	1.441	1.430	1.360	1.377	1.439	1.439	0.08	0.06	15.4	7.4



Numeração adotada para os compostos **36** e **38**.

Tabela VI.12. Comprimento de onda de emissão calculados nas transições de mais baixa energia dos compostos **36** e **38**.

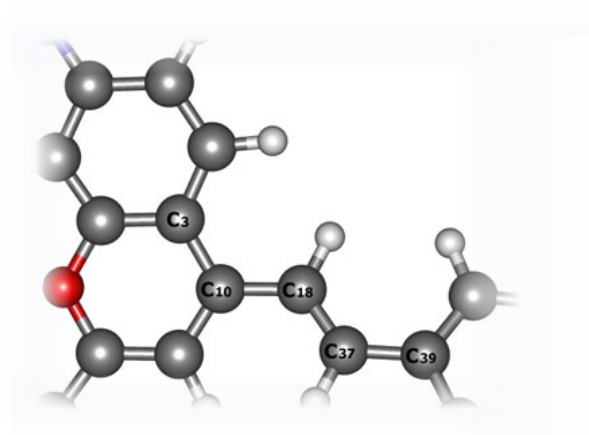
Composto		Comprimento de onda (nm)	f	Composição	τ (ns)
36	$S_1 \rightarrow S_0$	522.7	0.702	HOMO \rightarrow LUMO (98%)	5.83
38	$S_1 \rightarrow S_0$	560.2	1.678	HOMO \rightarrow LUMO (99%)	2.80

Tabela VI.13. Comprimento de onda de absorção calculados nas transições de mais baixa energia dos compostos **42** e **44**.

Composto		Comprimento de onda (nm)	<i>f</i>	Composição	Δr (Å)
42	$S_0 \rightarrow S_1$	563.1	0.929	HOMO \rightarrow LUMO (98%)	1.682
	$S_0 \rightarrow S_2$	485.5	1.372	H-1 \rightarrow LUMO (97%)	3.249
44	$S_0 \rightarrow S_1$	599.1	1.747	HOMO \rightarrow LUMO (93%)	4.373
	$S_0 \rightarrow S_2$	535.6	0.689	H-1 \rightarrow LUMO (94%)	2.402

Tabela VI.14. Distâncias de ligação selecionadas (Å), ângulo diedro (°) e BLA (Å) dos compostos **42** e **44** no estado fundamental S_0 e no estado excitado S_1 .

Composto	$r[10-18]$		$r[18-37]$		$r[37-39]$		BLA		$D[3-10-18-37]$	
	S_0	S_1	S_0	S_1	S_0	S_1	S_0	S_1	S_0	S_1
42	1.447	1.416	1.355	1.375	1.448	1.439	0.09	0.05	15.5	1.4
44	1.438	1.426	1.362	1.377	1.437	1.433	0.08	0.05	8.4	1.8



Numeração adotada para os compostos **42** e **44**.

Tabela VI.15. Comprimentos de onda de emissão calculados nas transições de mais baixa energia dos compostos **42** e **44**.

Composto		Comprimento de onda (nm)	<i>f</i>	Composição	τ (ns)
42	$S_1 \rightarrow S_0$	602.8	0.877	HOMO \rightarrow LUMO (98%)	6.21
44	$S_1 \rightarrow S_0$	623.0	1.850	HOMO \rightarrow LUMO (95%)	3.14

Tabela VI.16. Comprimentos de onda de absorção calculados para os compostos **58**, **60** e **63**, as orbitais envolvidas nas transições e os índices de caracterização CT.

Composto 58

Estado	λ (nm)	<i>f</i>	Transições das orbitais moleculares	$\Delta r/\text{\AA}$	Λ
S_1	502	1.7786	HOMO \rightarrow LUMO (96%)	2.18	0.65
S_2	299	0.0088	H-1 \rightarrow LUMO (92%)		
S_3	281	0.0015	H-3 \rightarrow LUMO (57%), HOMO \rightarrow L+3 (11%), HOMO \rightarrow L+6 (13%)		

Composto 60

Estado	λ (nm)	<i>f</i>	Transições das orbitais moleculares	$\Delta r/\text{\AA}$	Λ
S_1	476	1.6509	HOMO \rightarrow LUMO (94%)	4.07	0.58
S_2	286	0.0472	HOMO \rightarrow L+1 (47%), HOMO \rightarrow L+3 (18%), HOMO \rightarrow L+7 (16%)		
S_3	279	0.0111	HOMO \rightarrow L+1 (39%), HOMO \rightarrow L+3		

Composto 63

Estado	λ (nm)	f	Transições das orbitais moleculares	$\Delta r/\text{\AA}$	Λ
S ₁	534	1.6323	HOMO→LUMO (93%)	4.04	0.58
S ₂	315	0.0041	H-1→LUMO (79%)		
S ₃	294	0.0834	HOMO→L+1 (57%), HOMO→L+6 (14%)		

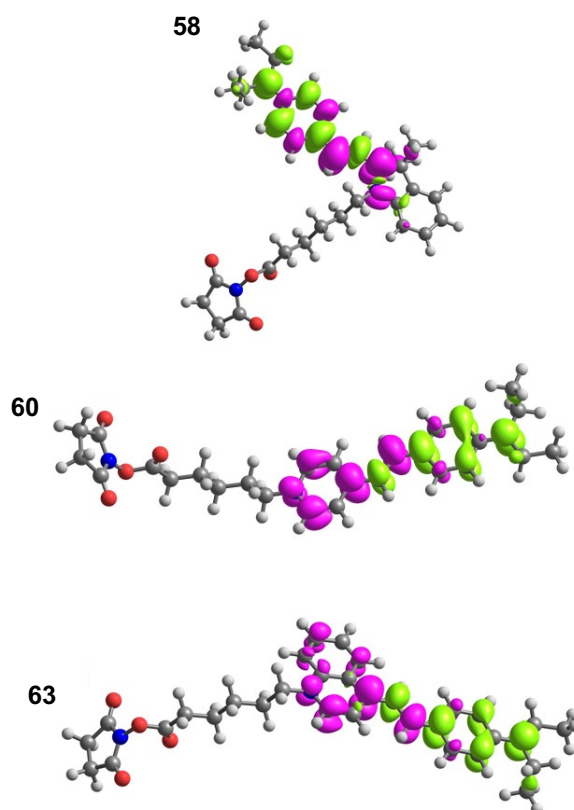


Figura VI.3. Geometria molecular otimizada para os compostos **58**, **60** e **63** em CH₃CN ao nível m06-2x/6-31G(d,p) (esquerda) onde os átomos de oxigénio, carbono, azoto e hidrogénios estão marcados a vermelho, cinzento, azul e branco, respetivamente. Gráficos de contorno da diferença de densidade eletrónica ($\Delta\rho$) da excitação de mais baixa energia para os diferentes compostos, em que a cor magenta indica um aumento da densidade eletrónica, enquanto a cor verde representa uma diminuição da densidade eletrónica.

Tabela VI.17. Ângulo dos planos dos anéis (°) e BLA (Å) dos compostos **58**, **60** e **63** no estado fundamental S_0 e no estado excitado S_1 .

Composto	BLA		Ângulo	
	S_0	S_1	S_0	S_1
58	0.04	0.00	19.4	16.6
60	0.07	0.01	0.3	1.1
63	0.06	0.02	8.1	1.1

Tabela VI.18. Comprimento de onda de emissão calculados para os compostos **58**, **60** e **63**, as orbitais envolvidas nas transições $S_1 \rightarrow S_0$ e o tempo de vida fluorescente teórico dos estados excitados.

Composto	λ (nm)	f	Transições das orbitais moleculares	τ / ns
58	544	1.7889	HOMO \rightarrow LUMO (99%)	2.48
60	533	1.7778	HOMO \rightarrow LUMO (99%)	2.39
63	587	1.7436	HOMO \rightarrow LUMO (99%)	2.96