



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**NOVOS SISTEMAS FOTOLUMINESCENTES DERIVADOS DO  
NÚCLEO 2,1,3-BENZOTIADIAZOLA PARA APLICAÇÕES EM  
BIOLOGIA MOLECULAR E CELULAR**

**Aluno: Felipe Feitosa de Oliveira**

**Orientador: Brenno Amaro da Silveira Neto**

**Co-Orientador: Alexandre Augusto Moreira Lapis**

**Brasília**

**2010**

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**  
**LABORATÓRIO DE QUÍMICA MEDICINAL E TECNOLÓGICA**

**NOVOS SISTEMAS FOTOLUMINESCENTES DERIVADOS DO  
NÚCLEO 2,1,3-BENZOTIADIAZOLA PARA APLICAÇÃO EM  
BIOLOGIA MOLECULAR E CELULAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química como  
pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Química

**Aluno: Felipe Feitosa de Oliveira**

Orientador: Brenno Amaro da Silveira Neto

Co-Orientador: Alexandre Augusto Moreira Lapis

**Brasília**

**2010**



Aos meus Pais, Leônidas e Ladjane  
e ao meu irmão Bruno.

## **Agradecimentos**

Em primeiro lugar agradeço a Deus, por me conceder força e esperança para continuar a caminhada sempre. Sem Ele, nada faria sentido.

Aos Meus Pais, Leônidas e Ladjane, por me dar raízes que perdurarão por toda a minha vida. E, embora as coisas tenham se tornado difíceis, nunca deixaram de me apoiar. Todo meu carinho e amor para vocês dois.

Ao meu irmão Bruno por todo o amor incondicional. Te amo guri.

Ao Prof. Brenno pela paciência, confiança e amizade. Minha profunda admiração e respeito.

Aos Professores que me ajudaram, de uma forma ou de outra, a chegar até aqui: Alexandre Lapis (UNIPAMPA), Paulo Anselmo Suarez (IQ-UnB), Joel Rubim (IQ-UnB), Sônia Freitas (IB-UnB) e José Raimundo (IB-UnB). Obrigado.

A minha amiga Karol. Obrigado por todas as conversas, conselhos e pela amizade irrestrita demonstrada nesses últimos quatro anos. Te adoro menina!!

Ao amigo Ronaldo, pela amizade e confiança, mesmo a distância.

Aos amigos para toda hora que conquistei por aqui: David, Luís, André, Guilherme, Ernani, Ludmila, Vilma e Ana Claudia.

Aos colegas e amigos do LaQuiMet por todos os momentos maravilhosos que vivemos juntos. Me apeguei fácil a vocês: Aline, Júlia, Diego, Pedrão, Reizinho, Marcelo, Gisele, Tamires e Vandinha. Obrigado pessoal!

Aos colegas do LMC pelo apoio e ajuda.

Ao Grupo PET-QUI ao qual devo muitas coisas.

Aos funcionários do IQ, que me ajudaram.

A CAPES, CNPq e FAP-DF pelo apoio financeiro

E por fim, mas não menos importante, a todas as pessoas que passaram pela minha vida e deixaram um pouco de suas esperanças, sonhos, medos e angústias. Nenhum homem vive sozinho nesse mundo e todos aqueles com os quais interagimos, nos mudam de alguma forma. O que me tornei, devo também a vocês, estranhos conhecidos, que mudaram meu jeito de ver a vida. Meus sinceros agradecimentos.

## Resumo

Este trabalho descreve a síntese, caracterização e aplicação de novos sistemas fluorescentes utilizando compostos do tipo 2-(2'-hidroxifenil) benzazóis acoplados com o núcleo 2,1,3-benzotiadiazola. Os novos sistemas fluorescentes foram sintetizados utilizando um acoplamento do tipo Buchwald-Hartwig e foram plenamente caracterizados. Suas características físico-físicas, com ênfase na foto-física, foram investigadas e suas propriedades como sondas fluorescentes foram determinadas. Para isso foram realizadas titulações espectrofotométricas e espectrofluorimétricas utilizando dsDNA e a proteína BSA. Além disso, estudos de variação de pH e de voltametria cíclica foram realizados para testar sua estabilidade em diferentes condições. Por fim, os sistemas foram aplicados em estudos de *live-cell imaging*, comprovando sua eficácia como marcadores seletivos de dsDNA nuclear em sistemas biológicos utilizando células-tronco humanas.

## **Abstract**

The present work describes the synthesis, characterization and application of new systems using fluorescent compounds such as 2 - (2'-hydroxyphenyl) benzazoles coupled with 2,1,3-benzothiadiazole core. The new fluorescent systems were synthesized using Buchwald-Hartwig cross coupling reaction and were fully characterized. Physical chemical properties, especially photophysical properties, were investigated and the applications as fluorescent probes were investigated. To achieve this goal, it was performed spectrophotometric and spectrofluorimetric titrations using dsDNA and BSA protein. Moreover, studies of pH-dependence and cyclic voltammetry were conducted to test the stability under different conditions. Finally, the systems were applied in live-cell imaging experiments, proving the effectiveness and selectivity as nuclear dsDNA staining dyes for biological systems using human stem-cells.



# Índice

Agradecimentos.....	iv
Resumo .....	vi
Abstract .....	vii
Lista de Abreviaturas e Acrônimos.....	ix
Lista de Tabelas .....	x
Lista de Figuras.....	xi
Lista de Esquemas.....	xiii
1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1. O processo de luminescência .....	2
1.2. Heterociclos benzazólicos.....	6
1.3. O núcleo 2,1,3-Benzotiadiazola .....	8
1.4. O processo de transferência protônica intramolecular no estado excitado (ESIPT) .....	10
1.4.1. Influência do solvente no processo ESIPT .....	12
1.4.2. A influência do pH no processo ESIPT. ....	14
1.5. Marcadores biológicos fotoluminescentes. ....	15
1.6. A estrutura do DNA e o processo de intercalação.....	18
1.6.1. Marcadores comerciais. ....	23
Objetivos.....	25
2. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
2.1. Síntese dos novos compostos fluorescentes.....	27
2.2. Ciclo catalítico .....	28
2.3. Estudo fotofísico.....	30
2.4. Titulações espectrofotométricas.....	35
2.5. Titulações espectrofluorimétricas.....	37
2.6. Dependência do pH na intensidade de fluorescência.....	41
2.7. Análise Eletroquímica dos Fluoróforos.....	43
2.8. Experimento de <i>live-cell imaging</i> .....	46
3. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS .....	55
4. PARTE EXPERIMENTAL .....	57
4.1. Equipamentos e solventes .....	58
4.2. Síntese da BTDBT e BTDBI.....	58
4.3. Amostras Celulares .....	59
4.4. Experimentos de <i>live-cell imaging</i> .....	60
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	61

## **Lista de Abreviaturas e Acrônimos**

BI – 2-(2'-hidroxifenil)benzoimidazol;

BT – 2-(2'-hidroxifenil)benzotiazol;

BTD – 2,1,3-benzotiadiazola;

DAPI – 4',6-diamidinofenilindol;

dsDNA – DNA dupla fita;

ESIPT – Transferência Protônica Intramolecular no Estado Excitado;

FTIR – Infravermelho com Transformada de Fourier;

ICT – Transferência Intramolecular de Carga;

RMN – Ressonância Magnética Nuclear;

UV – Ultravioleta;

VC – Voltametria Cíclica.

## Lista de Tabelas

<b>TABELA 1.</b> TEMPOS CARACTERÍSTICOS PARA OS VÁRIOS PROCESSOS DE DESATIVAÇÃO.....	5
<b>TABELA 2.</b> ESTRUTURAS NATURAIS QUE APRESENTAM FLUORESCÊNCIA, SEUS COMPRIMENTOS DE ABSORÇÃO E EMISSÃO E RENDIMENTOS QUÂNTICOS DE FLUORESCÊNCIA (ADAPTADO DA REFERÊNCIA 37).....	15
<b>TABELA 3.</b> PROPRIEDADES FOTOFÍSICAS SELECIONADAS DOS FLUORÓFOROS ESTUDADOS ( $1,00 \times 10^{-5}M$ ).....	34

## Lista de Figuras

<b>FIGURA 1.</b> DIAGRAMA BÁSICO DE JABLONSKI.....	3
<b>FIGURA 2.</b> HETEROCICLOS BENZAZÓLICOS.....	6
<b>FIGURA 3.</b> INTRODUÇÃO DE GRUPO 2'HIDROXIFENIL NA POSIÇÃO 2 DO ANEL AZÓLICO.....	6
<b>FIGURA 4.</b> O NÚCLEO 2,1,3-BENZOTIADIAZOLA.....	8
<b>FIGURA 5.</b> FORMA ENOL E CETO PARA OS HETEROCICLOS BENZAZÓLICOS.....	10
<b>FIGURA 6.</b> MECANISMO GERAL PARA UM PROCESSO ESIPT.....	11
<b>FIGURA 7.</b> DESLOCAMENTO DE STOKES PARA UM DOS HETEROCICLOS BENZAZÓLICOS.....	12
<b>FIGURA 8.</b> EFEITO DO SOLVENTE NAS CONFORMAÇÕES DE COMPOSTOS ESIPT.....	13
<b>FIGURA 9.</b> ESPECTROS DE EMISSÕES DIFERENCIADOS EM SOLVENTES DIFERENTES PARA UM MESMO COMPOSTO.....	14
<b>FIGURA 10.</b> UNIDADE DA GFP COM UM GRUPO FLUORÓFORO.....	16
<b>FIGURA 11.</b> CAMUNDONGOS TRANSGÊNICOS OBTIDOS POR MARCAÇÃO COM GFP (FIGURA ADAPTADA DA REFERÊNCIA 42).....	16
<b>FIGURA 12.</b> ESTRUTURA DE UM NUCLEOTÍDEO DE DNA.....	19
<b>FIGURA 13.</b> AS QUATRO BASES NITROGENADAS E SUAS INTERAÇÕES POR MEIO DE INTERAÇÕES DE HIDROGÊNIO. (FIGURA ADAPTADA DA REFERÊNCIA 51).....	20
<b>FIGURA 14.</b> A ESTRUTURA EM DUPLA-HÉLICE DO DNA.....	21
<b>FIGURA 15.</b> PROCESSO DE LIGAÇÃO EXTERNA DA Sonda COM A DUPLA-HÉLICE DO DNA. (FIGURA ADAPTADA DA REFERÊNCIA 51).....	22
<b>FIGURA 16.</b> PROCESSO DE INTERCALAÇÃO NA CADEIA DO DNA (FIGURA ADAPTADA DA REFERÊNCIA 56).....	23
<b>FIGURA 17.</b> ESTRUTURA DO FLUORÓFORO COMERCIAL DAPI.....	24
<b>FIGURA 18.</b> MARCADOR DAPI. À ESQUERDA, NEUROBLASTOMAS HUMANOS SH-SY5Y MARCADOS COM DAPI (AZUL). À DIREITA, CROMOSSOMOS HUMANOS.....	24
<b>FIGURA 19.</b> FLUORESCÊNCIA EM ESTADO SÓLIDO E EM SOLUÇÃO ( $1,00 \times 10^{-5}$ M) DE ACETONITRILA DOS FLUORÓFOROS SINTETIZADOS. ACIMA <b>BTDBI</b> E ABAIXO <b>BTDBT</b> .....	28
<b>FIGURA 20.</b> AS QUATRO POSSIBILIDADES DO PROCESSO ESIPT, PARA OS NOVOS FLUORÓFOROS SINTETIZADOS.....	30
<b>FIGURA 21.</b> ESPECTROS DE ABSORÇÃO E EMISSÃO PARA <b>BTDBT</b> EM TRÊS SOLVENTES DIFERENTES. 31	
<b>FIGURA 21 (CONTINUAÇÃO).</b> ESPECTROS DE ABSORÇÃO E EMISSÃO PARA <b>BTDBI</b> EM TRÊS SOLVENTES DIFERENTES.....	32
<b>FIGURA 22.</b> ABSORÇÃO E EMISSÃO DE <b>BTDBT</b> EM ACETONITRILA.....	33
<b>FIGURA 23.</b> TITULAÇÕES ESPECTROFOTOMÉTRICAS DOS QUATRO FLUORÓFOROS USANDO dsDNA (CALF THYMUS) E A PROTEÍNA BSA.....	36
<b>FIGURA 24.</b> TITULAÇÕES ESPECTROFOTOMÉTRICAS DE <b>BI</b> E <b>BT</b> USANDO DNA E BSA.....	38
<b>FIGURA 25.</b> TITULAÇÕES ESPECTROFOTOMÉTRICAS DE <b>BTDBI</b> E <b>BTDBT</b> USANDO dsDNA (CALF THYMUS) E BSA.....	40

<b>FIGURA 26.</b> DEPENDÊNCIA DAS EMISSÕES FLUORESCENTES EM VALORES DIFERENTES DE PH PARA <b>BI</b> E <b>BT</b> .....	42
<b>FIGURA 27.</b> DEPENDÊNCIA DAS EMISSÕES FLUORESCENTES EM VALORES DIFERENTES DE PH PARA <b>BTDBI</b> E <b>BTDBT</b> .....	43
<b>FIGURA 28.</b> VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS PARA <b>BI</b> E <b>BT</b> .....	45
<b>FIGURA 29.</b> VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS PARA <b>BTDBI</b> E <b>BTDBT</b> .....	46
<b>FIGURA 30.</b> <i>LIVE-CELL IMAGING</i> DE CÉLULAS EM SUSPENSÃO DE MACRÓFAGOS DE CAMUNDONGOS. A ESQUERDA, CONTRASNTE DE FASE; A DIREITA, MICROSCOPIA CONFOCAL DE FLUORESCÊNCIA. DE CIMA PARA BAIXO: <b>BI, BT, BTDBI</b> E <b>BTDBT</b> .....	47
<b>FIGURA 30 (CONTINUAÇÃO).</b> <i>LIVE-CELL IMAGING</i> DE CÉLULAS EM SUSPENSÃO DE MACRÓFAGOS DE CAMUNDONGOS. A ESQUERDA, CONTRASNTE DE FASE; A DIREITA, MICROSCOPIA CONFOCAL DE FLUORESCÊNCIA. DE CIMA PARA BAIXO: <b>BI, BT, BTDBI</b> E <b>BTDBT</b> .....	48
<b>FIGURA 31.</b> <i>LIVE-CELL IMAGING</i> DE CÉLUAS TRONCO HUMANAS ADERIDAS UTILIZANDO OS QUATRO FLUORÓFOROS E O DAPI. CONTRASTE DE FASE (A ESQUERDA) E MICROSCOPIA CONFOCAL DE FLUORESCÊNCIA (DIREITA). DE CIMA PARA BAIXO OS CORANTES: <b>BI, BT, BTDBI, BTDBT</b> E <b>DAPI</b> .....	49
<b>FIGURA 31 (CONTINUAÇÃO).</b> <i>LIVE-CELL IMAGING</i> DE CÉLUAS TRONCO HUMANAS ADERIDAS UTILIZANDO OS QUATRO FLUORÓFOROS E O DAPI. CONTRASTE DE FASE (A ESQUERDA) E MICROSCOPIA CONFOCAL DE FLUORESCÊNCIA (DIREITA). DE CIMA PARA BAIXO OS CORANTES: <b>BI, BT, BTDBI, BTDBT</b> E <b>DAPI</b> .....	50
<b>FIGURA 32.</b> MARCAÇÃO NÃO SELETIVA DO DAPI, UM DOS FLUORÓFOROS MAIS UTILIZADOS PARA MARCAÇÃO DE DSDNA. VEJA A MARCAÇÃO DE FUNDO, DEVIDA A BAIXA SELETIVIDADE.....	51
<b>FIGURA 33.</b> MODELO DE INTERCALAÇÃO DE BTD COM O DNA (ADAPTADA DE REFERÊNCIA 72).....	52
<b>FIGURA 34.</b> MODELO DE INTERCALAÇÃO COM O DNA.....	53
<b>FIGURA 35.</b> MARCAÇÃO SELETIVA DE MITOCÔNDRIAS UTILIZANDO MARCADORES FLUORESCENTES. À ESQUERDA, EXPERIMENTO APENAS COM O MARCADOR DESENVOLVIDO NO GRUPO; À DIREITA, UTILIZAÇÃO SIMULTÂNEA DO CORANTE DESENVOLVIDO JUNTO COM O MARCADOR COMERCIAL <b>DAPI</b> . NOTE QUE O <b>DAPI</b> MARCA O DSDNA NUCLEAR ENQUANTO O OUTRO MARCA O DSDNA MITOCONDRIAL.....	54

## Lista de Esquemas

<b>ESQUEMA 1.</b> SÍNTESE DA UNIDADE 4,7-DIBROMO-2,1,3-BENZOTIADIAZOLA. ....	9
<b>ESQUEMA 2.</b> SÍNTESE DOS HETEROCICLOS BENZAZÓLICOS <b>BI</b> E <b>BT</b> . ....	27
<b>ESQUEMA 3.</b> SÍNTESE DOS FLUORÓFOROS <b>BTDBT</b> E <b>BTDBI</b> . ....	28
<b>ESQUEMA 4.</b> CICLO CATALÍTICO PROPOSTO PARA A FORMAÇÃO DOS NOVOS SISTEMAS FLUORESCENTES <b>BTDBI</b> E <b>BTDBT</b> . ....	29

---

# 1. INTRODUÇÃO

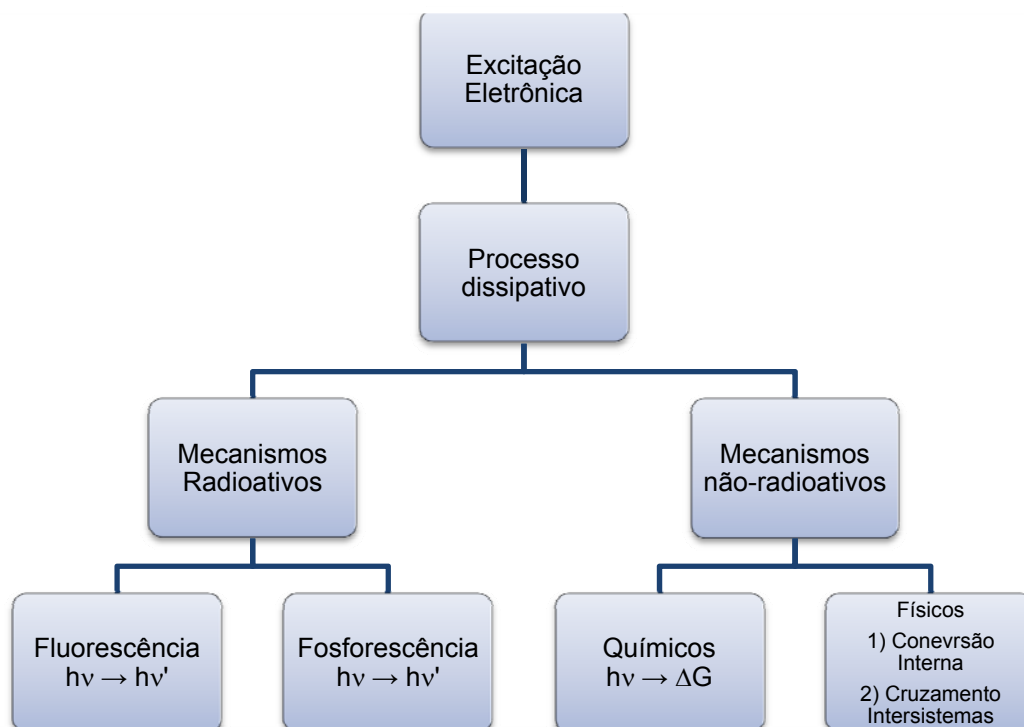
## 1.1. O processo de luminescência

Elétrons podem passar do estado fundamental para o estado excitado por meio do fornecimento de energia à molécula. A energia necessária para excitar uma molécula do estado fundamental pode provir de diferentes fontes: térmica, luminosa, sonora, química, bioquímica e outras. A fonte de excitação determinará o tipo da luminescência. Assim, quando a fonte de excitação é consequência de uma reação química, tem-se a quimioluminescência; se a fonte é luminosa, a fotoluminescência; e assim por diante.<sup>1</sup>

Em condições normais, as moléculas estão no menor estado de energia, ou seja, no estado fundamental. A absorção de um fóton de energia excita as moléculas para estados energeticamente superiores (tanto vibracionais, quanto rotacionais).<sup>2</sup> O processo de relaxação molecular, em que a molécula volta ao seu estado fundamental dissipando a energia absorvida na forma de luz denomina-se luminescência.

No estado excitado, a molécula torna-se instável e a tendência natural é que por algum processo, seja físico ou químico, libere energia, indo para um estado energeticamente inferior (normalmente o estado fundamental). Alexander Jablonski (1898-1990) desenvolveu uma teoria fundamental para compreensão dos processos de relaxação molecular. Ele foi o responsável pela criação de um diagrama (Figura 1) que racionaliza o processo de dissipação energética a partir do estado excitado.<sup>3</sup>





**Figura 1.** Diagrama básico de Jablonski.

Como podemos perceber, existem dois tipos básicos de mecanismos de dissipação energética: os mecanismos radioativos, em que a energia absorvida é dissipada como energia luminosa, mas com uma frequência diferente da energia incidente (notadamente,  $\nu > \nu'$ ); e os mecanismos não-radioativos, em que a energia de excitação é dissipada por meio ou de reações químicas ou liberação de calor.

Os mecanismos radioativos podem ser de dois tipos: fluorescentes ou fosforescentes. Quando a molécula absorve energia, passando para o estado excitado, essa transição, normalmente, ocorre com conservação do momento de spin. Assim, uma molécula em um estado fundamental singleto, passará, no estado excitado, para um estado também singleto.<sup>4</sup> Essa transição, singleto  $\rightarrow$  singleto, é uma transição permitida, uma vez que obedece às regras de seleção para transições eletrônicas (a variação no momento de spin de uma molécula deve ser igual a zero).<sup>5</sup> Com o aumento do tamanho da molécula, entretanto, estados eletrônicos podem começar a sobrepor-se (interações spin-órbita). Nessas condições, outras transições, em que a variação do momento de spin é diferente de zero, passam a ser permitidas. Assim, a molécula pode

sair de um estado singleto e passar para um estado tripleto, ou vice-versa. O tipo de transição diferenciará a fluorescência da fosforescência.

Na fluorescência, a transição acontece de um estado excitado singleto para um estado fundamental também singleto. A fosforescência ocorre quando a transição ocorre de um estado excitado tripleto para o estado fundamental singleto. É importante ressaltar que uma transição singleto  $\rightarrow$  tripleto, ou o oposto, é um evento significativamente pouco provável, tendo um tempo de meia-vida que pode variar de  $10^{-4}$  s até vários segundos. Da mesma forma, a fluorescência é um evento bem mais eficiente, com tempos de meia vida que podem variar de  $10^{-9}$  a  $10^{-6}$  s.<sup>6</sup>

Os processos de desativação não-radioativos também são de dois tipos: os processos químicos, em que a energia luminosa é convertida em energia para reações químicas (energia livre de Gibbs) e os processos físicos. Estes podem ser de dois tipos: conversão interna e cruzamento intersistemas. A conversão interna acontece quando uma molécula passa para um estado eletrônico de energia menor sem emissão de radiação. Esse processo ocorre de um estado singleto para outro estado singleto e é bastante eficiente, uma vez que poucas substâncias apresentam fluorescência.<sup>7</sup> No cruzamento intersistemas, a transição entre estados não é radioativa, assim como na conversão interna, mas ocorre de estados tripletos para estados singletos. O cruzamento intersistemas torna-se mais comum quando as interações spin-órbita são maiores, favorecendo a mudança de spin.

A absorção de um fóton de luz e a passagem para o estado excitado é um processo muito rápido ( $10^{-14}$  a  $10^{-15}$  s). A velocidade de desativação, entretanto, dependerá do tipo de emissão da molécula. Na Tabela 1, indicamos os tempos médios para os processos descritos acima.<sup>8</sup>

**Tabela 1.** Tempos característicos para os vários processos de desativação.

Processo	Varição da Multiplicidade de Spin	Tempo (s)
Absorção	1 → 1	$10^{-15}$
Fluorescência	1 → 1	$10^{-9}$ a $10^{-6}$
Fosforescência	3 → 1	$10^{-3}$ a 1
Conversão Interna	1 → 1	$10^{-13}$ a $10^{-11}$
Cruzamento Intersistemas	1 → 1	$10^{-19}$ a $10^{-7}$

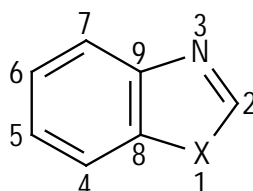
Processos cineticamente mais rápidos são favorecidos. Entretanto, é possível o planejamento de uma arquitetura molecular que ajude a induzir os mecanismos de dissipação radioativos. Fatores como rigidez estrutural, extensão de conjugações  $\pi$ , transições do tipo  $\pi \rightarrow \pi^*$ , planaridade, entre outras características, favorecem a emissão radioativa, aumentando a eficiência dos processos fluorescentes e fosforescentes.

A luminescência tem extensas aplicações analíticas, uma vez que apresenta uma sensibilidade bastante alta, muitas vezes na faixa de partes por bilhão.<sup>9</sup>

## 1.2. Heterociclos benzazólicos.

Heterociclos são compostos cíclicos que apresentam pelo menos um heteroátomo em sua estrutura. Os heterociclos têm uma importância crucial em muitos processos biológicos, pois são constituintes de muitas estruturas naturais como carboidratos, enzimas e a clorofila.<sup>10</sup>

Os benzazóis são heterociclos que apresentam um anel benzênico condensado a um anel azólico (Figura 2). Como se pode perceber, a posição 3 é ocupada por um átomo de nitrogênio e a posição 1 é ocupada por um outro heteroátomo, que determinará o tipo de benzazol. Assim podemos ter benzimidazóis (X = NH) ou benzotiazóis (X = S).

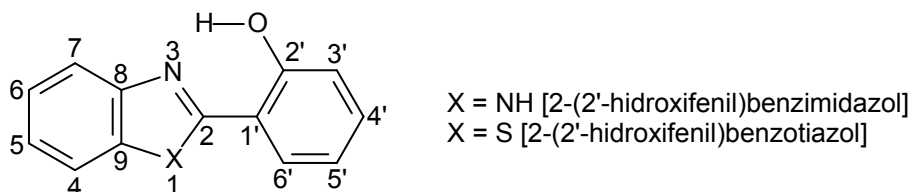


X = NH (Benzimidazóis)

X = S (Benzotiazóis)

**Figura 2.** Heterociclos benzazólicos.

Uma alteração interessante é a introdução, na posição 2 do anel azólico (Figura 3), de um grupo fenila substituído na posição orto. Esses compostos são conhecidos como 2-(2'-hidroxifenil)benzazóis e podem realizar o processo de Transferência Protônica Intramolecular no Estado Excitado (ESIPT, na sigla em inglês), discutido posteriormente.<sup>11,12,13</sup>

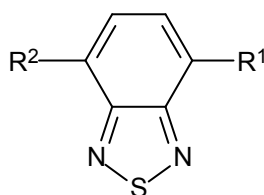


**Figura 3.** Introdução de grupo 2'hidroxifenil na posição 2 do anel azólico.

Compostos do tipo 2-(2'-hidroxifenil)benzazol e seus derivados possuem características que têm sido utilizadas para aplicações em diversas campos tecnológicos. Por exemplo, a sua utilização como marcadores biológicos fluorescentes.<sup>14,15</sup> Sabe-se que poucas estruturas biológicas apresentam uma fluorescência natural e aquelas que apresentam, normalmente possuem baixos rendimentos quânticos de fluorescência. Assim, a síntese e utilização desses benzazóis como marcadores para estudos conformacionais de proteínas e o estudo de DNA e RNA é uma área contemporânea e em expansão.<sup>16</sup>

### 1.3. O núcleo 2,1,3-Benzotiadiazola

O núcleo 2,1,3-Benzotiadiazola (**BTD**, Figura 4) tem recebido muita atenção nas últimas décadas, devido ao fato de encontrar-se entre os sistemas químicos com enorme potencial para síntese e aplicação de novos sistemas fotoluminescentes, altamente eficientes.<sup>17</sup>



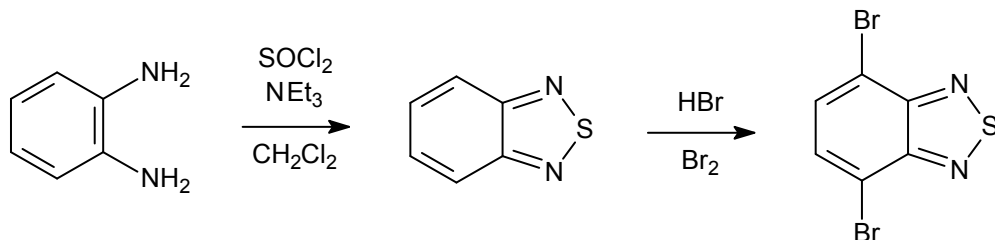
**Figura 4.** O núcleo 2,1,3-Benzotiadiazola.

Esse heterociclo é retirador e aceptor de elétrons e, portanto, um potencial sistema carreador eletrônico. Outra característica extremamente importante é a sua tendência em formar estruturas cristalinas bem ordenadas, devido a sua alta polarizabilidade, favorecendo, dessa forma, interações  $\pi \rightarrow \pi^*$ , característica altamente desejável para processos de fluorescência. Logo, estruturas que apresentam o sistema benzotiadiazola são normalmente bons precursores para a síntese de fluoróforos bastante eficientes.<sup>18</sup>

Outro fator a ser considerado é a preferência do núcleo por uma configuração quinoidal. Os quinóides podem ser vistos como estruturas cíclicas com ligações duplas conjugadas, possuindo dois locais onde podem unir-se dois outros grupos cromóforos. Essa deslocalização das ligações  $\pi$  causa drásticos deslocamentos nos comprimentos de absorção desses compostos,<sup>19</sup> em decorrência do processo de ressonância, que estabiliza a estrutura, aumentando o comprimento de onda emissivo.

A síntese de novos sistemas fluorescentes, utilizando o núcleo **BTD**, normalmente envolve o intermediário 4,7-dibromo-2,1,3-benzotiadiazola. A síntese desse intermediário (Esquema 1) envolve duas etapas bem estabelecidas na literatura,<sup>20</sup> usando como material de partida *o*-fenilenediamina. Esta é reagida com cloreto de tionila, na presença de uma

base (triethylamina) e diclorometano. A 2,1,3-benzotiadiazola é então tratada com bromo, na presença de ácido bromídrico, obtendo a 4,7-dibromo-2,1,3-benzotiadiazola, intermediário sintético versátil para a síntese de compostos fluorescentes com conjugações  $\pi$  estendidas derivados do núcleo **BTD**.

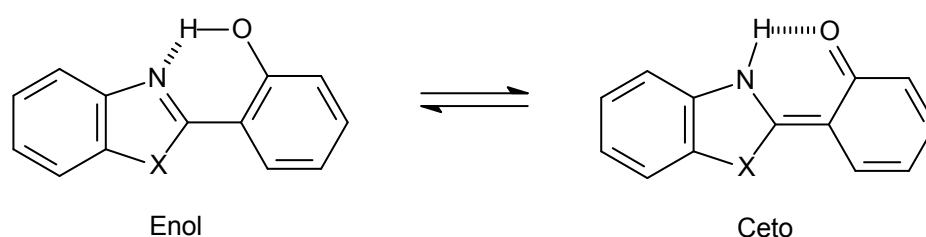


**Esquema 1.** Síntese da unidade 4,7-dibromo-2,1,3-benzotiadiazola.

#### 1.4. O processo de transferência protônica intramolecular no estado excitado (ESIPT)

Os benzazóis heterociclos como o 2-(2'-hidroxifenil)benzazol podem realizar o mecanismo de transferência protônica intramolecular no estado excitado (ESIPT), fenômeno que aumenta fortemente a estabilidade foto-física dessas estruturas, ocasionado um alto deslocamento de Stokes.<sup>21,22,23</sup>

No estado fundamental, as moléculas podem existir em dois tautômeros diferentes: enol ou ceto (Figura 5). A existência desses dois estados depende de uma série de variáveis.<sup>24</sup> Sabe-se que em solventes polares apróticos (como acetonitrila) e/ou apolares (como hexano), a forma enólica é a forma mais estável, devido, sobretudo, à existência de uma forte interação intramolecular de hidrogênio entre o grupo hidroxila do fenol e o átomo de nitrogênio do anel azólico.



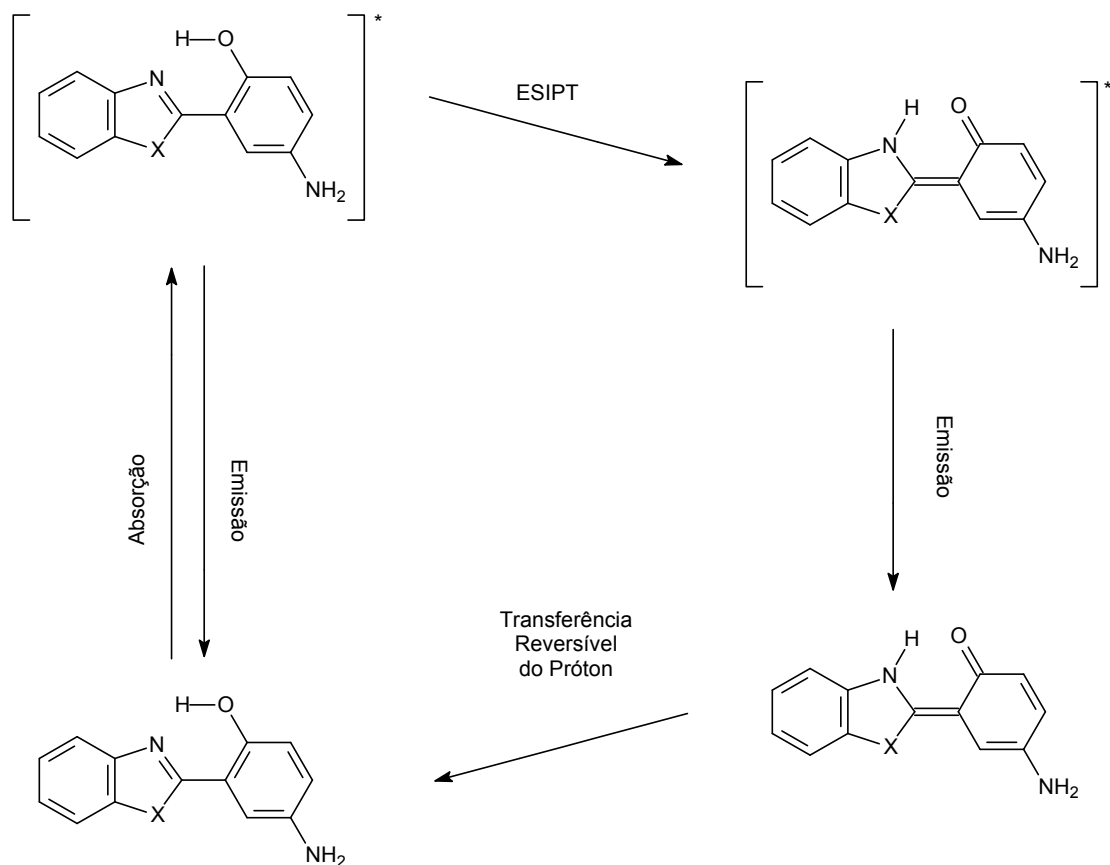
**Figura 5.** Forma enol e ceto para os heterociclos benzazólicos.

Quando a molécula absorve energia, o tautômero enol passa para o estado excitado. Nessas condições, as moléculas diferem de suas formas fundamentais em diversas características como força ácida e básica e geometria. Muitos trabalhos mostram que no estado excitado, grupos doadores (que apresentam uma acidez natural), como  $-OH$ ,  $-NH_2$  e  $-SH$ , tem sua acidez aumentada e grupos retiradores tornam-se mais eficientes e, portanto, mais básicos (teoria de Forster).<sup>25,26</sup> Além disso, estudos mostram que o tautômero ceto é cerca de  $1,5 \text{ kcal.mol}^{-1}$  mais estável, no estado excitado, que sua conformação enólica.<sup>27</sup>

O tautômero enol excitado é rapidamente convertido no tautômero ceto através da transferência protônica intramolecular (ESIPT) do hidrogênio



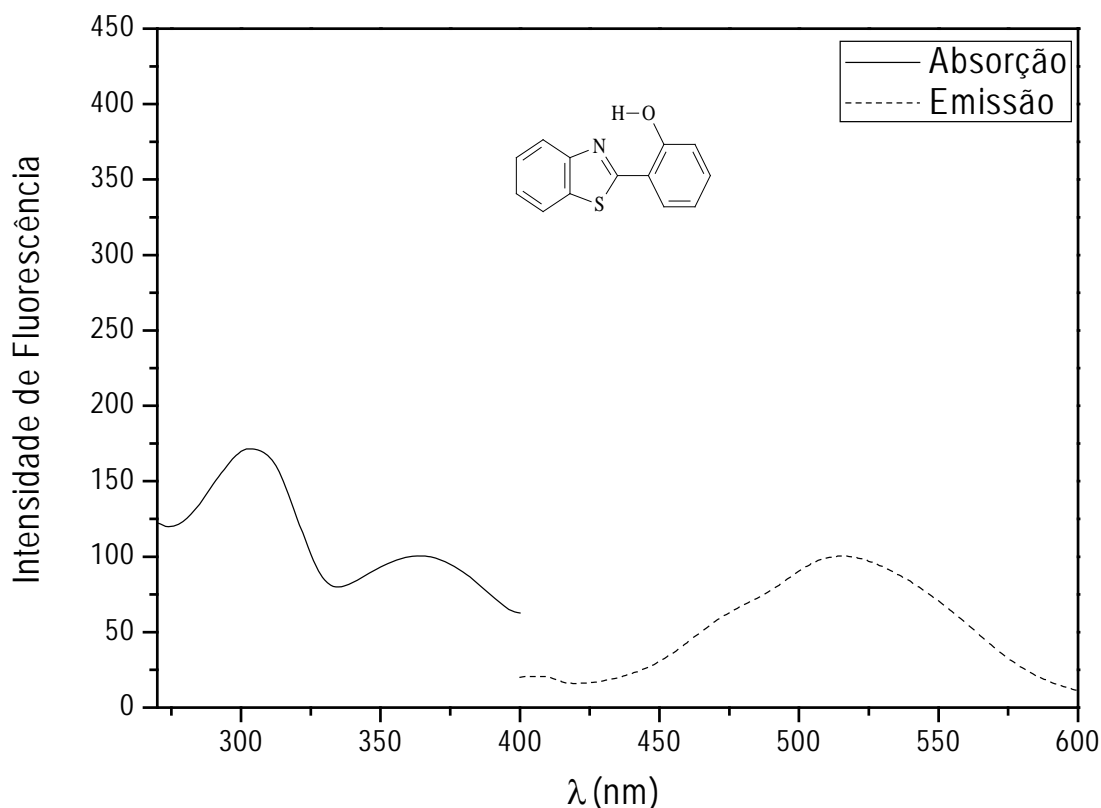
fenólico para o nitrogênio do anel azólico. O tautômero ceto, por sua vez, relaxa emitindo fluorescência e retornando ao seu estado fundamental. A forma ceto, menos estável, tautomeriza para a forma enólica (mais estável) e o sistema retorna ao seu estado inicial (Figura 6).



**Figura 6.** Mecanismo geral para um processo ESIPT.

O processo ESIPT é responsável por diversas características interessantes, como por exemplo, um alto deslocamento de Stokes. O deslocamento de Stokes é definido como sendo a diferença entre o comprimento de onda de absorção (máximo) e o comprimento de onda de emissão (máximo). Em estruturas que não apresentam o processo ESIPT, o deslocamento de Stokes normalmente encontra-se numa faixa de 30 a 70 nm.<sup>28</sup> Em compostos que apresentam o processo ESIPT esse deslocamento aumenta, podendo variar entre 100 a 250 nm. Esse alto deslocamento de Stokes é resultado da existência de um estado mais estável (tautômero ceto)

antes da emissão. Um exemplo do alto deslocamento de Stokes para espécies ESIPT é mostrado na Figura 7.



**Figura 7.** Deslocamento de Stokes para um dos heterociclos benzazólicos.

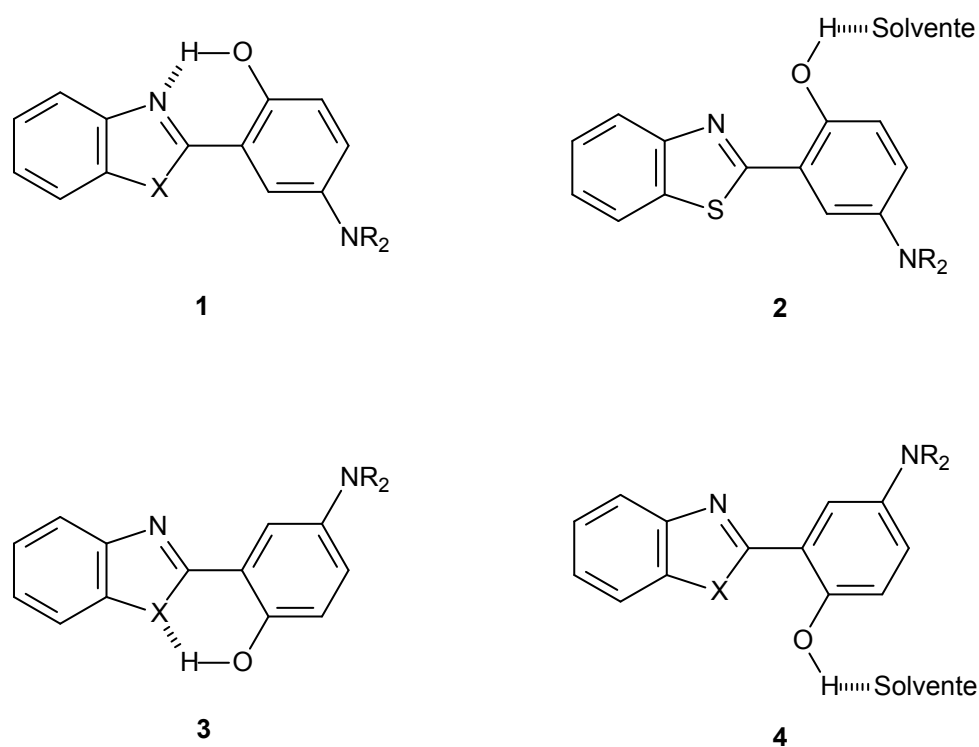
O deslocamento de Stokes pronunciado é visível (equivale a quase 180 nm). Essa característica peculiar desses compostos tem uma aplicabilidade muito útil. Estruturas que apresentam o processo ESIPT podem absorver na região do ultravioleta e emitir na região do visível do espectro. Essa característica será de extrema importância quando considerarmos a marcação de sistemas biológicos, utilizando compostos ESIPT.

#### 1.4.1. Influência do solvente no processo ESIPT

O solvente tem uma clara influência no processo ESIPT e diversos estudos têm procurado demonstrar essa influência.<sup>29,30,31,32</sup> Em solventes apolares e/ou apróticos, ou seja, aqueles que não podem formar uma ligação de hidrogênio entre o composto luminescente e o solvente, a forma enólica *cis* (**1**, Figura 8) é a forma predominante da maioria das moléculas. Por outro lado,

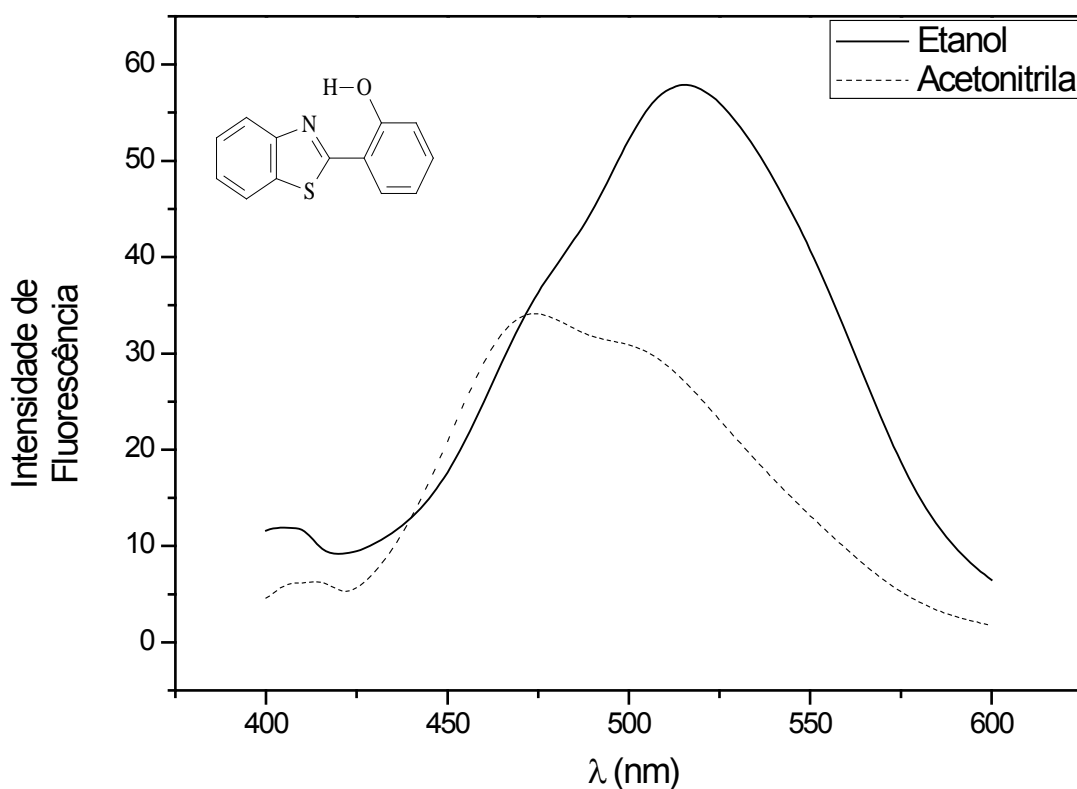
em solventes próticos e/ou polares pode haver uma “competição” entre a formação de ligações de hidrogênio intramolecularmente e intermoleculamente, ou seja, com as moléculas do solvente. Nesse caso, a forma enólica *trans* (**2**), pode ser a forma mais estável.

Outro fator a ser considerado é a possibilidade de rotação da ligação entre o anel azólico e o anel benzênico com o grupo hidroxila. Nesse caso, outras duas formas também serão estabilizadas: a enol *trans* **3** (em solventes apolares) e enol *trans* **4** (em solventes polares).<sup>33</sup>



**Figura 8.** Efeito do solvente nas conformações de compostos ES IPT.

Assim, compostos ES IPT podem apresentar duas curvas de emissão diferenciadas dependendo do solvente utilizado. E mais, em um mesmo solvente, compostos ES IPT podem apresentar uma dupla emissão de fluorescência. Por exemplo, o efeito de emissão diferenciada, em solventes diferentes é mostrado na Figura 9.



**Figura 9.** Espectros de emissões diferenciados em solventes diferentes para um mesmo composto.

Nota-se claramente a diferença de emissão para um mesmo composto em solventes diferenciados (um aprótico, acetonitrila; e outro prótico, etanol). Fato muito comum em compostos ESIPT.

#### 1.4.2.A influência do pH no processo ESIPT.

O pH também exerce uma forte influência nos processos emissivos de compostos ESIPT. Assim, espécies neutras, catiônicas ou aniônicas podem existir em solução. Trabalhos mostram<sup>34</sup> que em meio ácido, a tendência é a existência de espécies catiônicas, decorrentes da protonação de centros básicos (como hidroxila ou nitrogênio). Em meio básico, espécies aniônicas tendem a ser predominantes. E por fim, em meio neutro, a tendência é a existência de espécies neutras. Logo, a acidez ou basicidade de um meio pode influenciar o processo ESIPT, diminuindo-o ou o aumentando, com a protonação ou desprotonação.

## 1.5. Marcadores biológicos fotoluminescentes.

A fluorescência é um método analítico bastante atrativo por variados motivos. Primeiramente, o apelo visual que a técnica desperta. Muitas estruturas apresentam uma fluorescência na região visível do espectro. Outra característica, sem sombra de dúvidas também importante, é sua alta sensibilidade, que muitas vezes é bastante superior a de outras técnicas analíticas, chegando mesmo a partes por bilhão.<sup>35</sup>

Portanto, a utilização de compostos fluorescentes para estudos analíticos é bastante atraente dada a sua alta sensibilidade. A aplicação como sondas biológicas para a detecção de estruturas celulares e biomoleculares, como DNA, RNA e proteínas é uma área muito promissora e que tem recebido muita atenção nos últimos anos, com diversos trabalhos abordando o tema.<sup>36</sup>

Todavia, quando falamos em luminescência em sistemas biológicos, o assunto parece desanimador. Poucas estruturas biológicas apresentam fluorescência e mesmo aquelas que possuem, o fazem com um rendimento quântico de fluorescência baixíssimo. Exemplos de estruturas biológicas que apresentam fluorescência são mostradas na Tabela 2.

**Tabela 2.** Estruturas naturais que apresentam fluorescência, seus comprimentos de absorção e emissão e rendimentos quânticos de fluorescência (Adaptado da referência 37).

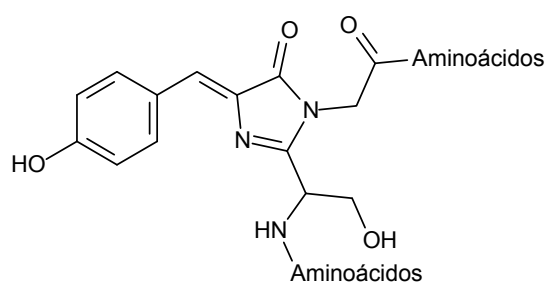
Composto	$\lambda_{\text{máximo de absorção}}$ (nm)	$\lambda_{\text{máximo de emissão}}$ (nm)	$\phi_f$
<b>Tirosina</b>	274	303	0,4
<b>Triptofano</b>	280	348	0,14
<b>Fenilalanina</b>	257	282	0,024

Como se pode perceber na Tabela, tais compostos apresentam um rendimento quântico de fluorescência muito baixo, diminuindo drasticamente a eficiência dos estudos com esses sistemas.<sup>37</sup> Outros compostos que apresentam uma fluorescência natural são a clorofila e algumas flavinas. De fato, nem mesmo esses sistemas apresentam uma fluorescência considerável e estudos envolvendo tais sistemas não são muito eficientes.<sup>38</sup>

Logo, se faz necessário a utilização de compostos fluorescentes que possam, de alguma forma, se ligar à biomolécula para uma detecção “indireta”,

ou seja, a detecção da biomolécula fluorescente e, por conseguinte, do sistema biológico ao qual ela está ligada.<sup>39,40</sup>

A importância da utilização de sistemas fluorescentes como marcadores biológicos foi coroada em 2008, quando os cientistas Osamu Shimomura, Martin Chalfie e Roger Tsien foram laureados com o prêmio Nobel de Química pela descoberta, isolamento, identificação e utilização da proteína verde fluorescente (GFP).<sup>41</sup> A GFP foi isolada a partir do estudo da água viva *Aequorea victoria* e consiste de uma cadeia monomérica de 238 aminoácidos. Seu fluoróforo está indicado na Figura 10.<sup>42</sup>



**Figura 10.** Unidade da GFP com um grupo fluoróforo.

Os trabalhos usando a GFP como marcador estão em constante crescimento, uma vez que a proteína pode ser utilizada para estudar a expressão de genes, estudos envolvendo células-tronco e estudos de cinética protéica.<sup>43</sup> Uma aplicação bastante curiosa da GFP é mostrada na Figura 11, que mostra animais modificados geneticamente por meio da expressão do gene da GFP.



**Figura 11.** Camundongos transgênicos obtidos por marcação com GFP (Figura adaptada da referência 42).

Além da GFP, muitos outros fluoróforos têm sido utilizados para o estudo de sistemas celulares. Por exemplo, Bohme e co-autores aplicaram os fluoróforos EYFP, Lumio e SNAP para estudos do neuropeptídeo Y, família de peptídeos endócrinos que estão envolvidos com a regulação pancreática e gástrica, com a pressão sanguínea, com o ritmo cardíaco, entre outras atividades.<sup>44</sup> Recentemente Zhang e Lo sintetizaram e estudaram as propriedades de complexos luminescentes de irídio (III), aplicando-os em estudos celulares.<sup>45</sup>

## **1.6. A estrutura do DNA e o processo de intercalação.**

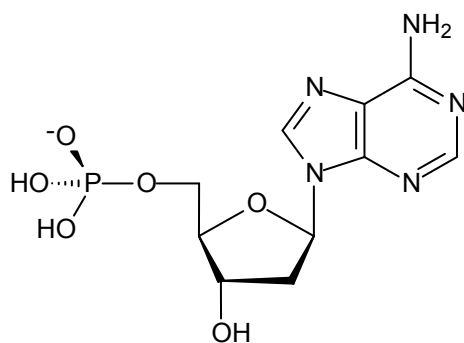
O ácido desoxirribonucléico (DNA) é um ácido nucléico que armazena as informações genéticas e as expressa por meio do controle do funcionamento celular.<sup>46</sup> Todas as formas de vida conhecidas na Terra, à exceção de alguns vírus que expressam suas informações por meio do RNA, transmitem seus traços genéticos por meio do DNA.<sup>47</sup>

Em organismos eucariontes, o DNA ocorre como cromossomos lineares e o conjunto de cromossomos forma o genoma,<sup>48</sup> que define todas as características fenotípicas de um organismo. Durante a reprodução, o DNA é duplicado e sua sequência é transcrita em RNA (processo de transcrição) que é utilizado para a síntese de aminoácidos e, conseqüentemente, proteínas (processo de tradução).

Assim, a obtenção de sensores químicos para a detecção e quantificação de ácidos nucléicos é uma área de grande interesse em diversos campos de atuação, como na área farmacológica (síntese de medicamentos específicos), processos de seleção genética, diagnósticos médicos entre muitas outras aplicações.<sup>49,50</sup>

A estrutura tridimensional do DNA foi elucidada em 1953 por Watson e Crick<sup>51</sup> e consiste em um longo polímero, em que as unidades básicas de repetição são conhecidas como nucleotídeos (Figura 12). Estes são formadas por três subunidades: uma base nitrogenada, um grupo fosfato e um carboidrato (no DNA, uma desoxirribose).





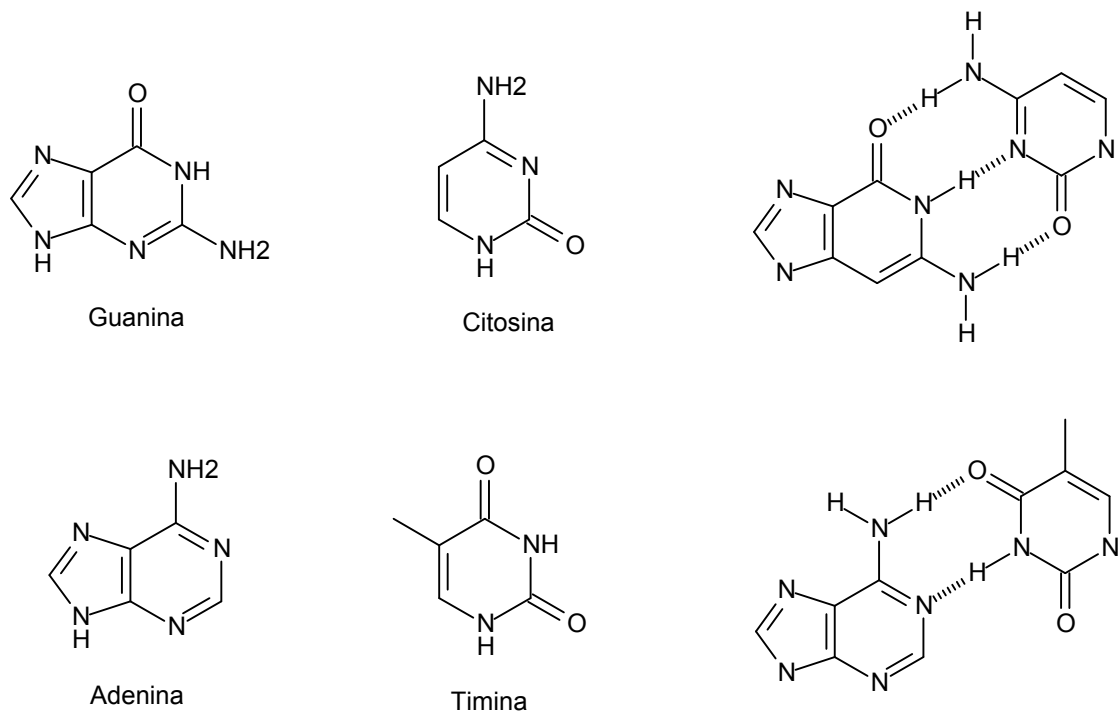
**Figura 12.** Estrutura de um nucleotídeo de DNA.

As bases nitrogenadas, compostos heterociclos com nitrogênio, podem ser de dois tipos:

1. Bases purínicas: heterociclos bi-anelares, compostos por um anel de seis membros e outro de cinco membros. São de dois tipos: adenina e guanina (Figura 13).

2. Bases pirimidínicas: heterociclo mono-anelar de seis membros, sendo pelo menos dois átomos de nitrogênio. De dois tipos: citosina e timina (Figura 13).

Cada uma dessas bases nitrogenadas é unida a outra por meio de interações intermoleculares do tipo ligação de hidrogênio, de forma que uma base púrica sempre esteja ligada a uma base pirimídica. Mais especificamente, uma guanina sempre se liga a uma citosina e uma adenina sempre está ligada a uma timina (Figura 13).



**Figura 13.** As quatro bases nitrogenadas e suas interações por meio de interações de hidrogênio. (Figura adaptada da referência 51).

A interação entre os vários conjuntos de bases nitrogenadas forma a estrutura de dupla-hélice do DNA – dsDNA (Figura 14). Embora seja possível a existência de fitas simples de DNA (ssDNA), em sistemas biológicos só existem estruturas com dupla hélice.<sup>52</sup>



**Figura 14.** A estrutura em dupla-hélice do DNA.

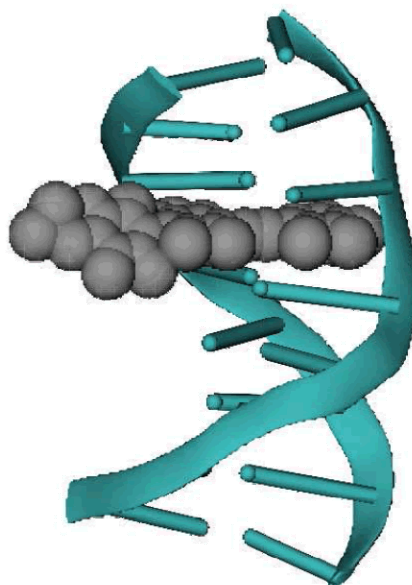
O processo de ligação de uma molécula sonda com o DNA ainda é controverso e muitos estudos sugerem mecanismos diferentes de ligação.<sup>53</sup> Apesar da discussão científica controversa, sugerem-se basicamente duas formas de interação entre uma molécula sonda e o dsDNA, como descrito a seguir:

1. **Ligação externa:** Nesse tipo de interação, as moléculas do ligante interagem com a dupla hélice do DNA por meio de forças de interação intermoleculares com os grupos fosfato da dupla fita (Figura 15). Esse tipo de ligação provoca poucas alterações na cadeia do DNA, mas é mais facilmente rompida, resultando em processos menos eficientes.<sup>54</sup>



**Figura 15.** Processo de ligação externa da sonda com a dupla-hélice do DNA. (Figura adaptada da referência 51).

2. **Intercalação:** A intercalação consiste na inserção de moléculas planares, normalmente aromáticas, entre dois pares consecutivos de bases nitrogenadas da dupla-hélice do dsDNA (Figura 16). Na dupla-hélice do DNA, duas bases estão orientadas em uma orientação quase coplanar, permitindo a inserção de moléculas planares entre esses dois pares de bases, por meio de interações  $\pi$  ( $\pi$  *stacking*).<sup>55</sup>



**Figura 16.** Processo de intercalação na cadeia do DNA (Figura adaptada da referência 56).

A intercalação de uma molécula da sonda molecular provoca uma leve alteração na estrutura do DNA. Os grupos fosfato sofrem uma pequena abertura, de forma a permitir a inserção do marcador. Isso provoca um pequeno desenrolar da dupla fita, alongando a cadeia do DNA. Assim, para evitar distorções mais pronunciadas, a inserção de uma sonda em um par de bases nitrogenadas, exclui a inserção no par vizinho, no chamado “Princípio de Exclusão do Vizinho”.<sup>56,57</sup> Isso é um resultado muito importante, pois evita alterações muito grandes na estrutura do material genético, o que poderia ocasionar uma perda de suas funções.

De maneira geral, estruturas planares e aromáticas, facilitam interações  $\pi$  entre o fluoróforo e as bases nitrogenadas do DNA, permitindo interações muito eficientes entre a biomolécula e a sonda fluorescente. Neto e co-autores demonstraram<sup>58</sup> que fluoróforos com grupos doadores associados a grupos receptores, tendo um espaçador entre eles formam uma arquitetura molecular adequada para intercalação em dsDNA.

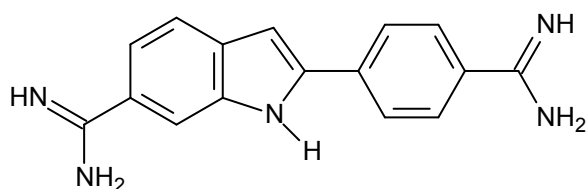
### **1.6.1. Marcadores comerciais.**

Estudos com diferentes sistemas marcadores têm sido realizados, uma vez que podem fornecer uma visão fundamental sobre a estrutura celular e de

diversos tecidos. Os experimentos de *live-cell imaging* são, na atualidade, experimentos fundamentais em campos variados como neurobiologia, farmacologia e no promissor campo da engenharia genética.<sup>59</sup>

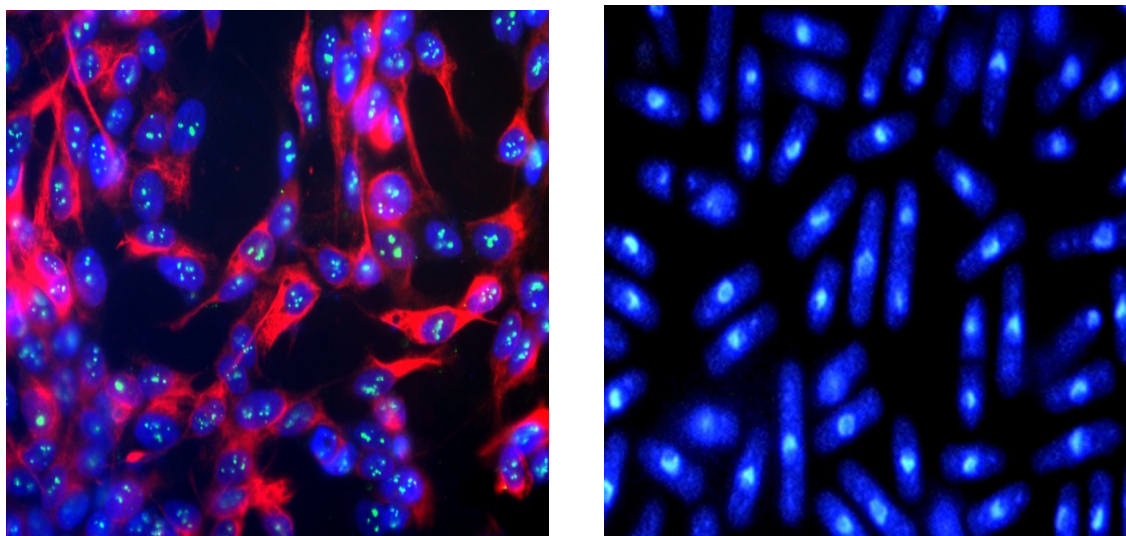
Diversos grupos têm testado compostos fotoluminescentes como marcadores. De fato, um dos fluoróforos comerciais mais utilizados em experimentos de *live-cell imaging*, como marcador seletivo de dsDNA é o DAPI.

O 4',6-diamidinofenilindol (Figura 17) é um marcador seletivo de dsDNA, comercializado pela Invitrogen. Seu comprimento de onda de excitação se dá na faixa do ultravioleta (358 nm) e sua emissão máxima ocorre próximo a 460 nm (na região do azul).<sup>60</sup>



**Figura 17.** Estrutura do fluoróforo comercial DAPI.

Como sua fluorescência é azul, não há sobreposição de cores com outros fluoróforos muito utilizados, como a GFP (verde) e o Alexa Flúor (vermelho). O DAPI é um dos fluoróforos mais utilizados para estudos de processos em dsDNA. Algumas aplicações aparecem na Figura 18.<sup>61,62</sup>



**Figura 18.** Marcador DAPI. À esquerda, neuroblastomas humanos SH-SY5Y marcados com DAPI (azul). À direita, cromossomos humanos.

## Objetivos

Os objetivos deste trabalho, desenvolvido no Laboratório de Química Medicinal e Tecnológica (LaQuiMeT) no Instituto de Química da Universidade de Brasília, são a síntese, caracterização e aplicação de novos sistemas fotoluminescentes com conjugações  $\pi$ -estendidas, acoplando os núcleos 2,1,3-benzotiadiazola e 2-(2'hidroxifenil)benzazol.

Estes novos sistemas luminescentes foram planejados de forma a permitir até quatro centros ES IPT e que possuam um grupo doador e um grupo aceptor em sua estrutura, para testar suas propriedades como marcadores biológicos seletivos para DNA.

Nossos objetivos específicos consistem em realizar testes espectrofotométricos, espectrofluorimétricas, de variação de pH e estabilidade eletroquímica (voltametria cíclica) para determinar as principais características dos novos sistemas luminescentes com conjugações  $\pi$ -estendidas e sua viabilidade como marcadores biológicos fotoluminescentes para visualização de processos celulares. Uma vez testada suas características, os compostos serão aplicados em estudos celulares para marcação do núcleo de células-tronco humanas.

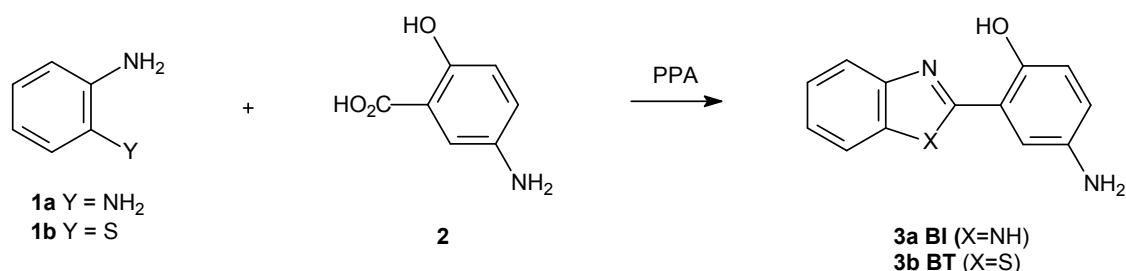
---

## 2. RESULTADOS E DISCUSSÃO



## 2.1. Síntese dos novos compostos fluorescentes

**BT** e **BI** foram sintetizados utilizando-se metodologia já descrita na literatura (Esquema 2).<sup>63</sup> A metodologia consiste na condensação do ácido 5-aminosalicílico (**2**) com uma anilina orto-substituída (**1a** e **1b**) em ácido polifosfórico (PPA), obtendo-se os compostos **3a** e **3b**, com bons rendimentos.<sup>i</sup>

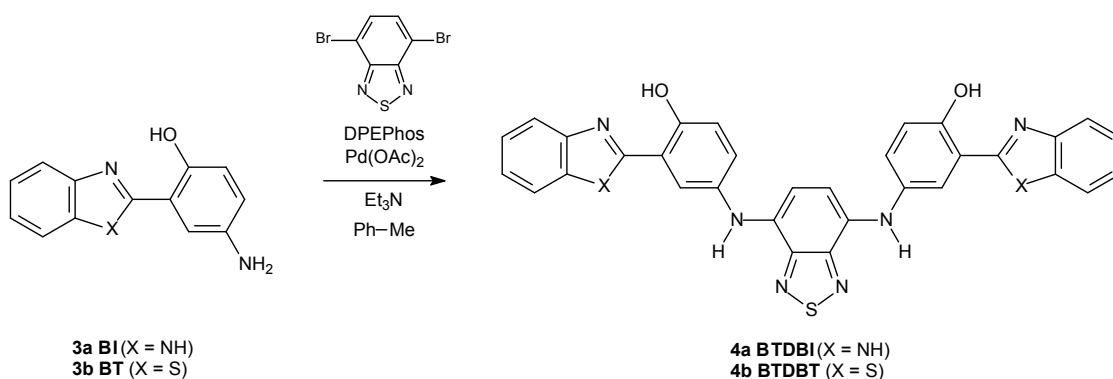


**Esquema 2.** Síntese dos heterociclos benzazólicos **BI** e **BT**.

A síntese dos novos fluoróforos, **BTDBT** e **BTDBI**,<sup>ii</sup> com o núcleo 2,1,3-BTD envolve uma reação de acoplamento de Buchwald-Hartwig, entre **BT** e **BI** (**3a** e **3b**) e 4,7-dibromo-2,1,3-benzotiadiazola, adicionando-se DPEphos, NEt<sub>3</sub>, o catalisador de paládio (utilizando Pd(OAc)<sub>2</sub>) e dissolvendo a mistura reacional em tolueno seco. A mistura é então agitada, sob atmosfera inerte de argônio, a 100°C por 72 horas. Após, esta é resfriada, filtrada em celite e lavada com acetato de etila. O sólido resultante, marrom-avermelhado, é purificado em coluna cromatográfica de sílica com uma solução eluente de acetato de etila/hexano (95:5). Os produtos resultantes, **BTDBT** e **BTDBI**, são sólidos cristalinos amarelos.

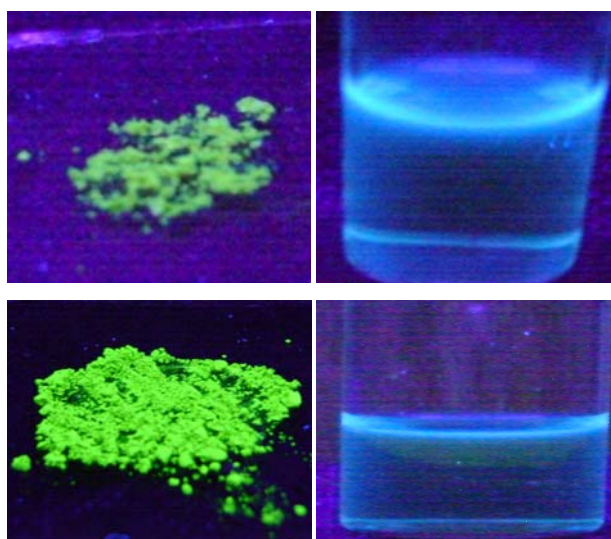
<sup>i</sup> As moléculas **BI** e **BT** foram sintetizadas pelo Prof. Dr. Alexandre A. M. Lapis, na Universidade Federal do Pampa (Unipampa).

<sup>ii</sup> As moléculas **BTDBI** e **BTDBT** foram sintetizadas pelo aluno de IC Diego C. B. D. Santos em seu trabalho de Técnica de Pesquisa sob orientação do Prof. Dr. Brenno A. D. Neto e minha supervisão (FFD Oliveira).



**Esquema 3.** Síntese dos fluoróforos **BTDBT** e **BTDBI**.

Ambos, **BTDBT** e **BTDBI**, apresentam fluorescência no estado sólido, emitindo na região do verde. Em solução de acetonitrila, os compostos tem uma emissão na região do azul do espectro (Figura 19).



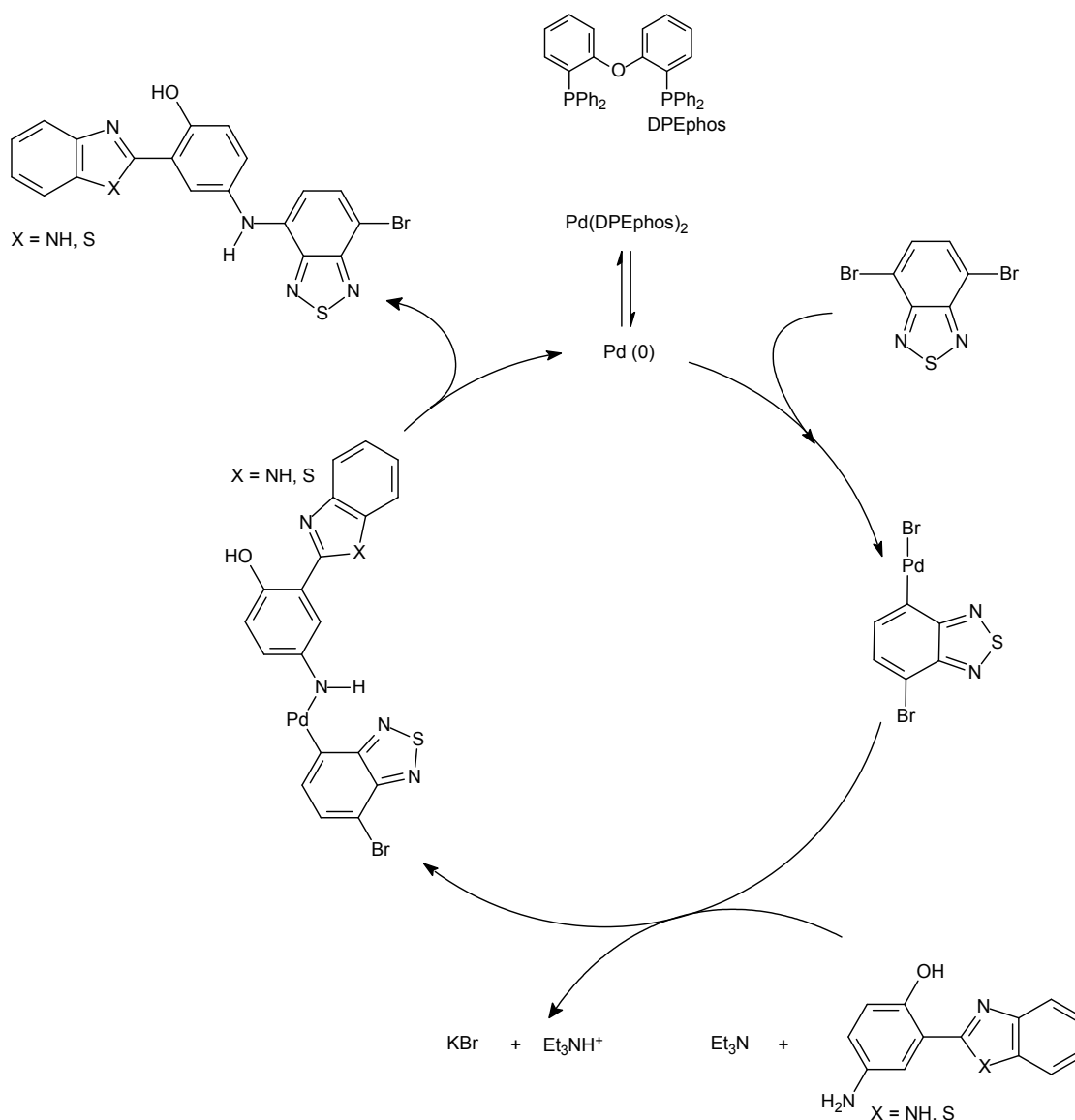
**Figura 19.** Fluorescência em estado sólido e em solução ( $1,00 \times 10^{-5}$  M) de acetonitrila dos fluoróforos sintetizados. Acima **BTDBI** e abaixo **BTDBT**.

## 2.2. Ciclo catalítico

As reações de Buchwald-Hartwig são reações de acoplamento, para a formação de ligações nitrogênio-carbono utilizando paládio como catalisador.<sup>64</sup>

O Esquema 4 descreve a síntese realizada. A primeira etapa consiste na redução de Pd(II) para Pd(0). Posteriormente, ocorre uma adição oxidativa, em que o paládio (0) se insere na ligação carbono-halogênio. Nessa etapa, o

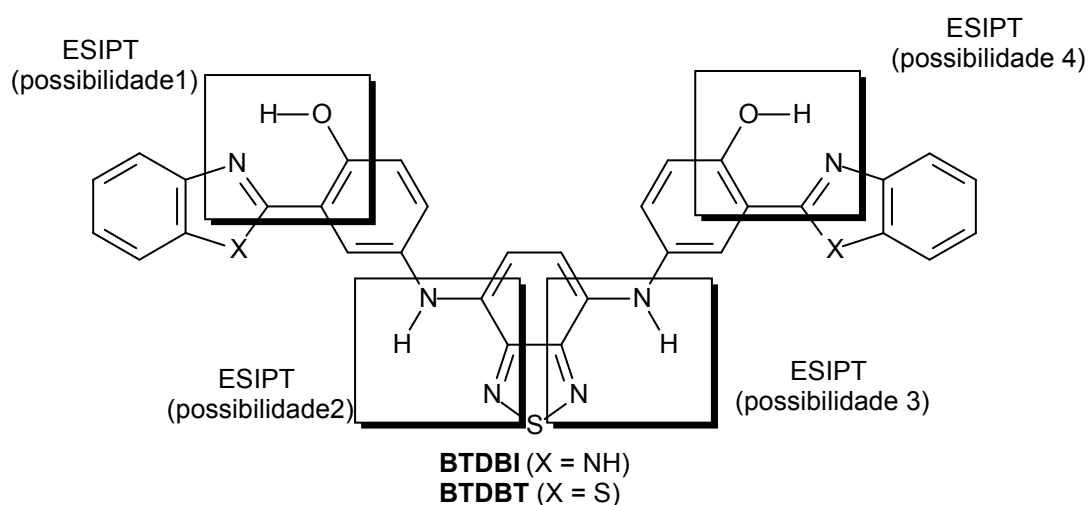
paládio sofre oxidação e seu número de oxidação passa a ser +2. Adicionalmente, as aminas, **BT** e **BI**, reagem com a base (triethylamina, no caso), formando um sal de trietilamônio com inserção da amina no metal em substituição ao brometo. Posteriormente, ocorre a etapa de eliminação redutiva, liberando o composto desejado e reduzindo o paládio, permitindo que um novo ciclo se inicie.



**Esquema 4.** Ciclo catalítico proposto para a formação dos novos sistemas fluorescentes BTDBI e BTDBT.

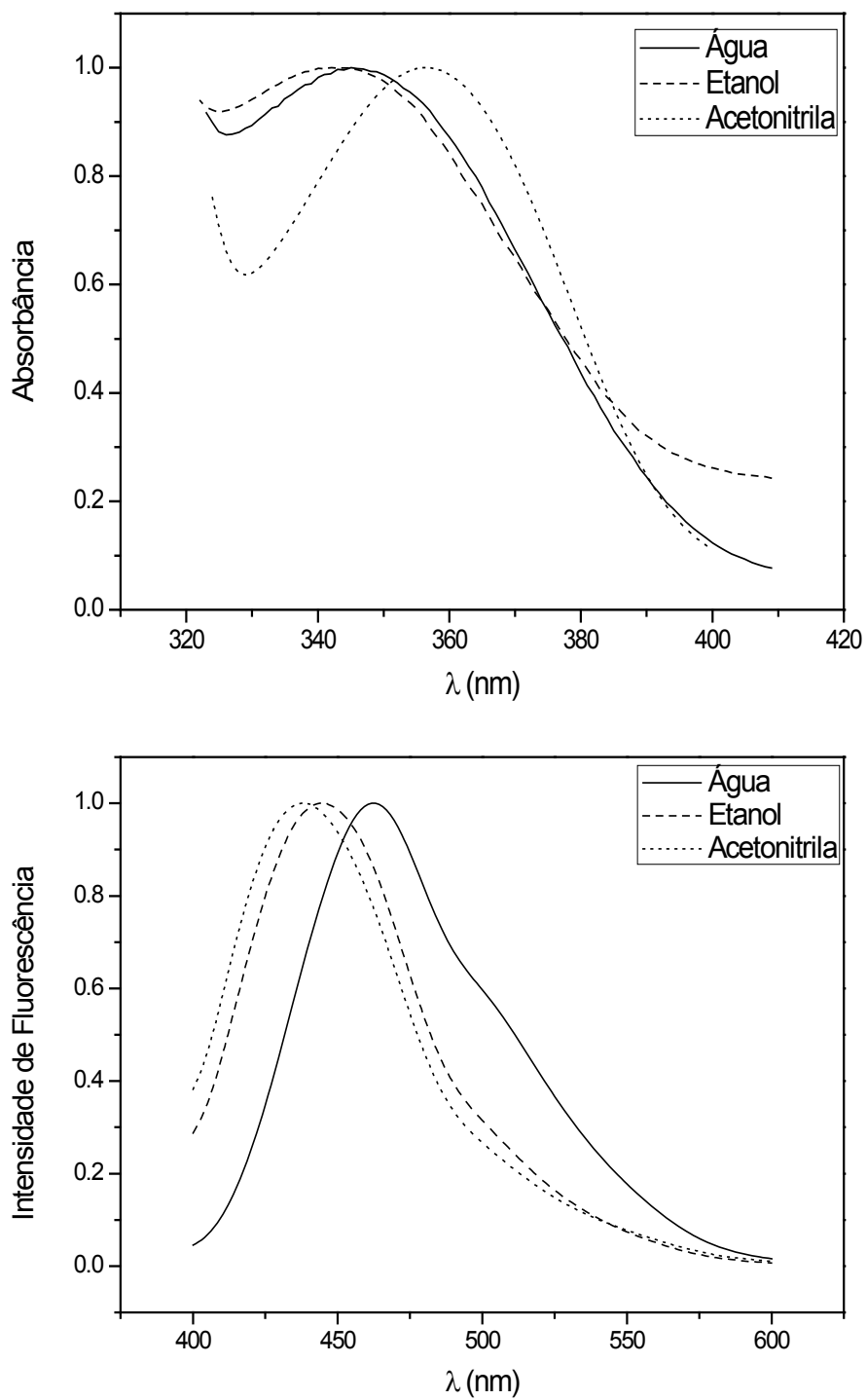
## 2.3. Estudo fotofísico

Os novos compostos fluorescentes foram sintetizados com um planejamento na arquitetura molecular de forma que até 4 centros possam realizar o processo ESIPT (Figura 20). A transferência protônica pode ocorrer entre a hidroxila (OH) e o anel azólico ou entre o nitrogênio e o anel BTB. De fato, ambos os processos ESIPT tem sido estudados e relatados em outros sistemas.<sup>65</sup>

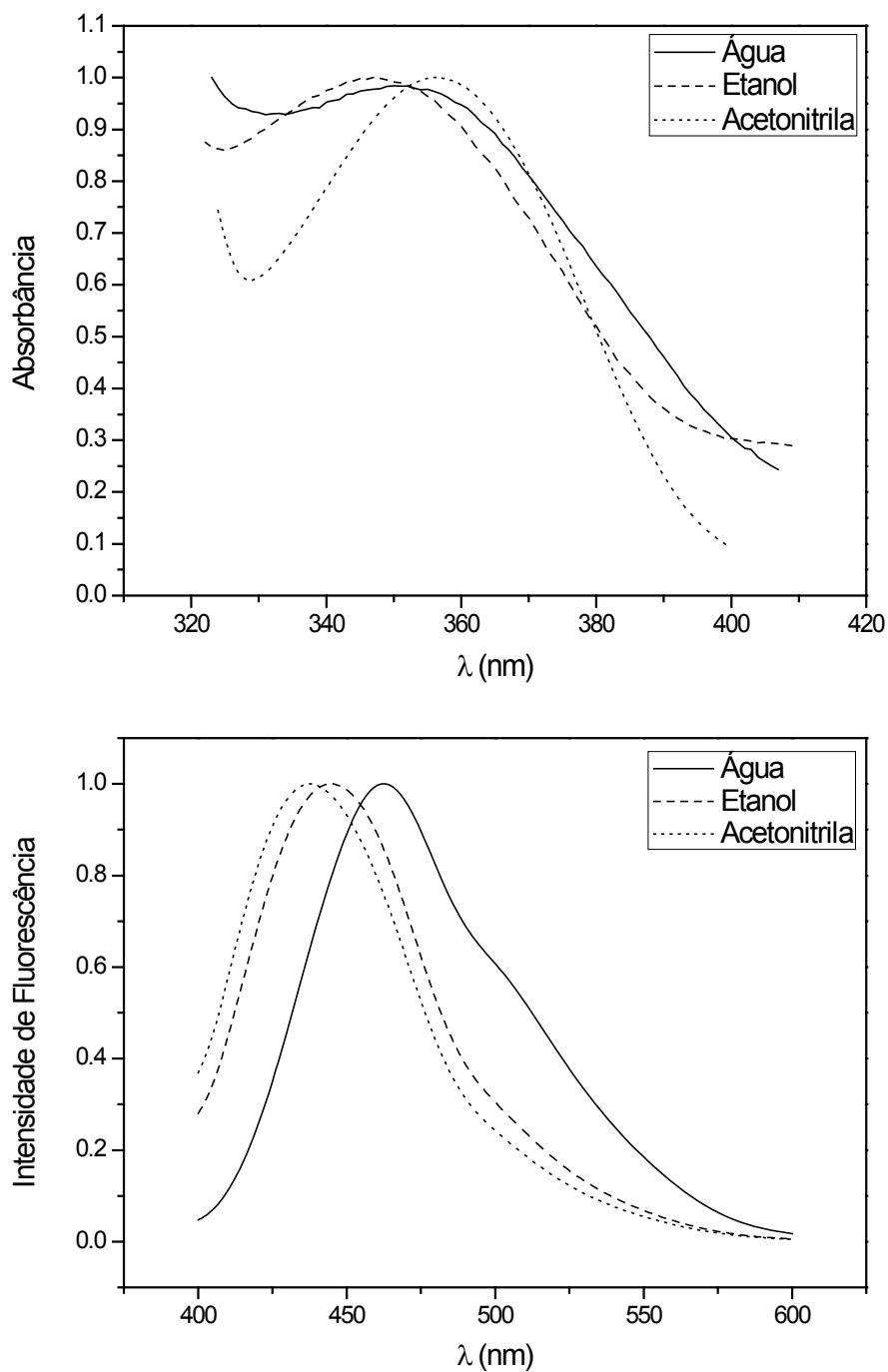


**Figura 20.** As quatro possibilidades do processo ESIPT, para os novos fluoróforos sintetizados.

Os gráficos de absorção de UV-Vis e emissão de fluorescência de **BTDBT** e **BTDBI** estão representados na Figura 21. Os fluoróforos foram testados em três solventes diferentes: água (um solvente prótico), etanol (um solvente prótico) e acetonitrila (um solvente aprótico). Os experimentos foram realizados utilizando concentrações de  $1,00 \times 10^{-5}$  M dos fluoróforos.



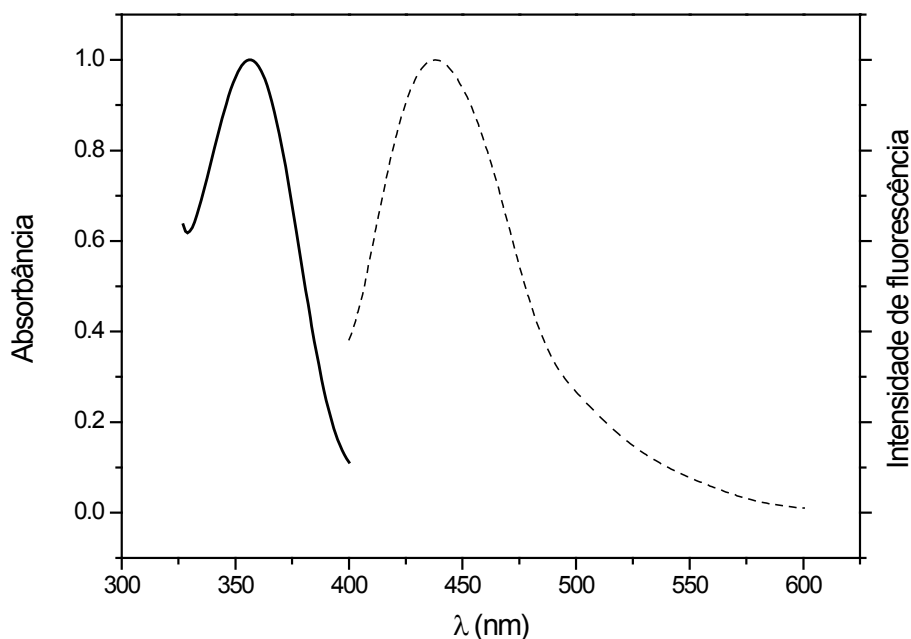
**Figura 21.** Espectros de absorção e emissão para **BTDBT** em três solventes diferentes.



**Figura 21 (continuação).** Espectros de absorção e emissão para **BTDBI** em três solventes diferentes.

Pode-se notar que os compostos **BTDBT** e **BTDBI** absorvem aproximadamente em 350 nm e emitem em torno de 450 nm. Portanto, absorvem na região do ultravioleta e emitem na faixa do visível (azul). Essa diferença está muito explicitada na Figura 22, com a absorção e emissão de

**BTDBT** em acetonitrila. Isso terá conseqüências importantes quando considerarmos a possibilidade de marcação biológica.



**Figura 22.** Absorção e emissão de **BTDBT** em acetonitrila.

As propriedades fotofísicas dos fluoróforos utilizados (sintetizados e precursores) estão resumidas na Tabela 3. O primeiro fato a ser salientado é a diferença nos deslocamentos de Stokes e nos comprimentos de onda de absorção e emissão, em diferentes solventes. Isso é um indicativo de que realmente existe uma transferência intramolecular de cargas (ICT), comumente observado em processos ESIPT. Outro fato a ser notado: os extensos deslocamentos de Stokes em todas as espécies, variando de um mínimo de 64 nm (**BI** em acetonitrila) a um máximo de 142 nm (**BT** em etanol), fato decorrente do processo de transferência de cargas eficiente e boa estabilidade na formação do estado excitado.

**Tabela 3.** Propriedades fotofísicas selecionadas dos fluoróforos estudados ( $1,00 \times 10^{-5}M$ ).

	$\lambda_{\max}(\text{abs})$ <sup>[a]</sup>	$\lambda_{\max}(\text{em})$ <sup>[a]</sup>	$\log \epsilon$ (MeCN)	$\Delta\lambda$ <sup>[a]</sup>	$\Phi_f$
<b>BI</b>	346, 361, 338.	478, 425, 456.	3,90	132, 64, 118.	0,022
<b>BT</b>	371, 389, 359.	513, 478, 462.	3,72	142, 89, 103.	0,0046
<b>BTDBI</b>	348, 356, 353.	444, 438, 462.	3,91	96, 82, 109.	0,016
<b>BTDBT</b>	344, 345, 345.	445, 440, 463.	3,93	101, 95, 118.	0,016

<sup>[a]</sup> Etanol, Acetonitrila e Água, respectivamente.

Para **BTDBT** e **BTDBI**, os maiores deslocamentos de Stokes foram observados em água e os menores em acetonitrila, mas a diferença entre eles não é considerável. Isso mostra que os fluoróforos têm uma alta estabilidade, decorrente da extensão de conjugações  $\pi$ . A deslocalização dos elétrons decorrentes da conjugação  $\pi$  acarreta um abaixamento energético dos orbitais antiligantes, diminuindo as energias de transição. É importante ressaltar também que o solvente exerce um papel nos  $\lambda_{\max}$  de absorção e emissão, decorrente da diferença de conformações no estado fundamental.

Outro fator a ser considerado é o coeficiente de absorvidade molar ( $\epsilon$ ). Os valores encontrados mostram típicas transições  $\pi \rightarrow \pi^*$ . Além disso, pode-se observar um efeito batocrômico (deslocamento para o vermelho), decorrente do aumento da polaridade do solvente: conforme a polaridade aumenta, o comprimento de onda aumenta. Isso decorre das forças atrativas entre solvente e fluoróforo, baixando os níveis energéticos dos estados fundamental e excitado, diminuindo a energia das transições.

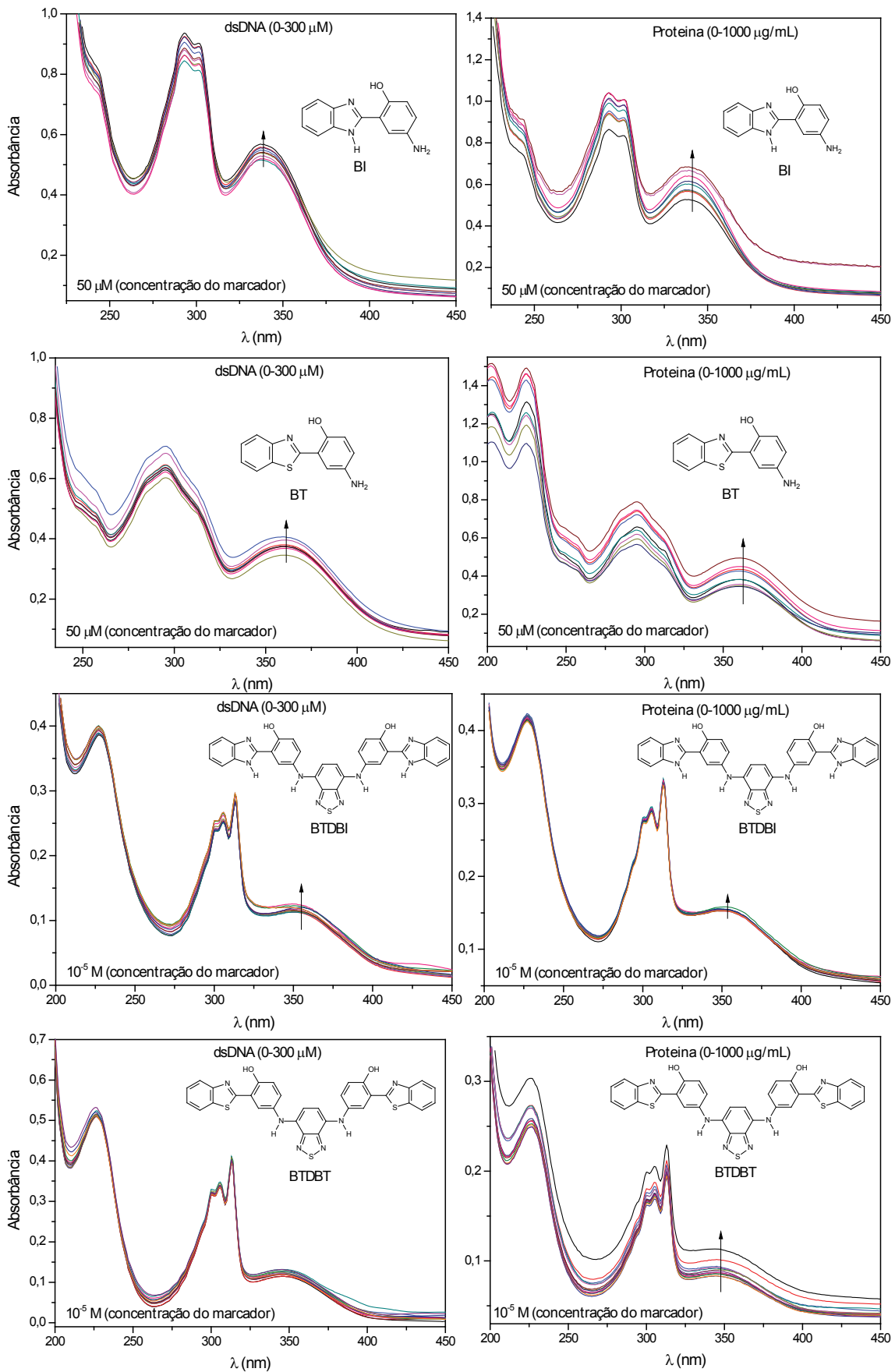
Os rendimentos quânticos de fluorescência são baixos, fato já esperado para este tipo de sonda fluorescente, uma vez que o processo de intercalação com os pares de bases nitrogenadas do DNA aumenta a rigidez estrutural da molécula, aumentando, conseqüentemente, a eficiência da fluorescência e, portanto, seu rendimento quântico de fluorescência.



## 2.4. Titulações espectrofotométricas

Uma vez conhecida as propriedades fotofísicas dos compostos utilizados, nossa atenção se voltou para o estudo de suas interações com biomoléculas. Primeiramente, testamos as propriedades fotométricas com titulações de dsDNA (*calf thymus*) ou de plasmídeos e a proteína BSA (albumina do soro bovino). Plasmídeos são estruturas de DNA circular extrassômicas, utilizadas em engenharia genética como multiplicadores genéticos.<sup>66</sup> A proteína BSA é um dos principais componentes do sangue.<sup>67</sup>

Na Figura 23 estão mostrados os espectros de UV-vis para os quatro fluoróforos utilizados, titulados com dsDNA e a albumina bovina. Como resultados idênticos são obtidos, independente do dsDNA utilizado, os estudos seguiram com dsDNA de terneiro (*calf thymus*).



**Figura 23.** Titrções espectrofotométricas dos quatro fluoróforos usando dsDNA (*calf thymus*) e a proteína BSA.

A utilização de métodos espectroscópicos, como UV-Vis e fluorescência, para se estudar a interação de marcadores com bioestruturas é bastante eficiente, devido à sensibilidade dos métodos e o fato de que os estudos envolvem comprimentos de onda que não interferem com o comprimento de absorção do DNA (que absorve próximo a 260 nm).

Nota-se que para os quatro fluoróforos nenhum efeito batocrômico ou hipsocrômico é observado, apenas efeitos hiperocrômicos. Isso indica que a interação dos fluoróforos com as bioestruturas provoca leves alterações conformacionais na estrutura das sondas, mas nenhuma alteração estrutural drástica. Para os quatro fluoróforos percebe-se a eficiência na ligação, embora as alterações não sejam tão pronunciadas devido à sensibilidade mais baixa do UV-Vis, quando comparada às técnicas fluorescentes.

Os resultados mostram ainda que para **BT** e **BI** a detecção de proteínas mostrou-se mais eficiente, ocasionando efeitos mais pronunciados nos espectros de absorção, fato já esperado para os benzimidazóis e benzotiazóis.<sup>68</sup> Para **BTDBT** e **BTDBI** os efeitos não são tão pronunciados, mas indicam a eficiência dos processos de ligação entre os fluoróforos e as biomoléculas.

## 2.5. Titulações espectrofluorimétricas

A fluorescência é um método altamente atraente, dada sua alta sensibilidade, apresentando limites de detecção muito melhores quando comparado a outros métodos.<sup>69</sup> Portanto, a detecção de fluorescência é bem mais eficiente quando comparado à técnica de UV-vis. De fato, concentrações mais baixas ( $\mu\text{M}$ ) do fluoróforo, quando comparadas às titulações fotométricas, deram bons resultados. Novamente, as titulações foram feitas utilizando-se dsDNA (*calf thymus*) e a proteína bovina (BSA). Os espectros de emissão de **BI** e **BT** estão na Figura 24.

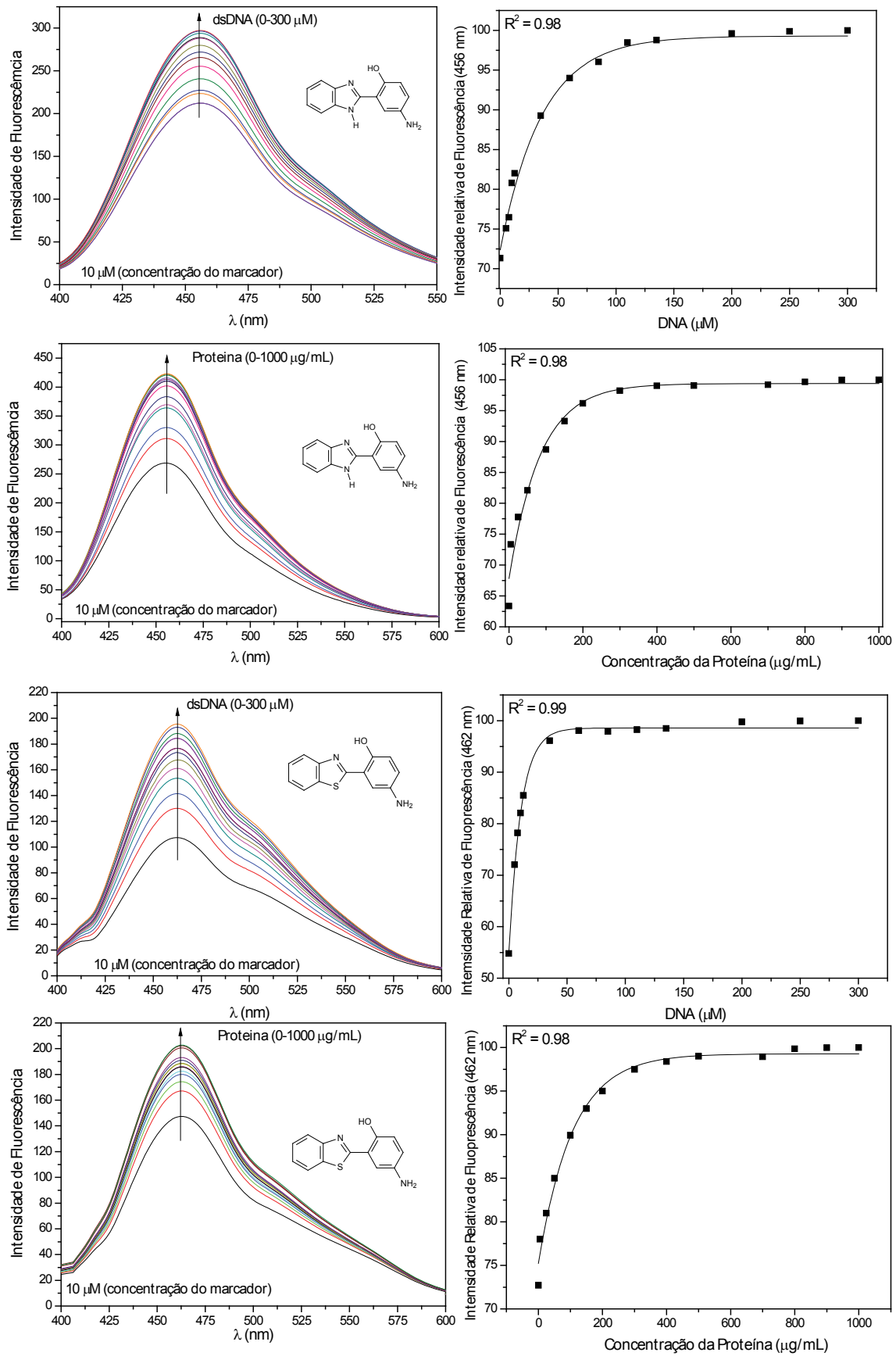
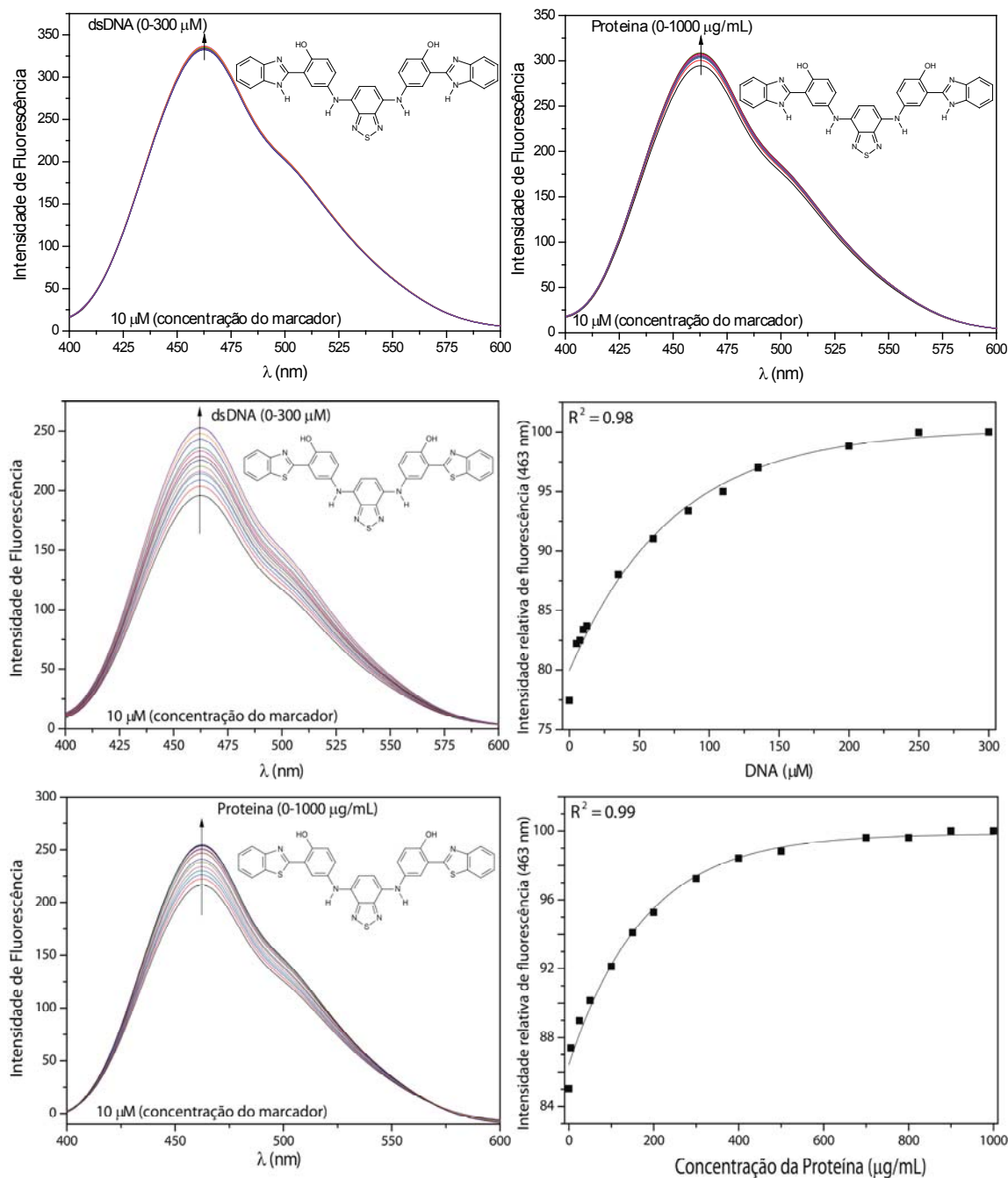


Figura 24. Titrulações Espectrofotométricas de BI e BT usando DNA e BSA.

Para **BT** e **BI** se obtêm um máximo de absorção próximo a 460 nm. Além disso, um aumento exponencial da intensidade de fluorescência é observado. Esse efeito hipercrômico revela a eficácia das moléculas fluorescentes como marcadores. Para os testes com ácidos nucleicos, as titulações foram realizadas com quantidades crescentes da biomolécula, variando de 0 a 300  $\mu\text{M}$ . As duas sondas são capazes de detectar quantidades de até 10  $\mu\text{M}$ , estando nos mesmos limites de detecção dos fluoróforos mais utilizados.<sup>70</sup> Para a detecção de proteínas, quantidades consideravelmente maiores devem ser utilizadas, revelando baixa especificidade das sondas para a detecção de sistemas protéicos.

Os espectros para **BTDBT** e **BTDBI** estão na Figura 25.



**Figura 25.** Titrulações espectrofotométricas de **BTDBI** e **BTDBT** usando dsDNA (*calf thymus*) e BSA.

Para **BTDBT** nota-se claramente uma alta eficiência no processo de marcação. Um aumento significativo da intensidade de fluorescência é observado (efeito hiperacrômico) revelando a interação entre o fluoróforo e a biomolécula. Além disso, o aumento exponencial permite detecções quantitativas das bioestruturas, em limites de detecção comparáveis com os

melhores marcadores disponíveis comercialmente. Outro fator a ser destacado é altíssima sensibilidade para dsDNA (limites de detecção de 10  $\mu$ M) e a sensibilidade relativamente mais baixa para o estudo de proteínas, embora o efeito hipercrômico seja notado. Isso mostra a seletividade do método, nos fornecendo fortes indícios sobre a possibilidade de marcações exclusivas de dsDNA em quantidades adequadas do fluoróforo em testes celulares.

**BTDBI** mostra resultados negativos, mas bastante interessantes. Sua interação com dsDNA e com a proteína BSA é muito pobre, e um baixíssimo aumento da intensidade de fluorescência é observado. Essa baixa interação fluoróforo–bioestrutura é relevante, mostrando que o fluoróforo não é adequado como marcador em análises quantitativas, mas apenas para análises qualitativas. Essa baixa interação entre o fluoróforo e as biomoléculas é resultado da alta hidrofiliabilidade, devido à presença do grupo NH, em contraste ao enxofre presente na **BTDBT**. A presença do grupo NH aumenta a interação com as moléculas do solvente (água), diminuindo o grau de interação com as biomoléculas. Essa diminuição de interação interfere na marcação, ocasionando mudanças espectrais muito baixas.

Comparativamente, a detecção de dsDNA, de forma geral, foi bem mais eficiente que a detecção da proteína, que exige quantidades relativamente maiores para fornecer resultados quantitativos satisfatórios. Dessa maneira, limitaremos os próximos estudos à utilização de dsDNA.

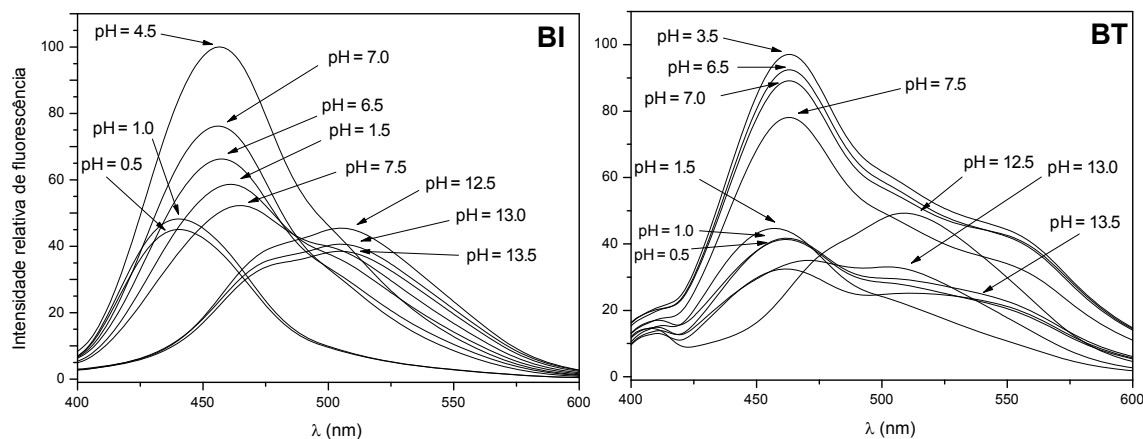
## 2.6. Dependência do pH na intensidade de fluorescência

O pH exerce uma influência marcante no processo de luminescência. Muitas espécies, em valores diferentes de pH, podem ter suas emissões de fluorescência aumentadas, diminuídas ou mesmo suprimidas. Um exemplo marcante é a anilina, que em pH ácido tem sua fluorescência suprimida<sup>71</sup>

O processo ES IPT, sobremaneira, apresenta uma alta dependência do valor de pH da solução, efeito relatado por vários autores.<sup>72,73</sup> Espécies neutras, catiônicas e aniônicas podem existir em diferentes valores de concentração hidrogeniônica, alterando comprimentos máximos de emissão

e/ou intensidade de fluorescência, além da forma da curva observada no espectro.

Os espectros de emissão selecionados para **BI** e **BT** estão na Figura 26.

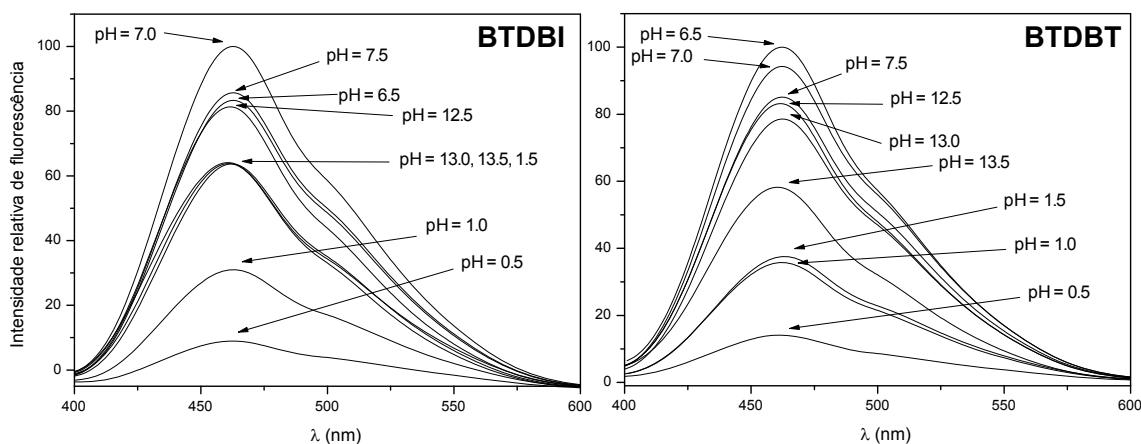


**Figura 26.** Dependência das emissões fluorescentes em valores diferentes de pH para **BI** e **BT**.

**BI** e **BT** apresentam comportamentos bastante próximos e seu espectro de emissão é bastante influenciado pelo pH. Em soluções muito ácidas, nota-se um efeito hipsocrômico (em comparação ao observado em pH neutro), decorrente da existência de espécies catiônicas que diminuem a ocorrência do processo ESIPT. Já em valores muito básicos, observa-se um efeito batocrômico pronunciado. Em valores tão altos de pH, haverá a desprotonação completa dos hidrogênios ácidos, o que deve aumentar a rigidez da molécula, deslocando os comprimentos máximos de absorção. Em ambos os casos, em pH relativamente ácido (4,5 para **BI**; 3,5 para **BT**) ocorrem os máximos de intensidade de fluorescência, indicando que tais compostos podem não ser úteis para estudos celulares *in vivo*.

Os espectros de emissão selecionados para **BTDBT** e **BTDBI** são mostrados na Figura 27.





**Figura 27.** Dependência das emissões fluorescentes em valores diferentes de pH para **BTDBI** e **BTDBT**.

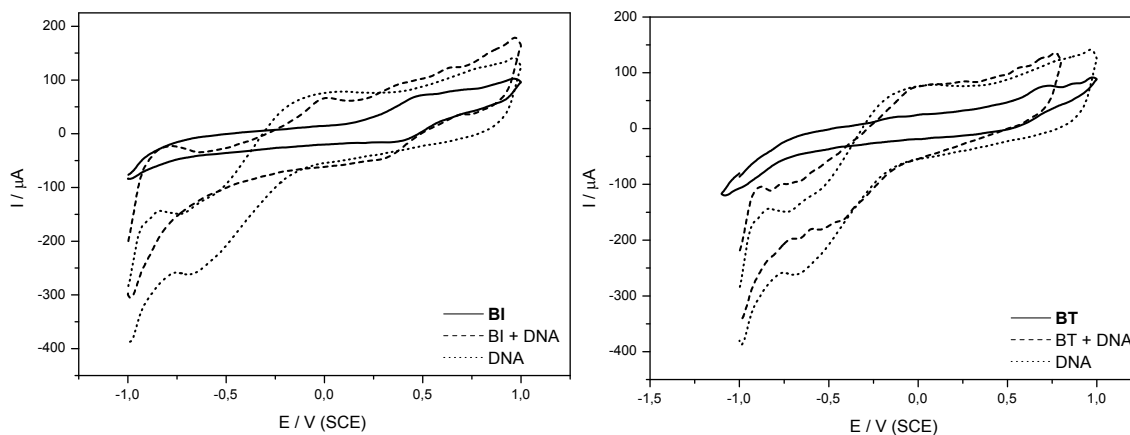
Para **BTDBI** e **BTDBT** a variação no pH não produz mudanças tão pronunciadas no espectro de emissão. Assim, observamos apenas mudanças na intensidade de fluorescência e nenhuma alteração nos comprimentos máximos de emissão. Essa pequena alteração nos espectros de emissão decorre da grande extensão das conjugações  $\pi$  dessas moléculas, que estabilizam as cargas em diferentes valores de pH. Essa estabilização é efeito da distribuição da carga por toda a estrutura, devido a efeitos de ressonância, decorrentes da hiperconjugação de orbitais  $\pi$  envolvidos, provocando poucas alterações nos espectros de fluorescência. Essa alta conjugação torna as **BTDBT** e **BTDBI** altamente estáveis e com amplas aplicações.

É interessante ressaltar que a máxima intensidade de absorção é observada em valores praticamente neutros de pH. Assim, **BTDBI** tem um máximo de fluorescência em 7,0 e **BTDBT** em 6,5, ou seja, valores muito próximos aos fisiológicos. Esse fato é mais uma indicação de que estes fluoróforos são bons candidatos como marcadores biológicos. Em qualquer outro valor de pH, um efeito hipsocrômico é observado, em maior ou menor grau.

## 2.7. Análise Eletroquímica dos Fluoróforos

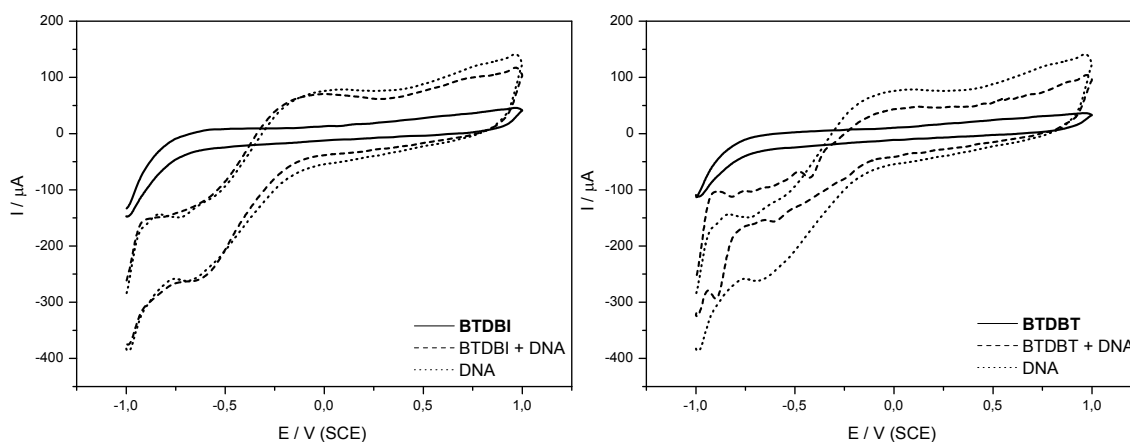
Como a detecção de proteínas não foi tão efetiva, exigindo quantidades consideravelmente maiores da biomolécula, e a detecção de dsDNA foi

bastante seletiva e eficiente, decidimos limitar os estudos eletroquímicos às soluções contendo DNA. Os voltamogramas cíclicos para **BI** e **BT** estão na Figura 28.



**Figura 28.** Voltamogramas cíclicos para **BI** e **BT**.

Para estes dois fluoróforos nenhuma redução catódica foi observada. **BI** mostra um pico de oxidação anódico em 0,48 V. Este pico está associado a outro pico em 0,38 V em um processo de transferência de carga reversível. A adição de DNA desloca estes picos para 0,65 V e 0,27 V, mantendo a reversibilidade do sistema. O processo envolve a transferência de um dos elétrons  $\pi$  do anel benzênico para os eletrodos, em processos de transferência de carga reversível. Para **BT** observa-se um pico anódico em 0,70 V, associado a um pico em 0,53 V, sendo um processo de transferência reversível de carga. Com a adição de DNA, o pico anódico em 0,70 V desloca-se para 0,57 V e o processo torna-se irreversível. Mais uma vez, o processo deve envolver a transferência de carga do anel benzênico. Para **BTDBT** e **BTDBI** os voltamogramas cíclicos estão na Figura 29.



**Figura 29.** Voltamogramas cíclicos para **BTDBI** e **BTDBT**.

**BTDBI** e **BTDBT** mostram sua alta estabilidade eletroquímica, uma vez que nenhum processo notório de oxidação/redução é observado na janela eletroquímica estudada. Intervalos maiores não foram considerados, pois processos de redução/oxidação poderiam ser observados no solvente. Uma pequena mudança de corrente é observada entre o fluoróforo **BTDBI** ligado ao DNA e o DNA puro, mostrando que realmente a interação do marcador com o DNA não é tão efetiva no meio estudado. Para o composto **BTDBT**, entretanto, observa-se uma diferença de corrente significativa, indicando a ótima interação que existe entre o fluoróforo e o DNA, mas sem alteração significativa na curva, indicando poucas mudanças na cadeia do material genético, corroborando com o princípio de exclusão de vizinho, que resultaria em mudanças radicais na cadeia do DNA e diferenças significativas em seu processo eletroquímico quando ligado a sonda.

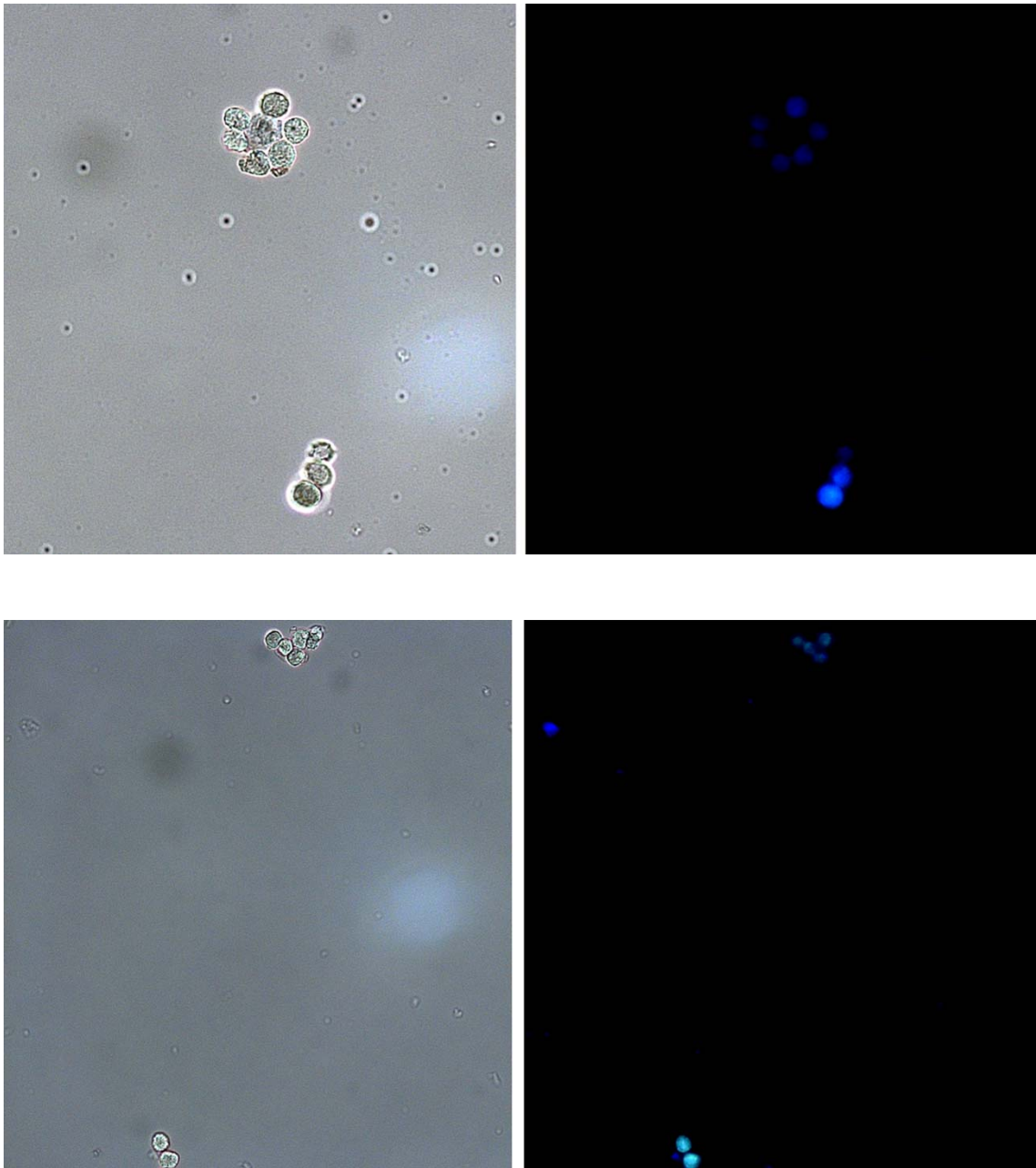
## 2.8. Experimento de *live-cell imaging*

Com todas as informações recolhidas pelas titulações espectrofotométricas e espectrofluorimétricas, e as análises de pH e voltametria cíclica, nosso próximo passo foi a utilização dos fluoróforos em experimentos em células vivas, para testar sua viabilidade como marcador em sistemas biológicos. A utilização de sondas fluorescentes para a detecção seletiva de biomoléculas como DNA, proteínas e outras estruturas celulares tem sido alvo de muitos estudos, por diversos grupos e suas aplicações são variadas e muito

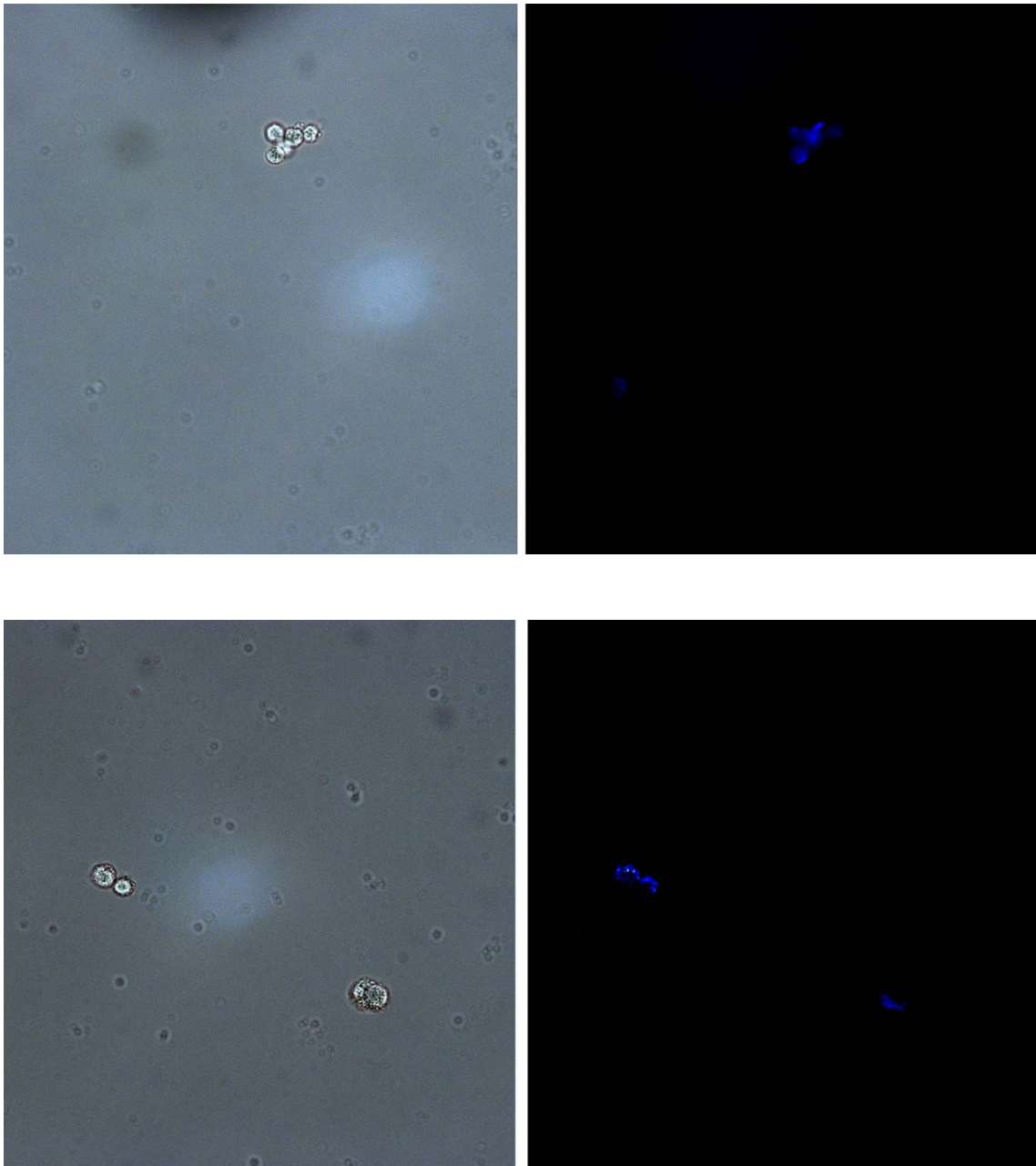
amplas. Recentemente, o Prêmio Nobel em Química (2008) foi conferido pelo estudo de sistemas fluorescentes como marcadores de bioestruturas.

Os experimentos de *live-cell imaging* foram feitos utilizando-se células-tronco humanas e células de macrófagos de camundongos.

Em um primeiro momento testou-se a viabilidade da marcação de dsDNA utilizando células de macrófagos de camundongos em suspensão, por ser um experimento mais simples e que indicaria a viabilidade de testes mais complexos. Em todos os experimentos realizados a marcação de dsDNA nuclear celular foi muito pronunciada (Figura 30). Esses testes iniciais demonstraram uma alta seletividade e eficiência de nossos marcadores.



**Figura 30.** *Live-cell imaging* de células em suspensão de macrófagos de camundongos. A esquerda, contraste de fase; a direita, microscopia confocal de fluorescência. De cima para baixo: **BI**, **BT**, **BTDBI** e **BTDBT**.

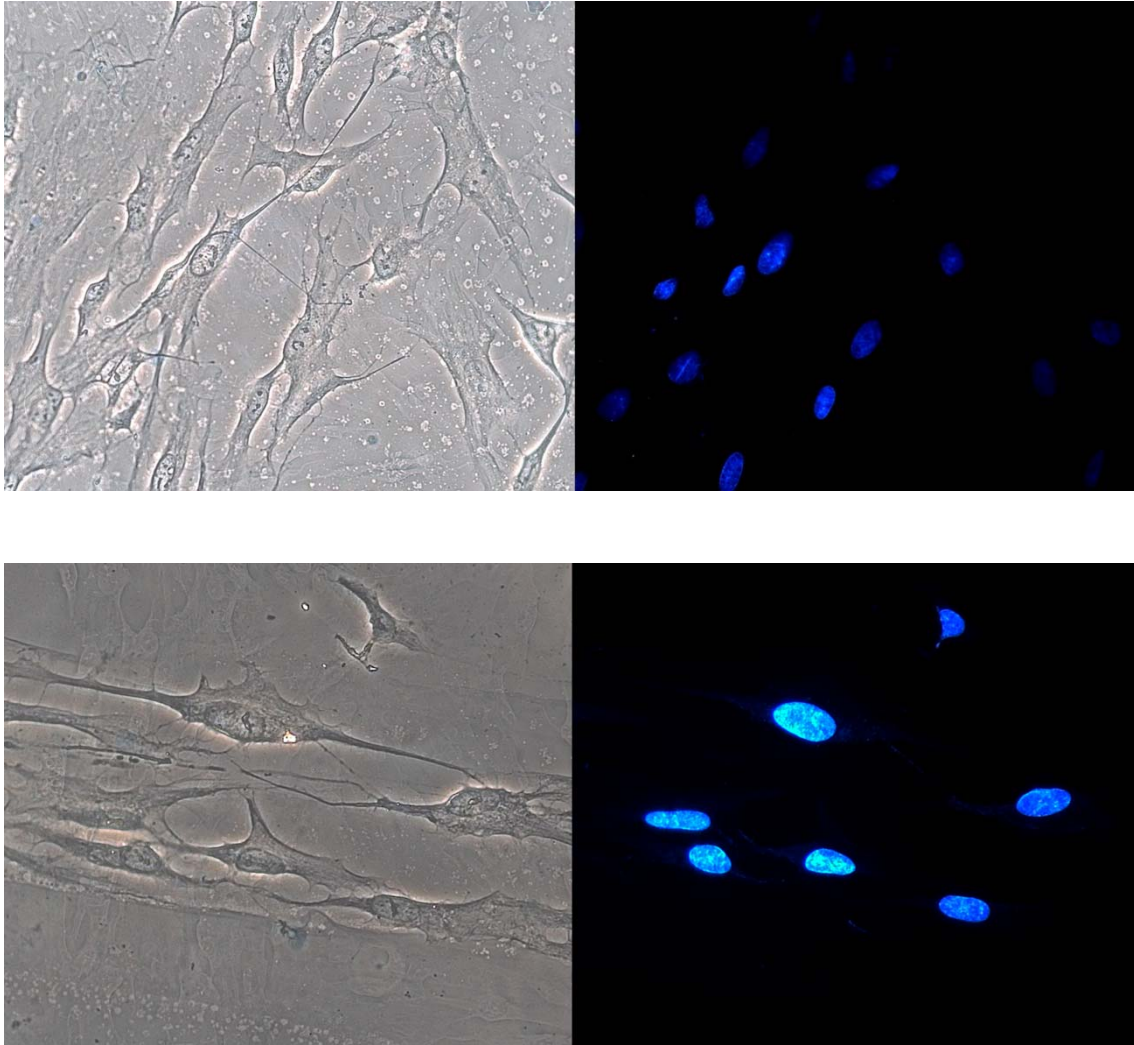


**Figura 30 (continuação).** *Live-cell imaging* de células em suspensão de macrófagos de camundongos. A esquerda, contraste de fase; a direita, microscopia confocal de fluorescência. De cima para baixo: **BI**, **BT**, **BTDBI** e **BTDBT**.

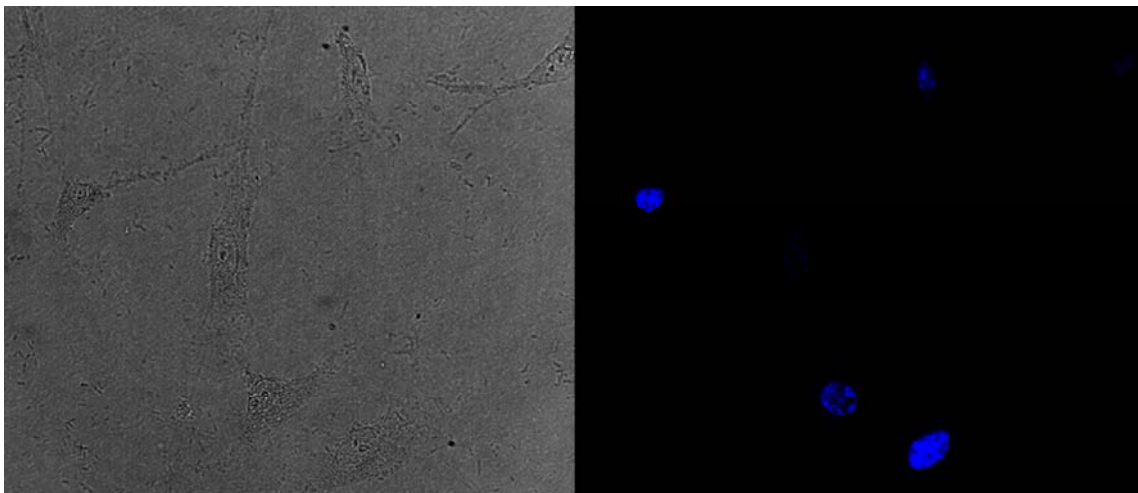
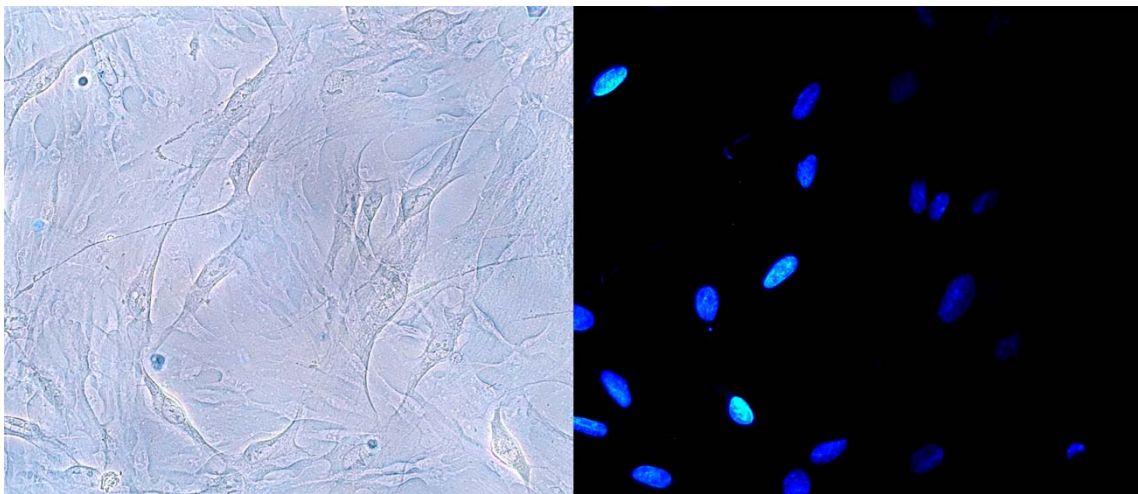
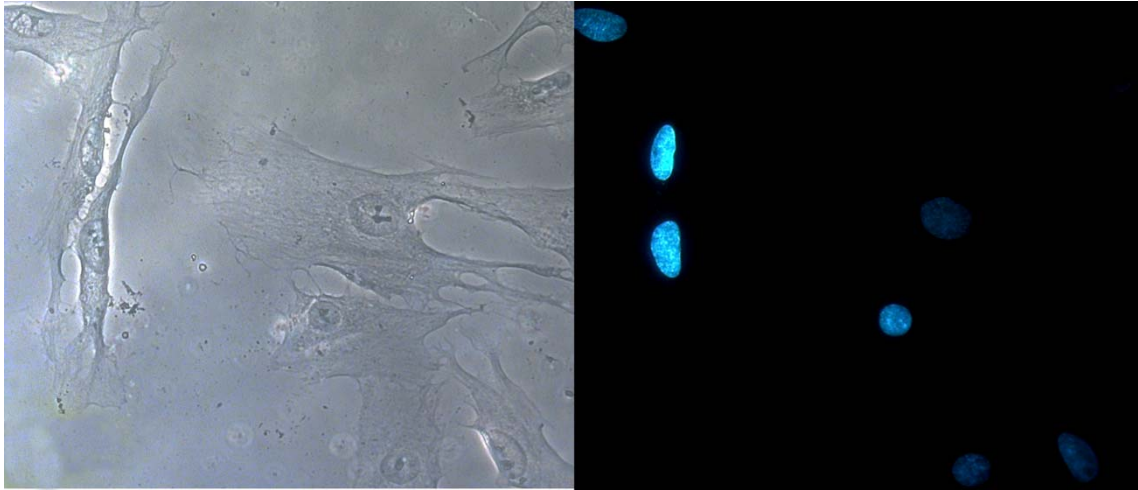
Embora os testes tenham sido positivos para a marcação de dsDNA, estudos mais complexos e de aplicabilidade mais geral são exigidos. Assim, os fluoróforos foram testados em células-tronco humanas aderidas em uma monocamada celular, em uma estrutura que mimetiza um tecido humano. Igualmente, fez-se uma comparação entre os fluoróforos testados no presente

trabalho e o **DAPI**, marcador comercialmente disponível de dsDNA que está entre os mais utilizados neste tipo de estudo.

Os resultados do estudo comparativo são vistos na Figura 31.



**Figura 31.** Live-Cell Imaging de células tronco humanas aderidas utilizando os quatro fluoróforos e o DAPI. Contraste de fase (a esquerda) e microscopia confocal de fluorescência (direita). De cima para baixo os corantes: **BI**, **BT**, **BTDBI**, **BTDBT** e **DAPI**.

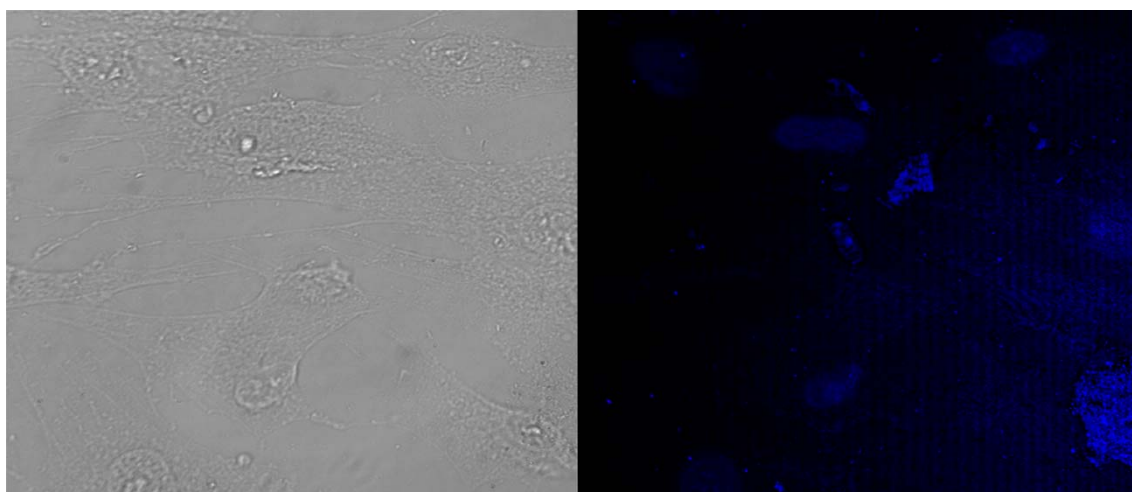


**Figura 31 (continuação).** Live-Cell Imaging de células tronco humanas aderidas utilizando os quatro fluoróforos e o DAPI. Contraste de fase (a esquerda) e microscopia confocal de fluorescência (direita). De cima para baixo os corantes: **BI**, **BT**, **BTDBI**, **BTDBT** e **DAPI**.



Como se pode perceber, todos os fluoróforos foram capazes de transpor a membrana celular e seletivamente marcar o dsDNA. Nenhum dos compostos foi adsorvido em outras estruturas celulares, indicando uma marcação de fundo mínima. **BT** e **BI**, embora tenham apresentado bons resultados como marcadores, precipitaram no meio celular, devido a sua baixa solubilidade em meio aquoso. Essa característica indica que tais compostos têm baixíssima aplicação como marcadores em sistemas vivos, já que pode haver precipitação no meio celular, ocasionando problemas a célula, como morte celular. Com os fluoróforos desenvolvidos, **BTDBT** e **BTDBI** isso não foi observado, indicando sua aplicabilidade em experimentos dessa natureza. Sua interação com dsDNA é notável. Igualmente, é notório a olho nu que a intensidade luminosa dos marcadores testados é maior do que a do **DAPI**.

Essa alta seletividade, aliada a possibilidade de detecção quantitativa de dsDNA, tornam o **BTDBT** e o **BTDBI** uma ótima possibilidade a ser utilizada na detecção de DNA, em especial o primeiro. Essa alta seletividade pode ser comparada com outras estruturas fluorescentes. Por exemplo, com o marcador comercialmente disponível **DAPI**. Ele foi testado na mesma monocamada de células-tronco humanas e revelou que sua seletividade para dsDNA é bem menor, marcando outras estruturas celulares, como a membrana celular, revelando sinais de fundo, mesmo em concentrações muito baixas (Figura 32).

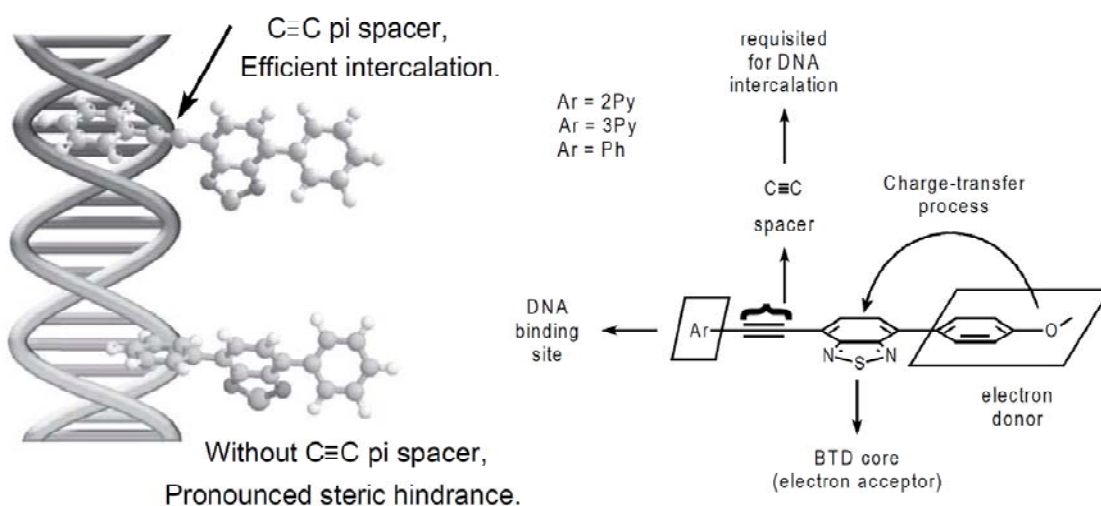


**Figura 32.** Marcação não seletiva do DAPI, um dos fluoróforos mais utilizados para marcação de dsDNA. Veja a marcação de fundo, devida a baixa seletividade.

Portanto, em especial o fluoróforo **BTDBT**, mostra características muito importantes para estudos celulares:

- 1) Sua capacidade de detecção quantitativa, no limite dos melhores marcadores comerciais;
- 2) Sua elevada seletividade para dsDNA, comprovada pelo experimentos de *live-cell imaging*, em que a sonda foi capaz de marcar seletivamente o núcleo celular, sem outras marcações de fundo. Quando comparado ao **DAPI**, o fluoróforo comercial, sua seletividade e eficiência são notáveis;
- 3) Sua alta estabilidade em diferentes valores de pH e estabilidade eletroquímica, demonstrado que a molécula, embora seja influenciada pelo meio, possui uma estrutura hiperconjugada que a torna muito atraente devido a sua altíssima estabilidade química.

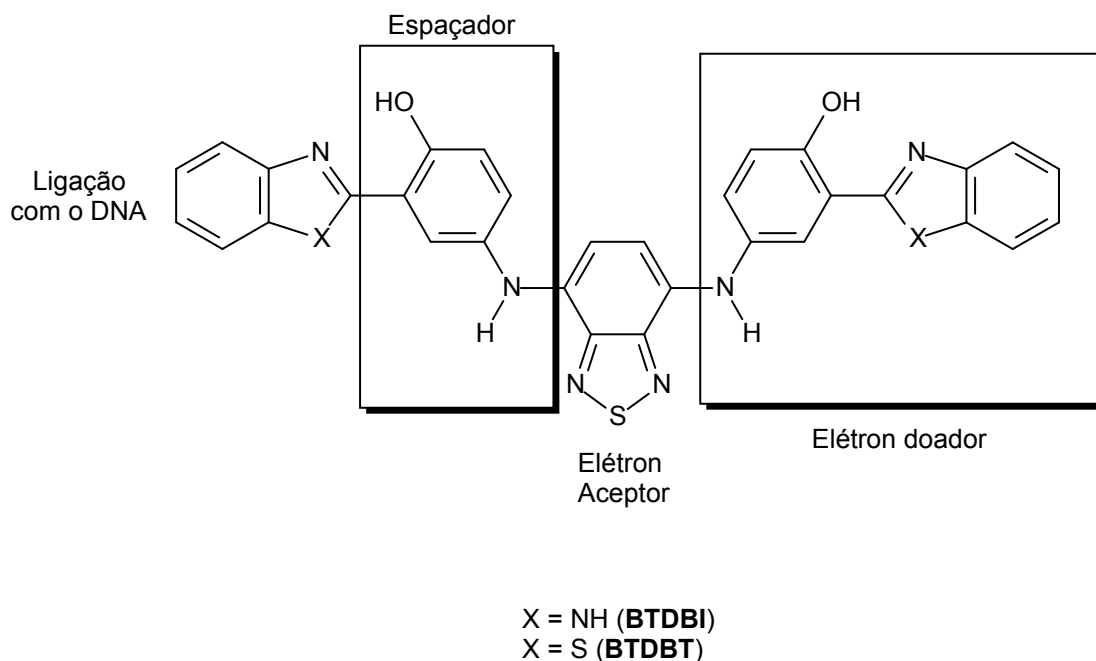
Um modelo de interação entre o DNA e o marcador fluorescente foi proposto por Neto e colaboradores. (Figura 33)<sup>74</sup> e consiste na existência de um espaçador C≡C e um grupo como PhOMe que seria o grupo elétron doador para a ocorrência de um processo de ICT com o núcleo **BTD**.



**Figura 33.** Modelo de intercalação de BTDBT com o DNA (Adaptada de referência 72).

O presente trabalho mostra que a utilização do núcleo BTD acoplado com sistemas benzalólicos fornecem a geometria adequada para a

intercalação, sem a necessidade de um espaçador  $C\equiv C$ . Portanto, uma boa proposta de intercalação para as estruturas testadas seria como representada na Figura 34.

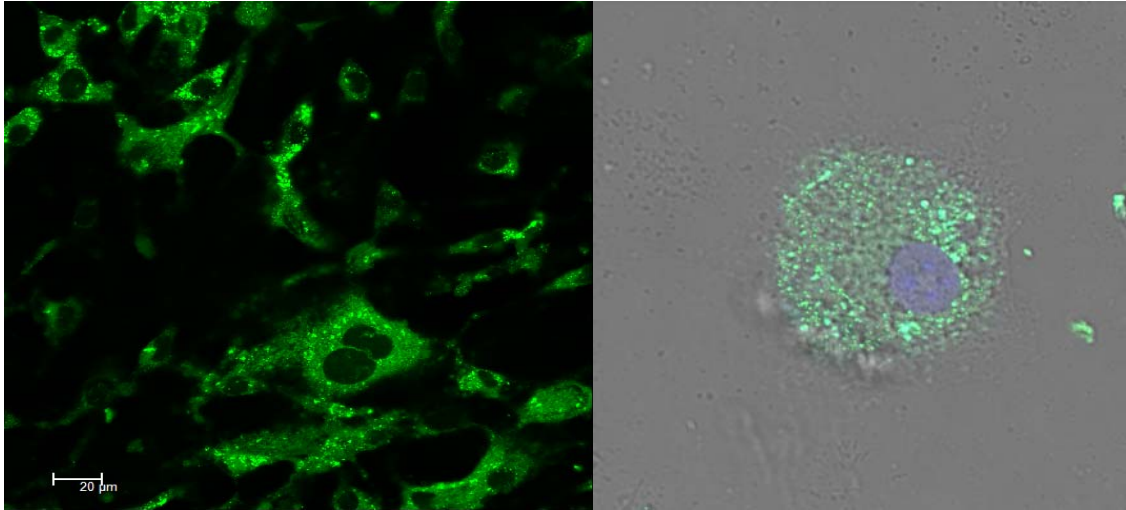


**Figura 34.** Modelo de intercalação com o DNA.

Na presente proposta, apesar da intercalação, continua havendo a possibilidade de ocorrência de processos ESIPT, indicando que a arquitetura molecular é mais do que adequada para a intercalação e para se manter a estabilidade da estrutura no estado excitado. Igualmente, a idéia de um doador e de um aceptor de carga para um processo ICT também é mantida.

Outras estruturas têm sido trabalhadas em nosso grupo, de forma a funcionarem como marcadores para outras estruturas celulares. Por exemplo, temos sintetizado estruturas que, seletivamente, funcionam como marcadores altamente seletivos de mitocôndrias e que podem ser usados simultaneamente com **BTDBT** e **BTDBI** em estudos de microscopia confocal de fluorescência<sup>iii</sup> uma vez que sua fluorescência se dá em outra região espectral (verde). A seletividade dessas estruturas é notável, como evidencia Figura 35.

<sup>iii</sup> Estrutura do marcador seletivo (desenvolvido no grupo do Prof. Dr. Brenno A. D. Neto) não apresentada por se encontrar em processo de negociações para patenteamento.



**Figura 35.** Marcação seletiva de mitocôndrias utilizando marcadores fluorescentes. À esquerda, experimento apenas com o marcador desenvolvido no grupo; à direita, utilização simultânea do corante desenvolvido junto com o marcador comercial **DAPI**. Note que o **DAPI** marca o dsDNA nuclear enquanto o outro marca o dsDNA mitocondrial.

---

# 3. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Neste trabalho foram sintetizados novos sistemas fluorescentes com conjugações  $\pi$  estendidas e aplicados em estudos celulares, como marcadores seletivos de dsDNA.

Mostramos que o fluoróforo sintetizado **BTDBT**, apresenta características muito interessantes para marcação de DNA:

1. Apresenta um alto deslocamento de Stokes, decorrente do processo de transferência intramolecular de cargas.
2. Possui quatro centros para realizar o processo ESIPT.
3. Suas propriedades fotofísicas indicam um eficiente processo de estabilização, decorrente da extensão de conjugação  $\pi$ .
4. Sua interação com o DNA é muito eficiente e um efeito hipercrômico muito acentuado é observado, indicando a alta afinidade entre fluoróforo e o DNA. Além disso, análises quantitativas são possíveis, em limites de detecção semelhantes aos encontrados para os melhores marcadores comerciais disponibilizados no mercado.
5. A detecção de proteínas exigiu quantidades consideravelmente maiores da bioestrutura, indicando que a utilização deste fluoróforo para a detecção de proteínas não é muito eficiente.
6. Nenhum efeito batocrômico ou hipsocrômico é observado com a variação do pH. Isso é decorrência da extensão das conjugações  $\pi$ , que estabiliza sobremaneira as cargas nesse composto. O máximo de intensidade de emissão é observado em pH próximo ao fisiológico.
7. Possui alta estabilidade eletroquímica, mesmo quando ligado ao DNA.
8. Apresenta altíssima seletividade para dsDNA, comprovada pelos experimentos de *live-cell imaging*, em que a sonda foi capaz de marcar seletivamente o núcleo celular, sem outras marcações de fundo. Quando comparado ao **DAPI**, o fluoróforo comercial, sua seletividade e eficiência são notáveis.

Para **BTDBI**, conclusões semelhantes podem ser inferidas, a exceção da possibilidade de detecção quantitativa de DNA, dada a alta hidrofiliabilidade do

fluoróforo. Apenas detecções qualitativas são possíveis, mas com a mesma altíssima seletividade da **BTDBT**.

Algumas perspectivas para este trabalho incluem a síntese e utilização de novos sistemas, utilizando o núcleo 2,1,3-benzotiadiazola, como marcadores para outras estruturas celulares. De fato, como observado na figura 35, a alta seletividade das estruturas desenvolvidas no grupo é notável.

---

# 4. PARTE

# EXPERIMENTAL



#### 4.1. Equipamentos e solventes

- ✓ **RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ :** Espectros de RMN foram registrados em um Espectrômetro Varian Mercury Plus de 7,05 T (300 MHz para hidrogênio e 76,4 MHz para carbono) em temperatura ambiente, usando uma sonda de diâmetro interno de 5mm. Clorofórmio deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ) foi usado como solvente e TMS (tetrametilsilano) como referência.
- ✓ **Infravermelho e Ponto de Fusão:** Os espectros de infravermelho foram registrados em um espectrômetro B-102 Bomem e os pontos de ebulição foram medidos em um aparelho PL 12000-DSC a uma taxa de aquecimento de  $5^\circ\text{C}/\text{min}$  ou em um aparelho de ponto de fusão Eletrotermal IA9000.
- ✓ **Solventes:** Todos os solventes utilizados nos trabalhos realizados foram comprados da Aldrich ou da Acros.
- ✓ **Fluorescência:** Os espectros de fluorescência foram obtidos utilizando um espectrofluorímetro Jasco FP-777 equipado com um suporte de célula termicamente controlada ( $25^\circ\text{C}$ ) e uma cubeta de quartzo de 1 cm de espessura. Os espectros de UV foram obtidos em um espectrofotômetro Cary 50 UV-Vis da Varian, utilizando uma cubeta de quartzo de 1 cm de espessura.

#### 4.2. Síntese da BTDBT e BTDBI

Em um tubo Schlenk foram misturados 294 mg (1,0 mmol) de 4,7 dibromo-2,1,3-benzotiadiazola, 115 mg (0,05 mmol) de  $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ , 2,7 mg (0,05 mmol) de DPEPhos e 3 mL de  $\text{Et}_3\text{N}$  em tolueno seco (5 mL). BI ou BT (1,2 mmol) foi adicionado à mistura, e agitada a  $110^\circ\text{C}$  por 72h. A mistura reacional é resfriada, filtrada em celite e lavada com acetato de etila. O sólido resultante, marrom-avermelhado, é purificado em coluna cromatográfica com uma solução

eluente de acetato de etila/hexano (95:5). O produto resultante, **BTDBT** e **BTDBI**, são sólidos amarelos, com 41% e 38% de rendimento, respectivamente.

## **BTDBT**

**Ponto de Fusão:** 165°-166°C

**RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz, δ em ppm):** 7.95 (dd, 2H, J = 8.7 and J = 0.9 Hz), 7.83 (dd, 2H, J = 6.9 and J = 0.9 Hz), 7.76-7.66 (m, 8H), 7.48 (d, 2H, J = 8.6 Hz), 7.45 (d, 2H, J = 8.1).

**RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz, δ em ppm):** 154.6, 154.5, 154.1, 153.4, 153.3, 152.8, 152.6, 132.3, 131.9, 130.8, 129.9, 125.5, 122.6, 120.8, 114.4, 113.9.

**FTIR (KBr, cm<sup>-1</sup>):** 3080, 3048, 1538, 1510, 1478.

**Análise ementar calculada para C<sub>32</sub>H<sub>20</sub>N<sub>6</sub>O<sub>2</sub>S<sub>3</sub>:** C, 62.32; H, 3.27; N, 13.63; Encontrado: C, 62.40; H, 3.35; N, 13.77.

## **BTDBI**

**Ponto de Fusão:** 191°-192°C

**RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz, δ em ppm):** 7.97 (dd, 2H, J = 8.8 and J = 1.0 Hz), 7.86 (dd, 2H, J = 7.2 and J = 0.9 Hz), 7.74-7.70 (m, 8H), 7.49 (d, 2H, J = 8.7 Hz), 7.48 (d, 2H, J = 8.6).

**RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz, δ em ppm):** 154.5, 153.3, 153.1, 152.8, 141.7, 139.6, 136.4, 132.3, 132.1, 131.9, 130.8, 129.9, 129.1, 128.3, 122.0, 120.8.

**FTIR (KBr, cm<sup>-1</sup>):** 3079, 3048, 1588, 1499, 1478.

**Análise elemental calculada para C<sub>32</sub>H<sub>22</sub>N<sub>8</sub>O<sub>2</sub>S:** C, 65.97; H, 3.81; N, 19.23;. Encontrado: C, 66.08; H, 3.89; N, 19.34.

## **4.3. Amostras Celulares**

As células-tronco foram obtidas a partir de tecido radicular dental. Os fragmentos de tecido foram submetidos à digestão enzimática de colagenase e

dispase (3mg/mL de collagenase, 4 mg/mL de dispase) em solução de meio de cultura D-MEM (Gibco) durante 1 hora a 37 °C. A suspensão de células obtidas foram semeadas em seis placas de cultura e mantidas em DMEM suplementado com soro fetal bovino em 10%, penicilina (100µg/mL) e estreptomicina (100µg/mL). A cultura de células foi mantida a 37°C, em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, com 70% de umidade, e as células foram obtidas nas culturas em aproximadamente cinco dias e utilizados em todos os ensaios.

#### **4.4. Experimentos de *live-cell imaging*.**

As células foram lavadas três vezes em PBS (tampão fosfato, pH 7,4) por 5 minutos cada, à temperatura ambiente, para retirar o meio de cultura, e em seguida fixado com 4% de PFA (paraformaldeído) por 20 minutos. As amostras foram lavadas três vezes em PBS, 5 minutos cada, à temperatura ambiente e permeabilizadas com tampão T (0,2% Triton X-100 em PBS). O tampão T foi removido e as amostras foram incubadas separadamente com os corantes DAPI, BI, BT, BTDBI e BTDBT por 15 minutos à temperatura ambiente, protegidos da luz. As amostras foram lavadas três vezes em PBS por cinco minutos cada, à temperatura ambiente, as lamínulas foram retiradas das seis placas e montados em lâminas de vidro com solução de lamela (glicerina 6 mg, 2,4 mg PVA – PoliVinil Álcool em 0,2 M Tris HCl, pH 8,0) sem anti-desbotamento. 4'-6-diamidino-2-fenilindol (**DAPI**), um corante usado comercialmente como marcador de DNA, foi utilizado como controle positivo em 500µg/ml. PBS sozinho foi utilizado como controle negativo. As imagens das células foram adquiridas em um microscópio de fluorescência Zeiss Axiophot equipados com Zeiss AxioCam MRc empregando o software Axivision LE 4.7.1 fornecido pela Carl Zeiss Imaging Solutions.

---

# 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 
- <sup>1</sup> Abrams, B.L.; Holloway, P.H. *Chem. Rev.* **2004**, 104, 5783-5801.
- <sup>2</sup> Valeur, B. *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*. Weinheim: Wiley-VCH, **2002**.
- <sup>3</sup> Turro, N.J. *Modern Molecular Photochemistry*. University Science Books, **1991**.
- <sup>4</sup> Ingle, J.D. *Spectrochemical analysis*. New Jersey: Prentice Hall, **1998**.
- <sup>5</sup> Lacowicz, J.R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. New York: Kluwer Academic, **1999**.
- <sup>6</sup> Skoog, D. A. *Princípios de Análise Instrumental*. Porto Alegre: Bookman, **2002**.
- <sup>7</sup> Barrow, G.M. *Introduction to Molecular Spectroscopy*. New York: McGraw-Hill, **1962**.
- <sup>8</sup> Gonçalves, P. *Síntese e caracterização de novas iminas fluorescentes e suas aplicações como sensores ópticos*. (Programa de Pós-Graduação em Química). Mestrado – UFRGS. **2008**. 102 p.
- <sup>9</sup> Harris, D. C. *Exploring Chemical Analysis*. New York: W.H. Freeman and Company, **2009**.
- <sup>10</sup> Da Silva, L.E. *Heterociclos aromáticos nitrogenados – Síntese e potencial quimioterápico*. (Programa de Pós-Graduação em Química). Doutorado – UFSC. **2006**. 183 p.
- <sup>11</sup> Brousmiche, D.W.; Wan, P. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. **2000**, 130, 113-118.
- <sup>12</sup> Park; Oh-Hoon Kwon; Young-Shin Lee; Du-Jeon Jang; Soo Young Park. *J. Phys. Chem.* **2007**, 111, 9649-9653.
- <sup>13</sup> Doroshenko, A.O.; Posokhov, E.A.; Verezubova, A.A.; Ptyagina, L.M. *J.Phys.Org.Chem.* **2000**, 13, 253.
- <sup>14</sup> Dennison, S. M.; Guharay, J.; Sengupta, P. K. *Spectrochim. Acta Part A*. **1999**, 55, 1127-1132.
- <sup>15</sup> Holler, M.G.; Campo, L.F.; Brandelli, A.; Stefani, V.J. *Photochem. Photobiol. A: Chem.* **2002**, 149, 217-225.
- <sup>16</sup> Nolan, E. M.; Lippard, S. J. *Acc. Chem. Res.* **2009**, 42, 193-203.
- <sup>17</sup> Omer, K.M.; Ku, S.Y.; Wong, K.T.; Bard, A.J. *J.Am.Chem.Soc.* **2009**, 131, 10733-10741.
- <sup>18</sup> Sakurai, H.; Ritonga, M.T.S.; Shibatani, H.; Hirao, T. *J.Org.Chem.* **2005**, 70, 2754-2762.
- <sup>19</sup> Neto, B.A.D. *Síntese de novas moléculas fotoluminescentes com conjugações  $\pi$ -estendidas com potencial para aplicação em sistemas OLEDs*. (Programa de Pós-Graduação em Química). Doutorado – UFRGS. **2006**. 166p.
- <sup>20</sup> Neto, B.A.D.; Ebeling, G.; Gonçalves, R.S.; Costa, V.E.U.; Quina, F.H.; Dupont, J. . *Tetrahedron*, **2005**, 61, 10975-10982.
- <sup>21</sup> Arnaut, L.G.; Formosinho, S.J. *J.Photochem. Photobiol. A: Chem.* **1993**, 75, 1-20.
- <sup>22</sup> Elguero, J.; Katritzky, A.R.; Denisko, O.V. *Adv. Heteroc. Chem.* **2000**, 76, 1-84.
- <sup>23</sup> Jin, R.F.; Zhang, J.P. *Theor. Chem. Acc.* **2009**, 124, 331-338.
- <sup>24</sup> McMurry, J. *Química Orgânica*. São Paulo: Pioneira Thomson Learning, **2006**.
- <sup>25</sup> Forster, T. *Z.Elektrochem.* **1950**, 54, 42-46.
- <sup>26</sup> Wyatt, P.A.H., Zochowski, Z.M. *Zeitschrift fur Physikalische Chemie-Frankfurt*. **1976**, 101, 143-150.

- 
- <sup>27</sup> Engeland, T.A.; Bultmann, T.; Ernstring, N.P.; Rodriguez, M.A.; Thiel, W. *Chem Phys.* **1992**, *163*, 43-53.
- <sup>28</sup> Krasovtskii, B.M.; Bolotin, B.M. *Organic Luminescent Materials*. Weinhein: VCH, 1988.
- <sup>29</sup> Le Gourriérec, D.; Kharlanov, V.A.; Brown, R.G.; Rettig, W. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **2000**, *130*, 101-111.
- <sup>30</sup> Forés, M.; Duran, M.; Solá, M.; Orozco, M.; Luque, F.J. *J. Phys.Chem. A.* **1999**, *103*, 4413-4420.
- <sup>31</sup> Purkayastha, P.; Chattopadhyay, N. *Int. J. Mol. Sci.* **2003**, *4*, 335-361.
- <sup>32</sup> Dogra, S.K.; Balamurali, M.M. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **2002**, *154*, 81-92.
- <sup>33</sup> Le Gourriérec, D.; Kharlanov, V.A.; Brown, R.G.; Rettig, W. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **2000**, *130*, 101-111.
- <sup>34</sup> Gauden, M.; Pezzella, A.; Panzella, L.; Neves-Petersen, M. T.; Skovsen, E.; Petersen, S. B.; Mullen, K. M.; Napolitano, A.; d'Ischia, M.; Sundstrom, V. J. *Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 17038-17043.
- <sup>35</sup> Wehry, E.L. *Physical Methods of Chemistry*. New York: Wiley, **1993**.
- <sup>36</sup> Nolan, E. M.; Lippard, S. J. *Acc. Chem. Res.* **2009**, *42*, 193-203.
- <sup>37</sup> Sinkeldam, R.W.; Greco, N.J.; Tor, Y. *Chem Ver.* **2010**, ASAP, DOI: 10.1021/cr900301e.
- <sup>38</sup> Atkins, P.; de Paula, J. *Physical Chemistry*. Oxford: Oxford University Press, **2006**.
- <sup>39</sup> Zhu, Q.Z.; Yang, H.H.; Li, D.H.; Xu, J.G. *Analytica Chimica Acta.* **1999**, *394*, 177-184.
- <sup>40</sup> Hens, A.G.; Ayala, H.R.M.; Romero, J.M.F. *Analytica Chimica Acta.* **2009**, *632*, 109-114.
- <sup>41</sup> Zimmer, M. *Green Fluorescent Protein Page*. Disponível em: <http://www.conncoll.edu/ccacad/zimmer/GFP-ww/GFP-1.htm>, acessado em 04 de fevereiro de 2010.
- <sup>42</sup> de Farias, F.M.C. *Rev. Virtual Quim.* **2009**, *1*, 2-8.
- <sup>43</sup> Chalfie, M.; Tu, Y.; Euskirchen, G.; Ward, W. W.; Prasher, D. C. *Science* **1994**, *263*, 802-805.
- <sup>44</sup> Bohme, I.; Morl, K.; Bamming, D.; Meyer, C.; Beck-Sickinger, A.G. *Peptides.* **2007**, *28*, 226-234.
- <sup>45</sup> Zhang, K.Y.; Lo, K.K.W. *Inorganic Chemistry*, **2009**, *13*, 6011-6025.
- <sup>46</sup> Birney, E.; Stamatoyannopoulos, J.A.; Dutta, A. *Nature.* **2005**, *447*, 799-816.
- <sup>47</sup> Joyce, .C.M.; Steitz, T.A. *J Bacteriol*, **1995**, *177*, 6321-6329.
- <sup>48</sup> Albà, M. *Genome Biol.* **2002**, *1*, 2.
- <sup>49</sup> Wu, F.Y.; Xie, F.Y.; Wu, Y.M. *J Fluoresc.* **2008**, *18*, 175-181.
- <sup>50</sup> Liu, Y.; Danielsson, B. *Analytica Chimica Acta.* **2007**, *587*, 47-51.
- <sup>51</sup> Michel, M. *A History of Molecular Biology*. Cambridge: Harvard University Press, **1998**.
- <sup>52</sup> Neto, B.A.D.; Lapis, A.A.M. *Molecules.* **2009**, *14*, 1725-1746.
- <sup>53</sup> Mukherjee, A.; Lavery, R.; Bagchi, B.; Hynes, J.T. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 9747-9755.
- <sup>54</sup> Sibirtsev, V. S. *Biochemistry (Moscow).* **2007**, *72*, 887-900.
- <sup>55</sup> Greguric, I.; AldrichWright, J.R.; Collins, J.G. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 3621-3622.
- <sup>56</sup> Neto, B.A.D.; Lapis, A.A.M.; Mancilha, F.S.; Batista, E.L.; Netz, P.A.; Rominger, F.; Basso, L.A.; Diogenes, S.S.; Dupont, J. *Mol. BioSyst.* **2010**, DOI: 10.039/b919155k.

- 
- <sup>57</sup> Rao, S.N.; Kollman, P.A. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1987**, *84*, 5735-5739.
- <sup>58</sup> Neto, B.A.D.; Lapis, A.A.M.; Mancilha, F.S.; Vasconcelos, I.B.; Thum, C.; Basso, L.A.; Santos, D.S.; Dupont, J. *Org. Lett.* **2007**, *20*, 4001-4004.
- <sup>59</sup> Kodama, S.; Asano, S.; Moriguchi, T.; Sawai, H.; Shinozuka, K. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.* **2006**, *16*, 2685-2688.
- <sup>60</sup> Invitrogen, DAPI Nucleic Acid Stain. Acessado em 4 de fevereiro de 2010.
- <sup>61</sup> <http://www.encorbio.com/Album/pages/ChkNFH-38F3-DAPI-Shsy5y.htm>, acessado em 4 de fevereiro de 2010.
- <sup>62</sup> <http://www.burnham.org/labs/wolf/>, acessado em 4 de fevereiro de 2010.
- <sup>63</sup> Campo, L. F.; Correa, D. S.; de Araujo, M. A.; Stefani, V. *Macromol. Rapid Commun.* **2000**, *21*, 832-836.
- <sup>64</sup> Shekhar, S.; Ryber, P.; Hartwig, J.F.; Mathew, J.S.; Blackmond, D.G.; Strieter, E.R.; Buchwald, S.L. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 3584-3591.
- <sup>65</sup> Dennison, S. M.; Guharay, J.; Sengupta, P. K. *Spectrochim. Acta Part A* **1999**, *55*, 1127-1132.
- <sup>66</sup> Russell, D.W.; Sambrook, J. *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor, **2005**.
- <sup>67</sup> Fujimoto, J.; Reis, E.A.O.; Petri, D.F.S.; Filho, S.P.C. *Quim. Nova.* **2002**, *25*, 757-761.
- <sup>68</sup> Cardoso, M. B.; Samios, D.; da Silveira, N. P.; Rodembusch, F. S.; Stefani, V. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2007**, *6*, 99-102.
- <sup>69</sup> Ingle, J.D. *Spectrochemical analysis*. New Jersey: Prentice Hall, **1998**.
- <sup>70</sup> Neto, B.A.D.; Lapis, A.A.M.; Mancilha, F.S.; Vasconcelos, I.B.; Thum, C.; Basso, L.A.; Santos, D.S.; Dupont, J. *Org Lett.* **2007**, *9*, 4001-4004.
- <sup>71</sup> Lima, K.M.G.; Raimunod, I.V.; Silva, A.M.S.; Pimentel, M.F. *Quim. Nova.* **2009**, *32*, 1635-1641
- <sup>72</sup> M. Gauden, A. Pezzella, L. Panzella, M. T. Neves-Petersen, E. Skovsen, S. B. Petersen, K. M. Mullen, A. Napolitano, M. d'Ischia, V. Sundstrom, J. *Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 17038-17043.
- <sup>73</sup> C. M. Czekster, B. A. D. Neto, A. A. M. Lapis, J. Dupont, D. S. Santos, L. A. Basso, *Arch. Biochem. Biophys.* **2009**, *486*, 19-26.
- <sup>74</sup> Neto, B.A.D.; Lapis, A.A.M.; *Molecules.* **2009**, *14*, 1725-1746.