



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FARMACOLOGIA

REBECA LIRIO DE OLIVEIRA

**Desenvolvimento de novos sensores de pH fluorescentes
derivados do borodipirrometeno (BODIPY) visando
aplicação em biologia celular**

VITÓRIA, ES

2021

Rebeca Lirio de Oliveira

Desenvolvimento de novos sensores de pH fluorescentes derivados do borodipirrometeno (BODIPY) visando aplicação em biologia celular

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Farmacologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Lucas Cunha Dias de Rezende

VITÓRIA, ES

2021

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

O48d Oliveira, Rebeca Lirio de, 1996-
Desenvolvimento de novos sensores de pH fluorescentes derivados do borodipirrometeno (BODIPY) visando aplicação em biologia celular / Rebeca Lirio de Oliveira. - 2021.
87 f. : il.

Orientador: Lucas Cunha Dias de Rezende.
Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Farmacologia) - Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Fluorescência. 2. Espectroscopia de emissão. I. Rezende, Lucas Cunha Dias de. II. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. III. Título.

CDU: 61

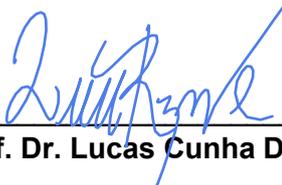
Rebeca Lirio de Oliveira

“Desenvolvimento de novos sensores de pH fluorescentes derivados do borodipirrometeno (BODIPY) visando aplicação em biologia celular”

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Farmacologia da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Farmacologia.

Aprovado(a) em 15 de dezembro de 2021.

BANCA EXAMINADORA:



Prof. Dr. Lucas Cunha Dias de Rezende – Orientador

Prof. Dr. André Romero da Silva – Examinador Interno



Prof. Dr. Hernandes Faustino de Carvalho – Examinador Externo

**Vitória/ES
2021**



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

PROTOCOLO DE ASSINATURA



O documento acima foi assinado digitalmente com senha eletrônica através do Protocolo Web, conforme Portaria UFES nº 1.269 de 30/08/2018, por
LUCAS CUNHA DIAS DE REZENDE - SIAPE 2424952
Departamento de Ciências Naturais - DCN/CEUNES
Em 15/12/2021 às 17:19

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link:
<https://api.lepisma.ufes.br/arquivos-assinados/333364?tipoArquivo=O>



Emitido em 16/12/2021

**FOLHA DE APROVAÇÃO-TCC Nº Defesa - Rebeca2 - 2021/2021 - UFES - UNIVERSIDADE FEDERAL DO
ESPÍRITO SANTO (ES - FEDERAL)**

(Nº do Protocolo: NÃO PROTOCOLADO)

(Assinado digitalmente em 16/12/2021 09:52)

ANDRE ROMERO DA SILVA

PROFESSOR DO ENSINO BASICO TECNICO E TECNOLOGICO

REI-PRPPG (11.02.37.15)

Matrícula: 1653769

Para verificar a autenticidade deste documento entre em <https://sipac.ifes.edu.br/documentos/> informando seu número: **Defesa - Rebeca2 - 2021**, ano: **2021**, tipo: **FOLHA DE APROVAÇÃO-TCC**, data de emissão: **16/12/2021** e o código de verificação: **4e264068d9**



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

PROTOCOLO DE ASSINATURA



O documento acima foi assinado digitalmente com senha eletrônica através do Protocolo Web, conforme Portaria UFES nº 1.269 de 30/08/2018, por
LUCAS CUNHA DIAS DE REZENDE - SIAPE 2424952
Departamento de Ciências Naturais - DCN/CEUNES
Em 17/12/2021 às 17:37

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link:
<https://api.lepisma.ufes.br/arquivos-assinados/335395?tipoArquivo=O>

Eu dedico este Trabalho de Conclusão de Curso aos futuros estudantes que hão de pesquisar em áreas semelhantes às abordadas nessa dissertação. Assim, da mesma forma em que outros trabalhos foram de imprescindível importância para a conclusão desta dissertação, que essa igualmente seja útil para os trabalhos de outrem. Dedico também à minha família e amigos, que me apoiaram em todas as etapas dessa dissertação e se disponibilizaram para que este momento conseguisse acontecer.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente queria agradecer a Deus, a fonte de toda a sabedoria e inteligência, certamente se não fosse Sua presença em minha vida me sustentando e motivando nas madrugadas difíceis de escrita e leitura esse trabalho teria sido interrompido no meio do processo. Obrigada Senhor por sua bondade e fidelidade, não a mereço.

Segundo, queria agradecer de maneira muito especial ao meu orientador, que sempre foi tão paciente, atencioso e compreensivo, não saberia expressar em palavras. Obrigada Lucas, por todo ensino, por toda dedicação e por toda motivação. Você tornou possível terminar essa jornada. Não conseguiria agradecer o suficiente o orientador maravilhoso que você é.

Agradeço também à minha preciosa família, sem ela também não teria conseguido. Toda a compreensão, amor, motivação e serviço possibilitou meus estudos, a pesquisa e, por fim, que esse trabalho fosse realizado. Obrigada mãe! Obrigada Gabi! Obrigada Bia! Obrigada pai! Amo vocês demais.

Agradeço também ao Prof. Jairo Pinto de Oliveira e ao Prof. Marco Cesar Cunegundes Guimarães por terem aberto a porta do laboratório para mim de maneira tão simpática e atenciosa, vocês são demais em excelência. Um agradecimento também a todos os colegas do Laboratório de Nanomateriais Funcionais e do LUCCAR pelas conversas e pelo suporte. Um agradecimento especial ao técnico Flávio que sempre foi tão simpático, sorridente e solícito em me localizar no laboratório. Obrigada pela ajuda e suporte Flávio, você é especial e foi essencial. Devo também um agradecimento em especial a Thaís, que foi incrível. Obrigada Thaís pela ajuda e pelas conversas foi muito bom ter te conhecido.

Agradeço também à Prof.^a Renata Dalmaschio Daltoé pela colaboração nos permitindo fazer os testes de citotoxicidade. E um super agradecimento a aluna Mileni que tão gentilmente não somente me ensinou a rotina com células e o ensaio MTT mas cooperou comigo em todo processo, sendo um suporte não somente técnico, mas amigo. Obrigada Mileni, você é incrível!

Agradeço também ao Prof. Hernandes Faustino de Carvalho da UNICAMP pela colaboração tornando possível os ensaios de microscopia.

Agradeço também ao Prof. André Romero da Silva que se disponibilizou na leitura do trabalho e agregou considerações importantes na qualificação, além de ter ajudado nos cálculos teóricos.

Agradeço também de maneira especial à Damiana secretária do programa, que sempre de maneira simpática, solícita e eficiente estava disposta a ajudar e tirar as dúvidas burocráticas. Obrigada Damiana pela gentileza de sempre, por desempenhar o seu serviço com excelência.

Por fim, agradeço a todos aqueles que de alguma forma, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho. Agradeço a todos os professores por todo o conhecimento compartilhado. Agradeço aos meus colegas de sala pelo companheirismo. Agradeço aos trabalhadores que mantêm o funcionamento da UFES. Agradeço à fundação de fomento à pesquisa CAPES pelo auxílio financeiro concedido.

RESUMO

Sensores de pH fluorescentes são uma ferramenta importante para monitorar diversos processos em meio celular. No entanto o desenvolvimento de novos sensores ainda se faz necessário na busca de estruturas moleculares com propriedades fotofísicas cada vez mais vantajosas. Visto que fluoróforos derivados do borodipirrometeno (BODIPY) apresentam características vantajosas, tanto fotofísicas como químicas, eles têm sido aplicados para esse fim. Entretanto, a maior parte dos sensores de pH derivados do BODIPY são baseados em estratégias sintéticas provenientes de pirróis metilados, encarecendo o processo de obtenção desses sensores. Portanto, neste trabalho foi realizada a caracterização fotofísica de novos sensores de pH fluorescentes de derivados BODIPYs não metilados funcionalizados na posição 3 por três grupos aminos diferentes (benzilamino, piridin-3-il e 4-aminofenil). Para isso foram realizadas titulações espectrométricas e fluorimétricas e através de ajustes sigmoidais da curva foi efetuado o cálculo do pKa. Dentre os BODIPYs caracterizados quatro apresentaram uma boa sensibilidade ao pH, sendo também investigada a citotoxicidade desses fluoróforos, visando aplicação em biologia celular. Desses compostos que se mostraram sensores de pH dois são derivados 3-benzilamino BODIPYs (compostos **2** e **5**) e como apresentaram alta viabilidade celular em ensaios de 72 horas, um comprimento de absorção e emissão relativamente longos e uma faixa aplicável de pH 3,6 a 5,7, se espera uma possível aplicação como sensores lisossomais. Esses sensores também apresentaram uma variação ratiométrica do espectro de fluorescência, o que é uma vantagem para aplicação celular. Um estudo das mudanças produzidas foi realizado e se inferiu uma sensibilidade ao pH devido a existência de dois estados de transferência de carga intramolecular fotoinduzida (ICT) distintos e radiativos, uma para a molécula protonada e outro para ela desprotonada. Os outros dois compostos sensíveis ao pH foram os 3-(4-aminofenil) BODIPYs (compostos **14** e **15**) que apresentaram uma aplicação em uma faixa mais ácida, de pH de 1,5 a 4,5. Através das mudanças espectrais e dos cálculos teóricos se presumiu que a supressão de fluorescência foi devida a reações de transferência de elétrons fotoinduzidas (PET). Ensaios de microscopia estão em andamento para compostos que apresentaram sensibilidade ao pH, sendo parte da continuação desse projeto.

Palavras-chave: Fluorescência, BODIPY, sensores, espectroscopia, biologia celular.

ABSTRACT

Fluorescent pH sensors are an important tool to monitor several processes in living cells. However, the development of new sensors with optimized photophysical properties is still necessary. In view of BODIPY's favorable photophysical features and their chemical versatility, these probes are widely used for the development of these sensors. However, many of these developed sensors are based on less affordable methylated pyrrolic starting materials. Therefore, in this work we propose to characterize the spectroscopic properties of three groups of non-methylated BODIPYs functionalized in position 3 as pH sensors – 3-benzylamino, 3-(pyridin-3-yl) and 3 (4-aminophenyl) BODIPYs – and explore its application in cellular biology. For this purpose, fluorimetric and spectroscopic titrations were performed, and, through sigmoidal curve adjustments, the pKa was determined. To explore the application in cellular biology, a MTT assay was performed for compounds that showed sensitivity to pH. Two of the investigated compounds, those with benzylamino in position 3 as the recognition site (compounds **2** and **5**), showed red-shifted emission with a ratiometric change, low cytotoxicity, and an applicable pH range of 3.6 to 5.7, suggesting a possible useful application as lysosomal sensors. The sensing mechanism was investigated and possible intramolecular charge transfer state (ICT) was inferred for these compounds. Two other compounds showed fluorescence change with the pH, the 3-(4-aminophenyl) BODIPYs (compounds **14** and **15**), which presented an OFF/ON application in a more acidic range, from pH 1.5 to 4.5. Through spectral properties and theoretical calculations, it was assumed that the fluorescence quenching was due to PET reactions. Microscopy analysis are in progress for compounds that exhibit pH sensitivity and are part of the continuation of this project.

Keywords: Fluorescence, BODIPY, sensors, spectroscopy, cell labeling.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 – Diagrama de transições de energia. a) Absorção da radiação; b) Relaxações não-radiativas e c) Fluorescência.

Figura 02 – Tipos de reconhecimentos sensoriais. a) Sensores *turn-off*; b) Sensores *turn-on* e c) Sensores ratiométricos.

Figura 03 – Diagrama de Jablonski para transferência de elétrons fotoinduzida. Sendo $h\nu_F$ a emissão do fluoróforo.

Figura 04 – Sensores baseados em transferência de elétrons fotoinduzida (PET). a) PET redutiva, em destaque o mais utilizado. b) PET oxidativa

Figura 05 – Representação dos orbitais de fronteira do estado ‘ligado’ dos sensores baseados em PET

Figura 06 – Representação dos orbitais de fronteira de uma PET redutiva.

Figura 07 – Diagrama de Jablonski para estado de transferência de carga intramolecular (ICT).

Figura 08 – Efeito de cátion com sítio de reconhecimento rico em elétrons na absorção de um fluoróforo com estado excitado ICT.

Figura 09 – Estrutura numerada do núcleo BODIPY, em destaque, e derivações do núcleo emitindo em todo espectro visível.

Figura 10 – Principais vias sintéticas nas diferentes posições do núcleo do BODIPY, derivado do pirrol.

Figura 11 – Alguns sensores de pH fluorescentes baseados em BODIPY presente na literatura provenientes de materiais de partida pirrólicos metilato (menos acessíveis).

Figura 12 – Derivados 3-benzilamino BODIPYs. a) Protonação do grupo benzilamino; b) 3-benzilamino BODIPYs estudados neste trabalho

Figura 13 – Derivados piridin-3-il BODIPYs. a) 8-piridinil BODIPY; b) Protonação do grupo 3-(piridin-3-il).

Figura 14 – Método de preparação do 3-piridinil BODIPY estudado. a) Primeira parte da estratégia em etapas; b) Estratégia sequencial “one-pot”.

Figura 15 – Derivados aminofenil BODIPYs. a) 8-aminofenil BODIPY; b) Protonação do grupo 4-aminofenil

Figura 16 – Rota sintética dos derivados 3-(4-aminofenil) BODIPYs

Figura 17 – Absorção do composto **1**. a) Titulação espectrofotométrica entre pH 0,8 e 6,6; b) Espectros de absorção em pH 7,7 e 1,7.

Figura 18 – Emissão do composto **1**. a) Titulação fluorimétrica entre pH 1,4 e 7,6; b) Espectros de emissão em pH 7,7 e 1,7.

Figura 19 – Absorção do composto **2**. a) Titulação espectrofotométrica entre pH 1,3 e 7,2; b) Espectros de absorção em pH 7,2 e 1,2.

Figura 20 – Emissão do composto **2**. a) Titulação fluorimétrica entre pH 1,9 e 6,7; b) Espectros de emissão em pH 7,2 e 1,2.

Figura 21 – Absorção e emissão do composto **2** em dimetilsulfóxido (DMSO). a) Absorção; b) emissão.

Figura 22 – Princípio de reconhecimento de um sensor ratiométrico. Diagrama de Jablonski adaptado.

Figura 23 – Curvas de titulação do composto **2**. a) Curva espectrométrica; b) Curva fluorimétrica.

Figura 24 – Estruturas do composto **1** e **2**.

Figura 25 – Estruturas de ressonância para os 3-benzilaminos BODIPYs. a) Compostos protonados; b) Compostos desprotonados

Figura 26 – Espectros de absorção e emissão em acetonitrila. a) Composto **1**; b) Composto **2**. Tracejados cinza – com adição de ácido trifluoroacético (TFA). Preto – sem adição de TFA.

Figura 27 – Absorção do composto **3**. a) Titulação espectrofotométrica entre pH 1,3 e 7,4; b) Espectros de absorção em pH 7,5 e 1,2.

Figura 28 – Emissão do composto **3**. a) Titulação fluorimétrica entre pH 1,5 e 7,0; b) Espectros de emissão em pH 7,5 e 1,2.

Figura 29 – Absorção do composto **4**. a) Titulação espectrofotométrica entre pH 0,6 e 7,9; b) Espectros de absorção em pH 8,0 e 2,0.

Figura 30 – Emissão do composto **4**. a) Titulação fluorimétrica entre pH 1,4 e 7,3; b) Espectros de emissão em pH 8,0 e 2,0.

Figura 31 – Absorção e emissão do composto **4** em DMSO. a) Absorção; b) emissão.

Figura 32 – Absorção do composto **5**. a) Titulação espectrofotométrica entre pH 1,3 e 7,1; b) Espectros de absorção em pH 7,4 e 1,9.

Figura 33 – Emissão do composto **5**. a) Titulação fluorimétrica entre pH 1,6 e 7,7; b) Espectros de emissão em pH 7,4 e 1,9.

Figura 34 – Curvas de titulação para o composto **5**. a) Espectrofotométrica em 551 nm. b) Fluorimétrica em 625 nm. c) Espectrofotométrica em 595 nm.

Figura 35 – Citotoxicidade dos sensores **2** (azul) e **5** (laranja) após 72 horas. Em cinza o tratamento apenas com DMSO 5% (controle)

Figura 36 – Decomposição do cloreto de diazônio formado.

Figura 37 – Cromatografia em camada delgada dos produtos da reação sequencial.

Figura 38 – Absorção do composto **9**. a) Titulação espectrofotométrica entre pH 1,5 e 7,7; b) Espectros de absorção em pH 10,1 e 1,4.

Figura 39 – Emissão do composto **9**. a) Titulação fluorimétrica entre pH 1,3 e 7,0; b) Espectros de emissão em pH 10,1 e 1,4.

Figura 40 – Espectros de absorção em solventes orgânicos. a) Composto **14**; b) Composto **15**.

Figura 41 – Espectros de emissão em solventes orgânicos. a) Composto **14**; b) Composto **15**.

Figura 42 – Titulação espectrométrica (1) e fluorimétrica (2) do composto **14** em meio aquoso com diferentes co-solventes. a) DMSO 30% b) MeCN 30% e c) MeOH 30%.

Figura 43 – Transferência de elétrons fotoinduzida da anilina desprotonada.

Figura 44 – Titulação espectrométrica (1) e fluorimétrica (2) do composto **15** em meio aquoso com diferentes co-solventes. a) DMSO 30% b) MeCN 30% e c) MeOH 30%.

Figura 45 – Processos fotoquímicos presentes nos compostos **14** e **15** protonados e desprotonados

Figura 46 – Superfícies do orbital molecular ocupado de maior energia (HOMO) dos compostos **14** e **15** na forma protonada e desprotonada. a) Estado desprotonado.
b) Estado protonado.

Figura 47 – Citotoxicidade dos sensores **14** (azul) e **15** (laranja) após 72 horas. Em cinza o tratamento apenas com DMSO 5% (controle)

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 – Toxicidade dos compostos **2** e **5** depois de 72 horas

Tabela 02 – Propriedades fotofísicas compostos **14** e **15** em solventes

Tabela 03 – Propriedades espectrométricas compostos **14** e **15**

Tabela 04 – Cálculos teóricos para os compostos **14** e **15**

Tabela 05 – Toxicidade dos compostos **14** e **15** depois de 72 horas

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

A: Aceitador de elétrons

TFA: Ácido trifluoroacético

BODIPY: Borodipirrometeno

CT: Charge transfer

D: Doador de elétrons

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO: Dimetilsulfóxido

ET: Electron transfer

FRET: Fluorescence resonance Energy Transfer

HOMO: Highest occupied molecular orbital

ICT: Intramolecular Charge Transfer

MeOH: Acetonitrila

MeOH: Metanol

MTT: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)

LUMO: Lowest unoccupied molecular orbital

PET: Photoinduced electron transfer

pH: Potencial hidrogeniônico

pKa: Potencial constante de ionização de ácido

S₀, S₁ e S₂: Níveis energéticos fundamental, primeiro e segundo

UV: Ultravioleta

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	9
RESUMO	11
ABSTRACT	12
LISTA DE FIGURAS	13
LISTA DE TABELAS	17
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	18
SUMÁRIO	19
1. INTRODUÇÃO	21
1.1. Fenômeno da fluorescência e fluoróforos	21
1.2. Sensores fluorescentes	23
1.2.1. TRANSFERÊNCIA DE ELÉTRONS FOTOINDUZIDA (PET).....	25
1.2.2. TRANSFERÊNCIA DE CARGA INTRAMOLECULAR FOTOINDUZIDA (ICT).....	28
1.2.3. SENSORES DE pH.....	30
1.3. Microscopia de fluorescência	32
1.4. Fluoróforos derivados de BODIPY	32
2. OBJETIVOS	38
2.1. Geral	38
2.2. Específicos	38
3. MATERIAS E MÉTODOS	39
3.1. Síntese de fluoróforos derivados do BODIPY	39
3.1.1. DERIVADOS 3-BENZILAMINO BODIPYs.....	39
3.1.2. DERIVADO 3-(PIRIDIN-3-IL) BODIPYs.....	40
3.1.3. DERIVADOS 3-(4-AMINOFENIL) BODIPYs.....	42
3.2. Caracterização fotofísica dos derivados do BODIPY	43
3.2.1. RENDIMENTO QUÂNTICO DE FLUORESCÊNCIA.....	43
3.2.2. TITULAÇÕES ESPECTROFOTOMÉTRICA E FLUORIMÉTRICA.....	44
3.3 Cálculos teóricos	46
3.4 Ensaios de viabilidade celular	46
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
4.1. 3-benzilamino BODIPYs como sensores de pH	48
4.1.1. CARACTERIZAÇÃO DO COMPOSTO 1.....	48
4.1.2. CARACTERIZAÇÃO DO COMPOSTO 2.....	50
4.1.3. CARACTERIZAÇÃO DO COMPOSTO 3.....	58

4.1.4.	CARACTERIZAÇÃO DO COMPOSTO 4	59
4.1.5.	CARACTERIZAÇÃO DO COMPOSTO 5	61
4.1.6.	ENSAIO DE CITOTOXICIDADE DOS COMPOSTOS 2 E 5	64
4.2.	Preparação e propriedades do 3-(piridin-3-il) BODIPY	66
4.3.	Caracterização dos 3-(4-aminofenil) BODIPYs	68
4.3.1.	CÁLCULOS TEÓRICOS	75
4.3.2.	ENSAIO DE CITOTOXICIDADE	78
5.	CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	80
6.	BIBLIOGRAFIA	81
	APÊNDICE	88
	ANEXOS	89

1. INTRODUÇÃO

1.1. Fenômeno da fluorescência e fluoróforos

A fluorescência é uma importante ferramenta de investigação em diversas áreas – desde ciência dos materiais ao diagnóstico clínico – devido à sua alta sensibilidade e seletividade.^[1] A teoria que envolve a fluorescência consiste nos processos que ocorrem após espécies químicas absorverem radiação eletromagnética. Ao incidir radiação uma substância absorverá energia discretamente, em um comprimento de onda específico, sendo excitada do seu estado fundamental (S_0 , de energia E_0) a um estado eletrônico mais elevado (S_1, S_2, \dots, S_n , de energia E_1, E_2, \dots, E_n), em algum nível vibracional (0, 1, 2) e rotacional (**Figura 01a**). Essa substância ao se encontrar no estado excitado poderá retornar ao seu estado fundamental por dois tipos de transições: não radiativas e radiativas, que voltam liberando energia na forma de fótons. Os processos não-radiativos (**Figura 01b**) são: i) relaxação vibracional, que provêm de processos dinâmicos, como por exemplo, durante colisões entre as moléculas excitadas e as moléculas do solvente; ii) conversão interna, que ocorre entre dois estados eletrônicos de mesma multiplicidade, ou seja, entre estados singleto ou entre estados tripleto; e iii) cruzamento intersistema, que ocorre entre níveis vibracionais pertencentes a estados eletrônicos de multiplicidades diferentes, ou seja, de um estado singleto para um tripleto, ou vice-versa. Esse último processo quando favorecido pode levar a fosforescência, porém como esse processo luminescente não será abordado nesse trabalho ele não foi detalhado no diagrama da Figura 01. Já as transições radiativas consistem em fluorescência (**Figura 01c**) e fosforescência, as quais se diferem na multiplicidade do estado excitado, enquanto a primeira envolve um estado singleto (normalmente o de menor energia, S_1) a segunda envolve o tripleto (o que faz com que os processos fosforescentes tenham uma maior duração).^[1-3]

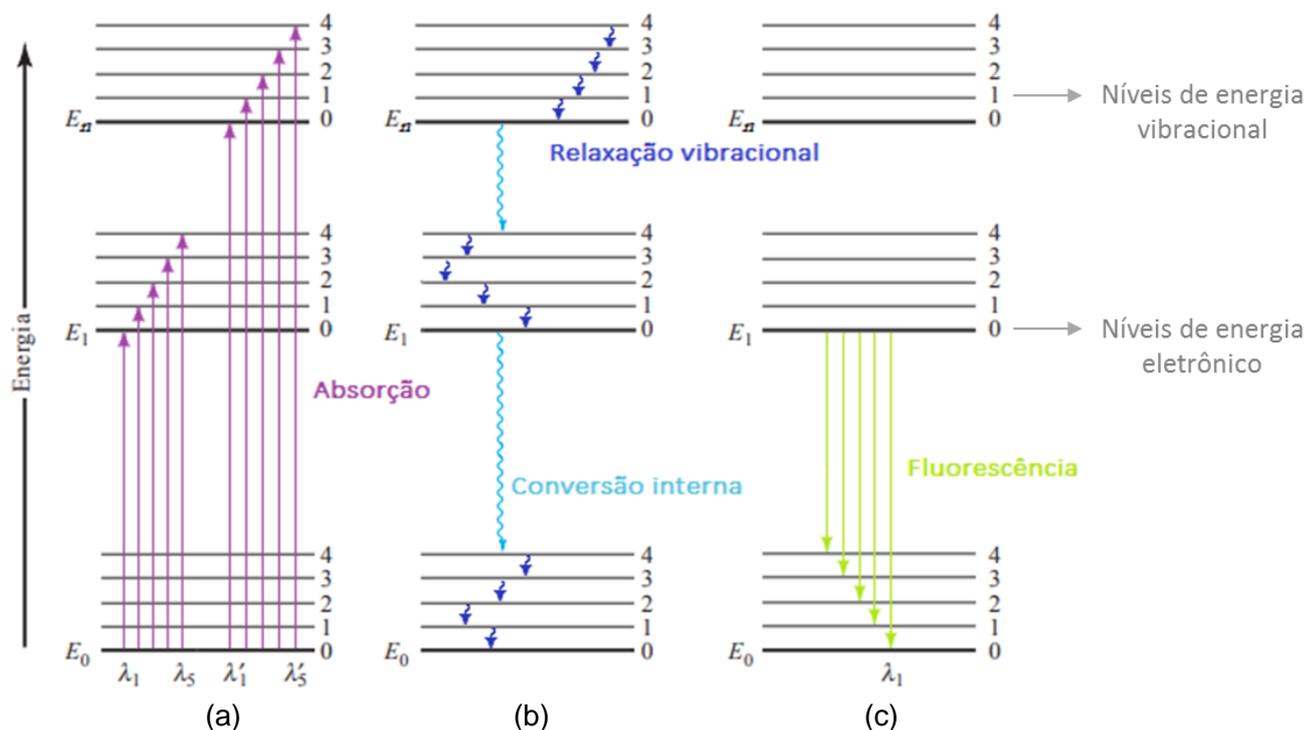


Figura 01 – Diagrama de transições de energia. a) Absorção da radiação; b) Relaxações não-radiativas e c) Fluorescência. Modificado.^[2]

Esses processos de transições não radiativas e radiativas competem entre si e, como as relaxações vibracionais e as conversões internas são mais rápidas, a maioria das moléculas tendem a decair do seu estado excitado por essas vias. Assim, para uma molécula apresentar fluorescência é preciso características estruturais específicas que diminuam a taxa de decaimento não radiativa (k_{nr}). Desta forma, a fluorescência requer a diminuição da velocidade dos processos não radiativos concomitantemente com o aumento da velocidade dos processos radiativos. Intrinsecamente, pequenas moléculas orgânicas aromáticas, com ligações π altamente conjugadas e anéis fundidos que possuem essa característica, pois conferem rigidez estrutural, planaridade e alta densidade eletrônica à molécula. Uma característica fotofísica importante é o rendimento quântico de fluorescência, que é a razão entre o número de fótons emitidos e o número de fótons absorvidos. Quanto menor for a perda por relaxações não-radiativas maior será a taxa de fluorescência, e, por conseguinte, maior será o rendimento quântico da molécula. Com isso há um número limitado de sistemas químicos que emitem fluorescência.^[1-3] Os compostos que possuem essa peculiaridade são chamados de fluoróforos, sendo compostos majoritariamente por moléculas orgânicas, e por grupos secundários como cátions

trivalentes dos lantanídeos e actinídeos, quantum dots e proteínas fluorescentes. Dessa maneira, devido à quantidade limitada de moléculas que possuem fluorescência intrínseca, muitos grupos de pesquisa investem em pesquisas com as diversas classes de fluoróforos visando o desenvolvimento de sondas fluorescentes com diversos fins, permitindo aplicações abrangentes em sistemas distintos.^[4]

1.2. Sensores fluorescentes

Fluoróforos são amplamente empregados no desenvolvimento de sensores fluorescentes, dado que o fluoróforo, uma vez excitado, pode ter suas características fotofísicas afetadas pelas interações com o microambiente, podendo assim traduzir informações do meio em um sinal fluorescente analiticamente útil.^[5,6] Tais sensores podem detectar, quantificar e formar imagens de moléculas, biomoléculas ou íons específicos, tornando-se uma ferramenta essencial na ciência, medicina e tecnologia.^[1,3] Além da diversidade de aplicações, o sucesso dos fluoróforos como ferramentas analíticas pode ser explicado pelas vantagens consideráveis oferecidas pela detecção de fluorescência: i) uma alta sensibilidade; ii) uma alta seletividade; iii) um tempo de resposta rápido e iv) o monitoramento contínuo com observação *in situ*, uma vez que a luz pode viajar e sair de ambientes biológicos.^[1,5,6] Um sensor típico de reconhecimento de analito é constituído por um fluoróforo, responsável por reportar o sinal, unido a um sítio de ligação, que é responsável pela interação com o analito – teoricamente, de maneira reversível. Esses sensores podem ser utilizados nas mais diversas aplicações, assim, à medida que surgem novas demandas de pesquisa, se faz necessário o desenho, desenvolvimento e a caracterização espectroscópica e fotofísica de novos sensores fluorescentes.^[7-11] Na literatura outros nomes podem ser encontrados para os sensores fluorescentes, dentre eles, quimiossensores, indicadores, detectores ou, mais genericamente, sondas fluorescentes.^[5,6]

A resposta observada em um sensor fluorescente pode ocorrer de maneiras diferentes, caracterizando dois tipos de sensores: i) sensores *on/off*, quando o analito é detectado através da variação da intensidade, esses, por sua vez, podem ser divididos em *turn-off* e *turn-on*. Um sensor *turn-off* quando há uma supressão do sinal de fluorescência após o reconhecimento (**Figura 2a**), e um sensor *turn-on* quando há o aumento da fluorescência com a ligação do analito (**Figura 2b**).^[9,10] ii) sensores ratiométricos, quando o analito é detectado através da mudança do comprimento de

onda de emissão (**Figura 2c**). Nesses sensores a concentração do analito pode ser determinada a partir da razão das intensidades nos diferentes comprimentos de onda de excitação ou emissão. Esse cálculo, conhecido como cálculo ratiométrico, é um ganho para a aplicação desses sensores, uma vez que fornece uma medida da concentração do analito que é independente da concentração da sonda, além de ser insensível à intensidade de luz incidente, espalhamento, efeitos de filtro interno e fotodegradação.^[9,10]

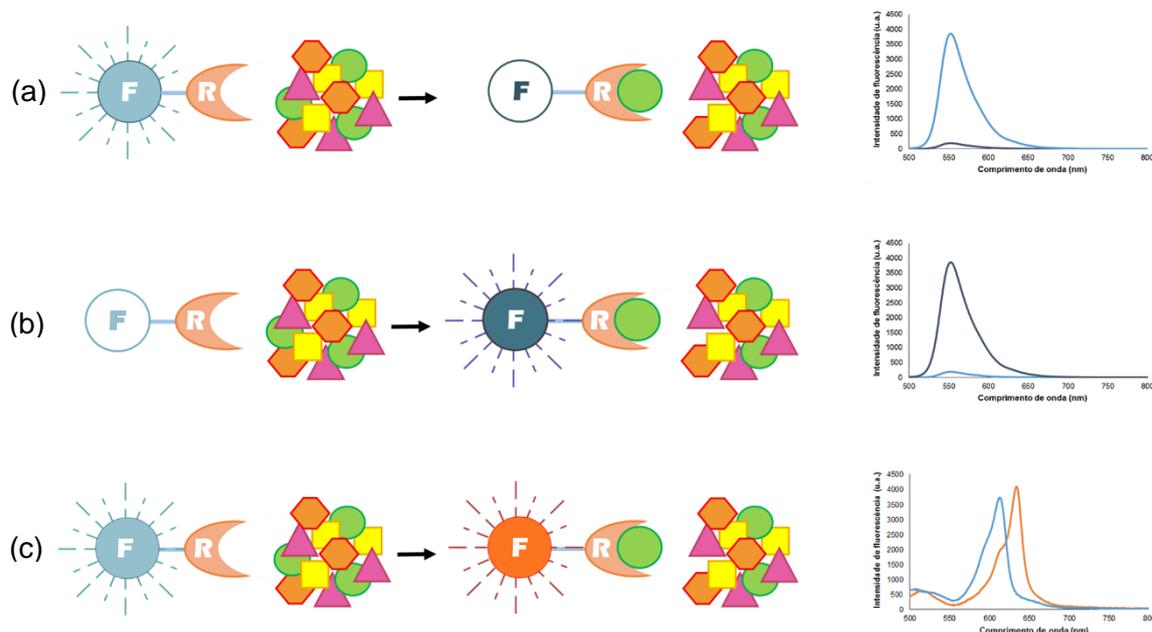


Figura 02 – Tipos de reconhecimentos sensoriais. a) Sensores *turn-off*; b) Sensores *turn-on* e c) Sensores ratiométricos.

O tipo de reconhecimento do sensor dependerá da perturbação provocada pelo analito aos processos fotoinduzidos. Devido à complexidade que envolve um estado excitado e seu ambiente, diversos processos podem causar perturbação com consequente alteração da fluorescência, como a transferência de prótons, transferência de elétrons, transferência de carga, transferência de energia, formação ou desaparecimento de excímero ou exciplex, entre outros.^[1,3,5] Assim, um sensor pode ser projetado por meio do controle de alguns mecanismos, como transferência de carga intramolecular induzida (ICT), transferência de elétrons fotoinduzida (PET) e transferência de energia de ressonância por fluorescência (FRET).^[4,6] No presente trabalho foram explorados os mecanismos PET e ICT, portanto somente esses serão explanados a seguir.

1.2.1. TRANSFERÊNCIA DE ELÉTRONS FOTOINDUZIDA (PET)

As moléculas em seus estados eletronicamente excitados geralmente exibem reatividades aumentadas em relação a reações de transferência de elétrons (ET), que por via de regra, são muito rápidas e competem com processos de desativação radiativa. Quando uma molécula apresenta um grupo doador de elétrons (D) e um grupo aceptor (A) a radiação incidida pode favorecer uma transferência de elétrons intramolecular de D para A, formando uma espécie de cargas separadas $[D^+A^-]^*$, que pode retornar ao estado fundamental por transições radiativas ou não. Por conseguinte, essas reações fotoinduzidas abrem um canal de desexcitação não emissiva que diminui a fluorescência e pode causar até a supressão de um fluoróforo (Figura 3).^[3,5,12]

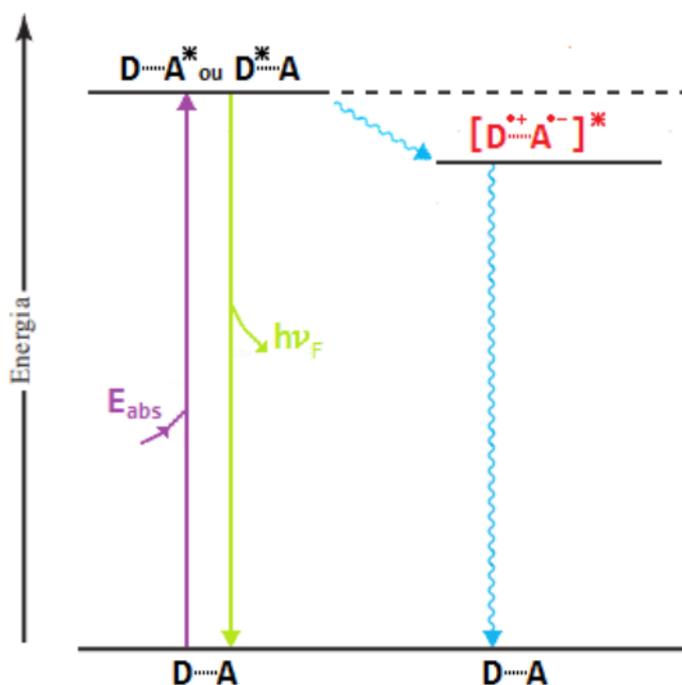


Figura 03 – Diagrama de Jablonski para transferência de elétrons fotoinduzida. Sendo $h\nu_F$ a emissão do fluoróforo. Modificada.^[3]

Assim, um sensor baseado em transferência de elétrons fotoinduzida (PET) é do tipo 'liga' e 'desliga', projetado para não emitir fluorescência na presença ou na ausência do analito, *turn-off* e *turn-on*, respectivamente, ou pelo menos serem fracamente fluorescente nessas ocasiões. O design desses sensores é relativamente racional, e envolve a incorporação de um grupo rico em elétrons de forma que possibilite uma transferência efetiva, garantindo assim uma fluorescência mínima no estado 'desligado'.^[5,14] Nesses sensores tanto o fluoróforo quanto o sítio de

reconhecimento podem atuar como doadores ou aceptores de elétrons, dependendo de seus potenciais de oxidação. Quando o fluoróforo excitado atua como receptor o mecanismo é conhecido como transferência de elétrons redutiva (PET redutiva), pois há a redução do fluoróforo, contudo, quando este atua como doador há a oxidação do mesmo, sendo o mecanismo conhecido como transferência de elétrons oxidativa (PET oxidativa). Na transferência de elétrons oxidativa, o orbital molecular desocupado de mais baixa energia (LUMO) do fluoróforo deve ser mais energético do que o LUMO do sítio de reconhecimento, uma vez que o fluoróforo excitado age como um agente redutor, doando seu elétron excitado do LUMO para o LUMO do sítio de reconhecimento (Figura 04b). Já na transferência de elétrons redutiva, que é mais frequente em projetos de sensores, o fluoróforo excitado age como agente oxidante, uma vez que a excitação do elétron gera uma vacância de baixa energia, permitindo a aceção de um elétron. Para possibilitar esse processo o orbital molecular ocupado de maior energia (HOMO) do fluoróforo deve ser menos energético do que o HOMO do sítio de ligação (Figura 04a). Contudo, no estado 'ligado' do sensor há, para a PET redutiva, a redução do nível energético do HOMO, que se torna menos energético do que o do BODIPY excitado (Figura 05 comparada com 04a). Para a PET oxidativa esse estado se torna emissivo por desestabilização do LUMO receptor (Figura 05 e 04b). Alteração essa que desacelera, ou, até mesmo, bloqueia a via de decaimento não radiativo do estado localmente excitado e, com isso, permite a fluorescência.^[1,6,15]

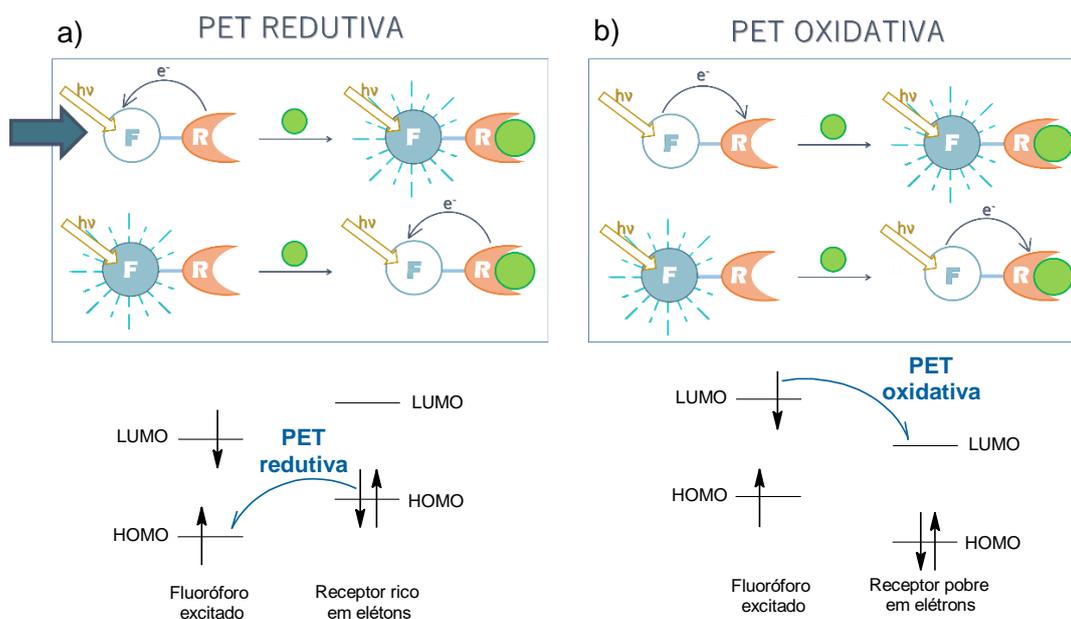


Figura 04 – Sensores baseados em transferência de elétrons fotoinduzida (PET). a) PET redutiva, em destaque o mais utilizado. b) PET oxidativa

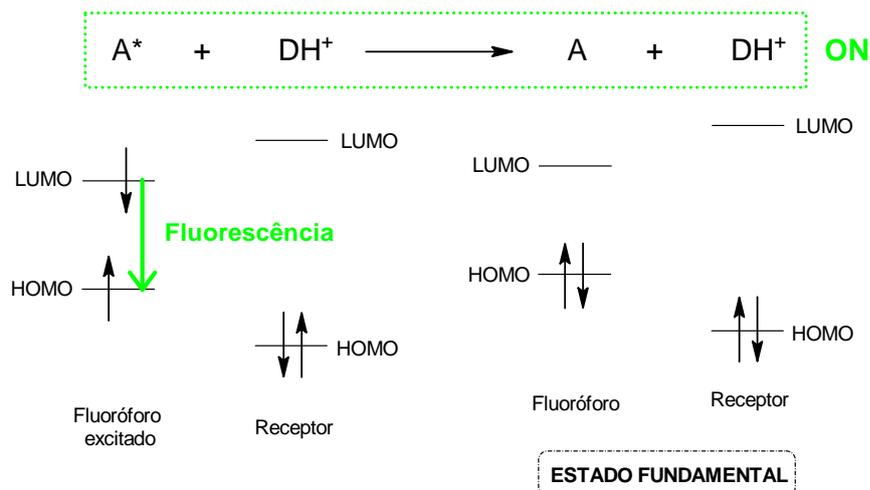


Figura 05 – Representação dos orbitais de fronteira do estado ‘ligado’ dos sensores baseados em PET. A = Aceptor de elétrons e D = Doador de elétrons.

Visto que a maioria dos sensores baseados em PET possuem o fluoróforo como aceptor (PET redutiva) o processo foi mais detalhado em termos de energias dos orbitais de fronteira (**Figura 06**).

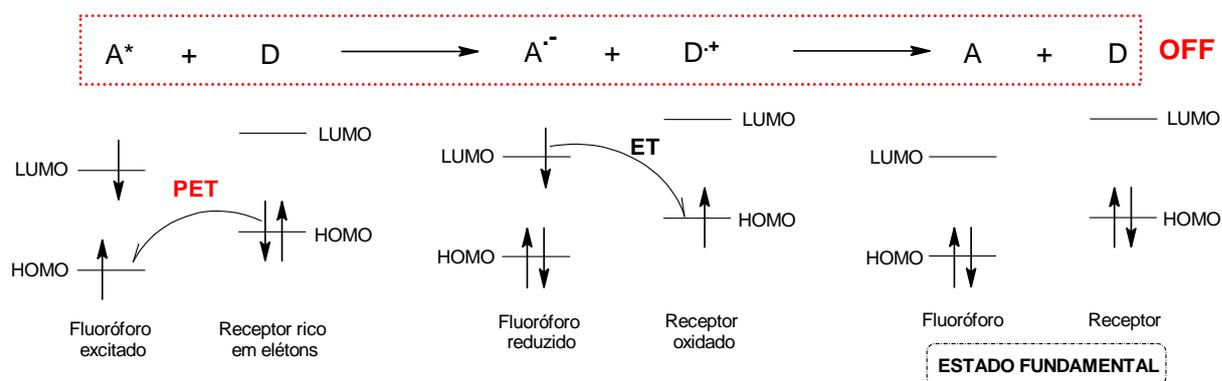


Figura 06 – Representação dos orbitais de fronteira de uma PET redutiva. A = Aceptor de elétrons e D = Doador de elétrons. Modificado e adaptado.^[6,14]

Após a excitação do fluoróforo, um elétron do HOMO é promovido para o LUMO, o que ocasiona uma vacância nesse orbital. E uma vez que, no estado ‘desligado’ desses sensores, a energia do HOMO do fluoróforo (aceptor) é menor em relação a do HOMO do sítio de reconhecimento (doador) a transferência de elétrons intramolecular desse para aquele é energeticamente favorável (**Figura 06**, primeira representação orbital molecular). Como resultado da transferência de elétrons fotoinduzida há a formação do estado de cargas separadas, que relaxa para o estado fundamental através de processos não radiativos, causando a supressão da

fluorescência do fluoróforo. (**Figura 06**, segundo OM representado). Esse retorno não radiativo pode ocorrer através da transferência do elétron extra no LUMO do fluoróforo para o HOMO do sítio de reconhecimento, por um processo de transferência térmica.^[1,6,14] Normalmente a PET redutiva ocorre quando o sensor está na forma livre de analito, 'ligando' a fluorescência quando há a ligação com o analito. Em outras palavras, geralmente são sensores *turn-on*, pois o reconhecimento induz o aumento do potencial redox do sítio de reconhecimento de tal forma que a PET é desfavorecida, aumentando o rendimento quântico do sensor e exibindo as propriedades de fluorescência inerentes ao fluoróforo.^[16]

1.2.2. TRANSFERÊNCIA DE CARGA INTRAMOLECULAR FOTOINDUZIDA (ICT)

A distribuição da densidade eletrônica do estado excitado de uma molécula pode diferir do seu estado fundamental, o que explica uma série de variações espectrais observadas em fluoróforos.^[15] Essa variação de densidade eletrônica pode ser observada quando um sensor possui uma unidade doadora de elétrons conjugada a um grupo retirador, possibilitando assim, mediante fotoexcitação, uma transferência de carga intramolecular do doador para o retirador e, portanto, o aumento no momento dipolo do estado excitado.^[6] Esse estado excitado polar formado nesses sensores, chamado de estado de transferência de carga intramolecular (ICT), é sensível às condições ambientais, como polaridade, acidez ou a presença de certos analitos, e, portanto, ideal para desenvolver sensores fluorescentes.^[15]

É importante mencionar que alguns sensores podem sofrer transferência de carga completa, ou seja, transferência de elétrons, resultando em um estado excitado de cargas separadas $[D^+A^-]^*$, que possui um grande momento dipolo.^[1,15] Esse estado, foi mencionado no item anterior, uma vez que é resultado de uma PET, entretanto não foi dada ênfase ao decaimento radiativo. Para ocorrer fluorescência com eficácia razoável de um estado excitado com polaridade significativa é necessário desacelerar a taxa de recombinação da carga, ou seja, diminuir relaxações por conversões internas, que são não radiativas.^[16] Os dois principais efeitos que precisam ser analisados são: (i) Interações intramoleculares, sendo a mais importante dentre elas o acoplamento de $D^{\delta+}$ e $A^{\delta-}$ com o efeito mesomérico de deslocalização, que diminuem a distribuição de carga reduzindo a energia do estado de ICT.^[12] (ii) Interações

intermoleculares, principalmente provenientes da reorganização da camada de solvatação de acordo com o dipolo, que, por sua vez, é melhor estabilizado por solventes polares. É válido ressaltar que sensores que possuem um estado ICT são conhecidos por emitirem com desvios batocrômicos à medida que a aumenta a polaridade, devido a essa característica de em solventes polares possuírem uma melhor estabilização.^[1,3,14] Sendo assim, o decaimento radiativo de um estado de ICT completa, alcançado após a PET, é favorecido quando há a diminuição da sobreposição dos orbitais de D^+ e de A^- , ou seja, quando o doador é desacoplado do acceptor após a PET (seja por ortogonalidade dos sistemas π , simetria ou por distancia). Com isso, se essa condição de desacoplamento da unidade doadora para a unidade acceptora for satisfeita, haverá a emissão desse estado (**Figura 07**, segundo estado excitado), porém se houver alguma sobreposição, e, por conseguinte, uma estabilização, esse estado poderá emitir de um estado ICT menos polar (**Figura 07**, terceiro estado excitado), com um comprimento de onda mais longo, entretanto se a taxa de recombinação dessa carga for acelerada haverá a supressão por PET, vista na sessão 1.2.2. (**Figura 03**). Assim, quanto menor for a interação entre D^+ e A^- menor será a taxa de decaimento não radiativo, e por consequência maior rendimento quântico.^[12,16]

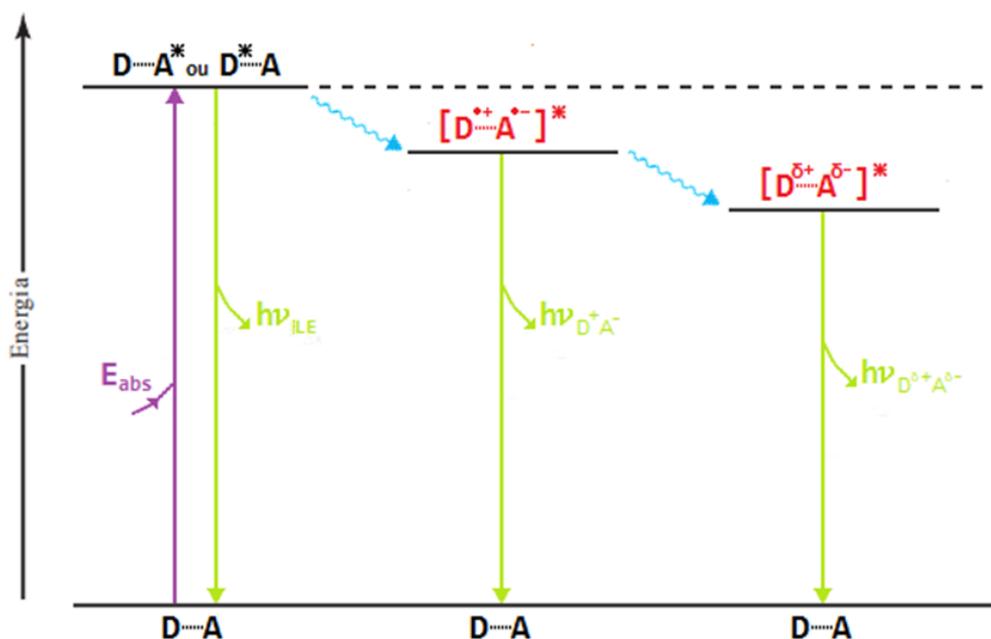


Figura 07 – Diagrama de Jablonski para estado de transferência de carga intramolecular (ICT). Sendo $h\nu_{LE}$ a emissão do estado localmente excitado (LE), $h\nu_{D^+A^-}$ a emissão de um estado de cargas separadas e $h\nu_{D^{\delta+}A^{\delta-}}$ a emissão de um estado de transferência de carga mais estabilizado. Modificada.^[3]

Esse fenômeno é explorado para o desenvolvimento de indicadores ratiométricos de alto nível. A base do design do sensor se dá no fato da interação do analito com o sítio de reconhecimento (atuando como o D ou o A) poder alterar o caráter de transferência de carga (CT) do estado excitado, afetando o comprimento de onda espectral da absorção e fluorescência, bem como o rendimento quântico de fluorescência do fluoróforo.^[7,16] Um exemplo muito comum é um sensor de cátions com sítio de reconhecimento rico em elétrons (**Figura 08**, o estado fundamental pode ter um momento dipolo nulo ou diferente de zero, porém é menor do que o do estado excitado). Considerando esse exemplo teríamos uma transferência de carga do sítio de reconhecimento para o fluoróforo. Porém com o reconhecimento do cátion há a redução do caráter doador do sítio de reconhecimento, resultando na diminuição da conjugação, e assim, um deslocamento para o azul é esperado junto com a diminuição do coeficiente de extinção. Outra maneira de visualizar esse efeito é o aumento da polaridade do estado excitado com a interação com o analito, que desestabiliza esse estado, absorvendo e emitindo em comprimentos de onda mais curtos. Todos esses efeitos fotofísicos são obviamente dependentes da carga e do tamanho do cátion, e a seletividade desses efeitos é esperada.^[5,14]

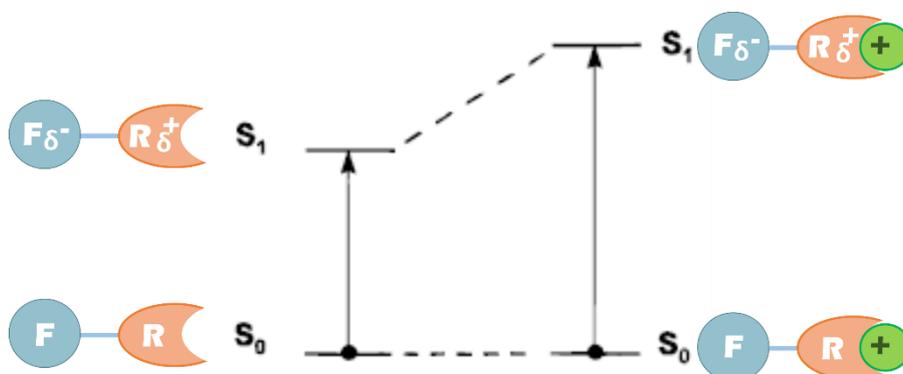


Figura 08 – Efeito de cátion com sítio de reconhecimento rico em elétrons na absorção de um fluoróforo com estado excitado ICT. F = Fluoróforo; R = Sítio de reconhecimento. Modificado.^[14]

1.2.3 SENSORES DE pH

Uma classe de sensores com aplicação bem difundida são os sensores de prótons, dado que o pH regula muitos fenômenos, tornando fundamental o monitoramento desse parâmetro em diversas áreas, como na indústria química, no monitoramento

ambiental, em biotecnologia e em bioquímica.^[8,18] Os sensores de pH possuem um sítio de ligação formado por grupos funcionais contendo pares de elétrons não ligantes, que atuam como uma base de Bronsted-Lowry, fazendo o reconhecimento dos prótons. Normalmente, o grupo mais utilizado para esse reconhecimento são os grupos aminos, entretanto existem alguns outros disponíveis. Em condições de pH baixo, o sítio de reconhecimento sofre protonação, diminuindo a capacidade do grupo de doar elétrons, porém à medida que há o aumento do pH, e, como consequência, a desprotonação, a conjugação eletrônica do receptor com o fluoróforo é restabelecida; permitindo o reconhecimento quando essa alteração ocasiona mudanças nas propriedades fotofísicas do último.^[16,20] Para o uso desses sensores é importante considerar o seu pKa, pois essa propriedade determinará sua aplicação e os sensores de pH com estequiometria de ligação 1:1 têm uma resposta de pH utilizável na faixa aproximada de $pK_a - 1$ a $pK_a + 1$.^[6] Vale ressaltar que as características químicas do grupamento químico passível de protonação e desprotonação é o principal fator que contribui para o valor de pKa, ainda que seja importante considerar o efeito que outros grupos químicos, como ativadores e desativadores de anel, possam ter sobre a sua densidade eletrônica.^[21]

Os sensores de pH fluorescentes são particularmente úteis em biologia celular, uma vez que vários processos intracelulares são regulados pelo pH, tais como, proliferação celular e apoptose, vias de internalização celular, transdução de sinal mediada por receptor, atividade enzimática, transporte de íons e a própria homeostase.^[9,22-24] Com isso, as organelas possuem sua função específica dependente de sua faixa ótima de pH. Os lisossomos, por exemplo, possuem o pH na faixa de 4,5 - 5,5, o mais ácido dentre as organelas – que é ideal para a atividade das hidrolases lisossomais, favorecendo a degradação de proteínas no metabolismo celular – enquanto que as mitocôndrias possuem um pH de aproximadamente 8.^[9,24] A interrupção da homeostase do pH causa danos como a geração de radicais livres, apoptose celular inadequada e necrose, além de ser observado em algumas doenças, como por exemplo, em câncer, onde as células tumorais são mais ácidas que células saudáveis, e em doenças neurodegenerativas, onde é visto o aumento do pH lisossomal.^[24,26] Portanto, a demanda por imagens e medições de pH em ambiente intracelular, para estudo de processos fisiológicos e patológicos, tem estimulado o desenvolvimento desses sensores. Nos últimos anos, um grande número de sensores

de pH fluorescentes foi relatado, mas muitos possuem uma série de limitações.^[24] Por exemplo, para as sondas comumente utilizadas na avaliação do pH lisossomal é observado que algumas se acumulam em múltiplos compartimentos intracelulares, o que atrapalha na especificidade da técnica; outras acidificam o lisossomo, ocasionando erros nas medições; e algumas ainda possuem um alto ruído de fundo, ocasionando erros e dificuldade de visualização.^[26,27] Portanto, o desenvolvimento de novas sondas de pH com melhor biocompatibilidade, sensibilidade e especificidade de local ainda é necessário.

1.3. Microscopia de fluorescência

Uma técnica que obteve grandes avanços com a utilização da fluorescência foi a microscopia, se tornando indispensável em certas áreas de pesquisa, como a bioquímica e biologia celular por permitir imagem intracelular de forma não destrutiva com alta resolução. O advento dessa técnica tornou possível a observação de eventos intracelulares *in situ* e em tempo real; sendo que sua ampla utilização é, em parte, graças aos avanços no desenvolvimento de sensores fluorescentes, que permitem a marcação dos analitos alvos.^[28-30] Esses marcadores são usados com êxito na microscopia por poderem ser razoavelmente pequenos, quimicamente estáveis e altamente versáteis para o desenho molecular e aplicação. Essas características possibilitam a marcação/detecção de cátions, ânions, biomoléculas e organelas em células vivas.^[11] Entretanto, a fim de proporcionar essa marcação, tais sondas precisam ser permeáveis às células e biocompatíveis, sendo não tóxicas e inertes, ou seja, não interferindo em processos endógenos.^[11,31,32] Outro fator importante também é a excitação e emissão em comprimentos de onda mais longos, pois minimizam o fotodano e a autofluorescência celular de cromóforos endógenos.^[32] Com isso, essa técnica tem cooperado desde as investigações de interações bimoleculares, de processos bioquímicos e de localização de espécies, até o estudo de tipos específicos de células para caracterização e diagnóstico em terapia de doença.^[11,29] No entanto, sondar sistemas intracelulares específicos ainda é uma tarefa desafiadora em decorrência da natureza intrincada das células.^[31]

1.4. Fluoróforos derivados de BODIPY

Uma classe de fluoróforos muito importante e com aplicação difundida é o grupo dos Borodipirrometenos (BODIPYs), que são derivados pirrólicos contendo o núcleo

4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-sindaceno (**Figura 09**), caracterizado por alta rigidez estrutural, bandas espectrais de absorção e fluorescência intensas e estreitas, coeficiente de absorção molar e rendimento quântico relativamente altos.^[4] Além disso, tais sondas são solúveis em solventes orgânicos, e tipicamente possuem alta estabilidade química, térmica e fotoquímica, que cooperam para o sucesso deste fluoróforo. Vale ressaltar, ainda, a versatilidade química dos BODIPYs, uma propriedade atrativa que viabiliza substituições seletivas nas diferentes posições do núcleo BODIPY, permitindo a funcionalização desse para diversas aplicações. Não somente isso, a versatilidade química dos BODIPYs possibilita também a modulação de suas propriedades fotofísicas e a indução de novos fenômenos fotofísicos (como transferência de carga ou elétron), atendendo a requisitos específicos e possibilitando o aprimoramento da sua função (como sensibilidade de sondagem, para sensores) e a sua eficiência.^[11,29] Como consequência, é possível a obtenção de derivados BODIPYs com a absorção e emissão ao longo de, praticamente, todo o espectro visível, sendo idealizados de acordo com a aplicação (**Figura 10**). BODIPYs que absorvem e emitem em comprimentos de onda mais longos, por exemplo, que são importantes para microscopia, podem ser obtidos através da inserção de grupos aromáticos e/ou ricos em elétrons nas posições 3 e 5, principalmente. Outra maneira possível, é a substituição do C-8 por um nitrogênio, formando AzaBODIPYs, um grupo de fluoróforos derivados do BODIPY, bem conhecidos por esse deslocamento batocrômico.^[15,16]

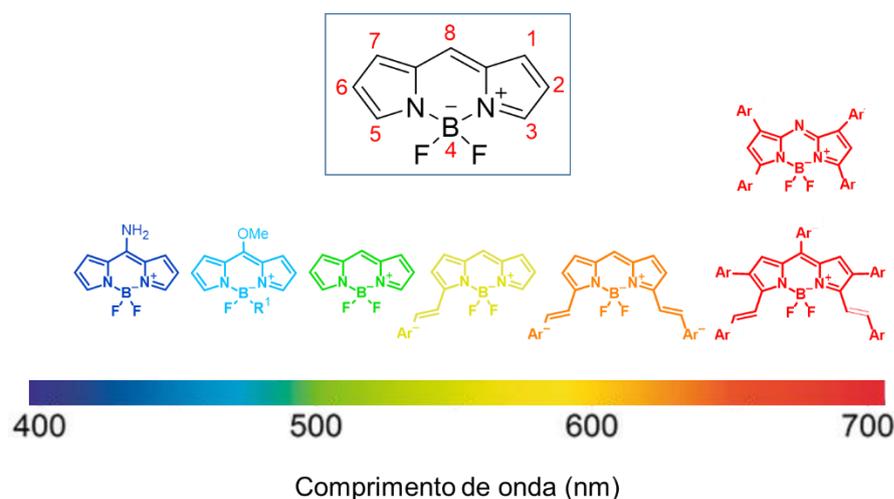


Figura 09 – Estrutura numerada do núcleo BODIPY, em destaque, e derivações do núcleo emitindo em todo espectro visível.

Desde a descoberta do BODIPY, em 1968, um esforço tem sido feito no sentido de desenvolver vias sintéticas que possibilitem a preparação de derivados de BODIPY. No princípio a modificação estrutural do núcleo BODIPY acontecia somente na síntese, por meio da diversificação do material de partida ou dos intermediários da reação, entretanto, nas últimas décadas, métodos de modificação direta começaram a surgir.^[4] Atualmente, com os avanços na química do BODIPY, a pós-funcionalização em todas as posições do núcleo é possível (**Figura 10**), algumas de maneira bastante simples e acessível. Como consequência, transformações na estrutura dos BODIPYs podem ser, não somente, sintetizadas após racionalização da estrutura desejada, como também ajustadas de acordo com propriedades e requisitos específicos que precisarem ser aprimorados. A solubilidade, por exemplo, é um requisito importante para sondas de aplicação biológica, e pode ser adquirido por meio de inserção de grupos sulfonados nas posições 2 e 6, através de substituição eletrofílica em BODIPYs já sintetizados. Nessas posições é possível também a inserção do grupo tiocianato, essa diversificação química é recente, desenvolvida pelo nosso grupo de pesquisa em 2016, que traz como propriedades um desvio significativo para o vermelho e o alargamento do espectro de fluorescência, resultando em um desvio de Stokes mais pronunciado.^[41] O desenvolvimento de diversas estratégias sintéticas nas posições 3 e 5 ressalta a importância dessas posições, que além de produzirem uma mudança batocrômica pronunciada, possibilitam a extensão da conjugação do sistema BODIPY, com a inserção de grupo arila, por exemplo, podendo ser explorada para projeto de sensores. Derivados substituídos na posição 8, conhecidos como compostos *meso*-substituídos, foram amplamente estudados e sintetizados, por sua rota sintética ter sido uma das pioneiras a ser desenvolvida, e possuem o seu valor no aprimoramento de propriedades e processos fotofísicos.^[4,15,16,33]

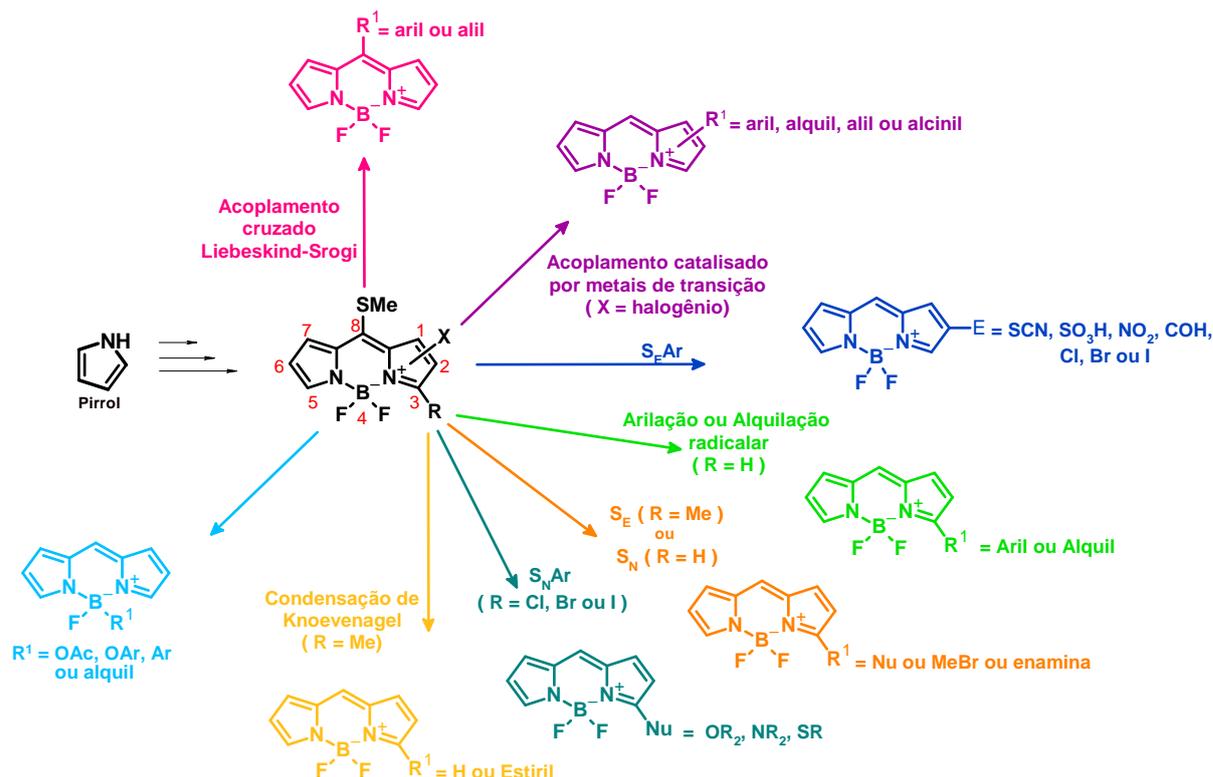


Figura 10 – Principais vias sintéticas nas diferentes posições do núcleo do BODIPY, derivado do pirrol.

A disponibilidade desses métodos de funcionalização com rotas sintéticas já conhecidas favorece, como mencionado anteriormente, a utilização desses compostos no desenvolvimento de novas sondas fluorescentes com propriedades e aplicações específicas. De fato, diversas derivatizações de BODIPYs têm sido desenvolvidas, o que tem levado a uma variedade de aplicações específicas para esse grupo de fluoróforos como em antenas artificiais de coleta de luz^[34], fios fotônicos moleculares^[35], lasers orgânicos^[36], sondas sensíveis à polaridade^[37], sensores^[38], bioconjugação^[39], marcação celular^[32,24], terapia fotodinâmica^[40] entre outros; ^[13,17,19] levando ao crescimento e a popularidade dessa classe de corantes.^[9] Os BODIPYs têm sido uma opção altamente conveniente para o uso em biomarcação,^[11,31] pois possuem um sinal duradouro, em razão de sua alta fotoestabilidade, e permitem uma detecção fácil e sensível, devido certos padrões de substituição do núcleo induzirem processos fotofísicos como FRET, ICT e PET, que são altamente sensíveis a condições ambientais.^[29,33] Assim, muitos designs de sensores baseados em BODIPYs para detectar e quantificar espécies intracelulares foram desenvolvidos. Dentre esses, diversos sensores de pH foram projetados e estudados, contendo as mais diversas bases de Bronsted-Lowry e aplicados de diversas maneiras. Como

mostra a **Figura 11**, indicadores à base de BODIPY contendo fenol,^[42] piridina,^[43] anilina,^[44] hidroxiquinolona,^[45] benzimidazol,^[46] calix[4]areno,^[47] morfolina,^[48] e piperazina,^[49] como sítios de reconhecimento de prótons foram publicados e aplicados como sensores de pH em biologia celular, visando citosol,^[47] lisossomos,^[49] células cancerosas,^[50] macrófagos fagocíticos,^[51] micrometástases,^[52] catepsina,^[53] entre outros.^[54,55] No entanto, como mostra a **Figura 11**, muitos desses sensores desenvolvidos são baseados em BODIPYs meso-substituídos 1,3,5,7-tetrametilados, que são amplamente estudados e explorados, pois podem ser facilmente sintetizados a partir de 2,4-dimetil pirrol e uma variedade de aldeídos aromáticos modificados. A inserção do grupo de detecção de pH em outras posições também foi conseguida a partir da condensação de Knoevenagel ou formilação de BODIPYs metilados, no entanto, o custo mais alto dos pirróis metilados quando comparados ao pirrol é uma desvantagem importante. Entretanto, recentemente, muitos métodos que permitem a substituição direta das posições 3 e 5 do núcleo BODIPY não metilado foram publicados,^[56-60] o que é especialmente interessante devido às alterações típicas nas propriedades fotofísicas que essas posições causam.

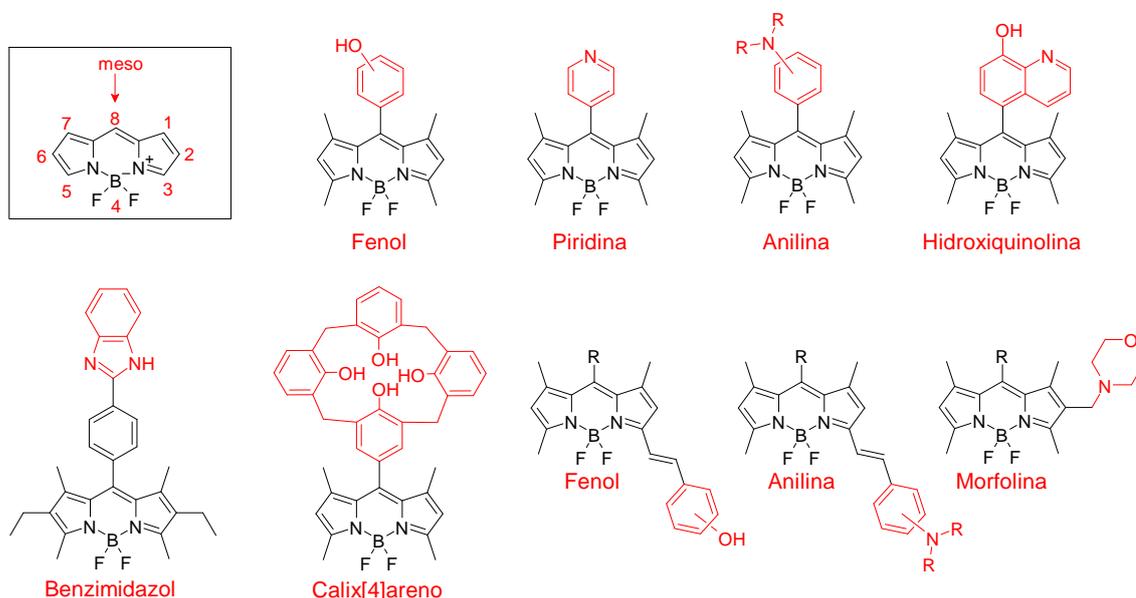


Figura 11 – Alguns sensores de pH fluorescentes baseados em BODIPY presente na literatura provenientes de materiais de partida pirrólicos metilato (menos acessíveis).

Como visto, a fluorescência é uma ótima ferramenta para investigar sistemas em um nível molecular. No entanto, o desenvolvimento de sensores de pH com aplicação em biologia molecular ainda se faz necessário na busca de biocompatibilidade, permeabilidade e especificidade melhoradas. Nesse contexto, o desenvolvimento e caracterização de novos sensores fluorescentes é uma forma interessante de investigar substituições alternativas que poderiam modular propriedades fotofísicas e melhorar propriedades gerais do fluoróforo. Nosso grupo de pesquisa está especialmente interessado no desenvolvimento de sondas e sensores de BODIPYs não metilados, devido à acessibilidade do pirrol, quando comparado ao 2,4-dimetil pirrol e 3-etil-2,4-dimetil pirrol, que são comumente usados a partir de materiais na síntese BODIPY. Por isto, este trabalho, buscou sintetizar um conjunto de derivados de 3-Benzilamino, 3-(Piridin-3-il) e 3-(4-Aminofenil) BODIPYs, sendo avaliado as propriedades fotofísicas e bioquímicas de algumas das moléculas sintetizadas.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Este trabalho tem por objetivo caracterizar uma biblioteca de novos sensores fluorescentes de pH derivados do BODIPY visando sua aplicação em biologia celular.

2.2. Específicos

- Sintetizar novos sensores derivados do BODIPY;
- Caracterizar a fluorescência e a absorção de BODIPYs em diferentes pH;
- Estabelecer os mecanismos moleculares de novos sensores de pH;
- Caracterizar a toxicidade dos sensores em meio celular.

3. MATERIAS E MÉTODOS

3.1. Síntese de fluoróforos derivados do BODIPY

3.1.1. DERIVADOS 3-BENZILAMINO BODIPYs

Em um artigo prévio o grupo sintetizou alguns BODIPYs com grupo benzilamino nas posições 3 e/ou 5 como substratos para reação de tiocianação, a partir dos quais foram gerados compostos análogos tiocianatados.^[41] O grupo benzilamino é um sítio de ligação de prótons (**Figura 12.b**), e por isso esses compostos podem ser vistos como potenciais sensores de pH. Nesse mesmo artigo, através de um teste simples foi demonstrado que a adição de ácido trifluoroacético a alguns desses derivados de BODIPY pôde causar importantes alterações nas suas características fotofísicas em meio orgânico.^[41] Assim, neste trabalho optamos por realizar um estudo em meio aquoso, e mais detalhado, de cinco benzilamino BODIPYs (**Figura 12.a**) como sensores de pH, verificando a influência da tiocianação.

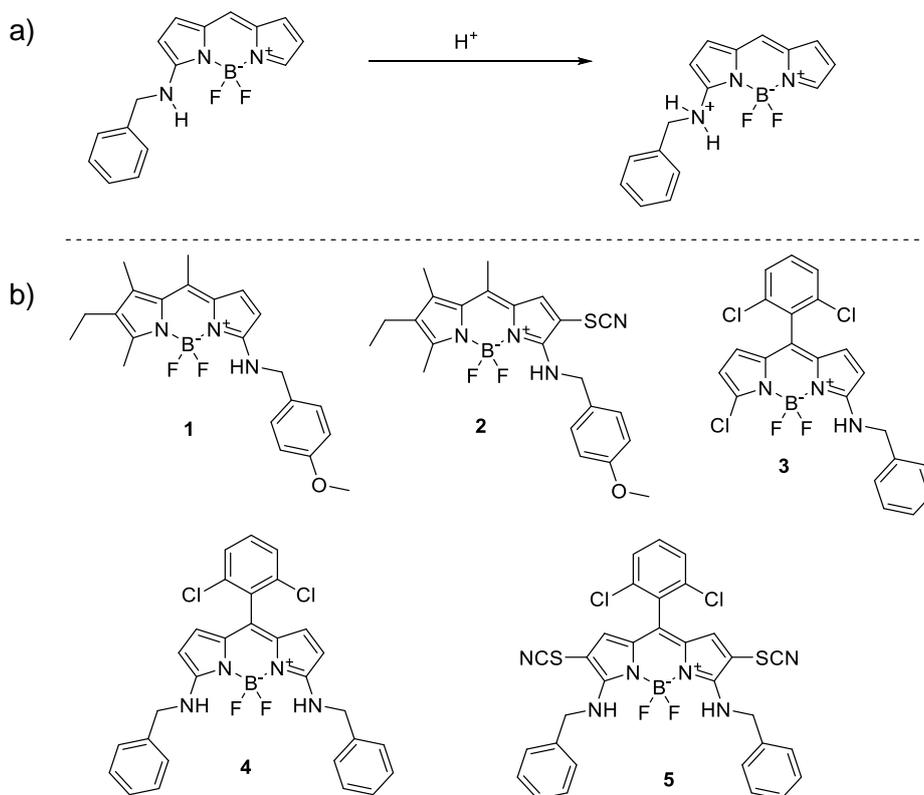


Figura 12 – Derivados 3-benzilamino BODIPYs. a) Protonação do grupo benzilamino; b) 3-benzilamino BODIPYs estudados neste trabalho.

3.1.2. DERIVADO 3-(PIRIDIN-3-IL) BODIPYs

Além do grupo benzilamino foi planejada a utilização do grupo piridin-3-il como unidade sensorial para o desenvolvimento de sensores para pH. A preparação e caracterização de 8-piridinil BODIPYs (**Figura 13.a**) já é bem descrita.^[61] Assim, visando a diversificação estrutural para estudar como a protonação do grupo piridina influenciará na fluorescência, foi planejado o desenvolvimento do anel piridina na posição 3 do BODIPY (**Figura 3.b**). Neste caso, diferentemente do que já está descrito, o substituinte piridin-3-il está na posição 3 do anel pirrólico do sistema BODIPY, e não na posição *meso*.

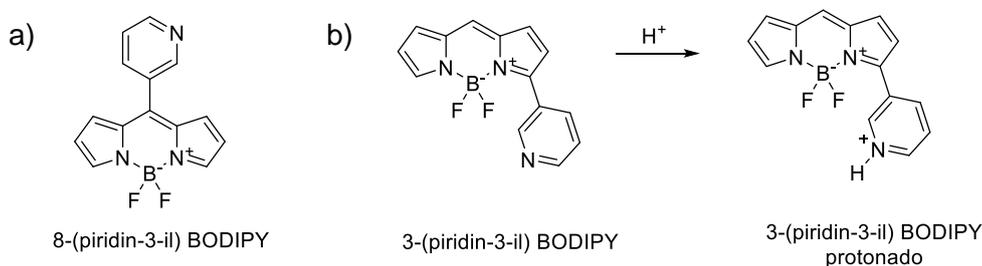
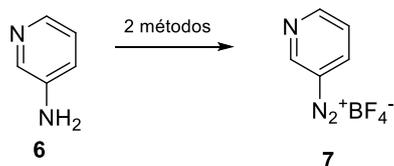


Figura 13 – Derivados piridin-3-il BODIPYs. a) 8-piridinil BODIPY; b) Protonação do grupo 3-(piridin-3-il).

O método de preparação do 3-piridinil BODIPY idealizado é baseado em uma reação radicalar a partir do tetrafluorborato de piridinil diazônio, que por sua vez é obtido a partir de amino-piridinas. Foi testado inicialmente uma estratégia em duas etapas, na qual o tetrafluorborato de diazônio é preparado, isolado e posteriormente aplicado na reação de arilação (**Figura 14.a e 14.b**). Dois métodos foram testados para realizar essa conversão. Devido a problemas, após as duas tentativas em executar essa primeira etapa da estratégia, foi testada também uma estratégia sequencial “one-pot”, onde o sal de diazônio não é isolado (**Figura 14.b**). As estratégias são descritas a seguir.

a) - Formação do sal de piridin-3-il diazônio



b) - Arilação

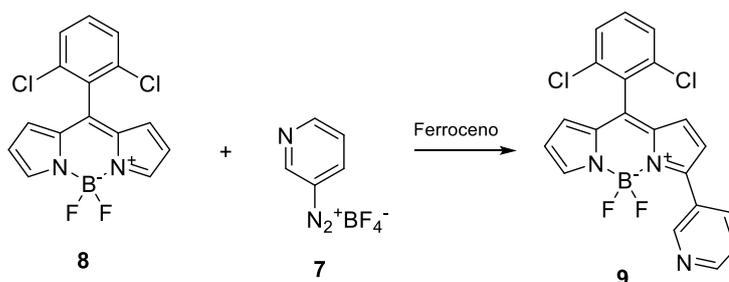


Figura 14 – Método de preparação do 3-piridinil BODIPY estudado. a) Primeira parte da estratégia em etapas; b) Estratégia sequencial “one-pot”.

A primeira tentativa de preparar o tetrafluorborato de 3-piridinil diazônio **7** (Método A) a partir da 3-aminopiridina **6** é baseada no método tradicionalmente utilizado na preparação de tetrafluorborato de fenil diazônio com ácido clorídrico (HCl), nitrito de sódio (NaNO₂) e tetrafluoroboreto de sódio (NaBF₄).^[62] A uma solução de 3-aminopiridina (1,5 g, 16 mmol) em 5 mL de água destilada e 3 mL de HCl PA a 5 °C sob agitação foi adicionada, no decorrer de 5 minutos, 4 mL de uma solução aquosa de NaNO₂ (1,18 g, 17 mmol) resfriada a 0 °C. E após 10 minutos de agitação a 0 °C adicionou 3 mL de uma solução aquosa contendo NaBF₄ (2,1 g, 19 mmol).

A segunda tentativa foi baseada em um método descrito na literatura^[63] com ácido tetrafluorbórico (HBF₄) e nitrito de terc-butila (*t*-BuONO) (Método B). Com essa abordagem sintética o tetrafluorborato de diazônio é formado diretamente, sem a formação do cloreto de diazônio como intermediário. A uma solução de 3-aminopiridina (940 mg, 10 mmol) em 4 mL de etanol a 0 °C foi adicionada 3 mL de uma solução aquosa comercial de HBF₄ 48 %. À solução formada a 0 °C foi adicionada lentamente o *t*-BuONO (2,4 mL, 20 mmol) no decorrer de 5 minutos. Após 30 minutos de agitação a 0 °C adicionou 10 mL de éter dietílico que resulta na precipitação de um sólido branco. Foi possível isolar 1,2 g do sólido branco após filtração a vácuo e lavagem com 20 mL de éter.

Uma terceira abordagem foi a tentativa de preparação *one-pot* do BODIPY **9** em uma reação utilizando 3-aminopiridina, HBF_4 , *t*-BuONO, para a formação in situ do sal de diazônio, seguida da reação com o BODIPY **8** e ferroceno.^[62] Uma solução de 3-amino-piridina (28 mg, 0,265 mmol) e HBF_4 (100 μL) em 500 μL de etanol foi preparada em um balão de 5 mL sob agitação e resfriamento em banho de gelo. A essa solução adicionou o *t*-BuONO (75 μL , 0,625 mmol) no decorrer de 5 minutos (15 μL por minuto), seguido de manutenção da agitação e resfriamento por 20 minutos. À solução se adicionou 1 mL de éter etílico gelado que promoveu a precipitação de um sólido branco. O sólido foi filtrado e prontamente solubilizado em 3 mL de acetona em um balão de 5 mL, em banho de gelo, seguido de adição do BODIPY **8** (45 mg, 0,134 mmol). À solução formada se adicionou lentamente uma solução do catalisador ferroceno (11 mg, 0,06 mmol) em 1 mL de acetona. Após completa adição do ferroceno, o banho de gelo foi removido e a reação foi mantida sob agitação 20 minutos à temperatura ambiente (25 °C). O controle da reação foi feito por cromatografia de camada delgada (CCD) e a purificação dos produtos formados foi realizada por cromatografia em coluna de sílica utilizando misturas de hexano e acetato de etila como fase móvel.

3.1.3. DERIVADOS 3-(4-AMINOFENIL) BODIPYs

Também foi utilizado o grupo 4-aminofenil para o desenvolvimento de mais um grupo de sondas fluorescentes para pH, a fim de se estudar a influência de unidades sensoriais distintas sobre núcleo BODIPY. A preparação e caracterização de 8-aminofenil BODIPYs (**Figura 15.a**) já é bem descrita.^[44,16] Assim, neste trabalho estudamos um outro derivado no qual o anel anilina se encontra na posição 3 do BODIPY (**Figura 15.b**), investigando a influência da protonação do grupo anilina.

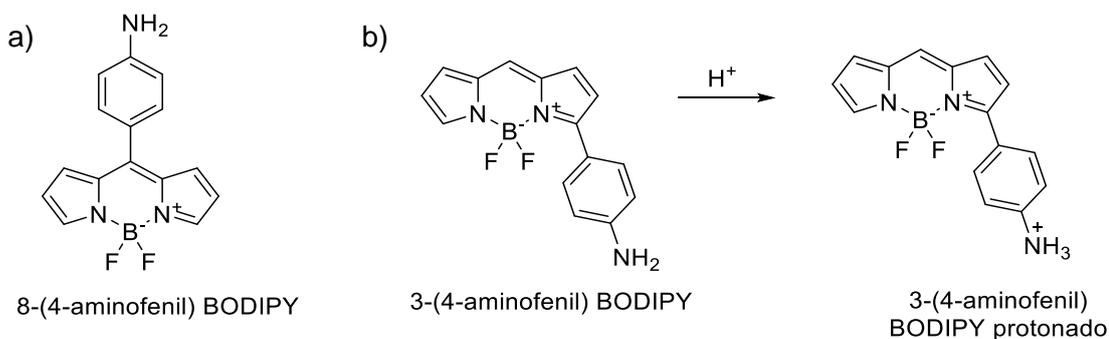
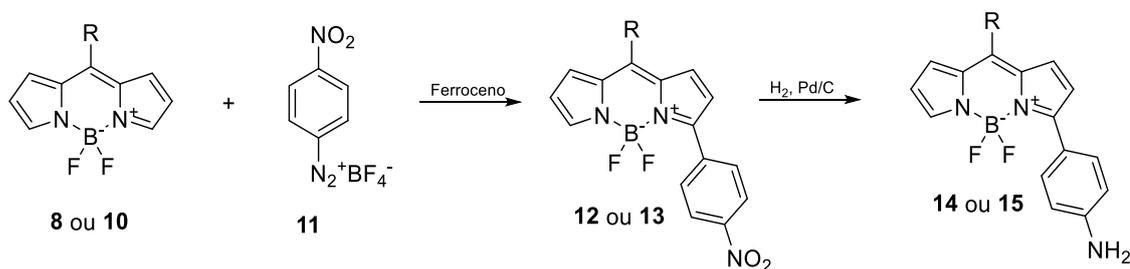


Figura 15 – Derivados aminofenil BODIPYs. a) 8-aminofenil BODIPY; b) Protonação do grupo 4-aminofenil.

Para esse estudo foram utilizados dois intermediários sintéticos de uma rota sintética realizada anteriormente pelo grupo de pesquisa (**Figura 16**).^[39] Nessa rota sintética se utiliza como precursor dois derivados distintos do BODIPY (compostos **8** e **10**) a partir dos quais, através de uma reação de arilação radicalar direta,^[62] se obtêm os derivados substituídos na posição 3 pelo anel 4-nitrofenil (compostos **12** e **13**). Por fim, através de uma hidrogenação catalítica, há a formação do composto final 3-(4-aminofenil) substituído (compostos **14** e **15**), que foram estudados neste trabalho como sensores de pH.



Para **10**, **12** e **14**. R = fenil
 Para **8**, **13** e **15**. R = 2,6-diclorofenil

Figura 16 – Rota sintética dos derivados 3-(4-aminofenil) BODIPYs

3.2. Caracterização fotofísica dos derivados do BODIPY

3.2.1. RENDIMENTO QUÂNTICO DE FLUORESCÊNCIA

Os compostos **14** e **15** foram caracterizados em relação ao rendimento quântico de fluorescência pelo método comparativo,^[64] usando a Rodamina B em metanol^[65] como padrão no comprimento de onda de excitação 520 nm ($\Phi_{\text{Rodamina-B}} = 0,70$). Esta medida foi realizada em metanol (MeOH), acetonitrila (MeCN) e dimetilsulfóxido (DMSO) acidificados com HCl concentrado. Para essa caracterização uma solução foi preparada com uma absorbância de aproximadamente 0,1, de cada fluoróforo em cada solvente. Em seguida, a leitura do espectro de absorção e de emissão foi realizada nos equipamentos UV-VIS Lambda 45 PerkinElmer e Fluorímetro LS 55 Perkin-Elmer, respectivamente, presentes no Laboratório de Instrumentação do LabPetro. Dessa solução inicial foram realizadas sucessivas diluições, lendo a absorção e a emissão após cada diluição. A curva da absorbância em 520 nm foi plotada *versus* a área do pico de emissão de cada diluição. Foi feito também o mesmo

procedimento para o padrão Rodamina B. Através do coeficiente angular de ambas as curvas se calculou o rendimento quântico utilizando a seguinte equação:

$$\Phi_x = \Phi_p \frac{\alpha_x}{\alpha_p} \left(\frac{\eta_x}{\eta_p} \right)^2$$

Sendo Φ o rendimento quântico; α o coeficiente angular obtido para a curva e η o índice de refração do solvente; com o coeficiente p correspondendo ao padrão rodamina e o x ao composto **14** ou **15**.

3.2.2. TITULAÇÕES ESPECTROFOTOMÉTRICA E FLUORIMÉTRICA

A fim de estudar o efeito do pH sobre a absorção e emissão desses fluoróforos foram realizadas titulações espectrofotométricas e fluorimétricas do meio ácido até o pH 7 aproximadamente, uma vez que se objetiva o uso em biologia celular. Para este ensaio soluções dos fluoróforos a 10^{-5} mol.L⁻¹ foram preparadas, a partir de soluções estoques de 1,0 mg.mL⁻¹, e acidificadas com HCl, até pH 1, aproximadamente, realizando a leitura do espectro de absorção e emissão. A solução foi gradualmente alcalinizada, com solução aquosa concentrada de NaOH, e novas análises de absorção e de fluorescência foram realizadas, obtendo espectros em diferentes condições de pH. Todo esse processo foi realizado a temperatura ambiente, aproximadamente 25°. A acidificação e a alcalinização do meio foram realizadas utilizando soluções concentradas, a fim de evitar diluições significativas da solução do fluoróforo.

Para se verificar a aplicabilidade desses sensores, o pKa dos mesmos foi determinado. Sabe-se que a piridina possui um pKa de 5,2,^[66] a anilina de 4,7^[67] e a benzilamina de 9,4,^[67] porém devido a presença do núcleo BODIPY se espera uma redução significativa desses valores de pKa. O cálculo foi realizado tanto a partir dos dados de absorção quanto de emissão. Para isso, duas curvas de titulação foram plotadas, uma curva de titulação espectrofotométrica e a outra de titulação fluorimétrica. As curvas foram obtidas através dos valores de absorção e intensidade de fluorescência referentes ao comprimento de onda máximo da molécula protonada. E a partir de cada uma das curvas um cálculo de pKa foi efetuado, para fins comparativos, se obtendo um pKa relacionado à absorção e outro à emissão.

Para o cálculo do pKa foi feito um ajuste não linear sigmoidal dos dados na equação a baixo, tendo como variáveis I_{max} , I_{min} e K_a .

$$I = \frac{I_{max}[H^+]^n + I_{min}K_a}{K_a + [H^+]^n}$$

I corresponde a intensidade de fluorescência ou a absorbância; n a estequiometria da ligação de H^+ ao sensor; K_a a constante de acidez da sonda; e I_{max} e I_{min} a maior e menor intensidade. O valor n foi mantido fixo em 1 no ajuste da curva. O cálculo do pKa foi realizado no Microsoft Excel 2007 (Microsoft Corporation) através da ferramenta solver.

Essas titulações foram desempenhadas em meio aquoso, uma vez que esse é o meio em que os processos biológicos ocorrem. Porém, devido à baixa solubilidade dos BODIPYs, que é bem relatada na literatura,^[68] o estudo foi realizado na presença de co-solventes. As titulações dos derivados 3-benzilamino e 3-(piridin-3-il) foram realizadas utilizando como co-solvente o DMSO 30%. Para a leitura dos espectros se utilizou o espectrômetro USB2000, da Ocean Optics, acoplado com o sistema de amostragem integrado USB-ISS-UV/VIS, para as análises espectrofotométricas, e acoplado com um LED azul, para as análises fluorimétricas. Porém, uma vez que alguns espectros de absorção do grupo 3-benzilamino apresentaram bandas deformadas, foi feita uma duplicata das titulações em um outro equipamento mais robusto. Utilizando então o Espectrofotômetro Evolution® 300 Thermo Scientific, presente no LABIOM (Laboratório Multiusuário de Análises Biomoleculares).

Para os Derivados 3-(4-aminofenil) foi realizado um estudo dos fluoróforos dissolvidos em diferentes co-solventes orgânicos: DMSO 30 %, MeOH 30 % e MeCN 30 %. Em um primeiro momento as titulações foram realizadas alternando o pH de forma mais minuciosa, fazendo a leitura em aproximadamente cada 0,3 unidades de pH acrescentada. Porém problemas de solubilidade foram constatados, o que nos levou a realizar a titulação com um intervalo maior de pH a fim de amenizar esse problema. A fim de produzir uma medida mais exata do pKa os experimentos foram realizados em triplicata. Os equipamentos utilizados nesses ensaios foram o Espectrofotômetro Evolution® 300 Thermo Scientific, presente no LABIOM (Laboratório Multiusuário de Análises Biomoleculares), para absorção, e o Fluorímetro

LS 55 Perkin-Elmer, presente no Laboratório de Instrumentação do LabPetro, para emissão. Foram utilizados os comprimentos de excitação de 522 e 530 nm para os compostos **14** e **15**, respectivamente. Também foi investigado para esses compostos o comportamento como sensores de pH em meio orgânico através dos espectros de absorção e emissão desses fluoróforos protonados e desprotonados. Para isso, os compostos **14** e **15** foram dissolvidos em MeOH, MeCN e DMSO com uma concentração final de $1,4 \times 10^{-6}$ mol.L⁻¹ e $5,6 \times 10^{-6}$ mol.L⁻¹, respectivamente, e seus espectros de absorção e emissão foram registrados antes e após a adição de HCl concentrado. Para os espectros de emissão se utilizou o comprimento de onda de excitação de 500 nm e a fenda de emissão de 5 nm, exceto para o composto **15** em MeOH e MeCN acidificados, cuja fenda foi de 2,5 nm.

3.3 Cálculos teóricos

Para os derivados 3-(4-aminofenil) BODIPYs foram realizados alguns cálculos teóricos, a fim de se compreender melhor as suas propriedades fotofísicas. Para isso se utilizou o software Avogadro 1.2.0 para o desenho tridimensional das estruturas, utilizando o campo de força UFF, e realizando otimizações dependendo do cálculo. Para o cálculo do dipolo e dos orbitais de fronteira das moléculas as otimizações foram realizadas através do método semi-empírico PM7 e do programa MOPAC 2016™. Para os cálculos dos orbitais de fronteira do BODIPY, da fenilamina e do fenilamônio as otimizações foram realizadas através da Teoria do Funcional de Densidade (DFT), utilizando o programa Orca 4.2.1, nesses cálculos foram utilizados: o funcional híbrido B3LYP com o conjunto de base orbital def2-TZVP, a base auxiliar def2/J, a aproximação RIJCOSX e os critérios de convergência Tight SCF com grades de integração aumentadas (Grid5 Finalgrid 6). Após o cálculo, as superfícies foram renderizadas usando o pacote Avogadro.

3.4 Ensaios de viabilidade celular

Como sensores fluorescentes com aplicação biológica requerem baixa toxicidade nas concentrações adequadas para imagens, foi realizado o ensaio de redução do MTT com o intuito de verificar a citotoxicidade dos derivados 3-(4-aminofenil) e de alguns derivados 3-benzilamino, que foram aqueles que apresentaram sensibilidade ao pH. A alta sensibilidade das técnicas fluorescentes demanda a utilização de baixas concentrações de fluoróforos em ensaios de microscopia de fluorescência, por isso o

teste de viabilidade celular foi feito com concentrações relativamente baixas dos fluoróforos. Para esse ensaio células da linhagem MCF-7 foram semeadas, em placas de 96 poços, em uma densidade de 9×10^3 células por poço, utilizando o meio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado com 10 % de soro fetal bovino. Esse plaqueamento foi realizado utilizando 90 μL de suspensão celular a uma concentração aproximada de 10^5 células/mL. Após o plaqueamento as placas foram incubadas em estufa à 37 °C com 5 % de CO_2 por 24 horas. Posteriormente, as células foram tratadas com 10 μL das sondas 14 e 15 em concentrações de 1, 5, 10, 50 ou 100 μM ou ainda com 10 μL de DMSO 5 % e, em seguida, foram incubadas novamente à 37 °C e 5 % de CO_2 , por 72 horas. Finalizada a incubação foi adicionado 10 μL de MTT ($5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) em cada poço e incubado por mais 4 horas. Finalmente, o meio foi removido, os cristais de formazan foram solubilizados em DMSO e a absorbância foi medida (em 570 nm) em um leitor de microplacas EPOCH 2TC BioTek. Cada tratamento foi testado em quatro poços por placa e o ensaio foi realizado em triplicata, sendo duas placas feitas no mesmo dia e outra uma semana depois. As células tratadas sem os fluoróforos, apenas com DMSO 5 %, foram utilizadas como controle e sua viabilidade celular foi fixada em 100%. Foi realizado também o branco com o meio, sem células e sem os compostos. A análise dos dados foi realizada com Microsoft Excel 2007 (Microsoft Corporation).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. 3-benzilamino BODIPYs como sensores de pH

Conforme mencionado na sessão de materiais e métodos para esses derivados os espectros de absorção foram realizados em dois aparelhos distintos, porém foi verificado que os espectros se reproduzem. Com isso, se optou por mostrar os resultados do espectrofotômetro mais robusto. Entretanto, o espectro do composto **4** foi representado com o espectro do outro equipamento, que apresentou menos ruído.

4.1.1. CARACTERIZAÇÃO DO COMPOSTO 1

Ao realizar a titulação espectrofotométrica do composto **1** (**Figura 17a**) foi observado que esse cromóforo possui uma banda com formato questionável e absorção máxima em aproximadamente 526 nm. Foi constatado também uma variação duvidosa da absorbância com a mudança de acidez do meio. Com isso, considerando que no decorrer da titulação era observado a deposição do composto às vidrarias, se suspeitou que essas incongruências poderiam ser consequências da baixa solubilidade do composto. Problemas de solubilidade ocasionam uma variação na concentração do cromóforo na solução, que por sua vez, segundo a Lei de Beer, influencia diretamente na absorbância; além de poder causar espalhamento da radiação se ocasionar partículas suspensas.^[2] Assim, a fim de dirimir essa incerteza foram realizadas duas varreduras – no início da faixa utilizada (pH \approx 1) e no extremo da mesma (pH \approx 7) – com o intuito de reduzir o tempo de análise, e conseqüentemente a quantidade de fluoróforo perdida. Foi invertida a ordem da leitura também, com a intenção de certificar a verdadeira influência do pH, assim, uma vez que as titulações foram realizadas do meio ácido para o neutro/básico nesse ensaio se procedeu do pH neutro/básico para o ácido. Posto que a baixa solubilidade em meio aquoso é uma tendência dos BODIPYs,^[68] e que esse comportamento de deposição se reproduziu nos demais compostos, a mesma análise foi implementada em todos os compostos. Este ensaio também foi efetuado para as titulações fluorimétricas.

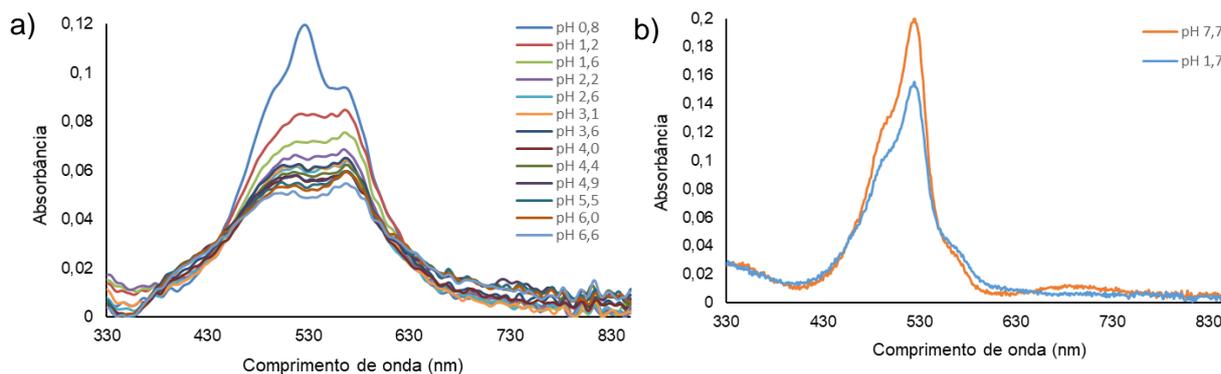


Figura 17 – Absorção do composto 1. a) Titulação espectrofotométrica entre pH 0,8 e 6,6; b) Espectros de absorção em pH 7,7 e 1,7.

Desta forma, os espectros realizados para averiguar os resultados obtidos na titulação espectrométrica (**Figura 17b**) mostrou que de fato a solubilidade estava influenciando a absorção do composto 1. Isso é constatado ao observar que nesse ensaio o espectro de maior absorção é resultado do cromóforo em meio quase neutro (**Figura 17b**; pH = 7,7), entretanto no ensaio prévio de titulação o mesmo era resultado do meio ácido (**Figura 17a**; pH = 0,8). Semelhantemente, o espectro de menor absorção, no qual no primeiro ensaio foi constatado em meio quase neutro (**Figura 17a**; pH = 6,6), já nesse ensaio em meio ácido (**Figura 17b**; pH = 1,7). Mostrando com isso que a variação na absorbância não concerne ao pH, mas sim à sequência das medidas, pois a concentração do cromóforo diminui em medidas sucessivas, devido à progressiva deposição do composto. Foi certificado também que a banda não se altera nem se desloca com o pH, permanecendo com o comprimento de onda de absorção máxima (λ_{abs}) em 525 nm. Igualmente no ensaio de titulação realizado a priori. Na região de 630 a 830 nm observa-se um perfil espectral que se aparenta a uma banda larga de intensidade reduzida, porém testes em pH maior que 7,7 não mostraram o aumento desse perfil. Por fim, foi observada a formação de uma banda congruente, fina e definida, característica dos BODIPYs.^[69] Essa observação evidencia uma imprecisão em relação ao ensaio de titulação, o qual pode ter sido ocasionada por problemas de solubilidade ou a erros sistemáticos não constatados. Entretanto, as averiguações fornecidas por essas análises são suficientes para constatar que o pH não acarreta o desvio da banda nem alteração no perfil da absorbância, ou seja, a absorção do composto 1 não é sensível ao pH.

Através da titulação fluorimétrica do composto 1 e do ensaio realizado de duas varreduras (**Figura 18**) foi observado que a protonação da 3-benzilamina não altera o

comprimento de onda máximo do pico de emissão (λ_{em}), que permanece, para ambos os ensaios, em aproximadamente 549 nm, independentemente do pH. Também percebemos que efetivamente não há variação da fluorescência devido ao pH, uma vez que a curva de maior absorbância é resultado de meios distintos, no ensaio anterior correspondia ao meio ácido (**Figura 18a**; pH = 1,4) e nesse ensaio ao meio básico (**Figura 18b**; pH = 7,7).

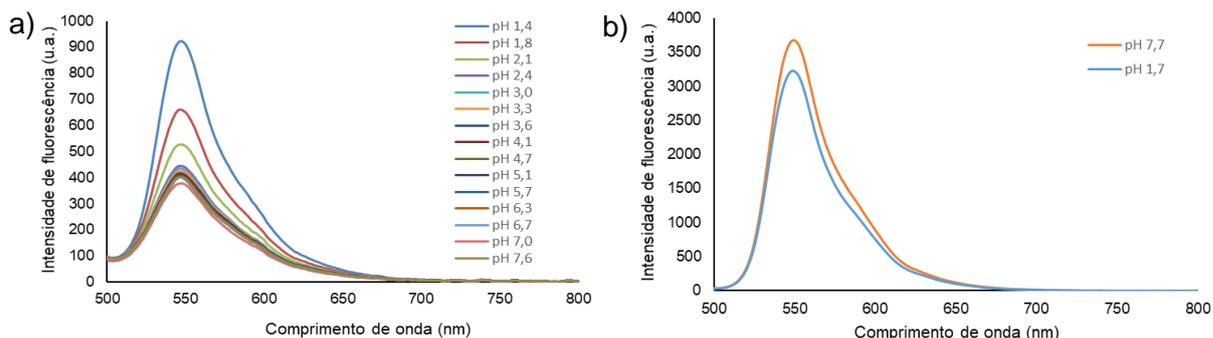


Figura 18 – Emissão do composto 1. a) Titulação fluorimétrica entre pH 1,4 e 7,6; b) Espectros de emissão em pH 7,7 e 1,7.

Com isso, confirmamos que o composto 1 não pode ser utilizado como um sensor de pH em meio aquoso. Pois não possui propriedades fotofísicas sensíveis ao pH.

4.1.2. CARACTERIZAÇÃO DO COMPOSTO 2

A titulação espectrofotométrica do composto 2 (**Figura 19a**) mostrou uma nítida alteração no formato da banda de absorção com o aumento do pH, resultando em uma banda de comprimento de onda maior, chamado de deslocamento ou efeito batocrômico. Essa observação confirmada no ensaio de duas varreduras (**Figura 19b**), onde também foi observado, com a desprotonação, o deslocamento da banda em 526 nm para, aproximadamente, 562 nm.

Do mesmo modo, os ensaios de emissão (**Figura 20**) apresentam um desvio batocrômico visível, de 552 a 587 nm, com a desprotonação. Também é perceptível a queda de intensidade de fluorescência, efeito hipocrômico, confirmado pelos espectros complementares em pH = 7,2 e pH = 1,2 (**Figura 20b**). O efeito hiperacrômico do meio neutro para o meio ácido no ensaio de dois pontos foi tal que foi necessário diminuir o tempo de integração do espectro no meio ácido, pois o mesmo extrapolou a escala (**Anexo 1**).

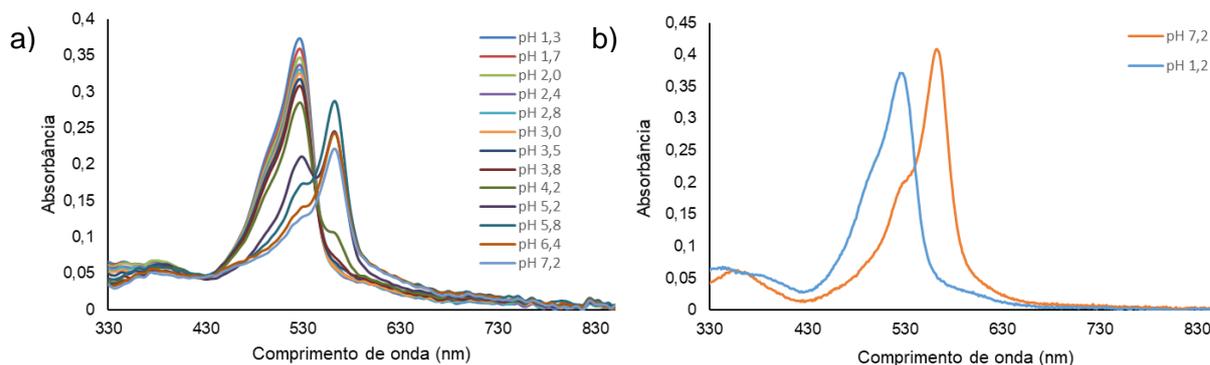


Figura 19 – Absorção do composto 2. a) Titulação espectrofotométrica entre pH 1,3 e 7,2; b) Espectros de absorção em pH 7,2 e 1,2.

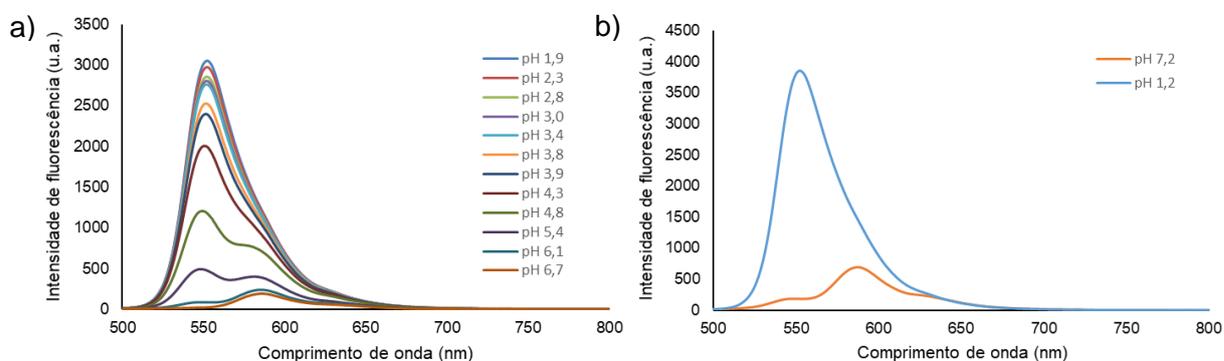


Figura 20 – Emissão do composto 2. a) Titulação fluorimétrica entre pH 1,9 e 6,7; b) Espectros de emissão em pH 7,2 e 1,2.

Uma vez que esses compostos apresentaram um comportamento interessante para serem utilizados como sensores de pH em meio aquoso se realizou um ensaio de dois pontos destes em DMSO puro e DMSO com gotas de HCl concentrado a fim de se verificar se esse comportamento ocorria somente em meio aquoso, se haveria a presença de algum agregado – uma vez que em DMSO eles são altamente solúveis – e poder caracterizar melhor essas sondas. Ambos os espectros em DMSO, de absorção (**Figura 21a**) e de emissão (**Figura 21b**), continuaram com o mesmo perfil espectral que os correspondentes em meio aquoso, apresentando para a molécula protonada um deslocamento hipsocrômico, de $\lambda_{\text{abs}} = 566 \text{ nm}$ para $\lambda_{\text{abs}} = 535 \text{ nm}$ e de $\lambda_{\text{em}} = 591 \text{ nm}$ para $\lambda_{\text{máx}} = 564 \text{ nm}$, respectivamente. Na emissão o efeito hipercrômico também se repetiu, sendo um sinal de algum processo no estado excitado interferindo no rendimento quântico.

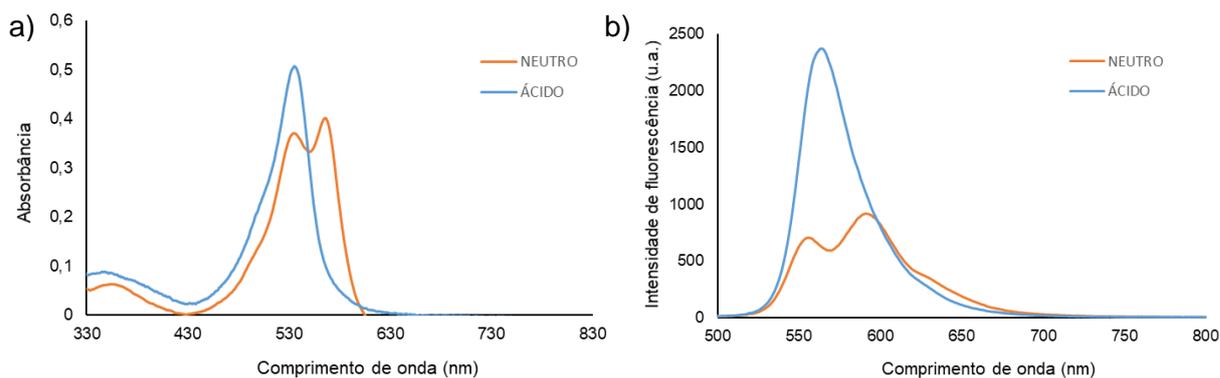


Figura 21 – Absorção e emissão do composto **2** em dimetilsulfóxido (DMSO).
a) Absorção; b) emissão.

Assim, essas constatações indicam que essa sonda pode ser potencialmente utilizada como um sensor de pH fluorescente ratiométrico. Essas observações revelam que o composto **2** protonado e desprotonado possuem estados excitados distintos, acarretando na absorção e emissão em diferentes comprimentos energéticos. O fluoróforo absorve energia e logo em seguida perde parte dela por processos dinâmicos, não radiativos, como relaxação vibracional, levando a um primeiro estado excitado (**Figura 22**), que, por sua vez, depende de o composto estar protonado ou não. (S_1^P representa o estado excitado do fluoróforo na forma protonada, e S_1^D na forma desprotonada). Esse estado, conforme evidenciado no espectro de absorção, será mais energético se o composto **2** estiver no estado protonado. Após a formação desse estado excitado inicial, há conversões internas, que estabilizam esses estados, os tornando menos energéticos, o que dependem, mais uma vez, da protonação para ditar seu nível de energia. Por fim, esse estado excitado de menor energia relaxa através de decaimento radiativo, fazendo que fluoróforo volte ao seu estado fundamental. Assim, observa-se a emissão em comprimentos de onda maiores para o estado desprotonado, que é menos energético, e comprimentos de onda menores para o estado protonado, que é mais energético (**Figura 10, 11 e 14**). Esses estados excitados podem variar também em estrutura, podendo alterar a taxa de decaimento não radiativo (k_{nr}) da molécula, e com isso a intensidade de fluorescência.

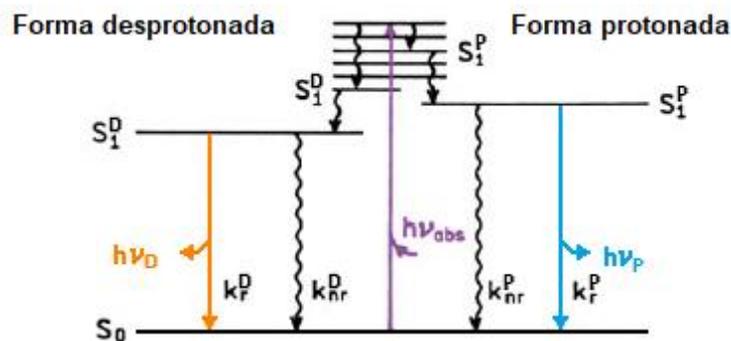


Figura 22 – Princípio de reconhecimento de um sensor ratiométrico. Diagrama de Jablonski adaptado. Modificado.^[3]

Esse comportamento é semelhante ao encontrado em sensores de cátions com sítio de reconhecimento rico em elétrons baseados em estado ICT, nos quais o sensor livre tem um estado excitado polar mais estabilizado do que o do estado ligado ao analito (**Figura 08**), resultando, assim em um deslocamento hipsocrômico com o reconhecimento. Como o grupo benzilamino atua como doador de elétrons e o BODIPY tanto como doador e aceitador,^[15] é considerável propor que possa ocorrer no composto **2** excitado a formação de um estado ICT do benzilamino para o BODIPY que é aumentado pela protonação.

Dado que há a variação dos espectros com o pH, as curvas de titulação espectrofotométrica (**Figura 23a**) e de titulação fluorimétrica (**Figura 23b**) foram plotadas, obtendo os valores de pKa de 4,7 e 4,6, respectivamente. Ambas as curvas apresentaram um bom ajuste aos dados experimentais, no entanto, conforme mostrado pela **Figura 23**, a titulação fluorimétrica apresentou uma melhor precisão. Foi constatado também que os dados estão coerentes com o valor esperado pelos espectros ($\approx 5,0$) e pelos grupos orgânicos presentes na molécula. Uma vez que a 4-metóxi-benzilamina tem seu par de elétrons não ligantes conjugado ao núcleo BODIPY – que apresenta um sistema altamente conjugado – deslocalizando esses elétrons, e com isso diminuindo drasticamente a basicidade dessa amina. Com isso era esperado uma queda significativa do pKa da 4-metóxi-benzilamina ($pK_a = 9,3$), a qual foi realmente observada. Assim, dispomos de um sensor potencialmente proveitoso em uma faixa de pH de 3,6 a 5,7. Um exemplo de utilização dessa faixa são as funções celulares dos lisossomos, que ocorreram em pH entre 4,5 e 5,5.^[24]

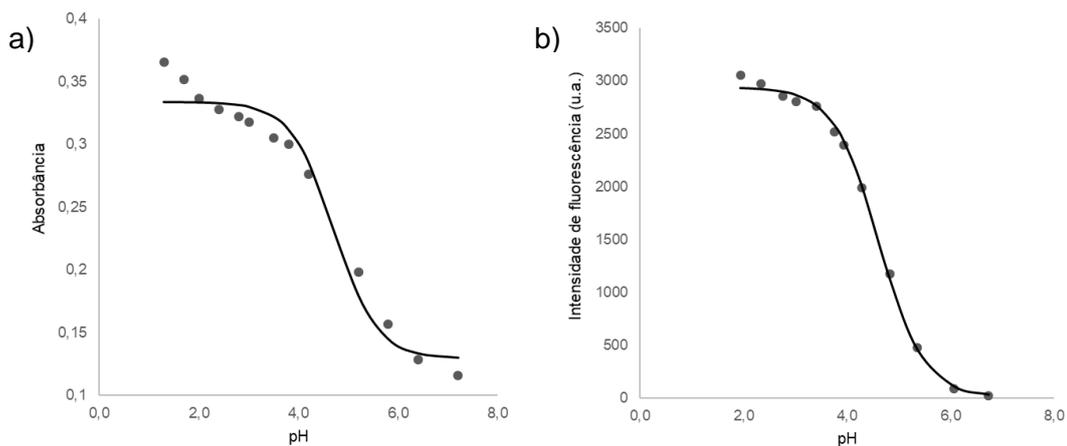


Figura 23 – Curvas de titulação do composto **2**. a) Curva espectrométrica; b) Curva fluorimétrica.

Dessa maneira, a análise dos dados dos compostos **1** e **2** denotam que enquanto o composto **2** se mostra como um sensor, aparentemente útil, de pH, o mesmo não pode ser dito sobre o composto **1**. Verificando as estruturas desses compostos (**Figura 24**) se constata que a diferença entre eles está na presença do grupo tiocianato conjugado ao sistema BODIPY, indicando que a presença desse grupo altera de alguma forma as propriedades eletrônicas do composto **2** no estado excitado, levando-o a possuir propriedades diferentes.

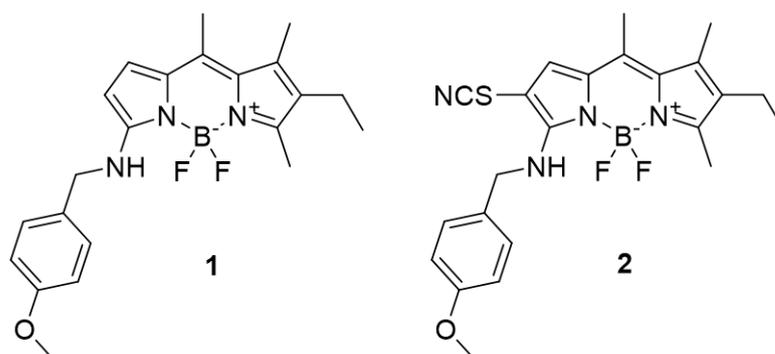


Figura 24 – Estruturas do composto **1** e **2**.

Como o comportamento de reconhecimento de prótons do composto **2** se assemelhou a um reconhecimento baseado em um mecanismo ICT, foi realizada uma investigação mais pormenorizada das interações mesoméricas presentes nessas duas moléculas, e a interferência do grupo tiocianato nelas. Para isso se escreveu as principais formas canônicas que contribuem para as estruturas reais do composto **1** e **2**, tanto protonado quanto desprotonado (**Figura 25a** e **25b**). As setas curvas pretas

mostram as deslocalizações presentes em ambos compostos, e as azuis aquelas que só ocorrem na presença do grupo tiocianato, ou seja, para o composto **2**. Essas estruturas próprias do composto **2** foram representadas com os átomos em azul.

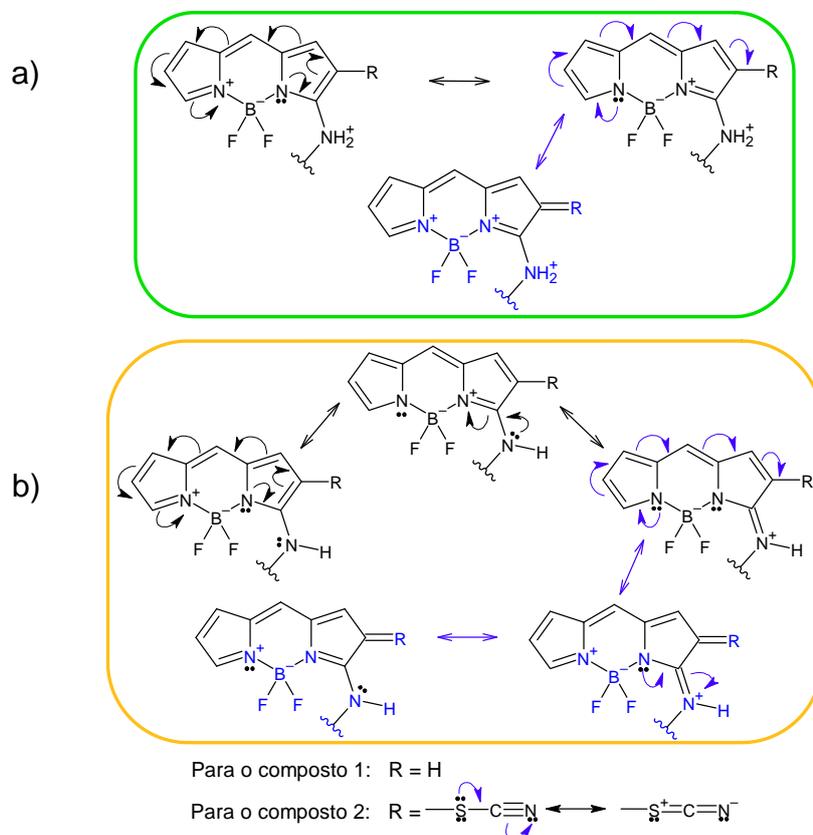


Figura 25 – Estruturas de ressonância para os 3-benzilaminos BODIPYs. a) Compostos protonados; b) Compostos desprotonados.

Analisando as estruturas de ressonância dos dois compostos desprotonados (**Figura 25b**) se observa que no composto **1** a benzilamina atua como um grupo doador de elétrons para o grupo BODIPY, podendo permitir um estado ICT para esta molécula excitada. Já para o composto **2** se observa uma doação de carga em direção ao cianeto, atuando o BODIPY conjugado a amina como o grupo doador, permitindo assim um possível estado ICT distinto. No entanto, para as moléculas protonadas (**Figura 25a**) se observa que no composto **1** não há mais interação entre a amina e o BODIPY, só há a ressonância do próprio BODIPY, indicando a ausência de um estado ICT. Já para o composto **2** a interação do BODIPY com o tiocianato permanece, sugerindo que ainda pode haver a formação de um estado ICT.

Conferindo os espectros de ambos os compostos se observou que os espectros de absorção e emissão do composto **1**, protonado e desprotonado, são semelhantes

aos espectros de absorção e emissão do composto **2** protonado (**2-H⁺**). Assim, por diferir somente os espectros do composto **2** desprotonado induz a supor, em um primeiro momento, que o tiocianato influencia somente no estado excitado do último. Porém, como visto nas estruturas de ressonância dos compostos, observa-se que o tiocianato age como retirador de elétrons, por efeito mesomérico, diminuindo a densidade eletrônica do BODIPY **2**, no estado fundamental, tanto quando a amina está protonada, quanto quando está desprotonada. Sugerindo que este, de igual modo, possa estar alterando o estado excitado da molécula **2**, independentemente da protonação. Além disso uma comparação dos resultados obtidos em meio aquoso 30% DMSO, nesse trabalho, com resultados em acetonitrila, obtidos em um artigo publicado pelo grupo de pesquisa no trabalho em que os compostos 3-benzilamínicos foram sintetizados,^[41] revela que os compostos **2** e **1** possuem o mesmo comportamento em meio aquoso (**Figura 26**). Porém com o composto **2** protonado apresentando comprimentos de onda de absorção e emissão desviados para o azul, 519 e 545 nm, respectivamente, em comparação com os obtidos nesse trabalho em meio aquoso $\lambda_{\text{abs}} = 526$ e $\lambda_{\text{em}} = 552$ nm. Todavia, os demais espectros, os do composto **1** e do composto **2** desprotonado, continuam com a absorção e a emissão em comprimentos de onda semelhantes, indicando que o estado do composto **2-H⁺** não é semelhante aos demais estados, por apresentar um solvatocromismo não observado para as demais moléculas. Ademais, analisando o ensaio em DMSO (**Figura 21**) com o do meio aquoso (**Figura 19 e 20**) e com o do artigo em MeCN (**Figura 26**)^[41] se observa um solvatocromismo do estado **2-H⁺** de 9 nm e 16 nm, respectivamente. Entretanto nenhum solvatocromismo significativo é observado para o composto **2** desprotonado. Esse fator indica um estado ICT significativamente polar para o estado **2-H⁺**, uma vez que foi uma diferença relativa a solventes polares. Com isso, uma revisão na literatura foi feita a fim de entender esse comportamento observado, onde aparentemente se tem dois estados excitados diferentes apresentando uma absorção e emissão semelhante.

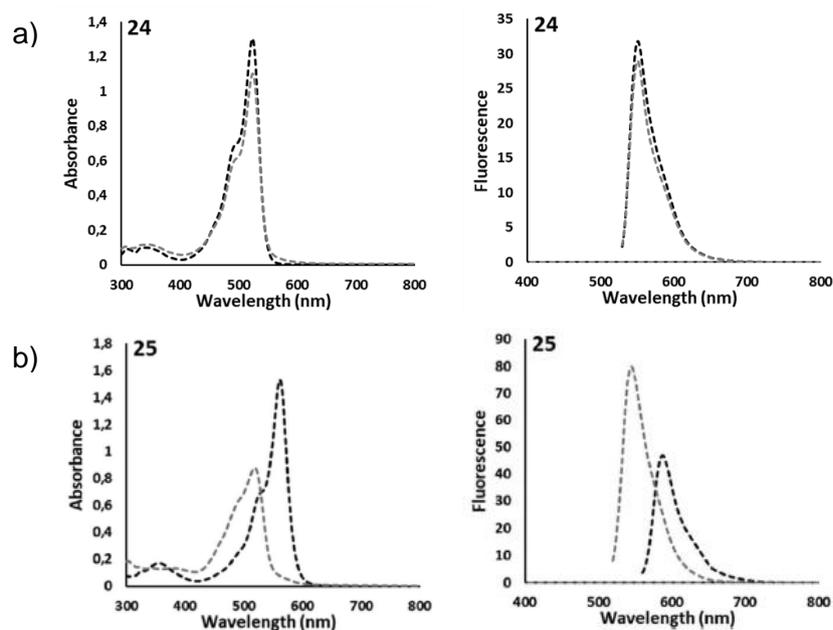


Figura 26 – Espectros de absorção e emissão em acetonitrila. a) Composto **1**; b) Composto **2**. Tracejados cinza – com adição de ácido trifluoroacético (TFA). Preto – sem adição de TFA.^[41]

A literatura mostra que um estado ICT característico difere substancialmente do seu estado fundamental de origem, tendo sua eficiência determinada pela separação da carga gerada ($D^+ \cdots A^-$) após a fotoexcitação.^[12] Um estado excitado de cargas separadas $[D^+A^-]^*$, ou seja, altamente eficiente e polar, não possui interação entre a parte doadora e aceptor, é um estado onde a sobreposição dos orbitais de D^+ e A^- é zero ou desprezível, o levando a possuir propriedades fotofísicas peculiares provenientes dessa localização de carga.^[16] Quando há essa separação de carga de forma eficiente a estrutura eletrônica de cada parte corresponde ao estado fundamental do íon radical livre de carga oposta, e assim o espectro corresponde à soma dos espectros dos subsistemas componentes (cromóforos locais), o ânion radical A^- e o cátion radical D^+ . Entretanto, quando há interação entre as cargas essas são estabilizadas e os espectros se desviam desse caráter. Assim sendo, a magnitude dessa peculiaridade está ligada a localização dessa carga, havendo o deslocamento, o alargamento e a diminuição das bandas à medida que há a estabilização da mesma por interações intramoleculares e/ou intermoleculares.^[12]

Assim, parece razoável atribuir que o estado ICT do composto **2-H⁺** seja um estado ICT eficiente, resultando em um espectro do BODIPY ligado com a benzilamina, semelhantemente ao do composto **1**. Visto que o tiocianato não absorve no visível. O

mesmo estado explica ainda o hipocromismo observado para molécula desprotonada, uma vez que, normalmente, a eficiência do estado ICT provém de uma geometria mais rígida, como a ortogonalidade do doador com o aceptor,^[16] diminuindo assim o decaimento não radiativo. Porém, uma vez desprotonado o nitrogênio, o núcleo BODIPY possui conjugação com a benzilamina, estabilizando melhor a carga positiva do estado ICT, fazendo com que esse estado se estabilize e o composto absorva e emita em comprimentos de onda menos energéticos. Acarretando assim o desvio para o vermelho, observado no composto **2** desprotonado. E por ser menos polar não ocasiona um solvatocromismo significativo. Como nenhum deslocamento é observado para o composto **1**, nem solvatocromico nem devido a protonação, se conclui que não há a formação de um estado ICT significativo para a molécula **1** desprotonada, resultando no mesmo espectro observado para a molécula **1** protonada e para o composto **2** protonado.

Com isso, se atribui ao tiocianato a capacidade sensorial do composto **2**, que permite à formação de um estado ICT eficiente para o estado protonado (S_1^P , **Figura 22**) e um estado ICT menos polar, com acoplamento eletrônico, para a molécula desprotonada (S_1^D , **Figura 22**).

Se conclui então que o composto **2** apresenta ambos os espectros sensíveis ao pH, podendo ser utilizado como uma sonda ratiométrica de comprimento de onda de excitação e, mais importante ainda, de emissão. Essa é uma propriedade vantajosa para um sensor, visto que essa propriedade permite determinar o pH a partir de uma razão de intensidades, independente da concentração da sonda, o que é um ganho para microscopia celular.

4.1.3. CARACTERIZAÇÃO DO COMPOSTO 3

Se observou através dos espectros de absorção e de emissão do composto **3** (**Figura 27 e 28**, respectivamente) que não há divergência nos espectros em diferentes pH. Uma vez que a diferença de intensidade nas **Figuras 27a e 28a** é explicada pelo problema de solubilidade já mencionado, mostrado nas **Figuras 27b e 28b**. A banda de absorção permanece em 479 nm e a de emissão em 538 nm, independentemente de a molécula estar protonada ou não. Assim, se observa que as propriedades fotofísicas do fluoróforo **3** em meio aquoso não são sensíveis à protonação da benzilamina, e, portanto, esse composto não pode ser utilizado como

um sensor de pH em meio aquoso. No ensaio prévio realizado e publicado anteriormente pelo grupo se observou que esse fluoróforo não seria um sensor de pH em meio orgânico também.^[41] Os espectros em acetonitrila, reportados na publicação, foram semelhantes aos encontrados neste trabalho também, não havendo mudanças significativas do comportamento da sonda com o meio. Esse fato, indica que esse composto em seu estado neutro não apresenta solvatocromismo, indicando a ausência de um estado excitado polar. Assim, essa constatação, juntamente com as observações feitas neste trabalho, sugere que esse composto não apresenta um estado ICT para ambas moléculas, protonada e desprotonada. Com isso, os dados observados para o composto **3** corroboram com o que foi descrito anteriormente para o composto **2**, que a presença do tiocianato induz uma diferença de carga.

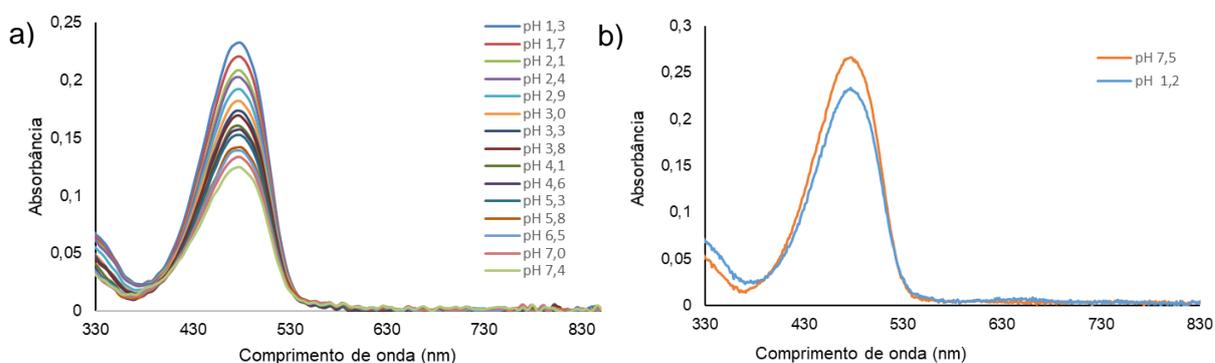


Figura 27 – Absorção do composto **3**. a) Titulação espectrofotométrica entre pH 1,3 e 7,4; b) Espectros de absorção em pH 7,5 e 1,2.

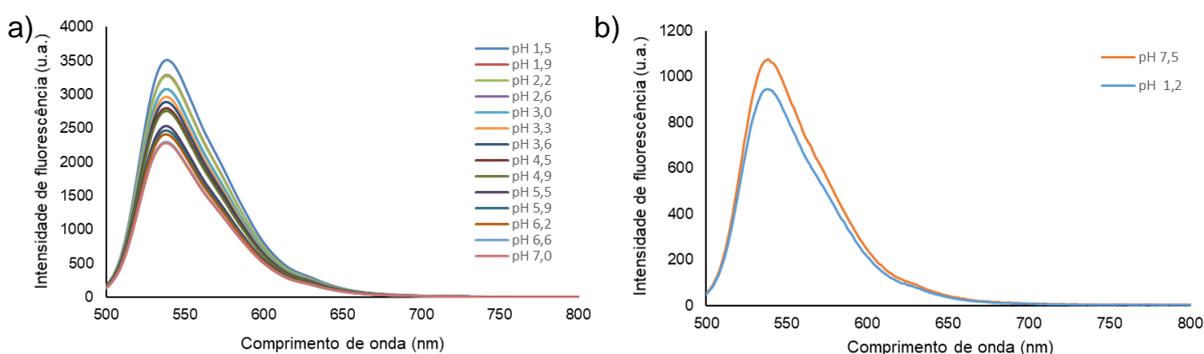


Figura 28 – Emissão do composto **3**. a) Titulação fluorimétrica entre pH 1,5 e 7,0; b) Espectros de emissão em pH 7,5 e 1,2.

4.1.4. CARACTERIZAÇÃO DO COMPOSTO 4

A avaliação dos espectros da titulação espectrofotométrica do composto **4** (**Figura 29**) nos fez constatar alguns formatos de banda anormais para BODIPYs, que, em

geral, apresentam uma banda fina típica.^[69] O ensaio de dois pontos foi realizado e houve a repetição da banda extremamente alargada (**Figura 29b**). Entretanto, foi possível visualizar que a diferença e a deformação observada nos espectros não foram devido ao pH do meio. Uma vez que a primeira leitura de ambos os ensaios, em pH 0,6 e pH 8,0, apresenta uma banda na mesma faixa espectral, independente do pH, com deformação nas leituras subsequentes. Se inferiu então que além da baixa solubilidade desse fluoróforo, poderia estar havendo uma forte agregação gerando a banda larga observada no decorrer do espectro.

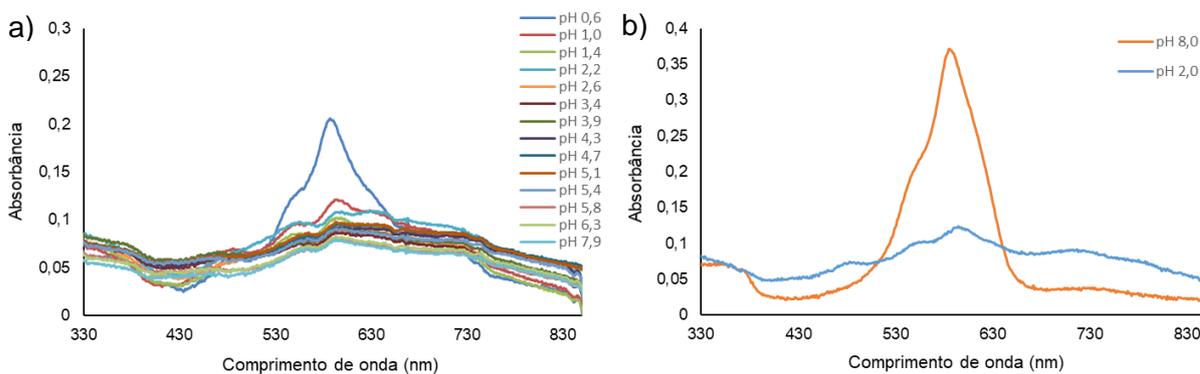


Figura 29 – Absorção do composto **4**. a) Titulação espectrofotométrica entre pH 0,6 e 7,9; b) Espectros de absorção em pH 8,0 e 2,0.

Na emissão do composto **4** o ensaio de dois pontos apresentou um ombro suspeito (**Anexo 2**), sendo necessário um novo ensaio, que foi realizado em três pontos (**Figura 30**). Nesse novo ensaio se percebeu uma banda dupla para a primeira leitura (em pH 4,34), e uma banda única, um pouco inclinada, para as leituras subsequentes (em pH 1,35 e 11,08). Uma vez que os espectros do meio básico e ácido se assemelham e a banda dupla é referente ao pH intermediário se infere que não há uma variação com pH, mas sim problemas de solubilidade e agregação que geram a perda do perfil da banda. Entretanto, a fim de se ter algo mais conclusivo foi realizado um ensaio em DMSO puro, uma vez que esses compostos são altamente solúveis nesse solvente (**Figura 31**). Esses ensaios mostraram que o sensor realmente não apresenta sensibilidade ao pH, devido os espectros do meio básico e ácido terem se assemelhado. Esses espectros mostraram também um perfil espectral parecido com as primeiras leituras em meio aquoso, inferindo que a deformação das bandas deformadas em meio aquoso, tanto na absorção como na emissão, devam a

agregação. Concluindo, assim, que o composto **4** não pode ser utilizado como um sensor de pH.

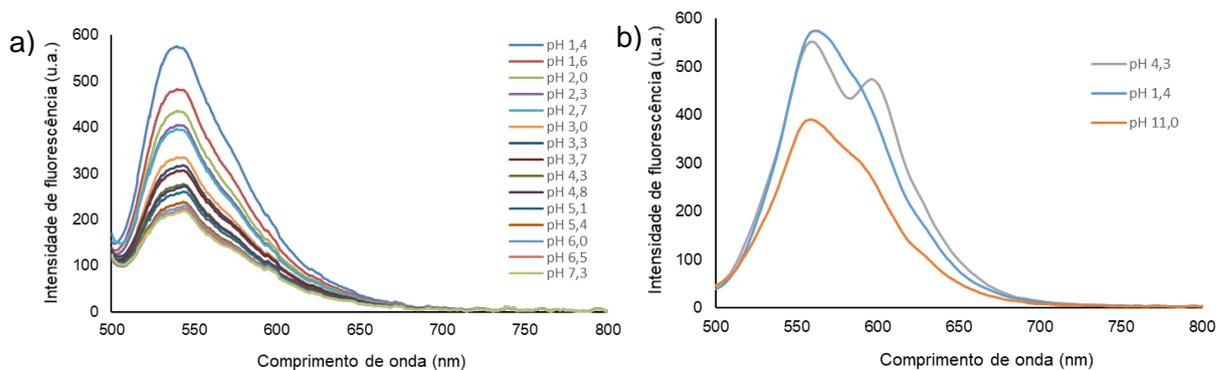


Figura 30 – Emissão do composto **4**. a) Titulação fluorimétrica entre pH 1,4 e 7,3; b) Espectros de emissão em pH 8,0 e 2,0.

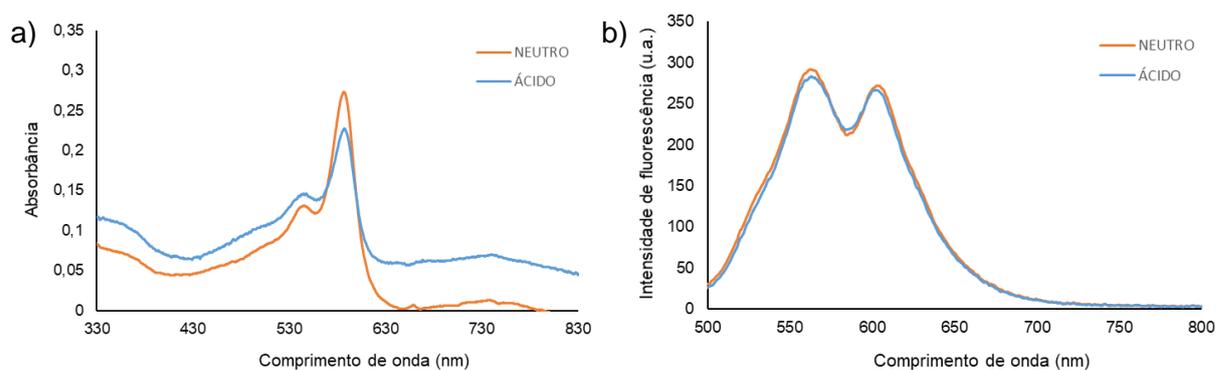


Figura 31 – Absorção e emissão do composto **4** em DMSO. a) Absorção; b) emissão.

4.1.5. CARACTERIZAÇÃO DO COMPOSTO 5

A titulação espectrofotométrica realizada para o composto **5** (**Figura 32**) mostra dois deslocamentos com a desprotonação. O que era esperado, uma vez que, a molécula possui dois sítios de ligação para o H^+ , ocorrendo dois processos de protonação/desprotonação distintos. Além da inserção de dois tiocianatos, favorecendo um estado ICT, como mencionado no composto **2**. O primeiro deslocamento observado no espectro de absorção começa a ocorrer em $pH = 2,3$, onde uma banda larga começa a aparecer em aproximadamente 550 nm, à medida que a banda em 595 nm vai desaparecendo. Esta modificação é proveniente da mudança do estado em que a molécula está duplamente protonada para o estado com uma protonação. Após essa primeira desprotonação começa em $pH 4,2$ a segunda

modificação espectral, com uma nova banda aparecendo em 639 nm. Percebemos também que a banda estruturada em 595 nm, para o estado onde a molécula está duplamente protonada, perde seu formato ao se deslocar para o estado onde está monoprotônica, com uma banda achatada, sem formato e de menor intensidade. Essa por sua vez, ao se deslocar para o estado desprotonado recupera um pouco da estrutura de banda e da intensidade da banda, porém continua menos intensa e mais larga que a banda diprotônica (pH = 7,4; **Figura 32**). Essas observações se correlacionam com as observações encontradas em meio orgânico.^[41]

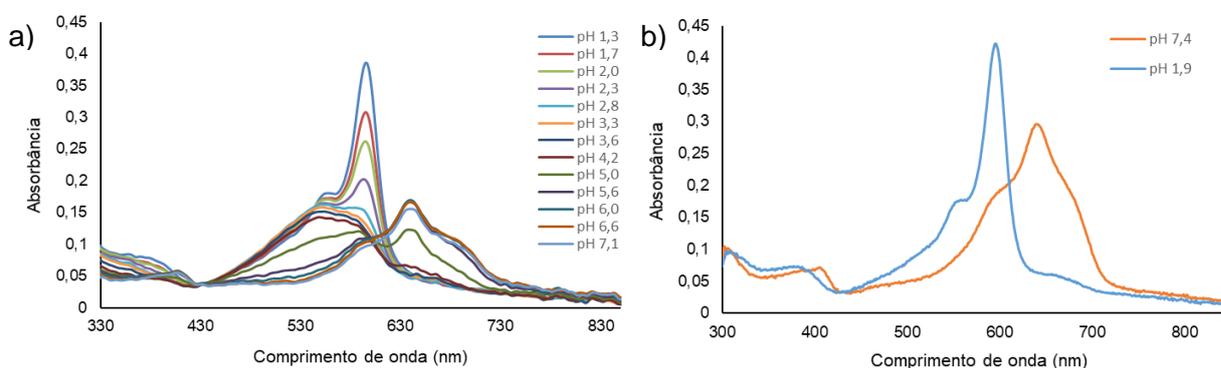


Figura 32 – Absorção do composto 5. a) Titulação espectrofotométrica entre pH 1,3 e 7,1; b) Espectros de absorção em pH 7,4 e 1,9.

Ao observar o espectro de emissão desse composto (**Figura 33**) se verificou que é possível constatar três bandas distintas também, porém a primeira modificação parece não ter sido completa, estando em pH mais baixo que 1,6. Podemos observar uma banda um pouco mais hipsocrômica em pH 1,6 com um ombro em aproximadamente 575 nm, que logo tem seu máximo ajustado para comprimentos de onda maiores e a consequente perda do ombro, gerando uma banda em 625 nm sem o ombro em pH = 3,2. Assim, se presume que a banda em pH 1,6 é uma banda de transição para o estado monoprotônico e, como consequência, o estado diprotônico se estabelece em pH mais ácido (a **Figura 34c** endossa essa observação). Com isso observamos também que a banda de absorção em 595 nm, que parecia corresponder ao estado diprotônico, também deve ser um estado de transição da banda diprotônica para monoprotônica. Por fim foi observado que em pH = 4,6 começou a se formar uma banda em 542 nm, decaindo a banda em 625 nm, e formando a nova banda, alargada e achatada, no pH 7,0, aproximadamente. Conferindo que essa

banda do estado desprotonado de fato é de menor intensidade e alargada, não sendo problema de solubilidade. (**Figura 33b**).

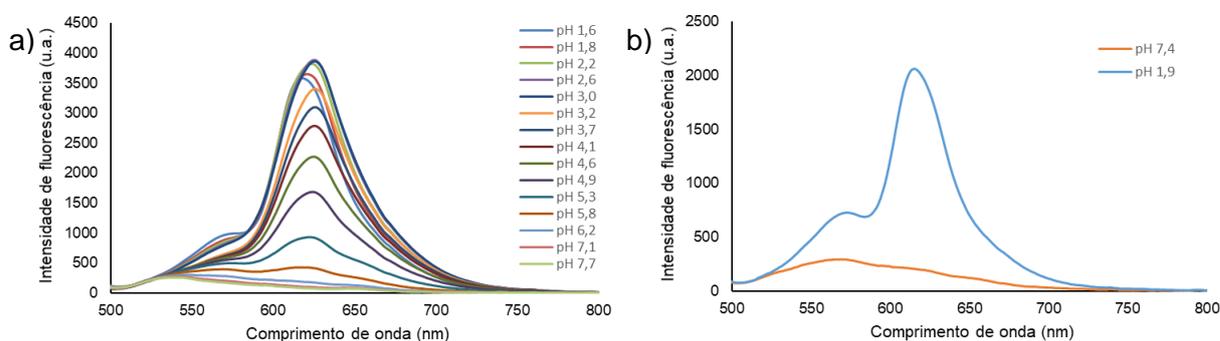


Figura 33 – Emissão do composto **5**. a) Titulação fluorimétrica entre pH 1,6 e 7,7; b) Espectros de emissão em pH 7,4 e 1,9.

Essas mudanças espectrais de absorção e emissão são devidas ao equilíbrio entre as formas dionizada, monoionizada e a neutra do composto **5**. Devido as interações que ocorrem entre o BODIPY, o tiocianato e a benzilamina, como visto para o composto **2**, se pressupõe que essas alterações observadas são devido a estados ICT distintos. Sendo o estado da molécula desprotonada o que mais possui sobreposição dos orbitais, resultando em bandas largas e uma alta supressão da fluorescência.

O pKa desse composto para a segunda desprotonação foi calculado, através do espectro de absorção (**Figura 34a**) e do de emissão (**Figura 34b**), encontrando um $pK_a = 4,9$, e $pH = 5,0$, respectivamente. O cálculo referente ao pka da primeira desprotonação não pode ser realizado, devido não ter sido possível localizar o estado diprotonado dentro da faixa de pH utilizada, como já mencionado. Esse fato é destacado na curva de titulação, proveniente da absorção (**Figura 34c**), onde o início da curva pertence a pH menores que 1,6, mostrando que, de fato, a banda localizada em 595 nm é apenas uma banda de transição da primeira desprotonação. Com isso se espera um pKa bem ácido para esta desprotonação. Como a benzilamina possui um pka de 9,4,^[66] foi constatado mais uma vez a eficiência do sistema conjugado em deslocalizar o elétron não ligante da amina.

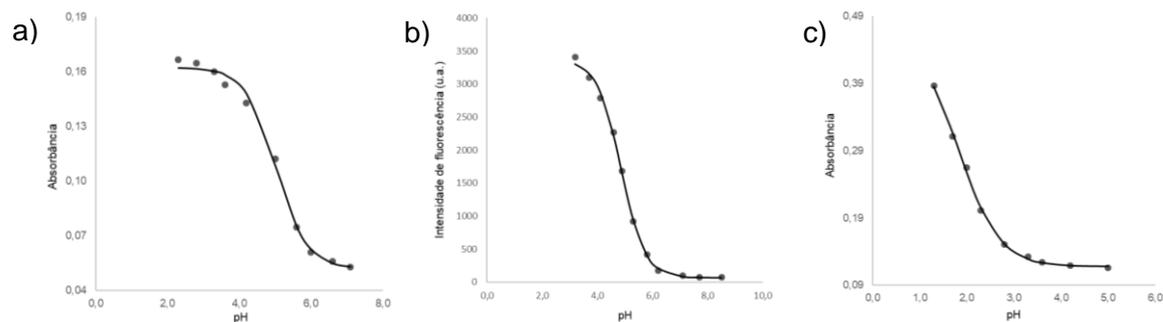


Figura 34 – Curvas de titulação para o composto **5**. a) Espectrofotométrica em 551 nm. b) Fluorimétrica em 625 nm. c) Espectrofotométrica em 595 nm.

Assim se conclui que esse fluoróforo é um sensor de pH com uma faixa de pH aplicável de 4,0 a 6,0, que é uma faixa interessante que, como visto no composto **2**, pode ser usada para marcar lisossomo, por exemplo. Além disso ele possui características fotofísicas bem interessantes, pois permite o cálculo ratiométricos e possui comprimentos de onda de absorção e emissão razoavelmente longos – o que minimiza o fotodano e a interferência da autofluorescência celular.^[32]

4.1.6. ENSAIO DE CITOTOXICIDADE DOS COMPOSTOS 2 E 5

Uma vez que os compostos **2** e **5** apresentaram características fotofísicas favoráveis foi realizado um teste de citotoxicidade com esses fluoróforos, a fim de verificar a aplicação destes em meio celular. O resultado desse ensaio (**Tabela 01 e Figura 35**) mostrou que estes compostos apresentam baixa citotoxicidade, possibilitando assim o uso em aplicação celular. Foi visto também que, devido à alta viabilidade dos compostos em todas as concentrações analisadas, de ~ 80% após 72 horas, não foi possível realizar o cálculo do tempo de vida dos fluoróforos. Este resultado está em conformidade com as características do grupo BODIPY, que geralmente não são tóxicos.^[70,71]

Tabela 01 – Toxicidade dos compostos **2** e **5** depois de 72 horas.

Composto	Concentração (uM)	Viabilidade (%)	
		Média ^a	SD ^b
2	1	85,6	14,7
	5	76,4	13,9
	10	80,9	13,1
	50	87,0	12,4
	100	92,7	13,1
5	1	79,9	14,8
	5	73,2	12,1
	10	77,2	8,4
	50	80,3	8,1
	100	77,0	13,7

^a Resultado médio de três experimentos. ^b Desvio padrão.

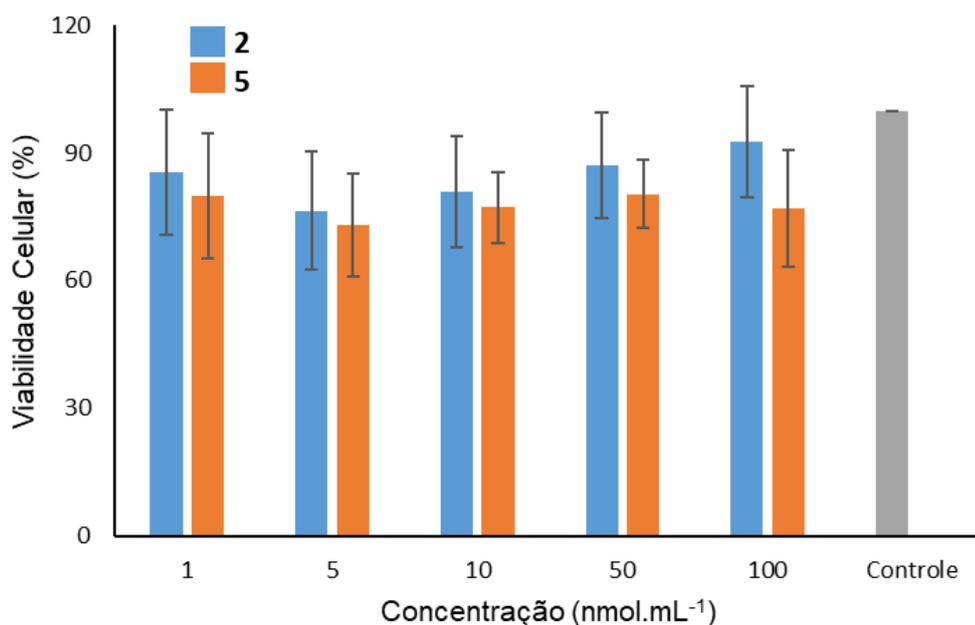


Figura 35 – Citotoxicidade dos sensores **2** (azul) e **5** (laranja) após 72 horas. Em cinza o tratamento apenas com DMSO 5% (controle)

4.2. Preparação e propriedades do 3-(piridin-3-il) BODIPY

A estratégia inicial para se obter o composto **9**, pela preparação do tetrafluorborato de piridinil diazônio pelo método tradicional, com HCl, NaNO₂ e NaBF₄, não se obteve sucesso. Foi observada a liberação imediata de gás na etapa de adição do NaNO₂, o que levou a concluir que o cloreto do sal de diazônio em questão é muito instável e elimina gás nitrogênio imediatamente após a sua formação (**Figura 36**).

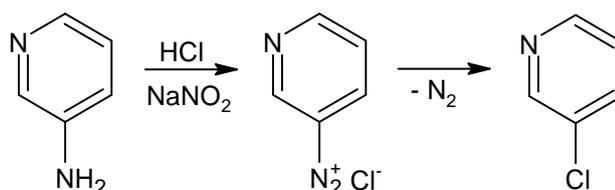


Figura 36 – Decomposição do cloreto de diazônio formado.

Na segunda estratégia foi utilizado ácido tetrafluorbórico, que possibilita a preparação direta do tetrafluorborato do sal de diazônio sem o cloreto como intermediário. A reação de fato ocorreu conforme planejado com a formação de um sólido branco, que seria aplicado na etapa de arilação. Todavia, o sólido isolado se mostrou muito instável se degradando completamente de forma instantânea e vigorosa. Essa observação nos levou a abandonar a estratégia de isolamento do tetrafluorborato de diazônio por precaução.

Nesse contexto, foi proposto as reações sequenciais one-pot, descrita na sessão de materiais e métodos, para remediar tais problemas. Nessa estratégia o sal de diazônio preparado não foi isolado nem armazenado, tendo sido aplicado diretamente na reação de arilação. O controle da reação por CCD mostrou a formação de produtos com características condizentes com o esperado para o produto arilado **9** (**Figura 37**), meso-diclorofenil BODIPY monoarilado). Infelizmente o rendimento dessa estratégia foi de apenas 11 %, com recuperação de cerca de 35 % do material de partida.

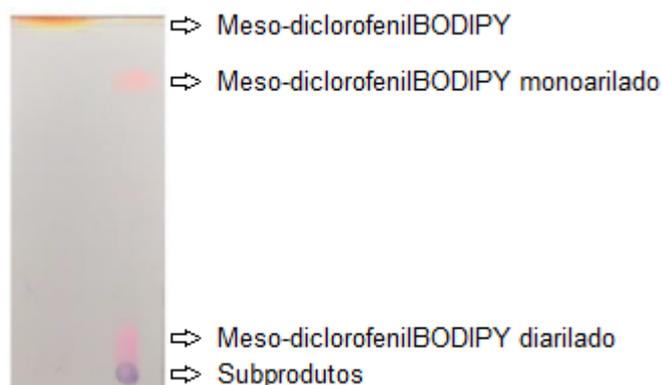


Figura 37 – Cromatografia em camada delgada dos produtos da reação sequencial.

Apesar das dificuldades foi possível isolar uma pequena quantidade de um produto fluorescente que, mesmo não sendo possível realizar ainda a confirmação estrutural por caracterização espectroscópica, se pressupõem ser o composto **9**. Essa suposição foi feita devido a indícios com o aparecimento de um novo produto bem polar na CCD (**Figura 37**) e alteração na coloração do meio reacional resultando em um produto isolado mais vermelho. Uma vez que a inserção de anéis aromáticos na posição 3 e 5 ocasiona o desvio batocrômicos,^[62] esperávamos esse comportamento.

Devido aos percalços com a síntese de 3-(pirindin-3-il) BODIPYs essa estratégia de preparação de BODIPYs foi abandonada momentaneamente. Contudo, como ainda foi possível se isolar uma pequena quantidade do produto se realizou a caracterização desse fluoróforo em relação ao pH.

Os espectros de emissão e absorção (**Figuras 38 e 39**) mostraram picos típicos de BODIPYs. Não foi possível identificar uma mudança significativa no espectro de absorção nem do de emissão com a desprotonação do BODIPY. A diferença aparente dos espectros se dá devido à baixa solubilidade dos BODIPYs, como mencionado anteriormente. O comprimento de onda de máxima absorção ocorreu em aproximadamente 530 nm, enquanto comprimento de onda de máxima emissão ocorreu em 559 nm. Esses resultados indicam um leve desvio batocrômico comparado ao meso-diclorofenilBODIPY ($\lambda_{\text{abs}} = 509 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{em}} = 522 \text{ nm}$),^[72] como verificado pela coloração, o que corrobora mais uma vez com a suposição que o composto sintetizado corresponde ao composto **9**.

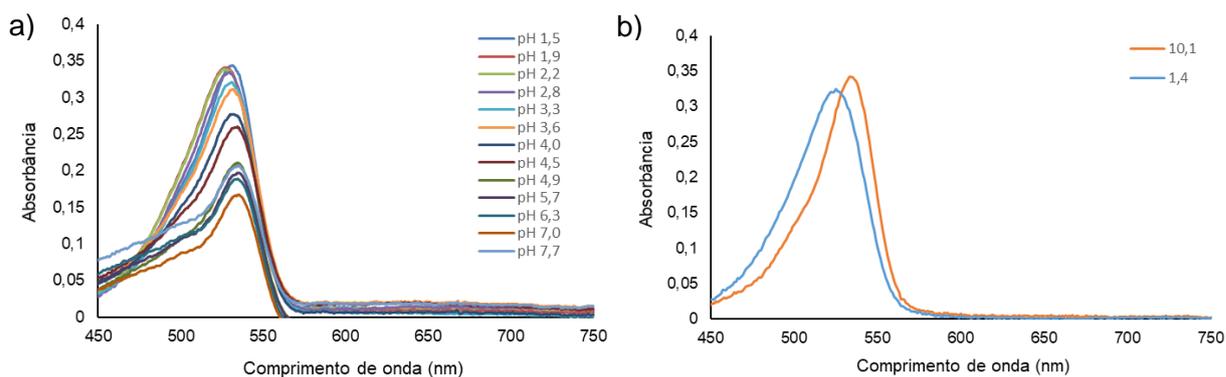


Figura 38 – Absorção do composto **9**. a) Titulação espectrofotométrica entre pH 1,5 e 7,7; b) Espectros de absorção em pH 10,1 e 1,4.

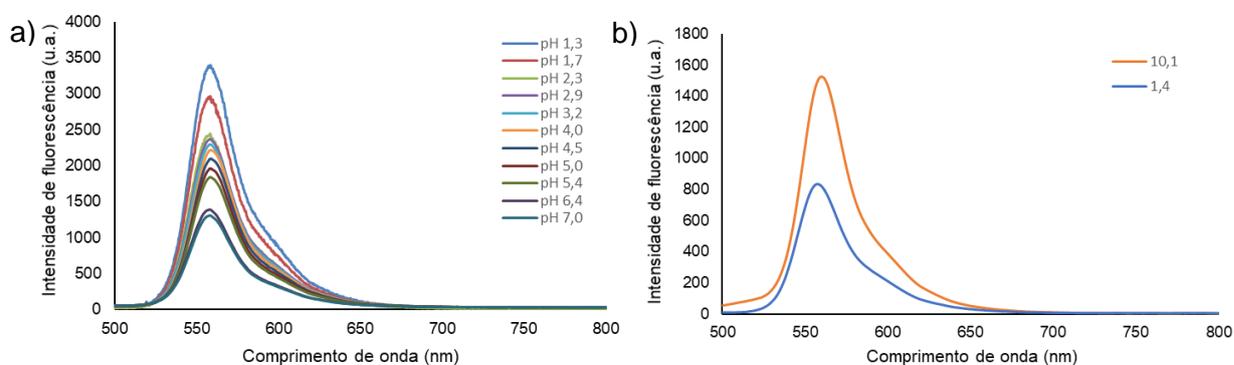


Figura 39 – Emissão do composto **9**. a) Titulação fluorimétrica entre pH 1,3 e 7,0; b) Espectros de emissão em pH 10,1 e 1,4.

Como as titulações realizadas mostraram que esse derivado não possui sua absorção e emissão sensíveis ao pH do meio, e sua síntese não se mostrou eficiente em termos de rendimento, foi abandonada momentaneamente o estudo desse grupo.

4.3. Caracterização dos 3-(4-aminofenil) BODIPYs

No que se refere o efeito da protonação sobre o rendimento quântico de fluorescência, os compostos **14** e **15** na forma desprotonada mostraram uma fluorescência mínima, com rendimento quântico de fluorescência próximo a zero. Por outro lado, a adição de ácido clorídrico resultou em o aumento considerável da fluorescência, possibilitando o cálculo do rendimento quântico de fluorescência (ϕ) em metanol, acetonitrila e dimetilsulfóxido acidificado (**Tabela 02**). Houve um aumento significativo do rendimento quântico de fluorescência do composto **15** em relação ao composto **14**, em DMSO de 6,3 vezes, em metanol de 21 vezes e em acetonitrila chegou a ser de 295 vezes. Os valores inferiores observados para o composto **14** em

relação ao composto **15** era esperado, devido ao efeito estérico dos átomos de cloro que impedem o decaimento não radiativo resultante da rotação do anel aromático na posição 8. Podemos perceber também um aumento significativo do rendimento quântico em DMSO, observado em ambos os compostos, o que pode ser explicado pela alta viscosidade desse solvente, o que diminui as rotações, evitando, assim, a perda de energia por vias não radiativas. Para o composto **15** o rendimento quântico em DMSO foi 1,49 vezes maior em comparação com o Φ_F em acetonitrila e 1,40 vezes do que em metanol, já para o composto **14** foi de 70 vezes maior em comparação a acetonitrila e de 4,67 maior do que em metanol.

Tabela 02 – Propriedades fotofísicas compostos **14** e **15** em solventes.

Composto	Molécula	Solvente	Φ_F	Comprimento de onda (nm)	
				Absorção	Emissão
14		DMSO	0,14	531 (H ⁺) / 595	551
		MeCN	0,002	521 (H ⁺) / 568	543
		MeOH	0,03	523 (H ⁺) / 564	541
15		DMSO	0.88	544 (H ⁺) / 608	562
		MeCN	0.59	536 (H ⁺) / 585	552
		MeOH	0.63	535 (H ⁺) / 582	552

Diante dessas observações foi realizada a leitura dos espectros de absorção e emissão dos compostos **14** e **15** nesses solventes mencionados. Os espectros de absorção (**Figura 40**) mostraram um deslocamento hipsocrômico com a adição de prótons no meio, indicando a existência de dois estados excitados com diferentes níveis de energia. Além disso, é possível ver na presença de ácido, bandas estreitas e estruturadas, típicas do BODIPY, que com a desprotonação são ligeiramente alargadas. O que é típico da mudança de um estado localmente excitado para um estado de transferência de carga.

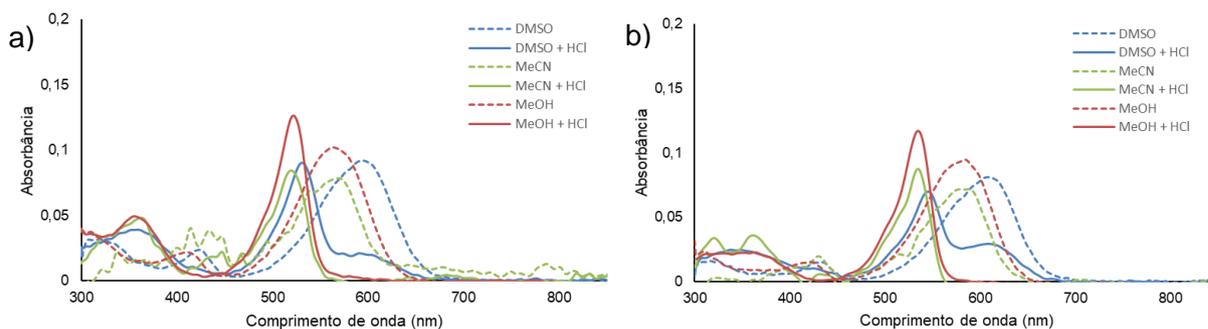


Figura 40 – Espectros de absorção em solventes orgânicos. a) Composto **14**; b) Composto **15**.

Nos espectros de emissão (**Figura 41**), nenhum deslocamento relevante é observado, porém é possível ver o aumento do sinal com a adição de prótons, sugerindo um mecanismo de extinção de fluorescência com a desprotonação da molécula. Assim, a fim de obter dados mais específicos foi realizada a titulação espectrofotométrica e fluorimétrica desses compostos no meio desejado, aquoso.

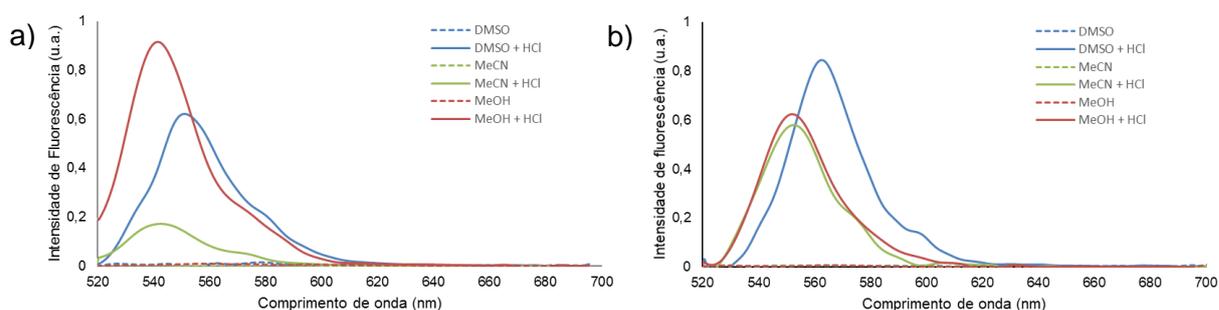


Figura 41 – Espectros de emissão em solventes orgânicos. a) Composto **14**; b) Composto **15**.

Conforme mencionado na sessão de materiais e métodos realizou-se uma mudança no intervalo das leituras das titulações, a fim de evitar precipitação, e, de fato, se observou uma melhora significativa com menos pontos de pH. Visto isso, somente os espectros de absorção e emissão do último ensaio foi representado, uma vez que apresentam melhor visualização, os demais espectros se encontram em anexo (**Anexo 3**). Os espectros de absorção obtidos para o composto **14** nos três sistemas aquosos distintos (**Figura 42 a.1, b.1 e b.3**) apresentaram uma banda em comprimentos de onda mais baixo, referente ao estado protonado, e com a desprotonação da molécula há o deslocamento da banda para o vermelho. Para a molécula no estado protonado observa-se os comprimentos de onda máximos em 524 nm, 522 nm e 520 nm, para os respectivos co-solventes DMSO, MeCN e MeOH, já para o estado desprotonado em 560 nm, 552 nm, 551 nm.

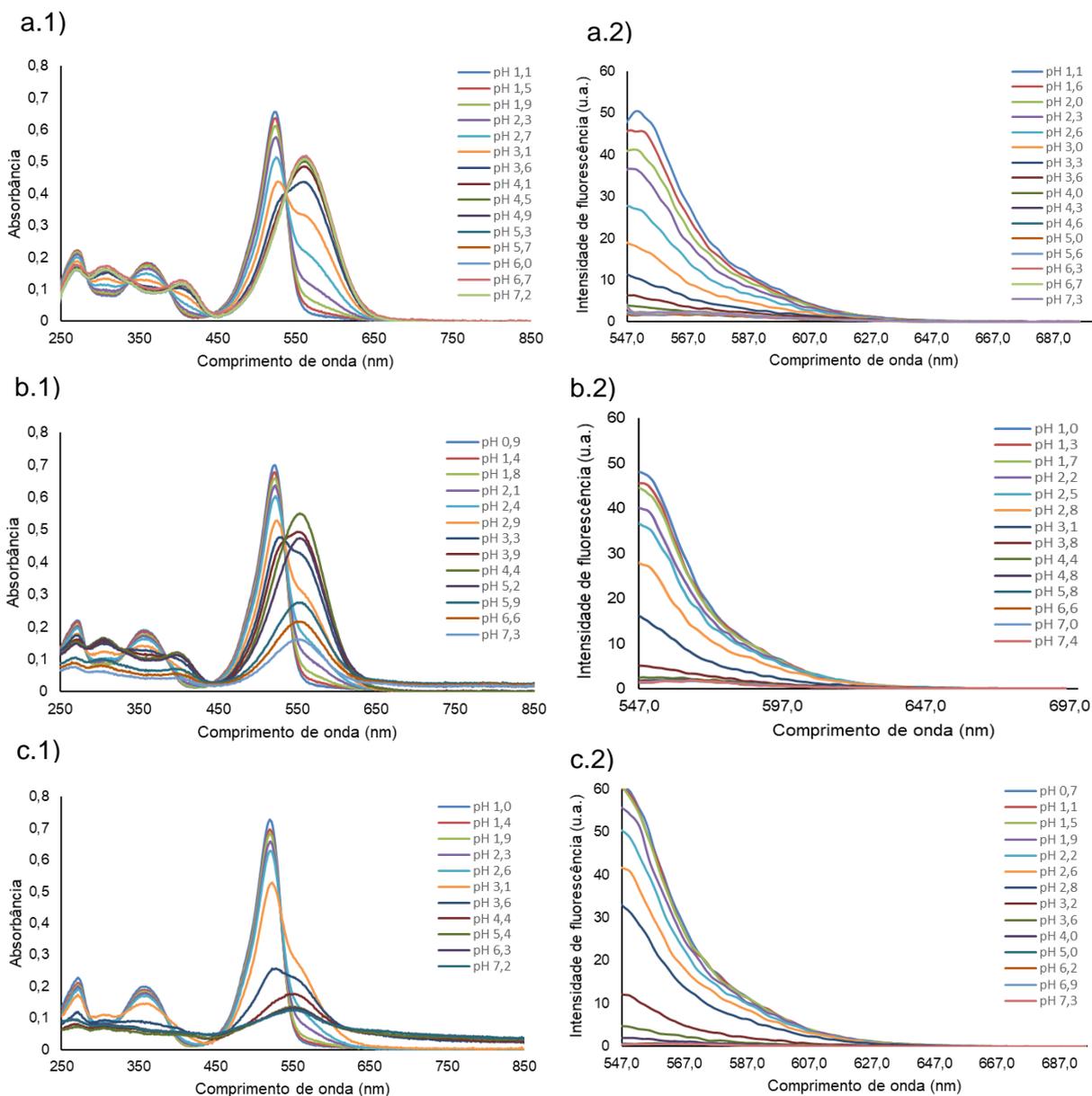


Figura 42 – Titulação espectrométrica (1) e fluorimétrica (2) do composto **14** em meio aquoso com diferentes co-solventes. a) DMSO 30% b) MeCN 30% e c) MeOH 30%.

Os espectros de fluorescência dessas moléculas mostram um máximo de emissão somente, em 551, 547 e 546 nm para DMSO 30 %, MeCN 30 % e MeOH 30 %, respectivamente. Contudo se observa um efeito hipocrômico com a desprotonação da molécula. Esses comportamentos, da titulação fluorimétrica juntamente com o da titulação espectrofotométrica e do ensaio de protonação em meio orgânico, evidenciam que esse composto possui um estado excitado protonado que apresenta um decaimento radiativo significativo e um estado excitado desprotonado, mais estável, que permite um decaimento não-radiativo, ocasionando a extinção de

fluorescência. Devido à presença do grupo amina, que possui um par de elétrons não ligantes na forma desprotonada, pode-se sugerir uma transferência de elétrons fotoinduzida, da porção aminofenil para o BODIPY (**Figura 43**), que produz um estado excitado polar que retorna ao estado fundamental por processos não luminescentes, causando a extinção da fluorescência. A protonação por sua vez, muda as propriedades de doação de elétrons do grupo fenilamino, "desligando" uma interação de transferência de elétrons (**Figura 43**), resultando na banda de absorção estreita e estruturada desviada para o azul e no aumento da banda de emissão. Assim, as mudanças observadas nos espectros poderiam ser eletronicamente explicadas por uma transferência de elétrons fotoinduzida (PET) do grupo 3-(4-aminofenil) para o núcleo do BODIPY. Alguns cálculos teóricos a serem apresentados posteriormente sustentam essa hipótese.

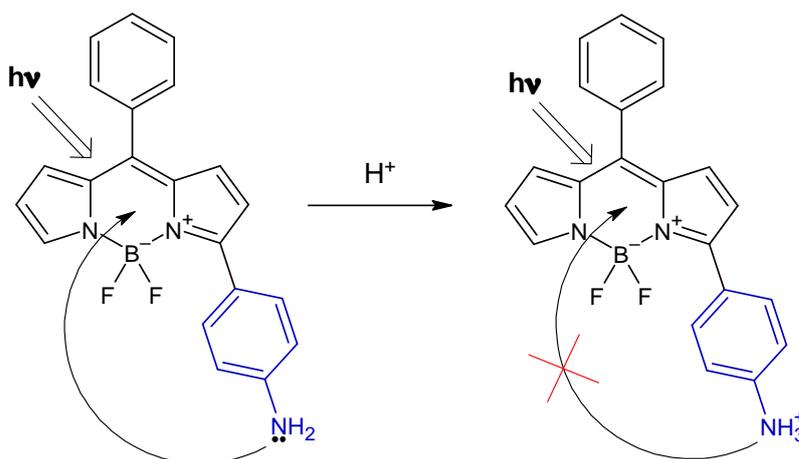


Figura 43 – Transferência de elétrons fotoinduzida da anilina desprotonada.

O composto **15** mostra um comportamento semelhante (**Figura 44**). À medida que o pH aumenta, o fluoróforo mostra um aumento na absorbância em 577 nm e uma diminuição na absorbância em 530 nm para o DMSO 30 %, em 568 nm e 569 nm para o MeCN 30 %, e em 534 nm e 533 nm para o MeOH 30 %. Como também o espectro de emissão apresenta os máximos em 562, 558, e 558 nm para os co-solventes citados na devida ordem. Se observa, assim, o mesmo processo, em pH baixo a anilina é protonada e não extingue o decaimento radiativo do BODIPY. Porém com o aumento de pH, há a desprotonação da anilina e a fluorescência diminui devido a PET. É possível observar também que a presença do cloro no composto **15** além de gerar um aumento no rendimento quântico da molécula, como calculado, ele ocasiona um deslocamento batocrômico nas bandas de absorção e emissão, mostrando que este

estabiliza de alguma forma o estado excitado, provavelmente por efeito indutivo de diminuição da densidade eletrônica. Uma outra observação realizada nos espectros desse composto foi um ombro mais batocrômico no espectro de absorção em MeOH 30% (**Figura 44 c.1**), que aparentemente está presente no espectro do composto 14 também (**Figura 44 c.1**), porém devido a prováveis problemas de solubilidade possui sua visualização comprometida. Esse deslocamento pode indicar alguma interação específica do metanol com o sensor, mas não foi realizado um estudo aprofundado para sustentar essa hipótese.

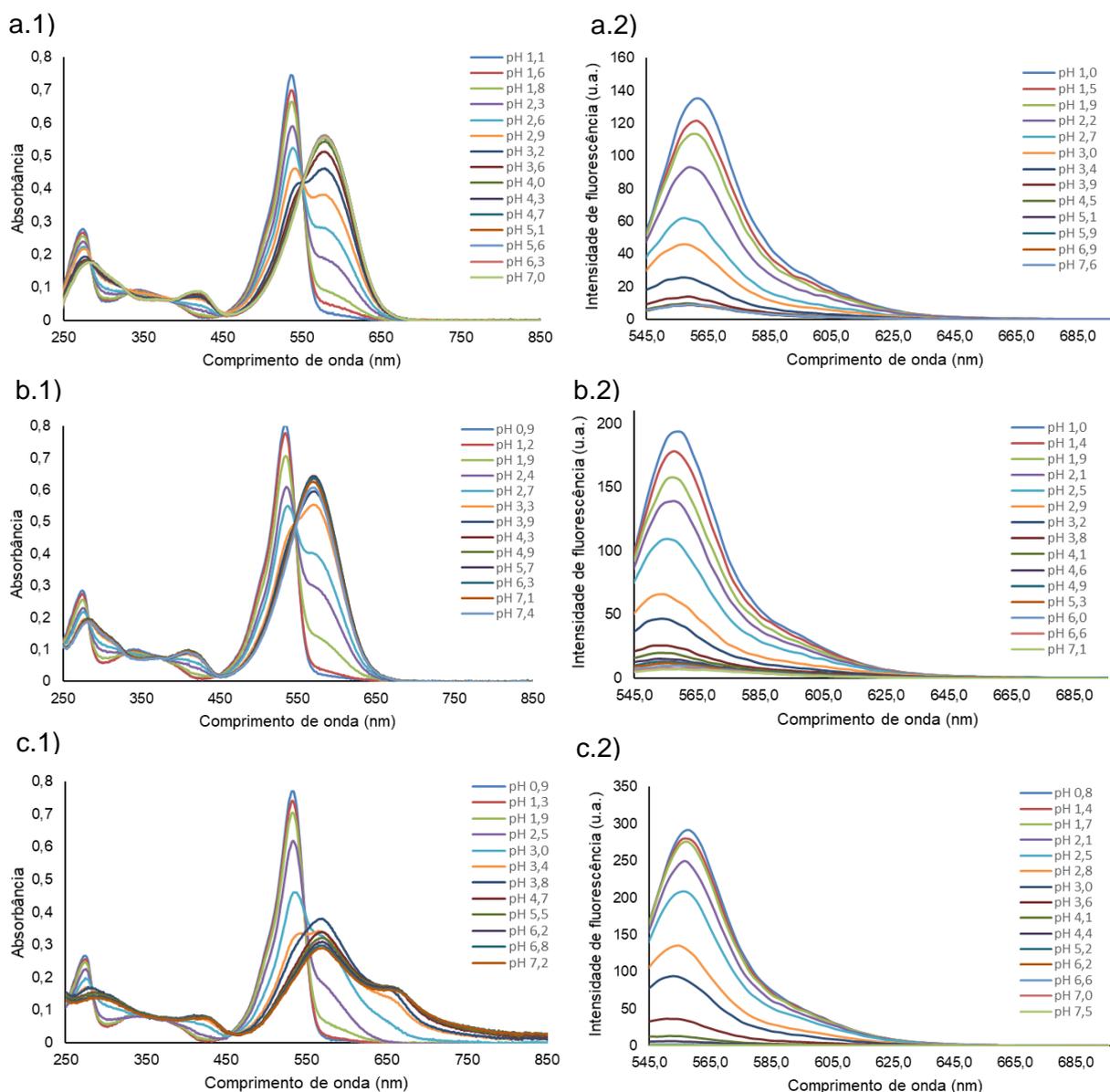


Figura 44 – Titulação espectrométrica (1) e fluorimétrica (2) do composto **15** em meio aquoso com diferentes co-solventes. a) DMSO 30% b) MeCN 30% e c) MeOH 30%.

Com base no deslocamento de absorção e na extinção de fluorescência foi determinada o logaritmo da constante de equilíbrio para a protonação da fenilamina dos dois compostos nos três sistemas aquosos (**Tabela 03**). Os valores de pKa de cada composto foram calculados a partir do ajuste sigmoidal não linear dos dados de titulação dos compostos, que gerou as curvas de titulações (**Anexo 4**). Para a absorção se obteve um valor médio, uma vez que as titulações foram realizadas em triplicatas. Os resultados mostraram valores de pKa semelhantes para os três co-solventes, indicando que não interferiram no equilíbrio de protonação e desprotonação dos compostos. Os resultados também indicam pouca variação do pKa entre os dois compostos nas diferentes condições analisadas, de maneira que o valor de pKa ficou entre 2,5 e 3,0. Sendo então aplicáveis em uma faixa de pH de 1,5 a 4,5. Observou-se uma tendência de valores de pKa um pouco maior para o composto **14**. O que é coerente com a estrutura das moléculas (**Figura 43**), devido o cloro presente no composto **15** possuir um efeito indutivo retirador de elétrons, diminuindo relativamente a densidade eletrônica da amina, diminuindo o pKa. É válido notar também que o pKa da anilina (4,6) ^[67] diminui consideravelmente com a conjugação com o anel BODIPY, indicando um importante efeito retirador de elétrons por parte do sistema BODIPY, que é uma característica que permite a ocorrência de um mecanismo de PET.

Tabela 03 – Propriedades espectrométricas compostos **14** e **15**

Espectro	Sistema de solvente	Comprimento de onda (nm)		pKa	
		Abs	Em	Abs	Em
14	DMSO 30 %	524 (H ⁺) / 560	551	2,8 ± 0,1	2,7
	MeCN 30 %	522 (H ⁺) / 552	547	2,7 ± 0,5	2,9
	MeOH 30 %	520 (H ⁺) / 551	546	3,0 ± 0,3	2,8
15	DMSO 30 %	536 (H ⁺) / 577	562	2,6 ± 0,1	2,5
	MeCN 30 %	534 (H ⁺) / 568	558	2,4 ± 0,1	2,5
	MeOH 30 %	533 (H ⁺) / 569	558	2,8 ± 0,3	2,7

Desse modo os compostos **14** e **15** apresentam mudanças espectrais devido à ionização dependente do pH, podendo ser utilizado como um sensor de pH do tipo *turn-on*. Ensaios microscópicos com esses dois compostos estão em andamento, a

fim de verificar a permeabilidade desses em células e o ruído de fundo apresentado, com intuito de verificar possíveis aplicações. Embora esses sensores tenham apresentado um pKa muito ácido para uma aplicação celular, ainda é válido a investigação uma vez que a versatilidade química do BODIPY permite pós-funcionalizações, assim é possível a adição de grupos doadores de elétrons que diminuam a acidez do grupo aminofenil. De todo modo, essa pode ser uma sonda útil em muitas aplicações que demandem uma faixa ácida de pH.

4.3.1. CÁLCULOS TEÓRICOS

Para melhor compreender e caracterizar o processo de PET cálculos das energias dos orbitais de fronteira dos compostos **14** e **15** foram realizados, exemplificando esse mecanismo pelo deslocamento da energia dos orbitais moleculares (**Figura 45**).

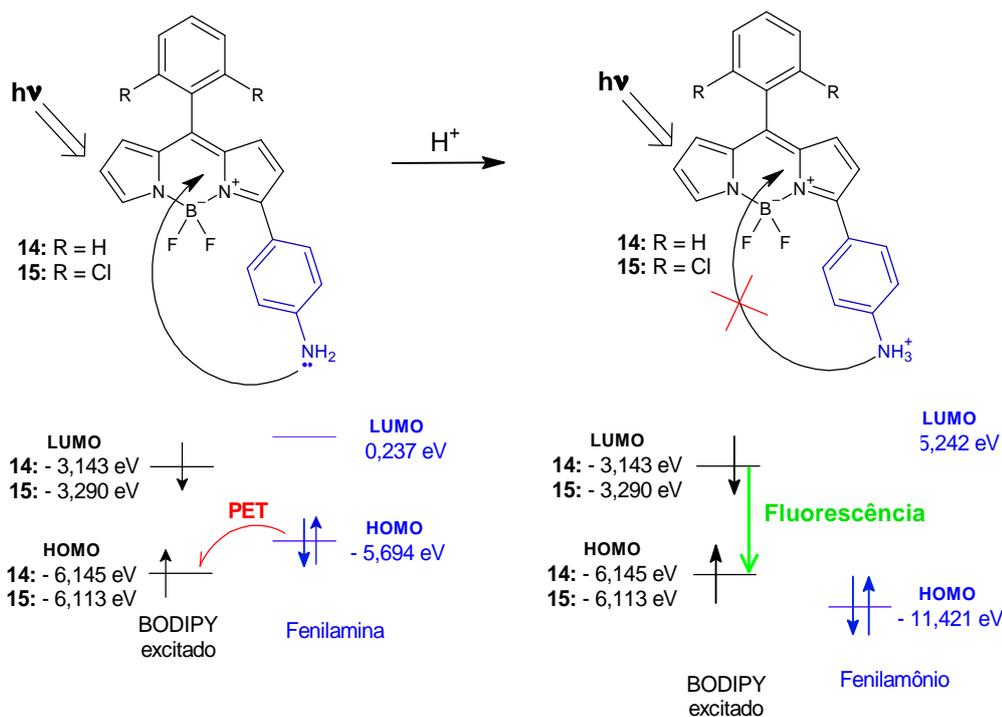


Figura 45 – Processos fotoquímicos presentes nos compostos **14** e **15** protonados e desprotonados.

Os pares de elétrons não ligantes da fenilamina estão em um orbital HOMO com um nível energético mais alto do que o orbital HOMO do BODIPY, que por sua vez, está individualmente ocupado após a fotoexcitação. Com isso, uma transferência de elétrons é energeticamente viável, permitindo que um elétron do nitrogênio seja transferido para esse orbital de menor energia, ou seja, PET redutiva do HOMO da fenilamina (porção doadora) para o HOMO do fluoróforo (porção aceptora), causando

a extinção da fluorescência do último. Todavia com a protonação, e, por conseguinte, a conversão da fenilamina em fenilamônio, a energia do par de elétrons é reduzida e a transferência de elétrons é então inibida, permitindo a fluorescência.

A parte importante deste processo como mecanismo sensorial é a estabilização do estado ICT formado após o PET. A energia diminui porque a capacidade de doar ou aceitar elétrons muda quando um fluoróforo está no estado de excitação, como visto pela vacância gerada no HOMO do BODIPY após a fotoexcitação. D e A não formam um complexo quando ambos estão no estado fundamental porque isso é energeticamente desfavorável, porém, a fotoexcitação fornece a energia para conduzir a separação de carga.^[3] Entretanto, se esse complexo vai seguir um decaimento radiativo ou não é determinado pela adaptação da estrutura molecular às novas densidades eletrônicas e às novas interações geradas pela PET. Mudanças essas provenientes da reibridização da oxidação de D e da redução de A e da conformação mútua de D^+ e A^- , respectivamente, que conjuntamente determinam os comprimentos e ângulos de ligações e a simetria e a geometria molecular desse estado. Essas características, por sua vez, regem a taxa de recombinação de carga, determinando assim a taxa de emissão da molécula.^[12] Uma vez que observamos um efeito hipocrômico para estes compostos desprotonados temos então que esse estado de transferência de carga apresenta uma estrutura molecular que favorece a interação entre o doador e o aceptor, e como consequência, o decaimento não radiativo.^[16,3] Diferentemente das estruturas dos compostos **2** e **5**, que favoreceram uma menor sobreposição orbitalar levando a um decaimento radiativo após a PET, e como consequência, um deslocamento da banda, não uma supressão. Buscar compreender esses mecanismos de detecção e a estrutura do estado excitado é importante para melhorias futuras na sonda sensorial fluorescente.

Além disso as superfícies desses orbitais foram renderizadas para melhor visualizar as interações presentes no sensor (**Figura 46**). A partir dessas superfícies percebe-se que nos compostos **14** e **15** protonados o HOMO está principalmente localizado no núcleo BODIPY (**Figura 46b**), enquanto na forma desprotonada ele está distribuído no núcleo BODIPY e na fenilamina (**Figura 46a**). Tal observação corrobora com a sugestão de uma transferência de elétrons da fenilamina para o BODIPY excitado apenas no estado da forma desprotonada. Não observamos alterações significativas no LUMO dos compostos protonados e desprotonados (**Anexo 5**).

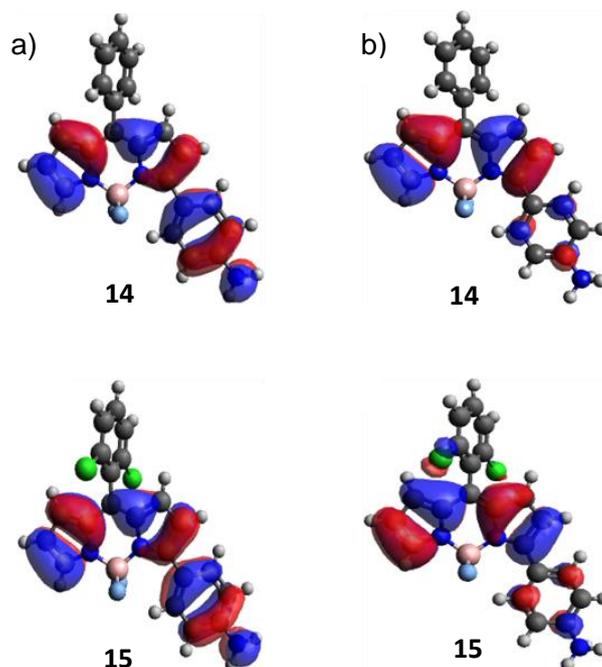


Figura 46 – Superfícies do orbital molecular ocupado de maior energia (HOMO) dos compostos **14** e **15** na forma protonada e desprotonada. a) Estado desprotonado. b) Estado protonado.

Por fim, foi realizado também cálculos do dipolo e dos orbitais de fronteira desses dois compostos anilínicos no estado fundamental (**Tabela 04**). Podemos observar que o estado protonado apresenta um dipolo significativamente maior em relação a molécula desprotonada para os dois compostos – sendo 6,3 vezes maior para o composto **14** e 5,0 vezes maior para o composto **15** – apresentando assim maior solubilidade nos sistemas de solventes utilizados. Isso corrobora com as observações realizadas durante a análise, que indicam um maior problema de solubilidade para as moléculas neutras. Ademais, a molécula **15** apresenta um dipolo 1,08 vezes maior, que pode ser evidenciado pelos espectros menos afetados por problemas de solubilidade. A absorção em MeOH 30 % é um exemplo desse caso, no espectro do composto 15 protonado (**Figura 43 c.1**) foi possível visualizar com clareza a banda mais estendida para o vermelho, entretanto, a mesma não foi visualizada em um primeiro momento no espectro do composto 14 (**Figura 41 c.1**). O efeito hipsocrômico observado após a protonação dos compostos **14** e **15** também pode ser corroborado pelos cálculos teóricos, estando relacionado ao gap energético maior nos compostos protonados.

Tabela 04 – Cálculos teóricos para os compostos **14** e **15**

DADO	Composto 14		Composto 15	
	Desprotonado	Protonado	Desprotonado	Protonado
Energia HOMO molécula/ eV	-8,08	-10,98	-7,99	-10,96
Energia LUMO molécula / eV	-1,77	-4,14	-1,84	-4,19
GAP molécula / eV	6,31	6,85	6,15	6,77
Dipolo / D (Debye)	3,23	20,36	4,36	21,98

4.3.2. ENSAIO DE CITOTOXICIDADE

O ensaio MTT foi realizado para investigar a citotoxicidade dos compostos **14** e **15**. Os resultados, expressos em viabilidade, estão expostos na **Tabela 05** e **Figura 47**. Foi possível verificar que essas sondas apresentaram baixa citotoxicidade nas concentrações testadas, sendo biocompatíveis. Como também foi visto nos compostos **2** e **5** não foi possível calcular o tempo de vida destes compostos, devido à alta viabilidade, até mesmo quando a concentração foi de 100 nmol.L⁻¹, o que é característico dos BODIPYs, que geralmente são atóxicos.^[70,71]

Tabela 05 – Toxicidade dos compostos **14** e **15** depois de 72 horas.

Composto	Concentração (uM)	Viabilidade (%)	
		Média ^a	SD ^b
14	1	83.8	14.2
	5	77.6	13.3
	10	75.3	10.3
	50	84.2	11.0
	100	80.5	7.5
15	1	78.4	13.7
	5	73.2	9.6
	10	75.1	10.1
	50	81.9	11.3
	100	83.31	11.0

^a Resultado médio de três experimentos. ^b Desvio padrão.

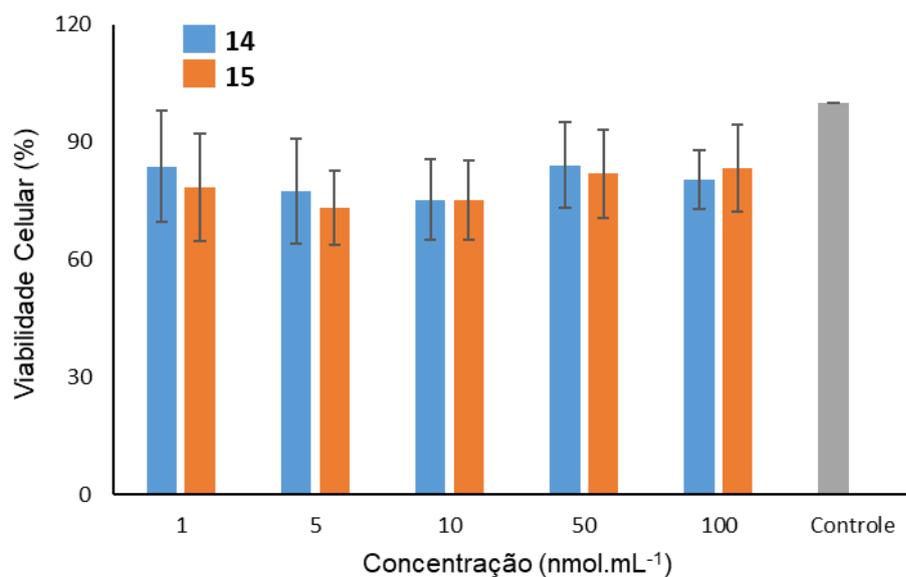


Figura 47 – Citotoxicidade dos sensores **14** (azul) e **15** (laranja) após 72 horas. Em cinza o tratamento apenas com DMSO 5% (controle)

5. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Dos 8 compostos testados como sensores de pH 4 apresentaram sensibilidade clara a alterações na acidez, dois dos 3-benzilamino BODIPYs (compostos **2** e **5**) e os dois 3-(4-aminofenil) BODIPYs (compostos **14** e **15**). A funcionalização do BODIPY na posição 3 por um grupo piridin-3-il não se mostrou vantajosa para se desenvolver um sensor de pH.

Dos compostos sensíveis a acidez com o sítio de reconhecimento 3-benzilamino se percebeu que a inserção do grupo tiocianato na posição 2 e 6 do BODIPY proporciona uma alteração no estado excitado da molécula que permite o reconhecimento de prótons do meio. Pelas análises feitas foi sugerido que esse grupo atua aumentando a polaridade do estado excitado, permitindo assim uma mudança ratiométrica com a perturbação do próton a esse estado ICT. O que é extremamente vantajoso para a utilização desse sensor, que além do mais apresentou comprimentos de emissão relativamente altos, baixa citotoxicidade e uma faixa aplicável de pH 3,6 a 5,7. Com isso, pretende-se como perspectivas futuras, a investigação do comportamento desses em meio intracelular, com intuito de verificar possíveis aplicações, provavelmente de estudos relacionados ao lisossomo. Ademais, o fato de uma provável indução de um estado ICT pelo tiocianato permite futuros projetos.

Os outros dois compostos sensíveis ao pH foram os 3-(4-aminofenil) BODIPYs que apresentaram uma faixa de aplicação mais ácida, de pH de 1,5 a 4,5. Cálculos teóricos endossaram uma hipótese de um possível mecanismo PET para esta molécula em seu estado excitado, que causa o reconhecimento turn-on com o aumento da acidez. A aplicabilidade desses compostos em microscopia de fluorescência já foi testada e os resultados preliminares indicam que ambos são permeáveis às membranas celulares todavia sem aparente marcação específica de organelas.

6. BIBLIOGRAFIA

- [1] Valeur, B. **Molecular Fluorescence, Principles and Applications**. Wiley-VCH, Weinheim, Germany, **2002**.
- [2] Skoog, D. A.; West, D. M.; Holler, F. J.; Crouch, S. R. **Fundamentos de Química Analítica**. Tradução da 8 ed. Americana. Ed. Thomson; São Paulo, 2007
- [3] LAKOWICZ, J. R. (Ed.). **Principles of Fluorescence Spectroscopy**. Springer Science & Business Media, 2013.
- [4] Rezende, L. C. D. **Síntese, caracterização e aplicações de fluoróforos derivados do BODIPY**. Tese (Doutorado em ciências farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, SP.
- [5] Valeur, B.; Leray, I. Design principles of fluorescent molecular sensors for cation recognition. **Coordination Chemistry Reviews**, 205 (2000) 3–40.
- [6] Boens N.; Leen V.; Dehaen W. Fluorescent indicators based on BODIPY. **Chemical Society Reviews**, 2012, v. 41, p.1130-1172.
- [7] Boens N. et. al. Ratiometric, Fluorescent BODIPY Dye with Aza Crown Ether Functionality: Synthesis, Solvatochromism, and Metal Ion Complex Formation. **The Journal of Physical Chemistry A**. 2008, 112, 6104–6114
- [8] Staudinger C.; Breininger J.; Klimant I.; Borisov S. M. Near-infrared fluorescent aza-BODIPY dyes for sensing and imaging of pH from the neutral to highly alkaline range. **Analyst**, 2019,144, 2393-2402
- [9] Burgess, K.; Han, J. Fluorescent Indicators for Intracellular pH. **Chemical Reviews**. 2010, 110, 2709–2728
- [10] Callan, J. F. and Sahoo, S. K. et. al. Iron(iii) selective molecular and supramolecular fluorescent probes. **Chemical Society Reviews**, 2012,41, 7195-7227
- [11] Alamudi S.H; Chang Y.T. Advances in the design of cell-permeable fluorescent probes for applications in live cell imaging. **Chemical Communications**, 2018, v. 54, p. 13641-3653.

- [12] Grabowski, Z. R.; Rotkiewicz, K. Structural Changes Accompanying Intramolecular Electron Transfer: Focus on Twisted Intramolecular Charge-Transfer States and Structures. **Chemical Reviews**. 2003, 103, 3899-4031
- [13] Dehaen, W. Macrocyclic Arenes Functionalized with BODIPY: Rising Stars among Chemosensors and Smart Materials. **Chemosensors** 2020, 8, 51
- [14] 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
- [15] Loudet, A.; Burgess, K. BODIPY Dyes and Their Derivatives: Syntheses and Spectroscopic Properties. **Chemical Reviews**. 2007, 107, 4891-4932
- [16] Ulrich, G.; Ziessel, R.; Harriman, A. The Chemistry of Fluorescent Bodipy Dyes: Versatility Unsurpassed? **Angewandte Chemie International Edition**, 2008, 47, 1184 – 1201
- [17] Nepomnyashchii, A. B.; Bard, A. J. Electrochemistry and electrogenerated chemiluminescence of BODIPY dyes. **Accounts of Chemical Research**. 2012, 45, 1844-1853.
- [18] R. Gotor, P. Ashokkumar, M. Hecht, K. Keil, and K. Rurack. Optical pH Sensor Covering the Range from pH 0–14 Compatible with Mobile-Device Readout and Based on a Set of Rationally Designed Indicator Dyes. **Analytical Chemistry**. 2017, 89, 16, 8437–8444
- [19] Maroto, B. L. and Moya, S. et. al. C*-BODIPYs: Exploring a New Strategy to Transfer Chirality towards BODIPY Chiroptics. **Proceedings** 2019, 41(1), 53
- [20] Previdello, B. A. F.; Carvalho, F. R.; Tessaro, A. L.; Souza, V. R.; Hioka, N. O pKa de indicadores ácido-base e os efeitos coloidais. **Química Nova**, 2006, v.29 n.3. São Paulo
- [21] Clayden, J.; Greeves, N.; Warren, S. G. **Organic chemistry**. Oxford: Oxford University Press, 2012
- [22] Bamnavat, K.; Bhardwaj, V.; Anand, T.; Kumar, S. A.; Sahoo, S. K. Pyridoxal derived AIEgen as a fluorescent pH sensor. **Dyes and Pigments**, 184 (2021) 108844.

- [23] Wu, D., Sedgwick, A. C., Gunnlaugsson, T., Akkaya, E. U., Yoon, J., James, T. D. Fluorescent chemosensors the past, present and future. **Royal Society of Chemistry**, 46(23), 7105–7123 (2017).
- [24] Yu, X. and Kim, J. S. et. al. Fluorescent bioimaging of pH: from design to applications. **Chemical Society Reviews**, 2017, 46, 2076
- [25] Ying, L.; Branchaud, B. P. Selective labeling and monitoring pH changes of lysosomes in living cells with fluorogenic pH sensors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 21 (2011) 3546–3549
- [26] Webb, B. A. et. al. pHLARE: a new biosensor reveals decreased lysosome pH in cancer cells. **Molecular Biology of the Cell**. Vol. 32, No. 2, 131–142 (2021)
- [27] Wolfe, D.M et. al. Autophagy failure in Alzheimer's disease and the role of defective lysosomal acidification. **European Journal of Neuroscience**, 37, 1949–1961. (2013)
- [28] Cabrera, E.P. et. al. Synthesis, Solvatochromism, Aggregation-Induced Emission and Cell Imaging of Tetraphenylethene-Containing BODIPY Derivatives with Large Stokes Shift. **Chemical Communications**, 2012, 48, p.10099-10101
- [29] Sola-Llano, R.; Bañuelos J. **BODIPY Dyes - A Privilege Molecular Scaffold with Tunable Properties**. IntechOpen, 2018.
- [30] Wang, R.; Yu, C.; Yu, F.; Chen, L. Molecular fluorescent probes for monitoring pH changes in living cells. **Trends in Analytical Chemistry**, Vol. 29, No. 9, 2010, 1004-1013
- [31] Alamudi, S. H. et. al. Development of background-free tame fluorescent probes for intracellular live cell imaging. **Nature Communications**, 2016, v. 7, p.11964.
- [32] Chang, C. J.; Chan, J.; Dodani, S. Reaction-based small-molecule fluorescent probes for chemoselective bioimaging. **Nature Chemistry**, Vol 4, 2012, 973-984.
- [33] Sola-Llano, R. et. al. **Tailoring the Photophysical Signatures of BODIPY Dyes: Toward Fluorescence Standards across the Visible Spectral Region**. IntechOpen, 2018.

- [34] Akkaya, E. U. et. al. Light Harvesting and Efficient Energy Transfer in a Boron-dipyrin (BODIPY) Functionalized Peryleneimide Derivative. **Organic Letters**, 2006, 8(13), 2871–2873.
- [35] Wagner, R. W.; Lindsey, J. S. A molecular photonic wire. **Journal of the American Chemical Society**, 1994, 116(21), 9759–9760.
- [36] Kuehne, A. J. C.; Gather, M.C. Organic lasers: Recent developments on materials, device geometries, and fabrication techniques. **Chemical Reviews**. 2016, v. 116, p. 12823-12864.
- [37] Sunahara, H.; Urano, Y.; Kojima, H.; Nagano, T. Design and Synthesis of a Library of BODIPY-Based Environmental Polarity Sensors Utilizing Photoinduced Electron-Transfer-Controlled Fluorescence ON/OFF Switching. **Journal of the American Chemical Society**, 2007, 129(17), 5597–5604.
- [38] Miao, F.; Uchinomiya, S.; Ni, Y.; Chang, Y.T., Wu, J. Development of pH-Responsive BODIPY Probes for Staining Late Endosome in Live Cells. **ChemPlusChem**, 2016, 81(11), 1209–1215.
- [39] Rezende, L.C.D. et al. Synthesis and characterization of two novel red-shifted isothiocyanate BODIPYs and their application in protein conjugation. **Dyes and Pigments**, 182 (2020) 108646.
- [40] Bassan, E.; Gualandi, A.; Cozzi, P. G.; Ceroni, P. Design of BODIPY dyes as triplet photosensitizers: electronic properties tailored for solar energy conversion, photoredox catalysis and photodynamic therapy. *Chemical Science*, 2021, 12, 6607
- [41] Rezende, L. C. D.; Melo; S. M. G.; Boodts, S.; Verbelen, B.; Emery, F. S.; Dehaen, W. Thiocyanation of 3-substituted and 3,5-disubstituted BODIPYs and its application for the synthesis of new fluorescent sensors. **Dyes and Pigments**, 2018, 154, 155–163.
- [42] Qiu, J.; Jianga, S.; Guoa, H.; Yanga, F. An AIE and FRET-based BODIPY sensor with large Stoke shift: Novel pH probe exhibiting application in CO₃²⁻ detection and living cell imaging. *Dyes and Pigments* 157: 351-358, 2018. **Dyes and Pigments**, 157 (2018) 351–358.

- [43] Weare, W. W. et. al. meso-Pyridyl BODIPYs with tunable chemical, optical and electrochemical properties. **New Journal of Chemistry**, 2013, 37, 2663
- [44] Luo, G. et. al. A simple BODIPY-aniline-based fluorescent chemosensor as multiple logic operations for the detection of pH and CO₂ gas. **Dalton Transactions**, 2014, 43, 8499
- [45] Jiang, J. et. al. 8-Hydroxyquinoline-Substituted Boron–Dipyrromethene Compounds: Synthesis, Structure, and OFF–ON–OFF Type of pH-Sensing Properties. **The Journal of Organic Chemistry**. 2011, 76, 10, 3774-3781.
- [46] Yaglioglu, H. G. and Hayvalı, M. et. al. Explanation of pH probe mechanism in borondipyrromethene-benzimidazole compound using ultrafast spectroscopy technique. **Sensors and Actuators B**. 193 (2014) 737– 744
- [47] Jiang, D.; Qin, Y. A BODIPY-derived fluorescent probe for cellular pH measurements. **Analytical Biochemistry** .435, 2, (2013) 106–113
- [48] Valenzano, L. et. al. Unusual Fluorescent Responses of Morpholine-Functionalized Fluorescent Probes to pH via Manipulation of BODIPY's HOMO and LUMO Energy Orbitals for Intracellular pH Detection. **ACS Sensors**. 2016, 1, 2, 158–165
- [49] Xing, G. et. al. 8-(4-aminophenyl)BODIPYs as fluorescent pH probes: facile synthesis, computational study and lysosome imaging. **ChemistrySelect** 2016, 1, 1-6
- [50] Urano, Y. et. al. Selective molecular imaging of viable cancer cells with pH-activatable fluorescence probes. **Nature Medicine**, 2009, 15 (1), 104-109
- [51] Lavilla, R. and Vendrell, M. et. al. Multicomponent Reactions for de Novo Synthesis of BODIPY Probes: In Vivo Imaging of Phagocytic Macrophages. **Journal of the American Chemical Society**. 2013, 135, 16018–16021
- [52] Siegwart, D. J. High-Contrast Fluorescence Detection of Metastatic Breast Cancer Including Bone and Liver Micrometastases via Size-Controlled pH-Activatable Water-Soluble Probes. **Advanced Materials**. 2017, 29, 1700131
- [53] Overkleeft, H. S. et. al. Targeted pH-dependent fluorescent activity-based cathepsin probes. **Chemical Communications**, 2011, 47, 9363–9365

- [54] Boens, N. et. al. Rational Design, Synthesis, and Spectroscopic and Photophysical Properties of a Visible-Light-Excitable, Ratiometric, Fluorescent Near-Neutral pH Indicator Based on BODIPY. **Chemistry – A European Journal**. 2011, 17, 10924 – 10934
- [55] He, W. and Guo, Z. et. al. BODIPY-derived ratiometric fluorescent sensors: pH-regulated aggregation-induced emission and imaging application in cellular acidification triggered by crystalline silica exposure. **Science China Chemistry** volume. 61, 11, (2018)1413–1422
- [56] LEEN, V. et al. Vicarious nucleophilic substitution of α -hydrogen of BODIPY and its extension to direct ethenylation. **Organic letters**, v. 13, n. 6, p. 1470-1473, 2011.
- [57] LEEN, V. et al. Direct functionalization of BODIPY dyes by oxidative nucleophilic hydrogen substitution at the 3-or 3, 5-positions. **Chemical communications**, v. 46, n. 27, p. 4908-4910, 2010.
- [58] VERBELEN, Bram et al. Direct palladium-catalysed C–H arylation of BODIPY dyes at the 3-and 3, 5-positions. **Chemical Communications**, v. 48, n. 73, p. 9129-9131, 2012.
- [59] VERBELEN, B. et al. Radical C-H Arylation of the BODIPY Core with Aryldiazonium Salts: Synthesis of Highly Fluorescent Red-Shifted Dyes. **Angewandte Chemie International Edition**, 2015, 54, 4612–4616
- [60] VERBELEN, B. et al. Radical C-H Alkylation of BODIPY Dyes Using Potassium Trifluoroborates or Boronic Acids. **Chemistry-A European Journal**, v. 21, n. 36, p. 12667-12675, 2015.
- [61] Rezende, L. C. D.; Emery, F. S. . Fluorescence Quenching of Two meso - Substituted Tetramethyl BODIPY Dyes by Fe(III) Cation. **Journal of the brazilian chemical society**, v. 26, p. 1048-1053, 2015.
- [62] Maas, G.; Tanaka M.; Sakakura T. Benzenediazonium Tetrafluoroborate. In: **e- EROS encyclopedia of reagents for organic synthesis**, vol. 8, pp. 1-6, 2001.

- [63] Lian, C.; Yue, G.; Mao, J.; Liu, D.; Ding, Y.; Liu, Z.; Qiu, D.; Zhao, X.; Lu, K.; Fagnoni, M.; Protti, S. Visible-Light-Driven Synthesis of Arylstannanes from Arylazo Sulfones. **Organic Letters**, 2019, 21, 13, 5187–5191.
- [64] Rezende, L.C.D.; Melo, S. M. G.; Boodts, S.; Verbelen, B.; Dehaenb, W.; Emery, F. S. Thiocyanation of BODIPY dyes and their conversion to thioalkylated derivatives. **Organic and Biomolecular Chemistry**, 2015, 13, 6031
- [65] Brouwe, A. M. Standards for photoluminescence quantum yield measurements in solution. **Pure and Applied Chemistry**, 2011, 83 (12), 2213–2228.
- [66] Perrin, D. D.; Dempsey, B.; Serjeant E. P. **pKa prediction for organic acids and bases**. Chapman & Hall, London, New York 1981
- [67] Huang, H.; Lin, Z.; Lin, Y.; Sun, X.; Xie, Y.; Zhang, L.; Chen, G. Preparation and evaluation of poly(4-vinylphenylboronic acid-co-pentaerythritol triacrylate) monolithic column for capillary liquid chromatography of small molecules and proteins. **Journal of Chromatography A**, 1251 (2012) 82– 90
- [68] Hoogendoorn, S.; Blom, A. E. M.; Willems, L. I.; Marel, G. A.; Overkleeft H.S. Synthesis of pH-Activatable Red Fluorescent BODIPY Dyes with Distinct Functionalities. **Organic letters**; 2011, Vol. 13, No. 20 5656—5659
- [69] QIN, W. et al. Photophysical properties of borondipyrromethene analogues in solution. **The Journal of Physical Chemistry A**, v. 109, n. 33, p. 7371-7384, 2005.
- [70] Gupta, I. et. al. Synthesis and characterization of styryl-BODIPY derivatives for monitoring in vitro Tau aggregation. **Sensors and Actuators B: Chemical**, 244, 2017, 673-683
- [71] Xu, H. et. al. Red/NIR neutral BODIPY-based fluorescent probes for lighting up mitochondria. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy** 248 (2021) 119199
- [72] Verbelen, B. **Efficient synthesis of novel bodipy dyes via C–H functionalization**. Thesis (PhD in Science) – Department of Chemistry, KU Leuven, Belgium

APÊNDICE

Publicações geradas no período da qualificação

Apresentação de banner no VII Encontro Capixaba de Química sob o título “Preparação e caracterização das propriedades ácido-base de fluoróforos orgânicos visando a aplicação celular”.

VII Encontro Capixaba de Química - SBQ / ES – ENCAQUI

2019

Preparação e caracterização das propriedades ácido-base de fluoróforos orgânicos visando aplicação celular.

Rebeca L. Oliveira^{1*} (PG), Vanessa G. Amorim¹ (PG), Ruan F. Leite² (IC), Shaiani M. G. Melo³ (PG), Flavio S. Emery³ (PQ), Lucas C. D. Rezende^{1,2} (PQ),

rebecalirio@gmail.com

¹ Centro de Ciências da Saúde, UFES.

² Centro Universitário Norte do Espírito Santo, UFES

³ Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, USP

Palavras Chave: Fluoróforo, BODIPY, Sensor, Sonda.

Introdução

A fluorescência é o processo fotoluminescente mais utilizado e de maior importância em estudos bioquímicos, o que estimulou o desenvolvimento de várias classes de compostos fluorescentes, os “fluoróforos” ou “sondas fluorescentes”. Uma das classes de fluoróforos mais conhecidos e com aplicação mais difundida são os Borodipirrometenos (BODIPY). Em geral, os BODIPYs possuem ótimas propriedades fotofísicas e grande versatilidade química; existindo assim, diversos métodos de modificações químicas aplicáveis no desenvolvimento de novas sondas fluorescentes. Sensores fluorescentes de pH encontram aplicações diversas, e podem ser sintetizados inserindo em suas estruturas funções orgânicas passíveis de protonação e desprotonação. A utilização de sondas fluorescentes trouxe grandes avanços à técnica de bioimagem; sendo esta, a técnica mais bem sucedida e utilizada para monitorar eventos bioquímicos em tempo real.¹ Neste projeto estudou-se a dois novos BODIPYs funcionalizados com anilinas, que foram caracterizados como sensores fluorescentes de acidez; pretendendo um posterior uso em aplicação celular.

Resultados e Discussão

Os fluoróforos utilizados possuem em sua estrutura uma unidade anilina conjugada ao núcleo BODIPY (Figura 1. A). A síntese envolveu uma arilação oxidativa e uma hidrogenação catalítica (Figura 1. B).



Figura 1. A: Fluoróforos utilizados. B: Síntese dos fluoróforos.

Primeiro caracterizou-se o espectro de absorção dos compostos em diversos solventes. Observou-se que o comprimento de onda do pico de absorção varia com o solvente utilizado; havendo um desvio batocrômico quando dissolvidos em DMSO, e em solventes mais apolares o desvio para o azul. Isso ocorre pela presença de amina primárias aromáticas que interagem fortemente com solventes mais polares. Uma vez caracterizada a absorção dos compostos foi realizado um ensaio para testar a influência do pH sobre os espectros de absorção e de emissão de fluorescência. A presença do anel anilina conjugado ao BODIPY, uma estrutura densa em elétrons, faz com que a protonação desse grupo funcional interfira na distribuição eletrônica da molécula, interferindo nos espectros de absorção e de emissão. Na amina desprotonada o par de elétrons não ligante participa da ressonância da molécula, porém uma vez protonada não há mais essa participação. Os dados obtidos indicam que a protonação está associada à formação de uma banda de absorção desviada para o azul e a uma fluorescência mais intensa, provavelmente associada a um efeito de transferência de elétrons fotoinduzida. A viragem observada nos ensaios de absorção e fluorescência ocorreram em um valor de pH inferior ao pKa da anilina, provavelmente devido ao efeito retirador de elétrons do anel BODIPY sobre a anilina.

Conclusões

Pode-se concluir que os compostos sintetizados de fato podem ser utilizados como sensores de pH, uma vez que possuem uma mudança nítida na fluorescência quando se altera a acidez do meio.

Agradecimentos

O grupo de pesquisa agradece à FAPES (projeto 038/2019), ao CNPq, à CAPES e à FAPESP.

¹ Sola-Llano, R.; Bañuelos, J. BODIPY Dyes - A Privilege Molecular Scaffold with Tunable Properties. IntechOpen, 2018.

ANEXOS

1) Extrapolação da emissão em meio ácido do composto 2.

Como no tempo de integração inicial de 93 (**Figura A1**) houve a extrapolação do espectro o tempo de integração foi mudado em meio ácido para 64, a fim de os dois espectros poderem ser completamente visualizados.

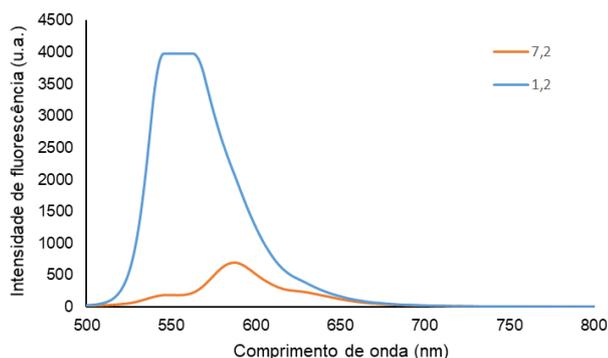


Figura A1 – Espectro de emissão em meio ácido extrapolado do composto 2.

2) Ensaio de dois pontos inconclusivo do composto 4.

Ensaio de dois pontos realizado para conferir problemas de solubilidade.

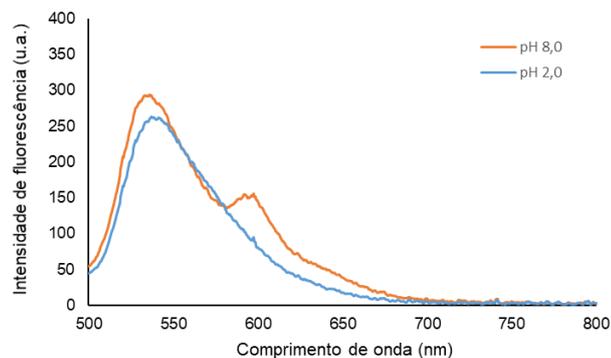


Figura A2 – Espectro de emissão com um ombro suspeito em pH 8,0 composto 4.

3) Demais espectros das titulações realizadas em triplicatas

Primeiro e segundo ensaio das titulações espectrofotométricas e fluorimétricas dos compostos 14 e 15 nos três sistemas de solventes.

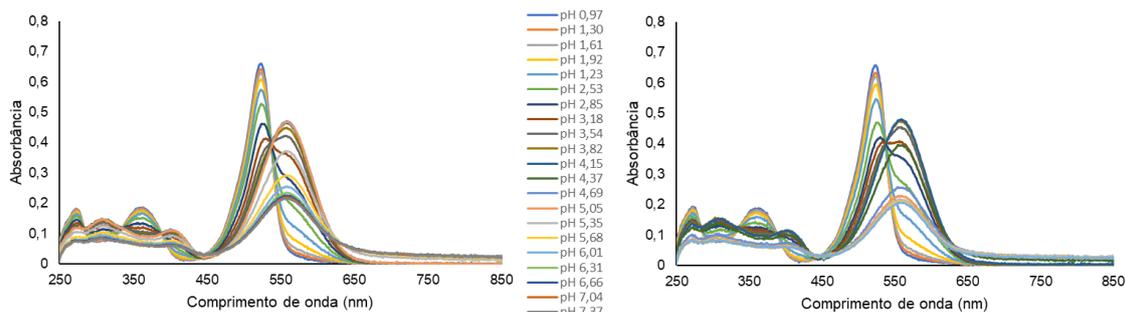


Figura A3 – Titulações espectrofotométricas em DMSO 30 % do composto 14.

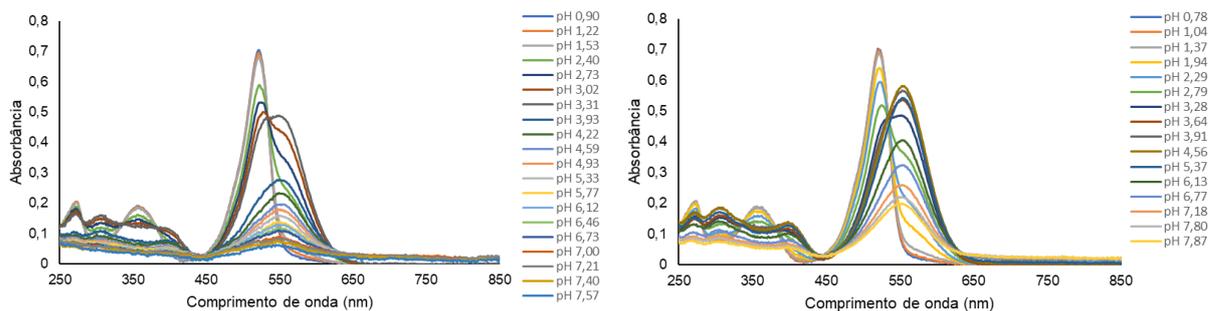


Figura A4 – Titulações espectrofotométricas em MeCN 30 % do composto 14.

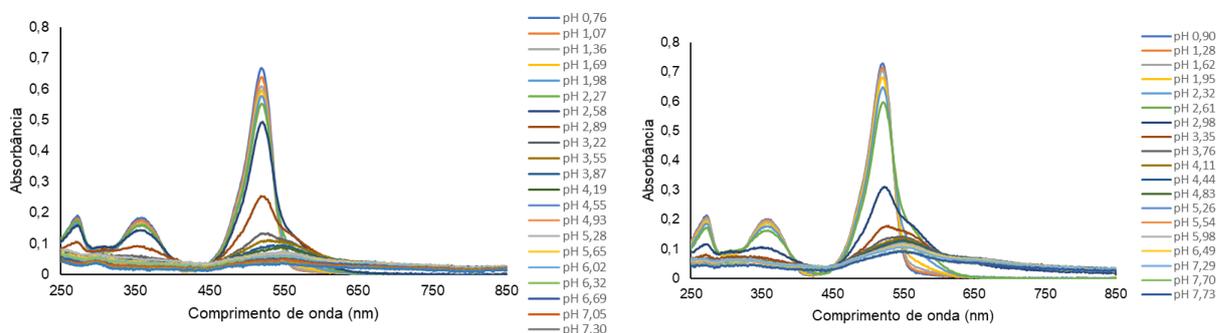


Figura A5 – Titulações espectrofotométricas em MeOH 30 % do composto 14.

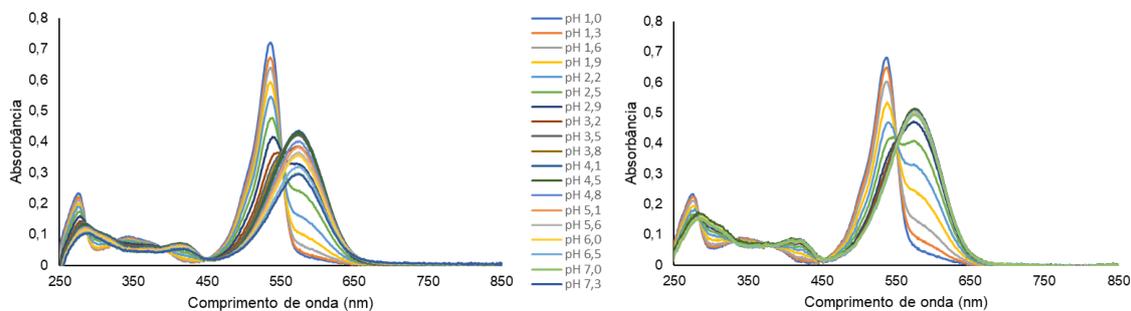


Figura A6 – Titulações espectrofotométricas em DMSO 30 % do composto 15.

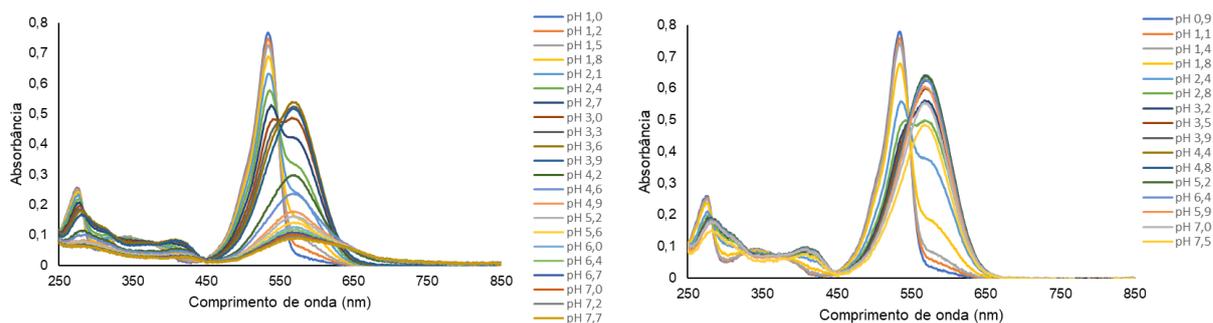


Figura A7 – Títulações espectrofotométricas em MeCN 30 % do composto **15**.

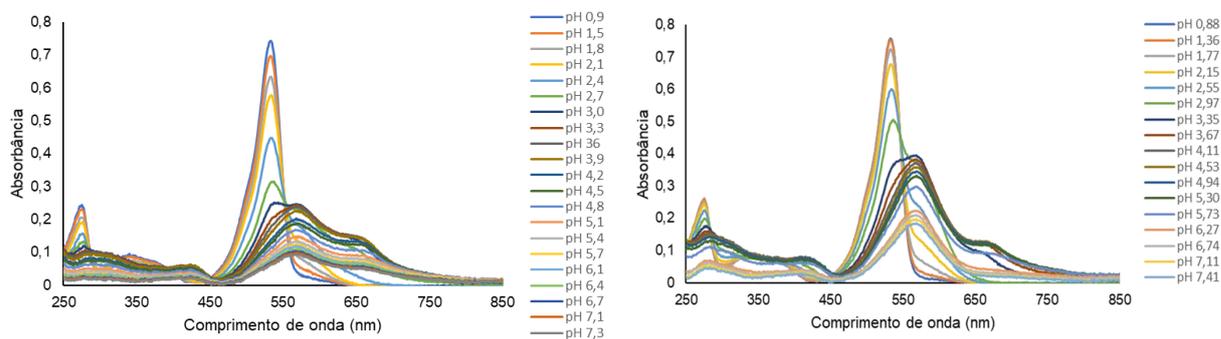


Figura A8 – Títulações espectrofotométricas em MeOH 30 % do composto **15**.

4) Curvas de titulação dos compostos **14** e **15**

Curvas de titulação espectrofotométricas e fluorimétricas dos compostos **14** e **15**.

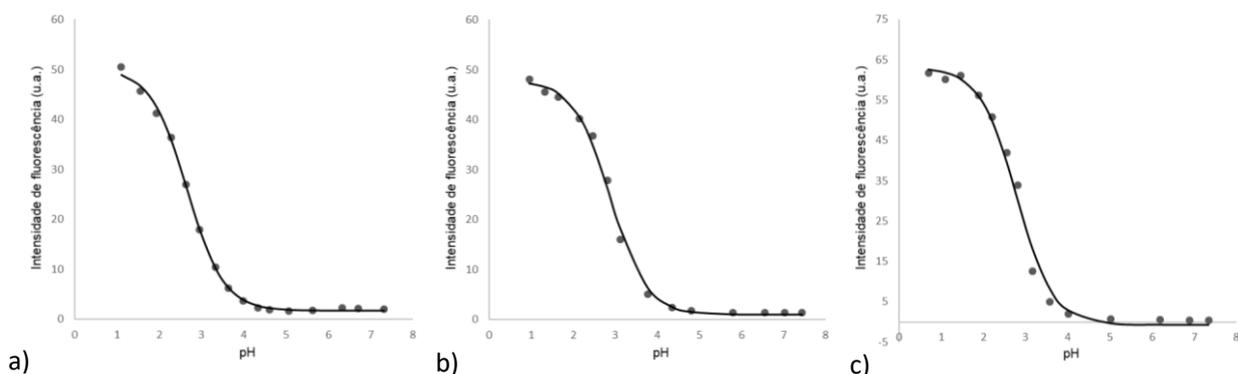


Figura A9 – Curvas fluorimétricas do composto **14**. a) DMSO 30 % b) MeCN 30 % c) MeOH 30 %. Excitação em 530 nm.

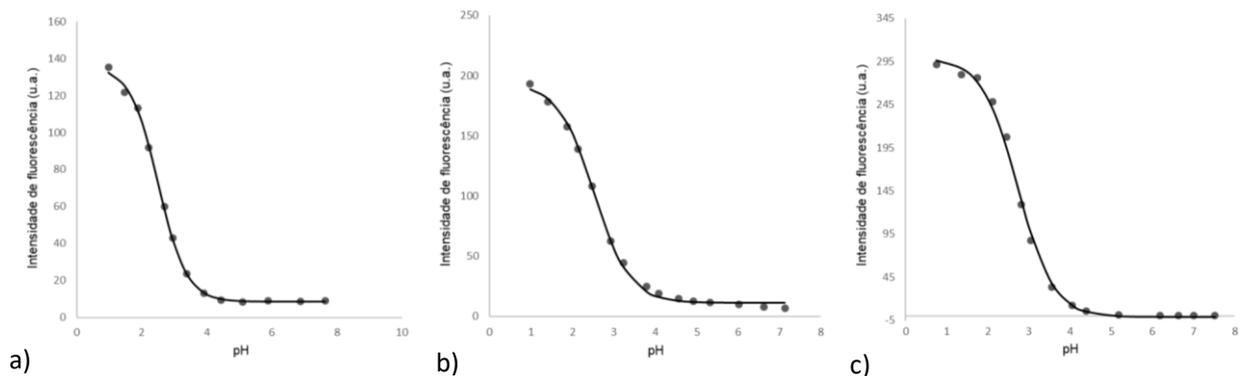


Figura A9 – Curvas fluorimétricas do composto **15**. a) DMSO 30 % b) MeCN 30 % c) MeOH 30 %. Excitação 522 nm.

5) Superfícies do orbital molecular desocupado de menor energia (LUMO) dos compostos 14 e 15

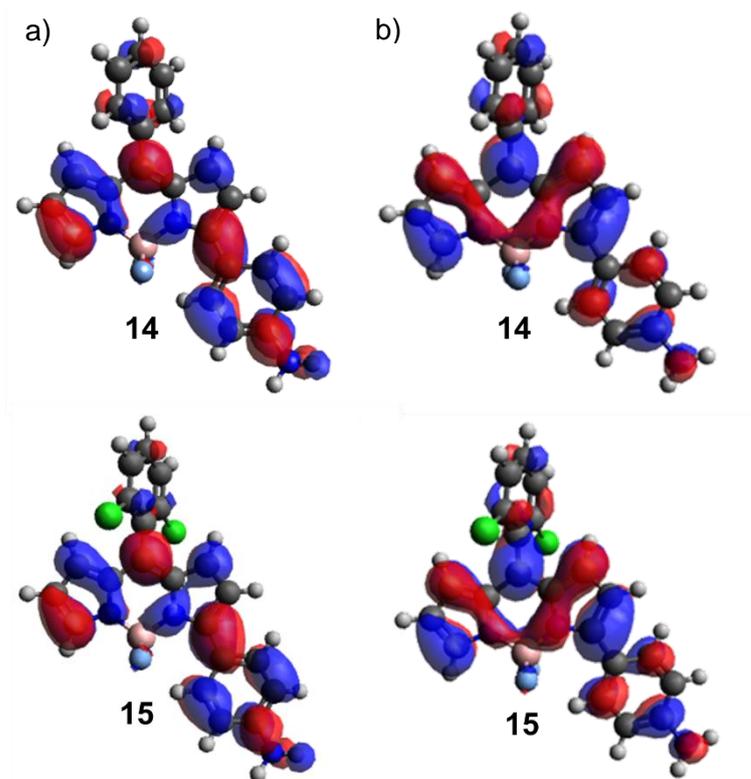


Figura A9 – Superfícies do orbital molecular desocupado de menor energia (LUMO) dos compostos **14** e **15** na forma protonada e desprotonada. a) Estado protonado. b) Estado desprotonado.