**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
Programa de Pós-Graduação em Química**

VICTOR FERNANDES CAVALCANTE

***Síntese de Seleno- e Teluro-Cumarinas para Estudos de
Emissão e Supressão de Fluorescência e Aplicações Analíticas
e/ou Biológicas***

Dissertação de Mestrado

Versão corrigida da Dissertação conforme Resolução CoPGr 5890

O original se encontra disponível na Secretaria de Pós-Graduação do IQ-USP

São Paulo

Data de depósito na SPG:

02/Junho/2017

VICTOR FERNANDES CAVALCANTE

Síntese de Seleno- e Teluro-Cumarinas para Estudos de Emissão e Supressão de Fluorescência e Aplicações Analíticas e/ou Biológicas

Dissertação apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Química (Química Orgânica)

Orientador: Alcindo A. Dos Santos

São Paulo

2017

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP

F376s Fernandes Cavalcante, Victor
 Síntese de Seleno- e Teluro-Cumarinas para
Estudos de Emissão e Supressão de Fluorescência e
Aplicações Analíticas e/ou Biológicas / Victor
Fernandes Cavalcante. - São Paulo, 2017.
 142 p.

Dissertação (mestrado) - Instituto de Química da
Universidade de São Paulo. Departamento de Química
Fundamental.
 Orientador: Dos Santos, Alcindo A.

 1. Sondas Fluorescentes. 2. Cumarinas. 3.
Pigmentos de Calcogênio. I. T. II. Dos Santos,
Alcindo A., orientador.

Em memória à minha madrinha Leila, por sempre me fazer acreditar e pensar em tudo o que vale a pena tentar e buscar sempre a superação dos meus limites, aceitando os desafios de transformar o mundo num lugar melhor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente e principalmente ao Pai Celestial, pela vida e por todas as minhas conquistas.

Aos meus familiares, minha mãe Fátima, meu pai José e meu irmão Persio, por toda a dedicação, educação, paciência, e conselhos sempre quando necessário além do apoio durante todos os anos da graduação e a vida.

Agradeço aos amigos de vida, Lucas Brusco e Eduardo Brusco que sempre me deram força durante os momentos mais difíceis e de cansaço, assim como também nos momentos mais felizes de realizações e conquistas. A minha eterna amiga Rúbia Yano, em quem eu sempre me espelhei e me incentivou a tomar este desafio dentro do mundo acadêmico. Agradeço aos amigos de graduação que se mantiveram comigo, Caroline Akemi, Mario Tanikoshi, Thaisa Umeda, Fernanda Carli, Luciana Dzik, Caroline Perez e Fernanda Rowies, por todo o companheirismo, apoio e força que me cederam durante todos esses anos, além de não medirem esforços em me ajudar sempre que preciso.

Agradeço também aos amigos da república Maciota; André Ferri, Henrique Fadel, Silvaney Ferreira, Leonardo Sai, Willian Silva, Andrews Santos e Felipe Testa, que me ajudaram a levar a vida longe de casa como uma grande família.

Ao professor Mauro Aquiles La Scalea, cujo incentivo e amizade durante os anos de graduação me fizeram enxergar uma nova trajetória no mundo acadêmico.

Ao professor Alcindo Dos Santos, por ter me acolhido em seu grupo de pesquisa, cuja orientação foi fundamental para o meu crescimento pessoal e profissional. Agradeço principalmente pela paciência, incentivo e dedicação durante a realização deste trabalho, tendo me apresentado à síntese orgânica com novos olhos e por ter me mostrado um mundo acadêmico repleto de oportunidades sobre as quais sou eternamente grato.

Gostaria de agradecer a ajuda e amizade do professor Dr. Carlos Lodeiro Espiño, do Dr. Javier Fernández Lodeiro e seu grupo REQUIMTE da Universidade Nova de Lisboa,

pela parceria e, mais do que isso pela consideração, mesmo que de longe, com os assuntos deste trabalho.

À amiga e companheira de laboratório Mônica Franco Zaninni Junqueira Amaral que teve papel fundamental no meu crescimento profissional e pessoal, gostaria de agradecer por todos os ensinamentos e a paciência que teve comigo em diversos momentos, se tornando uma das pessoas que eu mais admiro pelo profissionalismo, moral e conhecimento. Obrigado, Monicão!

À amiga Laís Sottili de Matos, gostaria de agradecer a toda ajuda que sempre me cedeu em diversos momentos, aos ensinamentos diários de tolerância e cortesia e também por sempre torcer por mim. Obrigado, Broto!

Ao amigo e colega de laboratório George Hideki Sakae, gostaria de agradecer a toda ajuda dentro e fora do laboratório, assim como por todos os momentos de descontração, além da paciência como meu vizinho de bancada.

Ao amigo e colega de laboratório Cleverson Rogerio Princival, gostaria de agradecer a toda ajuda e dedicação por quase todo o período de mestrado, principalmente pela paciência de me ensinar e auxiliar sempre que possível.

Ao professor Erick Leite Bastos por sempre disponibilizar seu tempo e laboratório tendo agregado imensamente com os interesses deste trabalho. Agradeço principalmente às suas alunas; Ana Clara Beltran Rodrigues e Barbara Coelho de Freitas Dörr, pela amizade durante esse período e por sempre me ajudarem e ensinarem. Muito do que eu consegui realizar neste trabalho se deve à ajuda de vocês! Obrigado por terem me ensinado e ajudado a passar os dias com a harmonia e alegria que eu tanto precisava.

Agradeço aos colegas de laboratório que foram essenciais no dia a dia e que de alguma forma contribuíram para este trabalho; Evelyn Schevciw, Gizele Celante, Jamila Djafari, Nayara Sato, Alexandre Sardelli, Antonio Soares, Augusto Gonçalves, Bruno de Sousa, Henrique Marques, Leandro Takata, Marcos Archilha, Marcos Botelho, Javier Lodeiro, João Petrarca e Yuniel Tejeda.

À aluna de doutorado Railmara Pereira da Silva orientanda da Profa. Dra. Flávia Meotti, pelo auxílio nos estudos de atividade biológica desenvolvidos neste trabalho.

Ao professor Rodrigo Luiz Oliveira Rodrigues Cunha, por ter nos ajudado cedendo espaço em seu laboratório, na Universidade Federal do ABC, UFABC, para trabalhar, quando foi necessário.

Aos colegas do bloco 11 e do laboratório do Professor Dr. Massuo Jorge Kato, pela ótima convivência. Assim como também agradeço à Dra. Lydia Fumiko Yamaguchi por ter cedido espaço e tempo em seu laboratório para a realização de algumas análises.

Aos funcionários da secretaria do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, da Central Analítica e do Almoxarifado que sempre auxiliaram da melhor maneira possível.

À FAPESP pela bolsa concedida (Processo 2014/07626-5) e ao CNPq pelo suporte financeiro concedido ao laboratório de pesquisa.

À Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP, do *campus* de Diadema, pela estrutura e laboratórios. Aos docentes, pelo conhecimento transmitido, pelas longas horas de estudo e batalha ao longo de quatro anos durante a minha graduação, aos funcionários e alunos que continuam lutando para a melhoria de nossa instituição. Aos amigos da Química, turma 03! Obrigado pelo papel, quiçá mais importante, para a construção do profissional que sou hoje.

Muito obrigado!

“The man who makes no mistakes usually does not make anything.”

- Edward John Phelps

Resumo

Cavalcante, F. V., **Síntese de Seleno- e Teluro-Cumarinas para Estudos de Emissão e Supressão de Fluorescência e Aplicações Analíticas e/ou Biológicas**. 2017. 142 páginas. Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Química, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Nos últimos anos, o desenvolvimento e a aplicação de sondas contendo átomos de calcogênio, expandiu significativamente, devido principalmente à reatividade dos elementos dessa família que são facilmente oxidados aos seus correspondentes calcogenóxidos e calcogenonas, permitindo diversas aplicações, especialmente em sistemas biológicos.

A inserção de átomos pesados como os calcogênios, ao núcleo fluorofórico, leva à supressão de fluorescência, processo conhecido por “efeito do átomo pesado” também atribuída por Transferência Eletrônica Fotoinduzida (*Photoinduced Electron Transfer*). A oxidação do calcogênio ao correspondente calcogenóxido ou calcogenona inibe esse processo reestabelecendo a fluorescência.

Todavia, moléculas com núcleo fluorofórico contendo, principalmente, os átomos de selênio e telúrio tem suas propriedades fotofísicas pouco investigadas, se comparado com moléculas contendo o átomo de enxofre. Neste trabalho foi tratado do desenvolvimento de metodologias de preparação de sondas contendo os átomos de selênio (II) e telúrio (II), mais especificamente, através da funcionalização da 7-hidróxi-4-metil-cumarina.

Foram preparadas 6 calcogeno-cumarinas inéditas em rendimentos que variaram de 27% a 69%. Esses compostos apresentaram comportamento fluorescente condizente com o que havia sido idealizado: suas propriedades fotofísicas foram determinadas em acetonitrila, a 298 K, observando-se máximos de absorção em 290 nm e em 320 nm e máximo de emissão de fluorescência em 380 nm. Demais propriedades fotofísicas como rendimento quântico e tempo de vida do estado excitado também foram obtidas.

Também foram realizados estudos com os compostos sintetizados frente a espécies oxidantes endógenas (ClO^- e H_2O_2) permitindo inicializar estudos em sistemas celulares, observando-se que as cumarinas contendo o átomo de telúrio (II) demonstraram resultados promissores para seu uso como sondas fluorescentes.

Palavras-chave: Sondas Fluorescentes, Cumarinas, Pigmentos de Calcogênio.

Abstract

Cavalcante, F. V., **Synthesis of Selenium- and Tellurium-coumarins for fluorescence emission and suppression studies and analytical and/or biological applications**. 2017. 142 pages. Masters Thesis – Graduate Program in Chemistry, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

In the last years, the development and application of chalcogen-containing –dyes has expanded significantly, mainly due to the chalcogen elements reactivity that are easily oxidized to their correspondent chalcogenides and chalcogenones, allowing several applications, especially in biological systems.

The insertion of heavy atoms such as chalcogens to the fluorophoric core of the molecule leads to a fluorescence suppression, process known as “heavy atom effect”, also attributed as Photoinduced Electron Transfer (PeT). The chalcogen oxidation to its correspondent chalcogenoxide or chalcogenone inhibits this process reestablishing the fluorescence of the molecule.

However, fluorophoric molecules containing selenium and tellurium are not very investigated towards its photophysical properties if compared to their sulfur analogues. It is discussed in this work, the development of methodologies for the preparation of probes containing selenium (II) and tellurium (II), more specifically, through the functionalization of the 7-methyl-4-hydroxi-coumarin.

Six novel chalcogen-coumarins were prepared presenting yields varying from 27% to 69%. These compounds presented consistent fluorescent behavior for what it was predicted: their photophysical properties were determined observing absorption maxima at 290 nm and 320 nm and fluorescence maxima at 380 nm. Other photophysical properties such as quantum yields and excited state lifetime were also obtained.

Studies with the synthesized compounds related to their behavior against endogenous oxidant species (ClO^- and H_2O_2) were also conducted, allowing initial studies in cell systems, which demonstrated that the tellurium (II) derived coumarins presented promising results as fluorescent probes.

Key-words: Fluorescent Probes, Coumarins, Chalcogen-Dyes.

Sumário

Resumo	ix
Abstract	x
<i>Lista de Abreviaturas e Símbolos</i>	xii
<i>Lista de Figuras</i>	xiii
<i>Lista de Esquemas</i>	xvii
<i>Lista de Tabelas</i>	xviii
1. Introdução	19
2. Objetivos	33
2.1 Objetivos específicos	33
3. Resultados e Discussão	34
3.1 Preparação dos precursores dos núcleos cumarínicos	34
3.2 Funcionalização do núcleo cumarínico	39
3.3 Funcionalização dos núcleos cumarínicos a partir da adição eletrofílica de trialetos de organiltelúrio	52
3.4 Funcionalização dos núcleos cumarínicos com grupos RY (R = Bu, Ph e Y = S, Se e Te)	56
3.4.1 Caracterização das propriedades fotofísicas	59
3.4.2 Determinação de espécies oxidantes	64
3.4.3 Titulação espectrofotométrica e espectrofluorimétrica com as espécies oxidantes	66
3.5 Aplicação biológica	78
4. Conclusões e Considerações Finais	86
5. Materiais e Métodos	88
5.1 Condições gerais	88
5.2 Ressonância magnética nuclear	88
5.3 Espectrometria de massas	89
5.4 Cromatografia líquida de alta eficiência	89
5.5 Espectros de infravermelho	89
5.6 Espectros de absorção na região do visível e do ultravioleta e espectros de emissão de fluorescência	89
5.7 Determinação do rendimento quântico de fluorescência (Φ_F)	90
5.8 Tempo de vida de fluorescência do estado excitado (τ)	90
5.9 Cálculo das constantes de decaimento radiativo de fluorescência (k_f) e de decaimento não radiativo (k_{nr})	92
6. Procedimentos Experimentais	93
7. Anexos	102
8. Referências Bibliográficas	137
SÚMULA CURRICULAR	141

Lista de Abreviaturas e Símbolos

CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CG/EM	Cromatografia Gasosa /Espectrometria de Massas
HOMO	Orbital Molecular Ocupado de Maior Energia
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Performance (“ <i>High Liquid Performance Chromatography</i> ”)
HRMS-ESI-TOF	Espectrometria de Massas de Alta Resolução Acoplado à Ionização por Eletronspray com Analisador do Tipo "Time of Fly"
Hz	Herz
ICT	Transferência Intramolecular de Carga (“ <i>Intramolecular Charge Transfer</i> ”)
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada (“ <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i> ”)
LUMO	Orbital Molecular Não Ocupado de Menor Energia
MO	Micro-ondas
ppm	Partes por milhão
R _f	Fator de retenção
RMN de ¹²⁵ Te	RMN de Telúrio - 125
RMN de ¹³ C	RMN de Carbono - 13
RMN de ¹ H	RMN de Hidrogênio
RMN de ⁷⁷ Se	RMN de Selênio - 77
UV/Vis	Espectroscopia no Ultravioleta Visível
δ	Deslocamento químico
<i>J</i>	Constante de acoplamento
Φ _F	Rendimento quântico de fluorescência
ε	Coefficiente de absortividade molar
Δν	Deslocamento de Stokes
λ _{abs}	Comprimento de máximo de absorção
λ _{exc}	Comprimento de máximo de excitação
λ _{em}	Comprimento de máximo de emissão de fluorescência
τ	Tempo de vida
k _f	Constante de decaimento radiativo por fluorescência
k _{nr}	Constante de decaimento não radiativa

Lista de Figuras

Figura 1. Estrutura típica de uma cumarina e a numeração do núcleo de acordo com a IUPAC.	19
Figura 2. Diagrama de Jablonski. Adaptado de Lakowicz, J., Principles of Fluorescence Spectroscopy, 2006, Springer.	24
Figura 3. a) Derivados de cumarinas com diferentes substituintes; b) Propriedades fotofísicas dos derivados. Fonte: Adaptado de Ranjith, C. et al, Spectrochimica Acta Part A, 2010, 75 p. 1611.	27
Figura 4. Sondas fluorescentes (Se-1 e Se-2) derivadas de cumarina: a) Células de macrófago RAW 264,7 tratadas com a sonda Se-1 b) Células de macrófago RAW 264,7 após de tratamento com LPS, endotoxina responsável pela produção de OCl^- intracelular. Após a adição de Se-1, observou-se a emissão de fluorescência em 480 nm. Fonte: Adaptado de Jiang, H. et al, Org. Lett., 2013, 15, 8, p. 2002.	28
Figura 5. a) Espectro de emissão de fluorescência de Se-1 (4 $\mu\text{mol/L}$) sob adição de HOCl (0 - 32 $\mu\text{mol/L}$); b) Intensidade de emissão de fluorescência de Se-1 a 480 nm em função da concentração de HOCl no intervalo de 0 - 6,4 $\mu\text{mol/L}$; c) Resposta de fluorescência de Se-1 (4 $\mu\text{mol/L}$) a adição de HOCl ; as setas representam a adição de 4 $\mu\text{mol/L}$ de HOCl ; d) Resposta de emissão de fluorescência de Se-1 e Se-2 (4 $\mu\text{mol/L}$) com adição de HOCl (100 $\mu\text{mol/L}$) e outras espécies de ROS/RNS (200 $\mu\text{mol/L}$): as barras representam a intensidade de emissão após (F) e antes (F_0) da adição de ROS/RNS. Fonte: Adaptado de Jiang, H. et al, Org. Lett. 2013, 15, 8, p. 2004.	29
Figura 6. Adição de Se-1 a um sistema contendo MPO, H_2O_2 e Cl^- . a) Aumento de fluorescência em função do tempo para reação de 4 $\mu\text{mol/L}$ de Se-1 num sistema catalisado por enzima (tampão PBS, 40 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 e 1 $\mu\text{g/mL}$ de MPO, $\text{pH}=7,4$, 37°C); b) Resposta de fluorescência de Se-1 na ausência ($\circ$) e presença ($\bullet$) de MPO. Fonte: Adaptado de Jiang, H. et al, Org. Lett. 2013, 15, 8, p. 2004.	30
Figura 7. Sonda fluorescente baseada no efeito PeT, “off-on”; a) a transferência eletrônica proveniente do receptor para o fluoróforo foto-excitado (hv) cria o efeito “off” do sensor; b) a transferência de elétron do receptor ao fluoróforo é bloqueada após o receptor ter sido oxidado pela espécie oxidante endógena, resultando no estado “on” do sensor. Fonte: Adaptado de Prasanna de Silva, A., Moody, T. M., Wright, G. D., Analyst, 2009, 134, p. 2386.	32
Figura 8. Espectro de RMN de ^1H de 12 ($\text{DMSO} - d_6$, 200MHz).	37
Figura 9. Espectro de massas de baixa resolução do composto 12	38
Figura 10. Espectro de RMN de ^1H de 7-hidróxi-4-metil-cumarina (16) (DMSO , 200MHz).	40
Figura 11. Espectro de RMN de ^1H da 4-metil-7-(fenilselanil)pirano[3,2-g]cromen-2(8H)-ona (19) (CDCl_3 , 200 MHz).	43
Figura 12. Espectro de absorção (linha cheia) a temperatura ambiente ($\lambda_{\text{abs}} = 316 \text{ nm}$), emissão normalizada (I_{norm} , linha pontilhada, $\lambda_{\text{em}} = 380 \text{ nm}$) do composto 19 em acetonitrila ($10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$).	44
Figura 13. Estudo solvatocrômico do composto 19 em acetonitrila ($\lambda_{\text{abs}} = 288, 316 \text{ nm}$), etanol ($\lambda_{\text{abs}} = 289, 320 \text{ nm}$), DMSO ($\lambda_{\text{abs}} = 291, 320 \text{ nm}$) e clorofórmio ($\lambda_{\text{abs}} = 290, 321 \text{ nm}$), todos na concentração de $10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$	45
Figura 14. Titulação espectrométrica (a) e espectrofluorimétrica (b) de 19 com peróxido de hidrogênio.46	
Figura 15. Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) do material isolado para a reação de obtenção de 20	49
Figura 16. Espectro de RMN de ^1H do composto 37 (CDCl_3 , 200MHz).	53
Figura 17. Espectro de RMN de ^1H do composto 38 (CDCl_3 , 800MHz).	54
Figura 18. Espectro de RMN de ^1H da fenil-seleno-cumarina 42 (CDCl_3 , 200 MHz).	57
Figura 19. Espectro de RMN de ^1H da cumarina 45 ($\text{DMSO} - d_6$, 200 MHz).	58
Figura 20. Espectro de absorção (linha cheia) a temperatura ambiente ($\lambda_{\text{abs}} = 319 \text{ nm}$), emissão normalizada (linha pontilhada, $\lambda_{\text{em}} = 378 \text{ nm}$) e espectro de excitação (linha tracejada, $\lambda_{\text{exc}} = 319 \text{ nm}$) do composto 42 em acetonitrila (10^{-5} mol/L).	59
Figura 21. Seletividade dos calcogenetos frente às espécies oxidantes H_2O_2 e HOCl (10 equivalentes). .65	
Figura 22. a) Espectros de absorção de 41 ; b) Emissão de fluorescência de 41 (10 μM) em acetonitrila, com adição de concentrações incrementares de HOCl (10 em 10 μM até estabilização do λ_{em} em 240 μM) em solução aquosa. $\lambda_{\text{ex}} = 319 \text{ nm}$; (c) Resposta linear de aumento de λ_{em} em 380 nm.	67

Figura 23. a) Espectros de absorção de 41 ; b) Emissão de fluorescência de 41 (10 µM) em acetonitrila, com adição concentrações incrementares de H ₂ O ₂ (10 em 10 µM até estabilização do λ _{em} em 200 µM) em solução aquosa. λ _{ex} = 319 nm; (c) Resposta linear de aumento de λ _{em} em 380 nm.....	67
Figura 24. a) Espectros de absorção de 42 ; b) Emissão de fluorescência de 42 (10 µM) em acetonitrila, com adição de concentrações incrementares de HOCl (10 em 10 µM até estabilização do λ _{em} em 260 µM) em solução aquosa. λ _{ex} = 319 nm; (c) Resposta linear de aumento de λ _{em} em 377 nm.....	68
Figura 25. a) Espectros de absorção de 42 ; b) Emissão de fluorescência de 42 (10 µM) em acetonitrila, com adição concentrações incrementares de H ₂ O ₂ (10 em 10 µM até estabilização do λ _{em} em 230 µM) em solução aquosa. λ _{ex} = 319 nm; (c) Resposta linear de aumento de λ _{em} em 380 nm.....	68
Figura 26. a) Espectros de absorção de 43 ; b) Emissão de fluorescência de 43 (10 µM) em acetonitrila, com adição de concentrações incrementares de HOCl (10 em 10 µM até estabilização do λ _{em} em 170 µM) em solução aquosa. λ _{ex} = 319 nm; (c) Resposta linear de aumento de λ _{em} em 380 nm.....	69
Figura 27. a) Espectros de absorção de 43 ; b) Emissão de fluorescência de 43 (10 µM) em acetonitrila, com adição concentrações incrementares de H ₂ O ₂ (10 em 10 µM até estabilização do λ _{em} em 230 µM) em solução aquosa. λ _{ex} = 319 nm; (c) Resposta linear de aumento de λ _{em} em 380 nm.....	69
Figura 28. a) Espectros de absorção de 44 ; b) Emissão de fluorescência de 44 (10 µM) em acetonitrila, com adição de concentrações incrementares de HOCl (10 em 10 µM até estabilização do λ _{em} em 60 µM) em solução aquosa. λ _{ex} = 319 nm; (c) Resposta linear de aumento de λ _{em} em 379 nm.....	71
Figura 29. a) Espectros de absorção de 44 ; b) Emissão de fluorescência de 44 (10 µM) em acetonitrila, com adição concentrações incrementares de H ₂ O ₂ (10 em 10 µM até estabilização do λ _{em} em 80 µM) em solução aquosa. λ _{ex} = 319 nm; (c) Resposta linear de aumento de λ _{em} em 379 nm.....	71
Figura 30. a) Espectros de absorção de 45 ; b) Emissão de fluorescência de 45 (10 µM) em acetonitrila, com adição de concentrações incrementares de HOCl (10 em 10 µM até estabilização do λ _{em} em 150 µM) em solução aquosa. λ _{ex} = 319 nm; (c) Resposta linear de aumento de λ _{em} em 378 nm.....	72
Figura 31. a) Espectros de absorção de 45 ; b) Emissão de fluorescência de 45 (10 µM) em acetonitrila, com adição de concentrações incrementares de H ₂ O ₂ (10 em 10 µM até estabilização do λ _{em} em 100 µM) em solução aquosa. λ _{ex} = 319 nm; (c) Resposta linear de aumento de λ _{em} em 378 nm.....	72
Figura 32. a) Espectros de absorção de 46 ; b) Emissão de fluorescência de 46 (10 µM) em acetonitrila, com adição de concentrações incrementares de HOCl (10 em 10 µM até estabilização do λ _{em} em 150 µM) em solução aquosa. λ _{ex} = 319 nm; (c) Resposta linear de aumento de λ _{em} em 378 nm.....	73
Figura 33. a) Espectros de absorção de 46 ; b) Emissão de fluorescência de 46 (10 µM) em acetonitrila, com adição de concentrações incrementares de H ₂ O ₂ (10 em 10 µM até estabilização do λ _{em} em 150 µM) em solução aquosa. λ _{ex} = 319 nm; (c) Resposta linear de aumento de λ _{em} em 380 nm.....	73
Figura 34. Cromatograma do padrão da cumarina 42	75
Figura 35. Cromatograma do padrão da cumarina (42) após adição de 1 equivalente de peróxido de hidrogênio.....	75
Figura 36. Cromatograma do padrão da cumarina (42) após adição de 3 equivalentes de peróxido de hidrogênio.....	76
Figura 37. a) Espectro de massas do primeiro componente com t _{r1} = 0,71 minutos; b) Espectro de massas do segundo componente com t _{r2} = 10,13 minutos.	76
Figura 38. a) Estrutura da enzima mieloperoxidase (MPO); b) Atividade Catalítica da MPO: mecanismos de halogenação e peroxidação de MPO; MPO ³⁺ é o complexo férrico da mieloperoxidase. RH representa os substratos orgânicos que sofrem a peroxidação, como tirosina, ascorbato e urato. R• é o radical produzido frente à oxidação de RH. Fonte: Adaptado de Meotti, C. Flávia et al, The Journal of Biological Chemistry, 2011 , 286, 15, 12901-12911, p. 12902.	79
Figura 39. 1a) Formação do ácido hipocloroso catalisado pela mieloperoxidase a partir de peróxido de hidrogênio e íon cloreto, 1b) Reação de cloração da taurina a partir do ácido hipocloroso, 1c) Oxidação da Tau-Cl por TNB e formação do DTNB que possui λ _{abs} = 320 -330 nm; 2) Espectros de absorbância do TNB (λ _{abs} = 412nm) e seu produto de oxidação, o DTNB (λ _{abs} = 320 -330 nm).	80
Figura 40. Estruturas dos compostos 43 e 46 selecionados para os estudos de aplicação biológica.	80
Figura 41. Estudo cinético de 43 em meio aquoso (PBS) com adições de 5, 10, 20 e 40 µmol/L de ácido hipocloroso; (E1 – branco, E2 – 5 µmol/L de HOCl, E3 – 10 µmol/L de HOCl, E4– 20 µmol/L de HOCl, E5– 40 µmol/L de HOCl).	81

Figura 42. Estudo cinético de 46 em meio aquoso (PBS) com adições de 5, 10, 20 e 40 $\mu\text{mol/L}$ de ácido hipocloroso; (F1 – branco, F2 – 5 $\mu\text{mol/L}$ de HOCl, F3 – 10 $\mu\text{mol/L}$ de HOCl, F4– 20 $\mu\text{mol/L}$ de HOCl, F5– 40 $\mu\text{mol/L}$ de HOCl).	81
Figura 43. Gráfico da concentração de HOCl em $\mu\text{mol/L}$ obtida no grupo controle e nos grupos contendo a sonda 46 em 10 $\mu\text{mol/L}$ e em 20 $\mu\text{mol/L}$	84
Figura 44. Gráfico de emissão de fluorescência por concentração da sonda adicionada ao meio celular (HI-60).	85
Figura 45. Espectro de massas de baixa resolução do composto 12 ; CGEM $m/z = 266$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$).....	102
Figura 46. Espectro de RMN de ^1H de 12 (DMSO – d_6 , 200MHz).....	102
Figura 47. Espectro de RMN de ^{13}C de 12 (DMSO – d_6 , 50MHz).....	103
Figura 48. Espectro de RMN de ^{77}Se de 12 (DMSO – d_6 , 38MHz).	103
Figura 49. Espectro de absorção (linha cheia) a temperatura ambiente ($\lambda_{\text{abs}} = 319 \text{ nm}$), emissão normalizada (linha pontilhada, $\lambda_{\text{em}} = 378 \text{ nm}$) e espectro de excitação (linha tracejada, $\lambda_{\text{exc}} = 319 \text{ nm}$) do composto 16 em acetonitrila (10^{-5} mol/L).	104
Figura 50. Espectro de RMN de ^1H de 16 (DMSO – d_6 , 200MHz).....	104
Figura 51. Espectro de RMN de ^{13}C de 16 (DMSO – d_6 , 50MHz).....	105
Figura 52. Espectro de IV de 16	105
Figura 53. Espectro de massas de baixa resolução do composto 17 ; CGEM $m/z = 332$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$).....	106
Figura 54. Espectro de massas de alta resolução do composto 18 ; ($[\text{M}+\text{H}]^+ = 216,07$).	106
Figura 55. Espectro de RMN de ^1H do composto 18 (CDCl_3 , 200MHz).	107
Figura 56. Espectro de RMN de ^{13}C do composto 18 (CDCl_3 , 50MHz).	107
Figura 57. Espectros de absorção de 19 em Dimetilsulfóxido em diferentes concentrações.	108
Figura 58. Espectros de absorção de 19 em Acetonitrila em diferentes concentrações.....	109
Figura 59. Espectros de absorção de 19 em Etanol em diferentes concentrações.	110
Figura 60. Espectros de absorção de 19 em Clorofórmio em diferentes concentrações.	111
Figura 61. Espectro de RMN de ^1H de 19 (CDCl_3 , 200MHz).....	112
Figura 62. Espectro de RMN de ^{13}C de 19 (CDCl_3 , 50MHz).....	112
Figura 63. Espectro de RMN de ^1H de 37 (CDCl_3 , 200MHz).....	113
Figura 64. Espectro de RMN de ^{13}C de 37 (CDCl_3 , 50MHz).....	114
Figura 65. Espectro de RMN de ^{77}Se de 37 (CDCl_3 , 38MHz).	114
Figura 66. Espectro de RMN de ^1H de 38 (CDCl_3 , 200MHz).....	115
Figura 67. Espectro de RMN de ^{13}C de 38 (CDCl_3 , 50MHz).....	116
Figura 68. Espectro de RMN de ^{125}Te de 38 (CDCl_3 , 63MHz).....	116
Figura 69. Espectro de absorção (linha cheia) a temperatura ambiente ($\lambda_{\text{abs}} = 319 \text{ nm}$), emissão normalizada (linha pontilhada, $\lambda_{\text{em}} = 378 \text{ nm}$) e espectro de excitação (linha tracejada, $\lambda_{\text{exc}} = 319 \text{ nm}$) do composto 39 em acetonitrila (10^{-5} mol/L).	117
Figura 70. Espectro de massas de alta resolução do composto 39 ; ($[\text{M}+\text{H}]^+ = 221,08$).	117
Figura 71. Espectro de RMN de ^1H de 39 (DMSO – d_6 , 200MHz).....	118
Figura 72. Espectro de RMN de ^{13}C de 39 (DMSO – d_6 , 50MHz).....	118
Figura 73. Espectro de IV 39	119
Figura 74. Espectro de absorção (linha cheia) a temperatura ambiente ($\lambda_{\text{abs}} = 319 \text{ nm}$), emissão normalizada (linha pontilhada, $\lambda_{\text{em}} = 376 \text{ nm}$) e espectro de excitação (linha tracejada, $\lambda_{\text{exc}} = 319 \text{ nm}$) do composto 40 em acetonitrila (10^{-5} mol/L).	119
Figura 75. Espectro de massas de alta resolução do composto 40 ; ($[\text{M}+\text{H}]^+ = 375,08$).	120
Figura 76. Espectro de RMN de ^1H de 40 (DMSO – d_6 , 200MHz).....	120
Figura 77. Espectro de RMN de ^{13}C de 40 (DMSO – d_6 , 50MHz).....	121
Figura 78. Espectro de IV 40	121
Figura 79. Espectro de absorção (linha cheia) a temperatura ambiente ($\lambda_{\text{abs}} = 319 \text{ nm}$), emissão normalizada (linha pontilhada, $\lambda_{\text{em}} = 377 \text{ nm}$) e espectro de excitação (linha tracejada, $\lambda_{\text{exc}} = 319 \text{ nm}$) do composto 41 em acetonitrila (10^{-5} mol/L).	122
Figura 80. Espectro de RMN de ^1H de 41 (CDCl_3 , 200MHz).....	123
Figura 81. Espectro de RMN de ^{13}C de 41 (CDCl_3 , 50MHz).....	123
Figura 82. Espectro de IV 41	124

Figura 83. Espectro de absorção (linha cheia) a temperatura ambiente ($\lambda_{\text{abs}} = 319 \text{ nm}$), emissão normalizada (linha pontilhada, $\lambda_{\text{em}} = 378 \text{ nm}$) e espectro de excitação (linha tracejada, $\lambda_{\text{exc}} = 319 \text{ nm}$) do composto 42 em acetonitrila (10^{-5} mol/L).	124
Figura 84. Espectro de massas de alta resolução do composto 42 ; ($[\text{M}+\text{Na}]^+ = 383,02$).	125
Figura 85. Espectro de RMN de ^1H de 42 (CDCl_3 , 200MHz).	125
Figura 86. Espectro de RMN de ^{13}C de 42 (CDCl_3 , 50MHz).	126
Figura 87. Espectro de RMN de ^{77}Se de 42 (CDCl_3 , 38MHz).	126
Figura 88. Espectro de IV 42	127
Figura 89. Espectro de absorção (linha cheia) a temperatura ambiente ($\lambda_{\text{abs}} = 319 \text{ nm}$), emissão normalizada (linha pontilhada, $\lambda_{\text{em}} = 380 \text{ nm}$) e espectro de excitação (linha tracejada, $\lambda_{\text{exc}} = 319 \text{ nm}$) do composto 43 em acetonitrila (10^{-5} mol/L).	127
Figura 90. Espectro de RMN de ^1H de 43 em (CDCl_3 , 200MHz).	128
Figura 91. Espectro de RMN de ^{13}C de 43 (CDCl_3 , 50MHz).	128
Figura 92. Espectro de RMN de ^{125}Te de 43 (CDCl_3 , 63MHz).	129
Figura 93. Espectro de IV 43	129
Figura 94. Espectro de RMN de ^1H de 44 (CDCl_3 , 200MHz).	130
Figura 95. Espectro de RMN de ^{13}C de 44 (CDCl_3 , 50MHz).	131
Figura 96. Espectro de IV 44	131
Figura 97. Espectro de massas de alta resolução de 45 ; ($[\text{M}+\text{Na}]^+ = 363,03$).	132
Figura 98. Espectro de RMN de ^1H de 45 ($\text{DMSO} - d_6$, 200MHz).	132
Figura 99. Espectro de RMN de ^{13}C de 45 ($\text{DMSO} - d_6$, 50MHz).	133
Figura 100. Espectro de RMN de ^{77}Se de 45 ($\text{DMSO} - d_6$, 38MHz).	133
Figura 101. Espectro de IV 45	134
Figura 102. Espectro de RMN de ^1H de 46 (CDCl_3 , 200MHz).	135
Figura 103. Espectro de RMN de ^1H de 46 (CDCl_3 , 50MHz).	135
Figura 104. Espectro de RMN de ^{125}Te de 46 (CDCl_3 , 63MHz).	136
Figura 105. Espectro de IV 46	136

Lista de Esquemas

Esquema 1. Condensação de Perkin.	20
Esquema 2. Proposta de mecanismo para a preparação do núcleo cumarínico através da condensação de Perkin.	21
Esquema 3. Condensação de Pechmann.	22
Esquema 4. Proposta de mecanismo para a preparação da 7-hidróxi-4-metil-cumarina através da condensação de Pechmann.	23
Esquema 5. Condensação de Pechmann.	34
Esquema 6. Estratégia de preparação de seleno-resorcinol (12) e em seguida a preparação do núcleo cumarínico (13) contendo o átomo de selênio.	34
Esquema 7. Funcionalização do grupo indol (14) através de dicalcogeneto de difenila, sob catálise de I ₂ , em micro-ondas a 80°C. Mecanismo de reação para a formação da espécie eletrofílica de calcogênio PhYI e funcionalização do grupo indol (14). Fonte: Adaptado de Braga, A. L., et al, J. Org. Chem., 2014 , 79, p. 4127.	35
Esquema 8. Funcionalização do resorcinol para a preparação de 12 (4-(fenilselanil)-1,3-benzenodiol). .	35
Esquema 9. Funcionalização do resorcinol para a preparação de 12 (4-(fenilselanil)-1,3-benzenodiol), via KICl ₂	36
Esquema 10. Preparo da 7-hidróxi-4-metil-cumarina (14).	39
Esquema 11. Preparação da seleno-cumarina 17 , via substituição eletrofílica mediada por KICl ₂	41
Esquema 12. Análise retrossintética para obtenção de seleno-cumarinas (19).	42
Esquema 13. Alquilação do oxigênio fenólico da cumarina 16	42
Esquema 14. a) Preparação do brometo de fenilselenenila, PhSeBr. b) Preparação do composto 19 por selenociclização do éter propargílico 18	42
Esquema 15. Formação de selenóxido (20) o qual não demonstrou resposta de reversibilidade de fluorescência com a adição de GSH.	46
Esquema 16. Esquema idealizado de preparação do composto 23	47
Esquema 17. Mecanismo reacional proposto para a esterificação de Steglich, utilizando-se o DCC como agente acoplador e DMAP como catalisador da esterificação para o composto 22	48
Esquema 18. Preparação do cloreto de ácido 27 e sua reação com a cumarina 16 para obtenção de 22	50
Esquema 19. Adição do reagente de telúrio 27 a um alquino (28), seguido da redução de 29 para dar origem ao telureto 30	52
Esquema 20. Preparo dos tricloreto de p-metóxfenilselênio (34) e p-metóxfeniltelúrio (35).	52
Esquema 21. Estratégia de preparação dos compostos 36 , 37 e 38 , por reação dos trialeto de organilcalcogênio com o éter propargílico 18 , seguida de redução com NaHSO ₃	53
Esquema 22. Preparação dos compostos contendo os átomos de S, Se e Te, através da substituição do grupo tosilato pelos calcogenolatos correspondentes.	56
Esquema 23. Transferência de carga intramolecular proposta para a 7-hidróxi-4-metil-cumarina via fotoexcitação por absorção e emissão. Adaptado de Liu, X., Cole, J. M., Waddell, P., Lin, T., Radia, J., Zeidler, A.; The Journal of Physical Chemistry, 2012 , 116, página 728.	62

Lista de Tabelas

Tabela 1. Valores de constante dielétrica dos solventes (ϵ_r), coeficientes de absortividade molar (ϵ) e seus respectivos máximos de absorção de 19 na concentração de 10^{-5} mol.L $^{-1}$	45
Tabela 2. Dados de caracterização fotofísica dos compostos analisados (10^{-5} mol.L $^{-1}$) em acetonitrila, a 298K.....	60
Tabela 3. Dados dos valores obtidos de absorção e concentração de HOCl para o estudo com células HL-60.....	83
Tabela 4. Tempo de vida (τ , ns), fatores pré-exponenciais (B) e fração de contribuição (f) relativos à fluorescência dos compostos caracterizados.	92
Tabela 5. Dados fotofísicos referentes ao composto (19) em Dimetilsulfóxido	108
Tabela 6. Dados fotofísicos referentes ao composto (19) em Acetonitrila	109
Tabela 7. Dados fotofísicos referentes ao composto (19) em Etanol.....	110
Tabela 8. Dados fotofísicos referentes ao composto (19) em Clorofórmio	111

1. Introdução

As cumarinas ou benzo- α -pironas pertencem à classe das flavonas. Sua estrutura consiste de uma α -pirona fundida a um anel benzênico¹. O nome do núcleo, de acordo com as regras da IUPAC é 2H-cromen-2-ona; também é conhecido por 1-benzopiran-2-ona e a numeração segue a ordem apresentada na Figura 1.

Figura 1. Estrutura típica de uma cumarina e a numeração do núcleo de acordo com a IUPAC.

O primeiro registro de isolamento de um derivado cumarínico data de 1820 e foi feito por Vogel, de sementes do cumaru (*Dipterix odorata*)², também conhecido por feijão *tonka*. Mais de 1300 derivados foram identificados na forma de metabólitos secundários encontrados em mais de 150 espécies diferentes de plantas nativas da América Central e norte da América do Sul (em países como o Brasil, Colômbia, Guiana Francesa, Guiana, Peru e Suriname). As cumarinas ocorrem em mais de 30 famílias de plantas como as *Rutaceae*, *Umbelliferae*, *Clusiceae*, *Oleaceae*, *Apiceae*, *Guttiferae*, *Caprifoliceae* e *Nyctaginaceae*, e podem ser isoladas de todas as suas partes; raízes, caules, folhas, frutos, flores e sementes².

Derivados de cumarinas também foram isolados de microrganismos como metabólitos de bactérias e de culturas de fungos *Aspergillus flavus*, presente na soja, na castanha-do-pará e no amendoim na forma de aflatoxinas que são tóxicas para os seres humanos³. Em animais foram encontradas nas secreções de glândulas odoríferas de castores (*Castor fiber*) e de carneiros, e no extrato de cupins australianos (*Nasutitermes exitiosus*)^{4,5}.

¹ Wagner, D. B., *Molecules*, **2009**, 14, 210 – 237;

² Pratap, R., Ram J. V., *Chemical Reviews*, **2014**, 114, 10476 – 10526; Sethna, S., *Chemical Reviews*, **1945**, 36, 1 – 62;

³ Asao, T., Büchi, G., Abdel-Kader, M. M., Chang, S. B., Wick, L. E., Wogan, G. N., *Journal of The American Chemical Society*, **1965**, 87, 882 – 886;

⁴ Lederer, E., *Journal of The American Chemical Society*, **1949**, 2115 – 2125; Moore, B. P., *Nature*, **1962**, 195, 1101 – 1102;

⁵ Soine, T. O., *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **1964**, 53, 231 – 264;

Diversas cumarinas^{2,6} já tiveram suas propriedades biológicas e farmacológicas investigadas e algumas apresentaram atividades sendo estas anti-inflamatória, anticoagulante, antibacteriana, antiviral, anticancerígena, anti-hipertensiva, antituberculose, anticonvulsivante, anti-adipogênica, anti-hiperglicêmica, antioxidante e também propriedades neuroprotetoras.

Provavelmente devido à grande variedade de propriedades que apresentam, diversos derivados cumarínicos com diferentes grupos substituintes já foram sintetizados, através de diversas rotas sintéticas^{2,7}, como por exemplo através da estratégia de Perkin descrita em 1868, demonstrada de maneira simplificada no Esquema 1.

Esquema 1. Condensação de Perkin.

A reação de Perkin faz uso de aldeídos aromáticos (**2**) que condensam com anidridos (**3**) ou ácidos carboxílicos alifáticos na presença de uma base fraca resultando em ácidos carboxílicos α,β -insaturados. Uma proposta de mecanismo⁸ para a preparação do núcleo cumarínico através da condensação de Perkin é apresentado no Esquema 2.

⁶ Venugopala, K. N., Rashmi, V., Odhav, B., *BioMed Research International*, **2013**, 1 – 14;

⁷ Perkin, W. H., *Journal of The Chemical Society*, **1868**, 21, 53 – 63; Johnson, J. R., *Organic Reactions*, John Wiley & Sons: New York, NY, EUA, **1942**, 1, 210-285;

⁸ Chandrasekhar, S., Karri, P., *Tetrahedron Letters*, **2006**, 2249 – 2251;

Condensação de Perkin

Mecanismo Proposto:

Esquema 2. Proposta de mecanismo para a preparação do núcleo cumarínico através da condensação de Perkin.

Na primeira etapa deste mecanismo, o acetato de sódio se dissocia em seu ânion correspondente (**I**) capaz de abstrair o hidrogênio em α do anidrido acético (**II**) gerando a espécie **III**. Na segunda etapa, esta espécie ataca o carbono eletrofílico do aldeído aromático (**IV**) formando a espécie **V**, prosseguindo em diferentes etapas até a formação do intermediário estável, o ácido *trans*-*o*-hidroxicinâmico **IX**. Ao final da reação, o ácido (**IX**) é convertido através de aquecimento em sua forma *cis* (**X**) capaz de sofrer uma condensação intramolecular que ocorre pelo ataque nucleofílico da hidroxila ao carbono eletrofílico do ácido carboxílico, formando a cumarina **XI**.

Outras metodologias de preparação de cumarinas foram desenvolvidas e entre estas se destacam as metodologias de Knoevenagel⁹, Reformatsky¹⁰, Wittig¹¹ e principalmente a condensação de Pechmann¹² descrita em 1883 e que é apresentada no Esquema 3.

Esquema 3. Condensação de Pechmann.

A condensação de Pechmann consiste no emprego de fenóis (5) e β -cetoésteres (6), na presença de catalisador ácido e aquecimento brando, originando derivados cumarínicos com diferentes substituintes na posição C-4 do anel. Esta reação desempenhou um grande avanço para a obtenção de cumarinas em bons rendimentos utilizando-se matérias-primas baratas². Uma proposta de mecanismo¹³ para a condensação de Pechmann para a preparação da 7-hidróxi-4-metil-cumarina a partir de resorcinol e acetoacetato de etila é demonstrada no Esquema 4.

⁹ Knoevenagel, E., *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, **1898**, 31, 2596 – 2619; Jones, G., *Organic Reactions*, John Wiley & Sons: New York, NY, EUA, **1967**, 15, 204 – 599;

¹⁰ Shriner, R. L., *Organic Reactions*, John Wiley & Sons: New York, NY, EUA, **1942**, 1, 1 – 37;

¹¹ Belavagi, S. N. *et al*, *RSC Advances*, **2014**, 4, 39667; Yavari, I.; Hekmat-Shoar, R.; Zonousi, A., *Tetrahedron Letters*, **1998**, 39, 2391 – 2392;

¹² Pechmann, H. V., Duisberg, C., *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, **1883**, 16, 2119 – 2128;

¹³ Daru, J., Stirling, A., *Journal of Organic Chemistry*, **2011**, 21, 8749 – 8755; Tyndall, S., Wong, F. K., VanAlstine-Parris, A. M., *Journal of Organic Chemistry*, **2015**, 80, 18, 8951 – 8953;

Mecanismo Proposto:

Esquema 4. Proposta de mecanismo para a preparação da 7-hidróxi-4-metil-cumarina através da condensação de Pechmann.

Na primeira etapa desta proposta, o acetoacetato de etila (**I**) é protonado em meio ácido, permitindo na segunda etapa reacional o ataque eletrofílico de **III** ao resorcinol (**IV**), formando a espécie **V**. Após desprotonação o intermediário relativamente estável **VI** segue as etapas de eliminação de água e protonação formando o intermediário **VIII**. Nesta última etapa observam-se as etapas de ataque nucleofílico da hidroxila ao carbono eletrofílico, seguida por uma rápida migração protônica para a formação do intermediário **IX**. Finalmente, tem-se uma eliminação de etanol e formação da 7-hidróxi-4-metil-cumarina.

No início do século XIX foi descoberto que as cumarinas apresentavam propriedades fluorescentes quando irradiadas com luz ultravioleta⁵. O processo de fluorescência, de maneira geral, ocorre através da emissão de radiação eletromagnética,

na forma de luz, após a excitação de um sistema via foto-irradiação, retornando para seu estado fundamental¹⁴.

Figura 2. Diagrama de Jablonski. Adaptado de Lakowicz, J., *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 2006, Springer.

No fenômeno da fluorescência esse processo ocorre através da excitação do estado singlete fundamental para um estado singlete de maior energia $S0 \rightarrow S_n$ ($n = 1, 2, 3...$), de modo que a orientação do spin do elétron que é excitado permanece a mesma, seguida de um processo inverso de $S_n \rightarrow S0$, ocorrendo a emissão de radiação eletromagnética na forma de luz, processo de transição esquematizado no diagrama de Jablonski, apresentado de forma pictórica na Figura 2.

O elétron promovido ao estado singlete excitado é rico em energia e pode liberá-la de duas maneiras: radiativa (transição a estados de menor energia envolvendo a emissão de luz) e não-radiativa (transição a estados de menor energia envolvendo a liberação de calor), que podem ser definidas através de constantes de velocidade de decaimento radiativo de fluorescência (k_f) e de velocidade de decaimento não-radiativo (k_{nr}).

Os elétrons de um estado singlete excitado de maior energia podem sofrer uma conversão interna para um estado excitado de menor energia, por exemplo de $S2 \rightarrow S1$, que ocorre rapidamente na faixa de 10^{-13} a 10^{-15} s, mais veloz que a própria vibração do núcleo do sistema, conhecida por transição de *Franck-Condon*. No caso da conversão do

¹⁴ Lakowicz, J., *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 2006, Springer;

estado singlete excitado S1 para o estado singlete fundamental S0 ($S1 \rightarrow S0$), este processo ocorre numa faixa de velocidade de 10^{-7} a 10^{-10} s, que pode ser determinada a partir do tempo de vida do estado excitado (τ).

As moléculas do sistema também podem sofrer um cruzamento entre sistemas (“*intersystem crossing*”) do estado singlete excitado para o estado triplete excitado T1 de menor energia, $S1 \rightarrow T1$, cuja orientação do spin do elétron é invertida. A transição de $T1 \rightarrow S0$ é “proibida” por conta da inversão da orientação de spin de elétron, ocorrendo mais lentamente do que $S1 \rightarrow S0$. Nessa transição também se observa a emissão de luz em maiores comprimentos de onda, conhecida como fenômeno de fosforescência.

A emissão de fluorescência de um composto é identificada pelo seu rendimento quântico (Φ_F) que é definido de forma geral pela razão do número de fótons emitidos pelo número de fótons absorvidos (de 0 a 1, sendo 1 referente a 100% de emissão de fluorescência), e pela energia do fóton liberado, menor do que a energia do fóton absorvido, de tal modo que o comprimento de onda de fluorescência é maior do que o comprimento de onda de absorção. Dos valores de máximos encontrados para as bandas de absorção e de emissão de fluorescência em seus respectivos espectros, também é possível determinar o deslocamento de Stokes ($\Delta\nu$) intrínseco para cada composto.

O espectro de absorção da cumarina (**1**) apresenta duas bandas de absorção (λ_{abs}) na faixa de 250 a 330 nm; a primeira banda de absorção é observada na região de 300 a 330 nm ($\log \epsilon$ 3,72), com máximo de absorção em 311 nm, a qual pode ser atribuída à transição $\pi-\pi^*$, de menor energia, do sistema conjugado $C=C-C=O$ do anel da α -pirona da cumarina. A segunda banda de absorção ocorre na região de 250 a 300 nm, com maior intensidade e máximo de absorção em 274 nm ($\log \epsilon$ 4,03), podendo ser atribuída às transições $\pi-\pi^*$, de maior energia, do sistema conjugado do anel benzênico da cumarina¹⁵.

Inicialmente, Goodwin e Kavanagh¹⁶ realizaram estudos com diferentes derivados de cumarinas isoladas de raízes de plantas, e verificaram que a maior parte dos compostos estudados fluoresciam na região do ultravioleta-visível havendo aumento de fluorescência em função do pH. O pH do meio é um importante fator para o perfil espectroscópico das cumarinas, além de que dependendo do valor de pH do meio, o anel lactônico pode sofrer abertura levando à formação do ácido *cis o*-hidroxicinâmico (ácido

¹⁵ Masrani, K. V., Rama, H. S. Bafna, S. L., *Journal of Applied Chemical Biotechnology*, **1974**, 24, 331 – 341;

¹⁶ Goodwin, R. H., Kavanagh, F., *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **1952**, 36, 442 – 455;

cumarínico), que isomeriza para a forma mais estável *trans o*-hidroxicinâmico (ácido cumárico) (**3**)¹⁷, os quais ambos possuem máximos de absorção na faixa de 260 – 280 nm, diferentemente de seu precursor.

As propriedades fotofísicas dependem principalmente da natureza do substituinte e sua posição no núcleo cumarínico, pois isso está diretamente relacionado a disponibilidade eletrônica do núcleo fluorescente. Wheelock¹⁸ estudou as propriedades fluorescentes de cumarinas em função de diferentes substituintes e observou que núcleos que contêm grupos doadores de elétrons (-OH, -OCH₃, -N(CH₃)₂) nas posições C-4, C-6 ou C-7, ou os que contem grupos retiradores de elétrons (-Cl, -COOH) na posição C-3 do anel de benzo- α -pirona apresentam deslocamento dos máximos de absorção e emissão de fluorescência para maiores comprimentos de onda.

Diversos estudos^{13,14} realizados demonstraram que substituintes nas posições C-5, C-7 ou C-8 que conferem efeito mesomérico positivo (*M*+), implicam em um deslocamento batocrômico da segunda banda de absorção (250 – 300 nm). Esse efeito é pronunciado com um substituinte na posição C-7 do núcleo cumarínico, pois a estrutura ressonante resultante favorece a planaridade e rigidez da molécula.

Qualquer substituinte, independentemente de suas propriedades eletrônicas, quando presente na posição C-6, leva a um deslocamento batocrômico no primeiro máximo de absorção (300 – 330 nm) deixando o segundo praticamente inalterado. Já substituintes capazes de retirar carga do carbono carbonílico tanto por efeito indutivo negativo (*I*-), quanto mesomérico negativo (*M*-), causam deslocamento batocrômico no primeiro máximo de absorção da cumarina, enquanto que um substituinte capaz de doar carga ao carbono carbonílico por efeito indutivo positivo (*I*+) ou mesomérico positivo (*M*+) causam deslocamento hipsocrômico no primeiro máximo de absorção do espectro da cumarina.

Recentemente, Ranjith e colaboradores¹⁹ sintetizaram diferentes derivados de cumarinas fluorescentes (apresentados na Figura 3) e suas propriedades fotofísicas foram investigadas.

¹⁷ López-Castillo, N. N., Rojas-Rodríguez, A. D., Porta, B. M., Cruz-Gómez, J. M., *Advances in Chemical Engineering and Science*, **2013**, 3, 195 – 201;

¹⁸ Wheelock, C. E., *Journal of the American Chemical Society*, **1959**, 81, 1348 – 1352;

¹⁹Ranjith, C., *et al*, *Spectrochimica Acta Part A*, **2010**, 75, 1610 – 1616;

Figura 3. a) Derivados de cumarinas com diferentes substituintes; b) Propriedades fotofísicas dos derivados. Fonte: Adaptado de Ranjith, C. *et al*, *Spectrochimica Acta Part A*, **2010**, 75 p. 1611.

Durante a investigação, os autores observaram que diferentes substituintes na posição C-3 do anel da α -pirona aumentavam os máximos de emissão de fluorescência para a faixa de 404 a 466 nm. Grupos doadores de elétrons nesta posição causavam o aumento de fluorescência, enquanto que substituintes retiradores de elétrons também em C-3 causavam a diminuição de fluorescência.

Também foi observado que a inserção do grupo acetóxi, doador de elétrons, na posição C-7 do núcleo cumarínico levou a um aumento de fluorescência dos compostos, enquanto que a inserção do grupo metila, doador de elétrons, na posição C-4 levou a diminuição da fluorescência. Observou-se que a incorporação tanto de grupos doadores quanto retiradores de elétrons em diferentes posições do esqueleto cumarínico afetam o comprimento de onda dos máximos de absorção e emissão, o deslocamento de Stokes e o rendimento quântico dos compostos, o que atesta a importância da preparação e estudo das propriedades de novos compostos destas classes.

O espectro de absorção das cumarinas também pode sofrer mudanças de acordo com o meio em que a substância se encontra. Para a benzo- α -pirona, em solventes apolares (como hexano) a segunda banda de absorção apresenta máximo de absorção em 271 nm (log ϵ 4,4) e a primeira com máximo de absorção em 312 nm (log ϵ 3,7). A medida que se aumenta a polaridade do solvente (por exemplo, água) ocorre um deslocamento batocrômico na primeira banda de absorção com máximo em 278 nm (log ϵ 4,03), e

verifica-se um deslocamento hipsocrômico sutil na primeira banda de absorção variando os máximos na faixa de 300-312 nm ($\log \epsilon$ 3,79)^{13,14}.

As cumarinas exibem propriedades fluorescentes que podem ser moduladas para aplicação em sistemas analíticos e biológicos. Nos últimos anos, uma série de dispositivos na forma de sondas fluorescentes vem sendo empregados para a detecção de espécies oxidantes endógenas, como por exemplo o ácido hipocloroso e o peróxido de hidrogênio, a fim de auxiliar na identificação de patologias específicas como o câncer, infecções, aterosclerose e o envelhecimento precoce, ao qual essas espécies são relacionadas²⁰.

Em 2013, Jiang e colaboradores²¹ reportaram a preparação de dois derivados de cumarinas como sondas fluorescentes seletivas para HOCl. O ácido hipocloroso é uma espécie oxidante formada no meio celular pela reação de H₂O₂ e íons Cl⁻, mediada pela enzima mieloperoxidase (MPO). Essas sondas foram planejadas para que se pudesse fazer a detecção de oxidantes, com base na capacidade redox do átomo de selênio, conforme ilustrado na Figura 4.

Figura 4. Sondas fluorescentes (Se-1 e Se-2) derivadas de cumarina: a) Células de macrófago RAW 264,7 tratadas com a sonda Se-1 b) Células de macrófago RAW 264,7 após de tratamento com LPS, endotoxina responsável pela produção de OCl⁻ intracelular. Após a adição de Se-1, observou-se a emissão de fluorescência em 480 nm. Fonte: Adaptado de Jiang, H. *et al*, *Org. Lett.*, **2013**, 15, 8, p. 2002.

²⁰a) Sugamura, K.; Keaney, J. F., *Free Radical Biology & Medicine*, **2011**, 51, 978 – 992; b) Houstis, N.; Rosen, E. D.; Lander, E. S. *Nature*, **2006**, 440, 944 – 948 ;

²¹ Li, G.; Zhu, D.; Liu, Q.; Xue, L.; Jiang, H. *Organic Letters*, **2013**, 15, 8, 2002 – 2005;

Mediante varredura com diferentes oxidantes (Figura 5d), verificou-se que ambas as sondas Se-1 e Se-2 apresentam altíssima seletividade para a detecção de HOCl. Assim foi realizado um estudo com células de linhagem RAW 264,7 de macrófagos, em tampão PBS (pH 7,4). Após o tratamento com as sondas (Figura 4a), foi adicionada LPS, uma endotoxina responsável pela produção de ClO^- intracelular. Observou-se, então, que o íon hipoclorito formado, oxidou o átomo de selênio da sonda, levando a uma β -eliminação de selenóxido e formação da espécie fluorescente, de acordo com Figura 4b.

Na Figura 5a, observa-se o aumento da intensidade de emissão de fluorescência em função da adição de quantidades crescentes de solução de HOCl, com resposta linearmente proporcional a concentração de oxidante adicionado (Figura 5b). A Figura 5c corresponde ao aumento da intensidade da emissão de fluorescência em função das quantidades incrementais do oxidante em função do tempo.

Figura 5. a) Espectro de emissão de fluorescência de Se-1 (4 $\mu\text{mol/L}$) sob adição de HOCl (0 - 32 $\mu\text{mol/L}$); b) Intensidade de emissão de fluorescência de Se-1 a 480 nm em função da concentração de HOCl no intervalo de 0 - 6,4 $\mu\text{mol/L}$; c) Resposta de fluorescência de Se-1 (4 $\mu\text{mol/L}$) a adição de HOCl; as setas representam a adição de 4 $\mu\text{mol/L}$ de HOCl; d) Resposta de emissão de fluorescência de Se-1 e Se-2 (4 $\mu\text{mol/L}$) com adição de HOCl (100 $\mu\text{mol/L}$) e outras espécies de ROS/RNS (200 $\mu\text{mol/L}$): as barras representam a intensidade de emissão após (F) e antes (F_0) da adição de ROS/RNS. Fonte: Adaptado de Jiang, H. *et al*, *Org. Lett.* **2013**, 15, 8, p. 2004.

Além desses ensaios, a sonda Se-1 foi exposta a concentrações variadas da enzima mieloperoxidase (MPO – enzima responsável por produção de entidades oxidantes em organismos vivos), a fim de verificar a resposta em ambiente fisiológico simulado (Figura 6), observando o aumento de fluorescência do meio, apenas após a adição de MPO, por conta da produção de ClO^- que oxidou o átomo de selênio presente na estrutura da molécula, produzindo então, em uma etapa seguinte, a espécie fluorescente (Figura 4b).

Figura 6. Adição de Se-1 a um sistema contendo MPO, H_2O_2 e Cl^- . a) Aumento de fluorescência em função do tempo para reação de 4 $\mu\text{mol/L}$ de Se-1 num sistema catalisado por enzima (tampão PBS, 40 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 e 1 $\mu\text{g/mL}$ de MPO, $\text{pH}=7,4$, 37°C); b) Resposta de fluorescência de Se-1 na ausência (○) e presença (●) de MPO. Fonte: Adaptado de Jiang, H. *et al*, *Org. Lett.* **2013**, 15, 8, p. 2004.

Dispositivos luminescentes fornecem na maioria das vezes metodologias visuais que facilitam a detecção qualitativa e quantitativa de uma série de analitos como íons, propriedades físicas como o pH e outros componentes como nanopartículas. Observa-se cada vez mais nas duas últimas décadas,^{22, 23} o aumento na síntese e caracterização de novos dispositivos além do estudo de seus principais mecanismos, facilitando a construção de novas ferramentas.

Entre os diferentes dispositivos estudados na atualidade, os sensores luminescentes baseados no princípio PeT (“*Photoinduced Electron Transfer*”)²⁴,

²² Prasanna de Silva, A., Moody, T. M., Wright, G. D., *Analyst*, **2009**, 134, 2385 – 2393;

²³ a) Fron, E., Coutiño-Gonzalez, E., Pandey, L., Sliwa, M., Auweraer, M. V., De Schryver, F. C., Thomas, J., Dong, Z., Leen, V., Smet, M., Dehaen, W., Vosch, T., *New Journal of Chemistry*, **2009**, 33, 1490 – 1496; b) Wang, B., Yu, F., Li, P., Sun, X., Han, K., *Dyes and Pigments*, **2003**, 96, 383; c) Wang, B., Li, P., Yu, F., Cheng, J., Qu, Z., Han, K., *Chemical Communications*, **2013**, 49, 5556 – 5558;

²⁴ a) Kavarnos, G., *Fundamentals of Photoinduced Electron Transfer*, VCH Publisher, New York, NY, EUA, **1993**; b) Freemantle, M. *Chem. Eng. News Archive*, **1998**, 76, 35;

traduzido para transferência eletrônica fotoinduzida, tem ganhado atenção por terem vasta aplicação em diferentes sistemas e por conta de sua simplicidade.

Em geral, a um fluoróforo se adiciona um receptor, muitas vezes por meio de um espaçador (muitas vezes não é necessário), no qual a luminescência do dispositivo é apagada (“*off*”) pela presença do receptor. A presença de um determinado analito no meio reage com o receptor e faz com que a luminescência do dispositivo volte a ocorrer (“*on*”).

O conhecimento de determinados fatores como por exemplo os valores dos potenciais redox podem influenciar na escolha de bons receptores. Neste caso, os receptores são aptos a transferirem elétrons para o fluoróforo no estado excitado. Isso significa que não ocorre emissão de fluorescência nesta etapa. Ao passo que o receptor interage com o analito, o seu potencial redox é modificado (diminuído energeticamente) de modo que a transferência de elétron do receptor para o fluoróforo não é mais energeticamente viável, e o estado excitado do fluoróforo é capaz de retornar ao seu estado fundamental, liberando energia na forma de fluorescência.

Devido aos seus altos potenciais de oxidação, compostos orgânicos de selênio e telúrio são candidatos promissores na busca por novos dispositivos como sondas moleculares sensíveis a espécies oxidantes endógenas e processos redox. Recentemente tem crescido o número de trabalhos relacionados ao papel dos átomos de selênio e telúrio em núcleos fluorofóricos²⁵.

O princípio de funcionamento desta classe de dispositivos, considerando os átomos de Se (II) ou Te (II) como o receptor e o analito como uma espécie oxidante endógena, está esquematizado na Figura 7.

²⁵ Lodeiro, J. F., Pinatto, M. F. P., Soares, A. A. P., Gonçalves, A. C., Sousa, B. A., Princival, C., Dos Santos, A. A., *Dyes and Pigments*, **2014**, 110, 28 – 48;

Figura 7. Sonda fluorescente baseada no efeito PeT, “off-on”; a) a transferência eletrônica proveniente do receptor para o fluoróforo foto-excitado ($h\nu$) cria o efeito “off” do sensor; b) a transferência de elétron do receptor ao fluoróforo é bloqueada após o receptor ter sido oxidado pela espécie oxidante endógena, resultando no estado “on” do sensor. Fonte: Adaptado de Prasanna de Silva, A., Moody, T. M., Wright, G. D., *Analyst*, **2009**, 134, p. 2386.

A inserção de átomos mais pesados como os átomos de selênio e telúrio à estrutura de um determinado fluoróforo também pode modificar os principais processos de desativação do estado excitado singlete da molécula ($S_n \rightarrow S_0$). Os níveis energéticos singlete e tripleto se aproximam, favorecendo as transições $S_n \rightarrow T_n$ e facilitando a ocorrência de processos de desativação por vias não radiativas, podendo suprimir de maneira efetiva o fenômeno de fluorescência, ou seja estes átomos são capazes de “apagar” o fluoróforo e deixá-los no seu estado “off”.

A oxidação dos átomos de selênio e telúrio, presentes nos núcleos fluorofóricos, a seus respectivos selenóxidos/selenonas ou teluróxidos/teluronas inibe o processo PeT permitindo o reestabelecimento da fluorescência da molécula (“on”). Portanto, a preparação de dispositivos capazes de reverter o processo de supressão de fluorescência é muito importante, principalmente, para seu uso em sistemas biológicos e analíticos na forma de agentes fotoquímicos terapêuticos e de sondas fluorescentes.

Visando a aplicação de núcleos cumarínicos como sondas fluorescentes, esse trabalho se propôs a estudar o papel dos átomos de selênio e telúrio nos fenômenos de ativação e supressão de emissão de fluorescência e utilizá-las em aplicações analíticas e biológicas.

2. Objetivos

Os objetivos gerais do projeto estiveram centrados na preparação de seleno- e teluro-cumarinas para estudos de emissão e supressão de fluorescência mediante tratamento com espécies oxidantes e redutoras endógenas para aplicações analíticas e biomédicas, utilizando-as como sondas na detecção de espécies associadas a desordens fisiológicas.

2.1 Objetivos específicos

Dentre os objetivos específicos deste trabalho podem ser elencados os seguintes pontos:

- i. Desenvolvimento de metodologias de preparação de precursores funcionalizados com Se de cumarinas (Se-resorcinol);
- ii. Estudos relacionados à introdução dos átomos de Se e Te no núcleo cumarínico;
- iii. Preparação de diferentes Se- e Te-cumarinas contendo substituintes cromofóricos para deslocamento das bandas de absorção e emissão de fluorescência;
- iv. Preparação de diferentes calcogeno-cumarinas no arranjo do tipo “fluoróforo-espaçador-receptor”;
- v. Caracterização fotofísica dos principais compostos preparados;
- vi. Avaliação biológica em sistemas celulares das principais Se- e Te-cumarinas preparadas.

3. Resultados e Discussão

3.1 Preparação dos precursores dos núcleos cumarínicos

Dentre as principais metodologias descritas em literatura para a síntese do núcleo cumarínico, podemos destacar a condensação de Pechmann. Assim como mencionado anteriormente, esta reação faz uso de fenóis e β -cetoésteres, sob catálise ácida e permite a preparação de diversas cumarinas com diferentes substituintes, por exemplo no anel da α -pirona (Esquema 5).

Esquema 5. Condensação de Pechmann.

Inicialmente, buscou-se pela introdução do átomo de selênio ao resorcinol (**11**), precursor utilizado na preparação de cumarinas, através do uso de disseleneto de difenila, e em seguida pela preparação do núcleo cumarínico correspondente (**13**) contendo o átomo de selênio (Esquema 6).

Esquema 6. Estratégia de preparação de seleno-resorcinol (**12**) e em seguida a preparação do núcleo cumarínico (**13**) contendo o átomo de selênio.

Para isso baseamo-nos em um trabalho recentemente reportado em literatura, uma metodologia desenvolvida por Braga e colaboradores²⁶, em que o núcleo indol (**11**) foi funcionalizado por reação com uma espécie eletrofílica de calcogênio ($PhYI$, $Y = Se$ e/ou Te) em bons rendimentos. A metodologia também se mostrou eficiente pela utilização de

²⁶ Azeredo B. J., Godoi, M., Martins, G. M., Silveira, C. C., Braga, A. L., *Journal of Organic Chemistry*, **2014**, 79, 4125 – 4130;

irradiação micro-ondas sem solvente orgânico. A equação da reação e a proposta de mecanismo dos autores para a reação é apresentada no Esquema 7.

Mecanismo proposto:

Esquema 7. Funcionalização do grupo indol (**14**) através de dicalcogeneto de difenila, sob catálise de I₂, em micro-ondas a 80°C. Mecanismo de reação para a formação da espécie eletrofílica de calcogênio PhYI e funcionalização do grupo indol (**14**). Fonte: Adaptado de Braga, A. L., *et al*, *J. Org. Chem.*, **2014**, 79, p. 4127.

Nesta reação se faz uso do dicalcogeneto de difenila e I₂, formando a espécie eletrofílica PhYI, Y = Se e/ou Te *in situ*. Em seguida ocorre a substituição do núcleo indol (**14**) e formação do calcogeneto correspondente **15**; O HI formado é convertido a I₂ através do DMSO no meio.

Desta forma, decidiu-se utilizar essa metodologia para a funcionalização do resorcinol (Esquema 8).

Esquema 8. Funcionalização do resorcinol para a preparação de **12** (4-(fenilselanil)-1,3-benzenodiol).

A fim de introduzir o grupo PhSe no resorcinol, pelo procedimento reportado, empregou-se disseleneto de difenila (Ph_2Se_2), sob as condições apresentadas no esquema 7²⁶. Nossa proposta baseou-se no procedimento descrito pois considerávamos que o resorcinol (**11**) fosse suficientemente rico em elétrons para promover o ataque da espécie eletrofílica de selênio, gerada *in situ*, de acordo com a proposta apresentada no Esquema 8, contudo em todas as tentativas, além de uma grande variedade de subprodutos, o de interesse foi isolado em rendimento igual 7%.

Outra abordagem realizada seguiu uma metodologia já utilizada no grupo de pesquisa conforme apresentado no Esquema 10.

Esquema 9. Funcionalização do resorcinol para a preparação de **12** (4-(fenilselanil)-1,3-benzenodiol), via KICl_2 .

Nesta metodologia optou-se pelo emprego do KICl_2 (dicloroiodato de potássio) como uma fonte de iodo capaz de gerar a espécie eletrofílica de selênio (PhSeI), *in situ*, que poderia levar à substituição eletrofílica no resorcinol em maior rendimento. No entanto, foi observado por CCD (cromatografia em camada delgada), a formação de diversos produtos com R_f muito próximos e de difícil separação, além de **12**, que isolado em rendimento igual a 10%. O composto **12** foi caracterizado por RMN de ^1H (Figura 8), ^{13}C e ^{77}Se (apresentados em Anexos).

Figura 8. Espectro de RMN de ¹H de **12** (DMSO – d₆, 200MHz).

Pelo espectro de RMN de ¹H de **12**, com ampliação na região dos aromáticos, observa-se em 6,24 ppm um duplo dubleto com a integração para 1 hidrogênio referente ao hidrogênio aromático “d” que acopla com os hidrogênios “c” e “e” do anel aromático, com constante de acoplamento $J = 2,1$ e 8,4 Hz. Em 6,44 ppm observa-se um dubleto com integração para 1 hidrogênio, com constante de acoplamento $J = 2,1$ Hz referente ao hidrogênio aromático “c”, que acopla com “d”. Em seguida visualiza-se em 7,13 ppm um dubleto com integração para 1 hidrogênio referente ao hidrogênio aromático “e” com constante de acoplamento $J = 8,4$ Hz que acopla com “d”. Os hidrogênios da porção aromática da fenila ligada ao átomo de selênio: f, f', g, g' e h, possuem deslocamentos químicos equivalentes apresentam-se como um singleto alargado em 7,23 ppm com integração equivalente a 5 hidrogênios. Observam-se ainda dois singletos, um em 9,61 ppm e outro em 9,77 ppm, referentes aos hidrogênios fenólicos “a” e “b” respectivamente, cada qual com integração para 1 hidrogênio.

O composto também foi caracterizado por espectrometria de massas de baixa resolução e o espectro de massas é apresentado na Figura 9, no qual observa-se o pico do íon molecular ($[M + H]^+$) em $m/z = 266$ que está próximo ao calculado (265,98). O pico base, de maior intensidade $[M]^+$, tem $m/z = 186$, devido à clivagem da ligação do carbono

da fenila ao selênio gerando o fragmento $[\text{C}_6\text{H}_6\text{Se}]^+$, enquanto que também se é possível, por exemplo, observar um pico em $m/z = 77$, referente ao fragmento da porção da fenila $[\text{C}_6\text{H}_6]^+$.

Figura 9. Espectro de massas de baixa resolução do composto **12**.

Apesar de ter sido possível isolar o composto **12** e caracterizá-lo devidamente, devido ao baixo rendimento em que conseguimos prepará-lo e especialmente devido à grande dificuldade de obtê-lo em quantidades significativas, não foi possível empregá-lo na síntese da cumarina correspondente.

Estão descritas em literatura outras espécies eletrofílicas de selênio, como, por exemplo, o PhSeOH (ácido fenilselenênico), o PhSeCl (cloreto de fenilselenenila) e o brometo de fenilselenenila (PhSeBr)²⁷ que poderiam ser utilizadas para funcionalização do resorcinol. Porém, optou-se neste momento seguir para as etapas de funcionalização do núcleo cumarínico já preparado, diretamente com os átomos de selênio e telúrio, a fim de obtenção de compostos em bons rendimentos e quantidade suficiente para dar sequência nos estudos de aplicação analítica e/ou biológica.

²⁷ Paulmier, C., *Selenium Reagents and Intermediates in Organic Synthesis*, **1986**, Pergamon Press: Oxford;
b) Back, T. G., *Organoselenium Chemistry*, **1999**, Oxford University Press;

3.2 Funcionalização do núcleo cumarínico

Outra abordagem que vislumbramos seria a introdução do átomo de calcogênio diretamente no núcleo cumarínico já formado. Dessa maneira, a cumarina **16** foi preparada em 94% de rendimento, por metodologia clássica de acordo com o Esquema 10.

Esquema 10. Preparo da 7-hidróxi-4-metil-cumarina (**14**).

Para esse procedimento, optou-se pelo uso da Amberlyst 15, uma resina ácida, como catalisador, no lugar de H_2SO_4 que é geralmente usado em grandes quantidades, resultando em longos períodos reacionais, problemas de corrosão, formação de subprodutos e geração de resíduos pela neutralização do ácido. Desta forma, cabe ressaltar as vantagens provindas do uso da resina ácida, como a diminuição do tempo reacional e diminuição da formação de resíduos. Além disso, os rendimentos reportados em literatura²⁸ para o uso da resina ácida, são acima de 80%, enquanto que com o uso de H_2SO_4 , os rendimentos são inferiores a 70%.

A 7-hidroxi-4-metilcumarina **16** foi caracterizada por RMN de ^1H e ^{13}C , e conforme a Figura 10, a fim de ilustrar o núcleo cumarínico o qual foi amplamente discutido neste trabalho, se apresenta o espectro de RMN de ^1H .

²⁸ Sabou, R., Hoeldrich, W. F., Ramprasad, D., Weinand, R., *Journal of Catalysis*, **2005**, 232, 34 – 37;

Figura 10. Espectro de RMN de ^1H de 7-hidróxi-4-metil-cumarina (**16**) (DMSO, 200MHz).

Em 2,37 ppm observa-se um singlete com integral de área para 3 hidrogênios, referentes aos hidrogênios da metila do núcleo cumarínico. Estes hidrogênios acoplam com o hidrogênio “c” cujo sinal observado em 6,14 ppm desacopla em um quarteto aparente que por conta de não ter resolução suficiente desdobrou-se para um dubleto com J = 1,1 Hz. Em seguida na região dos hidrogênios aromáticos, em 6,71 ppm, observa-se um dubleto com integração de área para 1 hidrogênio e J = 2,4 Hz.

Em 6,81 ppm observa-se um duplo-dubleto com integração para 1 hidrogênio referente ao núcleo “e” que acopla com os hidrogênios “d” e “f” do anel aromático (J = 8,7 Hz e 2,4 Hz). Em 7,60 ppm está o dubleto referente ao hidrogênio “d” com integração para 1 hidrogênio e constante de acoplamento J = 8,7 Hz. Finalizando com o hidrogênio “a” da hidroxila no deslocamento químico em 10,56 ppm mais deslocado pelo efeito de desblindagem do núcleo, tendo integração para 1 hidrogênio.

Prosseguindo, então, para a funcionalização do núcleo cumarínico, a mesma metodologia empregada para a preparação de **12**, que fez uso de KICl_2 como fonte de iodo capaz de formar a espécie eletrofílica de selênio, PhSeI , *in situ*, foi empregada assim como descrito no Esquema 11.

Esquema 11. Preparação da seleno-cumarina **17**, via substituição eletrofílica mediada por KICl₂.

O composto **17** foi obtido, porém, assim como no caso do resorcinol, observou-se a formação de muitos subprodutos (CCD), provavelmente da inserção do grupo PhSe nas posições orto- e meta- em relação ao grupo hidroxila do núcleo cumarínico. Além disso, foi isolada quantidade suficiente de **17** que permitiu a análise deste por espectrometria de massas de baixa resolução, observando-se o pico do íon molecular ($[M+1]^+$) em $m/z = 332$, próximo ao valor calculado em $m/z = 331,99$.

A exemplo da reação de funcionalização do resorcinol (Esquema 9), o rendimento da transformação de **16** em **17** foi muito baixo e consideramos esse procedimento inadequado para finalidades práticas, portanto decidimos buscar por procedimento que pudesse levar a algum derivado em quantidade razoável.

Outra estratégia de funcionalização da cumarina, diz respeito a substituição do oxigênio fenólico, como descrito para a preparação de furanocumarinas e xantiletinas²⁹, empregando éteres propargílicos^{30,31} e posterior ciclização do mesmo. Com base no que foi reportado em literatura³², uma abordagem retrossintética (apresentada no Esquema 12), foi traçada, com a intenção de se obter o composto **18**. Este composto foi projetado, de modo que a introdução de um substituinte na posição C-7 da cumarina pudesse introduzir o átomo de calcogênio responsável pelo efeito “on-off” de fluorescência e ainda levar a um possível deslocamento batocrômico do núcleo estrutural.²²

²⁹ a) Guiotto, A., Rodighiero, P., Manzini, P., Pastorini, G., Bordin, F., *Journal of Heterocyclic Chemistry*, **1987**, 24, 485 – 488, b) Guiotto, A., *et al.*, *J. Med. Chem.* **1984**, 27, 959 – 967;

³⁰ Yadav, N. *et al*, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, **2015**, 148, 311 – 317;

³¹ Babu, R., Mandhavarao, V., *Der Chemica Sinica*, **2015**, 6, 1, 1 – 6;

³² a) Rodriguez, L., *et al*, *Dalton Transactions*, **2014**, 43, 4426 – 4436; b) Stratakis, M., *et al*, *Chemical Communications*, **2011**, 47, 803 – 805;

Esquema 12. Análise retróssintética para obtenção de seleno-cumarinas (**19**).

Para levar à cabo a preparação do derivado **19**, iniciamos pela alquilação do oxigênio fenólico da cumarina **14**, com brometo de propargila (92%), empregando procedimento descrito em literatura.³³

Esquema 13. Alquilação do oxigênio fenólico da cumarina **16**.

O composto **18** foi devidamente caracterizado e então utilizado em condições reacionais que tiveram como objetivo empregar um reagente eletrofílico de selênio para promover ciclização através de C-6. Para tanto adaptou-se uma metodologia descrita em literatura³⁴, na qual a espécie eletrofílica de selênio ($PhSeBr$)³⁵ foi submetida à reação com o composto **18**, dando origem ao produto **19** em 32% de rendimento.

Esquema 14. a) Preparação do brometo de fenilselenenila, $PhSeBr$. b) Preparação do composto **19** por selenociclização do éter propargílico **18**.

³³ Bach, P.; Nilsson, K.; Wallberg, A.; Bauer, U.; Hammerland, L. G.; Peterson, A.; Svensson, T.; Oesterlund, K.; Karis, D.; Boije, M.; Wensbo, D., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2006**, 16, 4792;

³⁴ Godoi, B., Sperança, A., Back, D., Brandão, R., Nogueira, C., Zeni, G., *J. Org. Chem.*, **2009**, 74, 3469 – 3477;

³⁵ Lang, H., Keller, H., Imhof, W., Martin, S., *Chem. Ber.*, **1990**, 123, 417 – 422;

O composto **19**, 4-metil-7-(fenilselanil)pirano[3,2-g]cromen-2(8H)-ona, foi analisado por RMN de ^1H , ^{13}C e ^{77}Se , e seu espectro de ressonância magnética nuclear de ^1H é apresentado na Figura 11.

Figura 11. Espectro de RMN de ^1H da 4-metil-7-(fenilselanil)pirano[3,2-g]cromen-2(8H)-ona (**19**) (CDCl_3 , 200 MHz).

No espectro de RMN de ^1H do composto **19** observa-se um dubleto em 2,4 ppm com integração de área para 3 hidrogênios, referentes aos hidrogênios “a” da metila que acoplam com o hidrogênio “b” com constante de acoplamento $J = 1,0$ Hz, cujo sinal desdobra-se em um quarteto aparente e possui deslocamento químico em 6,15 ppm. Em seguida, observa-se em 4,9 ppm um dubleto com integração para dois hidrogênios, referente aos hidrogênios “f” que acoplam com o hidrogênio “e” ($J = 1,1$ Hz), cujo sinal é observado em 6,42 ppm na forma de um tripleto com área de integração para 1 hidrogênio.

Os hidrogênios aromáticos g e g' desdobraram-se em um multipeto em 7,55 ppm assim como os hidrogênios h, h' e i em 7,33 ppm com integração de área para 2 e 3 hidrogênios, respectivamente.

Após a obtenção do composto **19**, os primeiros estudos para sua caracterização fotofísica, como espectros de absorção e emissão de fluorescência foram obtidos. Observou-se que, em acetonitrila, o composto apresenta duas bandas de absorção bastante características do núcleo cumarínico em 288 e 316 nm, esta última com ϵ igual a 13759 L.mol⁻¹cm⁻¹, além de apresentar máximo de emissão de fluorescência em 380 nm. Os espectros de absorção e emissão de fluorescência estão apresentados na Figura 12.

Figura 12. Espectro de absorção (linha cheia) a temperatura ambiente ($\lambda_{\text{abs}} = 316$ nm), emissão normalizada (I_{norm} , linha pontilhada, $\lambda_{\text{em}} = 380$ nm) do composto **19** em acetonitrila (10^{-5} mol.L⁻¹).

Para este composto foi realizada a investigação dos máximos de absorção em solventes com diferentes polaridades: dimetilsulfóxido (DMSO), acetonitrila, etanol e clorofórmio além da determinação do coeficiente de absortividade molar em quatro diferentes concentrações nestes solventes (os valores e espectros estão apresentados nos anexos). Os solventes foram escolhidos por suas compatibilidades com ensaios biológicos e devido a solubilidade do composto **19** neles.

Os valores dos máximos de absorção de **19** em cada solvente, assim como os valores dos coeficientes de absortividade molar (ϵ) calculados na concentração de 10^{-5} mol.L⁻¹ estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Valores de constante dielétrica dos solventes (ϵ_r), coeficientes de absortividade molar (ϵ) e seus respectivos máximos de absorção de **19** na concentração de 10^{-5} mol.L⁻¹.

Entrada	Solventes	ϵ_r	λ_{abs} (nm)	ϵ (L.mol ⁻¹ .cm ⁻¹)	λ_{abs} (nm)	ϵ (L.mol ⁻¹ .cm ⁻¹)
1	Dimetilsulfóxido	46,7	320	1700	291	2694
2	Acetonitrila	37,5	316	13759	288	20792
3	Etanol	24,5	320	2348	289	3832
4	Clorofórmio	4,81	321	2376	290	3832

Ambos os máximos de absorção do composto **19** em DMSO, clorofórmio e etanol apresentaram deslocamento em 320 e 321 nm. No caso da acetonitrila, como fora mencionado previamente, os máximos de absorção apresentaram deslocamento em 316 nm. Os espectros de absorção, para cada caso, estão apresentados na Figura 13. Em nenhum dos casos foi observado mudança no valor de máximo de emissão (380 nm) no espectro de fluorescência.

Figura 13. Estudo solvatocrômico do composto **19** em acetonitrila (λ_{abs} = 288, 316 nm), etanol (λ_{abs} = 289, 320 nm), DMSO (λ_{abs} = 291, 320 nm) e clorofórmio (λ_{abs} = 290, 321 nm), todos na concentração de 10^{-5} mol.L⁻¹.

Paralelamente foi realizada uma varredura de resposta do composto **19** frente ao peróxido de hidrogênio (espécie oxidante endógena), a fim de analisar a capacidade de intercepção desse oxidante pelo átomo de selênio e verificar se este processo seria acompanhado de supressão/amplificação de fluorescência.

Neste estudo, à uma solução estoque do composto **19**, em acetonitrila (10^{-5} mol.L⁻¹) foram adicionadas quantidades de 0,33, 0,66, 1, 2, 3 e 13 equivalentes de H₂O₂ e os espectros de absorção e emissão de fluorescência de cada um foi obtido, logo após sua adição (apresentados na Figura 14).

Figura 14. Titulação espectrométrica (a) e espectrofluorimétrica (b) de **19** com peróxido de hidrogênio.

Observou-se que apenas a partir da adição de 1 equivalente de peróxido de hidrogênio o máximo de emissão de fluorescência de 0,91 unidades arbitrárias apresentou resposta, com aumento de intensidade de emissão de fluorescência a até 0,98 unidades arbitrárias, onde permaneceu estável.

Embora sutil, o aumento de fluorescência, se fosse em função da oxidação do átomo de selênio, poderia ser revertido mediante redução com glutatona. Para comprovar esta hipótese, foi realizado experimento que consistiu da adição de 0,33, 0,66 e 1 equivalente de glutatona (GSH), contudo com isso não se observou qualquer diferença espectral (Esquema 15).

Esquema 15. Formação de selenóxido (**20**) o qual não demonstrou resposta de reversibilidade de fluorescência com a adição de GSH.

Também propusemos a preparação de outro derivado cumarínico que se baseou na substituição do oxigênio fenólico. Neste caso, idealizamos a preparação de um éster propargílico conforme mostrado no Esquema 16.

Esquema 16. Esquema idealizado de preparação do composto **23**.

Desta forma foi utilizado o ácido 3-fenilpropíóico (**21**), para preparação do éster **22** que seria submetido a selenociclização para dar origem ao composto **23**. Para a preparação de **22**, os compostos **16** e **21** foram submetidos a reação empregando DCC (*N,N'*-diciclohexilcarbodiimida)^{36,37} e DMAP (*p*-dimetilaminopiridina), a fim de ativar a carboxila de **21**, cujo mecanismo é descrito no Esquema 17.

³⁶ B. Neises, W. Steglich, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1978**, 17, 522 – 524;

³⁷ Kawate, T., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2013**, 23, 6052 – 6059;

Mecanismo proposto:

Esquema 17. Mecanismo reacional proposto para a esterificação de Steglich, utilizando-se o DCC como agente acoplador e DMAP como catalisador da esterificação para o composto **22**.

O mecanismo pode ser explicado através de três etapas principais apresentadas de maneira ilustrativa no Esquema 17. Na etapa inicial ocorre abstração do hidrogênio do ácido carboxílico (**21**) pelo átomo de nitrogênio presente na *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida (DCC), seguido por um ataque nucleofílico do íon carboxilato formado ao carbono central do DCC, formando o intermediário **24**. Na etapa seguinte, ocorre uma protonação do átomo de nitrogênio em β ao átomo de oxigênio de **24**, seguido pelo ataque nucleofílico do nitrogênio piridínico da *p*-dimetilaminopiridina (DMAP) ao carbono eletrofílico do éster de **24**. Isso daria origem a amida **25**, que está em equilíbrio

com **26** que, devido a carga positiva no átomo de nitrogênio, é extremamente ativada para ser atacado pelo oxigênio fenólico da cumarina **16**.

Acompanhando a reação por CCD, observou-se o aparecimento de uma mancha ($R_f = 0,74$ – eluição com hexano/acetato de etila, 7:3) acima da mancha da cumarina **16** ($R_f = 0,2$) e que através de coluna cromatográfica em sílica gel flash, foi isolada e analisada por RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz), porém demonstrando perfil espectroscópico diferente do que se esperava para o éster **22**.

Figura 15. Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) do material isolado para a reação de obtenção de **20**.

Analisando o espectro de RMN de hidrogênio do material isolado, apresentado na Figura 15, observa-se que o que foi isolado na realidade é o intermediário de reação, o composto **24**, na forma de uma *O*-acilisouréia. Observa-se na região dos aromáticos, dois sinais em 7,59 ppm e em 7,42 ppm com integração de área para 2 e 3 hidrogênios respectivamente da porção da fenila para os hidrogênios, c e c', e para a, b e b', respectivamente. Em seguida, observa-se em 4,5 ppm um triplo tripleto com integração de área para 1 hidrogênio referente ao hidrogênio “d” adjacente ao átomo de nitrogênio.

Para a região dos hidrogênios das porções dos ciclohexanos, observam-se sinais sem multiplicidade resolvida em 0,85 ppm, 1,59 ppm e em 1,85 ppm, com integração de

área para 22 hidrogênios, sendo que 1 destes é referente ao hidrogênio “k” ligado ao átomo de nitrogênio que tem deslocamento químico equivalente em 1,88 ppm.

O procedimento foi repetido e mesmo no caso do uso de DCC em quantidades equimolares ao ácido 3-fenilpropiólico (**21**), foi observado a formação da DHU (diciclohexiluria, Esquema 17) um subproduto reacional, de difícil separação mesmo após coluna cromatográfica, ainda em grande quantidade, além da formação apenas do intermediário, o composto **21**, tendo sido analisado também por RMN de ^1H .

A partir disso, observou-se que 7-hidróxi-4-metil-cumarina (**16**), não seria um nucleófilo forte o suficiente mesmo para o ataque no carbono eletrofílico de **26**, mais ativado pela carga positiva do átomo de nitrogênio, favorecendo a formação apenas do intermediário de reação, o composto **24**.

Uma nova metodologia foi proposta para a preparação do éster **22**. Nesta, propôs-se a formação do cloreto de ácido correspondente do ácido 3-fenilpropiólico (**21**), seguido pelo ataque nucleofílico do oxigênio fenólico da cumarina **16** no carbono carbonílico de **27**. A preparação de cloreto de ácido se deu pela adição do cloreto de sulfurila (SO_2Cl_2) gota-a-gota ao ácido 3-fenilpropiólico em diclorometano (DCM) anidro, observando-se a formação de um óleo amarelado. Em seguida, ao meio foi adicionado o nucleófilo **16** com o objetivo de finalizar a formação do éster **22**.

Esquema 18. Preparação do cloreto de ácido **27** e sua reação com a cumarina **16** para obtenção de **22**.

Após a extração do bruto reacional, foi realizada uma análise por CCD, na qual observou-se o aparecimento de uma mancha ($R_f = 0,4$ – hexano/acetato de etila, 7:3) de R_f maior que o da cumarina **16** ($R_f = 0,2$). O extrato foi submetido à purificação por coluna cromatográfica em sílica gel flash, e foi observado que logo após o isolamento do possível produto, que este se degradava rapidamente sem que houvesse a possibilidade de se obter quantidade suficiente para análises que permitissem caracterização estrutural.

Essas dificuldades de preparação do éster **22** e consequentemente preparação de **23** (Esquema 16) fizeram com que optássemos por nos dedicar a outras propostas de

preparação de núcleos cumarínicos contendo os átomos de Se e/ou Te. Uma possibilidade que consideramos estava centrada na preparação de derivados de telúrio (IV) e a seguir apresentaremos resultados relativos a preparação de alguns exemplares.

3.3 Funcionalização dos núcleos cumarínicos a partir da adição eletrofílica de trialeto de organitелúrio

O aluno de doutorado, Cleverson R. Princival, orientando do Prof. Dr. J. V. Comasseto, desenvolveu metodologias de preparação de derivados de Te(IV). Assim, estabelecemos colaboração com ele e propusemos empregar sua metodologia de funcionalização de alquinos com o derivado **27**, que corresponde a uma espécie eletrofílica de telúrio³⁸. A adição desse tricloreto de telúrio a alquinos ocorre de maneira régio- e estereosseletiva e em bons rendimentos, dando origem aos teluretos **29** ou **30**, dependendo da forma como a reação é tratada ao final.

Esquema 19. Adição do reagente de telúrio **27** a um alquino (**28**), seguido da redução de **29** para dar origem ao telureto **30**.

Para esses estudos, em conjunto com o doutorando Cleverson Princival, foram preparados os tetracloreto de telúrio (TeCl₄, 85%) e selênio (SeCl₄, 92%) por reação do calcogênio elementar com cloreto de sulfurila (SO₂Cl₂). Em seguida, os tetracloreto de calcogênio foram submetidos à reação com o anisol (**33**), levando à formação do tricloreto de *p*-metóxfeniltelúrio (**34**) em 86% de rendimento e do tricloreto de *p*-metóxfenilselênio (**35**) que se demonstrou muito mais reativo que o de telúrio e não pode ser isolado.

Esquema 20. Preparo dos tricloreto de *p*-metóxfenilselênio (**34**) e *p*-metóxfeniltelúrio (**35**).

³⁸ Comasseto, J. V., Dos Santos, A. A., Princival, C., *J. Braz. Chem. Soc.*, **2015**, 26, 5, 832 – 836;

Em uma etapa seguinte, submeteu-se os trialetos de organilcalcogênio à reação com o éter propargílico **18**, dando origem ao composto de selênio (**37**) em 34% de rendimento e ao de telúrio (**38**) em 82% de rendimento (Esquema 21).

Esquema 21. Estratégia de preparação dos compostos **36**, **37** e **38**, por reação dos trialetos de organilcalcogênio com o éter propargílico **18**, seguida de redução com NaHSO₃.

O composto **37** foi analisado por RMN de ¹H, ¹³C e ⁷⁷Se. O espectro de ressonância magnética de ¹H é apresentado na Figura 16.

Figura 16. Espectro de RMN de ¹H do composto **37** (CDCl₃, 200MHz).

Referente ao núcleo cumarínico, o espectro de RMN de ¹H apresenta um sinal que se desdobra em um dubleto em 2,41 ppm com integração de área igual a 3 hidrogênios com constante de acoplamento $J = 1,0$ Hz, devido ao acoplamento entre os hidrogênios

da metila “a” do núcleo cumarínico e o hidrogênio vinílico “b” adjacente, cujo sinal é observado na faixa de deslocamento químico de 6,17 ppm também com $J = 1,0$ Hz, desdobrando-se em um quarteto aparente. O espectro tem ampliação na região dos aromáticos sendo que em 6,67 ppm observa-se um dubleto com área de integração igual a 1 hidrogênio, referente ao hidrogênio aromático “c”, com constante de acoplamento $J = 2,5$ Hz. Em seguida, em 6,84 ppm, observa-se um sinal do sem multiplicidade aparente, porém é possível observar que a integral de área é igual a 2 hidrogênios; “e” e “d”.

Em 4,21 ppm observa-se um sinal de duplo dubleto referente aos hidrogênios carbinólicos “f” com integração para 2 hidrogênios. Em seguida, tem-se um sinal de singlete com integração de área igual a 1 hidrogênio, referente ao hidrogênio “g” e, finalmente, observa-se em 7,65 e em 7,52 ppm os sinais referentes aos hidrogênios i e i’ (duplo dubleto, com integração para 2 hidrogênios), e aos hidrogênios h e h’ (sinal sem multiplicidade resolvida, com área de integração para 2 hidrogênios), respectivamente. Além disso, observa-se o sinal de singlete para os hidrogênios da porção da metoxila em 3,81 ppm com integração de área para 3 hidrogênios.

O composto **38** também foi analisado por RMN de ^1H , ^{13}C e ^{125}Te . O espectro de ressonância magnética de ^1H é apresentado na Figura 17.

Figura 17. Espectro de RMN de ^1H do composto **38** (CDCl_3 , 800MHz).

De acordo com o espectro, os hidrogênios “a” da metila do núcleo cumarínico possuem um sinal que se desdobra em um dubleto em 2,41 ppm ($J = 1,2$ Hz) com integração de área para 1 hidrogênio. Tais hidrogênios acoplam com o hidrogênio vinílico adjacente “b” cujo sinal se desdobra em um quarteto aparente em 6,16 ppm ($J = 1,2$ Hz) com integração de área para 1 hidrogênio. Em seguida, observam-se os sinais para os hidrogênios “c” e “d”, ambos acoplam com o hidrogênio “e”, cujos sinais se desdobram em dubletos em 6,79 ppm ($J = 2,5$ Hz) e em 7,49 ppm ($J = 8,8$ Hz), respectivamente, ambos com integração de área para 1 H. O hidrogênio “e” acopla com “c” e “d” e tem sinal de desdobramento para um duplo dubleto em 6,85 ppm ($J = 2,5$ Hz, 8,7 Hz) com integração de área para 1 hidrogênio.

Os hidrogênios da metila de “j” se desdobram em um singlete em 3,81 ppm com integração de área para 3 hidrogênios. Os hidrogênios aromáticos i, i’ são mais deslocalizados pelo efeito de desblindagem por conta do átomo de oxigênio e tem sinal de duplo dubleto aparente, em 7,72 ppm com integral de área para 2 hidrogênios. Os hidrogênios aromáticos h, h’ tem sinal de desdobramento duplo dubleto aparente em 6,77 ppm e integração de área para 2 hidrogênios. Em seguida, observa-se que o hidrogênio “g” acopla com os hidrogênios “f” e se desdobra em um sinal de tripleto em 6,05 ppm com integral de área para $J = 1,8$ Hz, enquanto que os hidrogênios “g” tem sinal de dubleto em 4,94 ppm, com integral de área para dois hidrogênios e $J = 1,8$ Hz.

Para o telureto **38** foi realizada uma investigação inicial de suas propriedades fotofísicas ao qual, em uma solução de 10^{-5} mol/L, em DMSO, observou-se para o espectro de absorção duas bandas em 320 nm e 290 nm, características do núcleo cumarínico, enquanto que o máximo de emissão de fluorescência observado para este composto foi de 370 nm.

Assim como fora mencionado, já se tem o conhecimento de que teluretos similares ao composto **38**, possuem atividade biológica como anti-epilépticos, e por conta disso, em parceria com Dra. Gabriela M. Predebon, orientada pela Profa. Dra. Maria J. S. Fernandes da UNIFESP, *campus* São Paulo, este composto será investigado como potencial agente neuroprotetor.

3.4 Funcionalização dos núcleos cumarínicos com grupos RY (R = Bu, Ph e Y = S, Se e Te)

Entre os compostos preparados neste trabalho, destacam-se derivados de RY, introduzidos na porção fenólica do núcleo cumarínico. A preparação desses compostos se deu pela funcionalização da cumarina **16**, adicionando-se um espaçador de dois carbonos sp^3 à sua estrutura, por reação com cloroetanol, resultando no intermediário **39**, em 96% de rendimento. Empregando metodologia já estabelecida³⁹, a hidroxila foi transformada em um tosilato (**40**) em 44% de rendimento. Assim, os derivados de enxofre, selênio e telúrio foram preparados a partir do calcogênio correspondente, na sua forma elementar em reação com o reagente de Grignard, o brometo de fenilmagnésio (PhMgBr), em THF seco. O composto **40**, foi adicionado ao meio e os compostos **41**, **42** e **43** (69%, 57% e 52% de rendimento, respectivamente) foram obtidos de acordo com o Esquema 22.

De maneira análoga, enxofre, selênio e telúrio foram submetidos a reação com *n*-butil lítio (*n*-BuLi), em THF seco, dando origem ao calcogenolato respectivo, que foi submetido a reação de **40** levando aos compostos **44**, **45** e **46** (57%, 65% e 27% de rendimento, respectivamente). Essas transformações estão sumarizadas no Esquema 22.

Esquema 22. Preparação dos compostos contendo os átomos de S, Se e Te, através da substituição do grupo tosilato pelos calcogenolatos correspondentes.

³⁹Princival, J. L., de Oliveira, M. S. C., Dos Santos, A. A., Comasseto, J. V., *Tetrahedron: Asymmetry*, **2009**, 20, 2699 – 2703;

Os compostos foram caracterizados por RMN de ^1H , ^{13}C , ^{77}Se e ^{125}Te . Adiante encontram-se os espectros de RMN de ^1H (Figura 18 e 19) dos compostos **42** e **45**, a fim de ilustrar o perfil espectral dos compostos obtidos.

Figura 18. Espectro de RMN de ^1H da fenil-seleno-cumarina **42** (CDCl_3 , 200 MHz).

O espectro de RMN de ^1H do composto **42**, apresentado na Figura 18 tem ampliação na região dos aromáticos sendo que em 7,54 ppm e em 7,27 ppm observam-se dois multipletos com integração de área para os hidrogênios *h* e *h'*, e para os hidrogênios *i*, *i'* e *j*, respectivamente. Os hidrogênios aromáticos do núcleo cumarínico são observados na mesma região. Em 7,47 ppm tem-se um dubleto com integral de área para 1 hidrogênio (hidrogênio *d*), $J = 8,7$ Hz. Em 6,73 ppm tem-se um sinal de dubleto com integral de área para 1 hidrogênio (hidrogênio *c*) $J = 2,4$ Hz. O hidrogênio *e* acopla com os hidrogênios *d* e *c* e desdobra-se em um sinal de duplo dubleto em 6,68 ppm, com integral de área para 1 hidrogênio e $J = 2,5$ e 8,4 Hz.

Em seguida, observa-se em 6,13 ppm um quarteto aparente com integração de área para um hidrogênio (*b*) com $J = 1,1$ Hz que acopla com os hidrogênios da metila *a* desdobrando-se em um sinal de dubleto em 2,39 ppm com integração de área para 3 hidrogênios e de $J = 1,1$ Hz. Os hidrogênios *f* e *g* acoplam entre si com constante de acoplamento $J = 7,1$ Hz e são observados dois tripletos em 4,24 ppm, mais deslocados

pelo efeito de desblindagem do núcleo pela proximidade ao átomo de oxigênio, e em 3,24 ppm, respectivamente, cada qual integrando para dois hidrogênios.

Figura 19. Espectro de RMN de ¹H da cumarina **45** (DMSO – d₆, 200 MHz).

O espectro de RMN de ¹H do composto **45** está apresentado na Figura 19. Em 7,68 ppm observa-se um sinal desdobrando-se em um dubleto com integração de área para um hidrogênio (*d*) de constante de acoplamento *J* = 8,4 Hz. Em seguida em 6,98 ppm, observa-se um sinal sem multiplicidade aparente com integração de área para dois hidrogênios que foram atribuídos aos hidrogênios *c* e *e*.

Em seguida, observa-se em 6,21 ppm um sinal de dubleto com integração de área para um hidrogênio atribuída ao núcleo designado como *b* (*J* = 1,1 Hz) que acopla com os hidrogênios da metila *a* cujo sinal desdobra-se em um dubleto em 2,39 ppm com integração de área para 3 hidrogênios e *J* = 1,1 Hz. Os hidrogênios *f* e *g* acoplam entre si desdobrando-se em dois tripletos que integram cada qual para 2 hidrogênios em 2,89 ppm e 2,67 ppm, respectivamente, com *J* = 6,8 Hz.

Os hidrogênios da porção alquílica da molécula (*n*-butil) *i* tem sinal de desdobramento de quintupeto em 1,6 ppm por acoplarem com hidrogênios *h* e *j*, com integral de área para dois hidrogênios. Os hidrogênios *j* acoplam com os hidrogênios *i* e

k, em um sinal de desdobramento de um sextupletto em 1,49 ppm com integral de área para 2 hidrogênios. Os hidrogênios *k* acoplam com os hidrogênios *j* e tem sinal de desdobramento de um tripleto em 0,88 ppm com integração de área para 3 hidrogênios ($J = 7,2$ Hz). Os hidrogênios *h* sofrem um efeito de blindagem pela aproximação ao átomo de selênio e possuem seu deslocamento químico em campo baixo de 2,67 ppm, desdobrando-se em um sinal de um tripleto pelo acoplamento com os hidrogênios *i* e com integração de área para 2 hidrogênios ($J = 7,3$ Hz).

3.4.1 Caracterização das propriedades fotofísicas

Os compostos de **16**, **39**, **40**, **41**, **42**, **43**, **44**, **45** e **46**, cujas estruturas são apresentadas na tabela 2, foram analisados em acetonitrila, a 298 K, 10^{-5} mol.L⁻¹, obtendo-se espectros de absorção, emissão e excitação para cada um.

A fim de ilustração destes espectros, a Figura 20, a seguir, apresenta os espectros de absorção, excitação e emissão do composto **42**. O composto derivado de selênio apresenta duas bandas de absorção bastante características do núcleo cumarínico em 290 e 319 nm ($\epsilon = 13065$ L.mol⁻¹.cm⁻¹), além de apresentar máximo de emissão de fluorescência em 378 nm.

Figura 20. Espectro de absorção (linha cheia) a temperatura ambiente ($\lambda_{\text{abs}} = 319$ nm), emissão normalizada (linha pontilhada, $\lambda_{\text{em}} = 378$ nm) e espectro de excitação (linha tracejada, $\lambda_{\text{exc}} = 319$ nm) do composto **42** em acetonitrila (10^{-5} mol/L).

Estes dados foram observados de maneira similar para os demais compostos caracterizados, e que também foram analisados em acetonitrila, a 298 K, na concentração de 10^{-5} mol.L⁻¹. Os espectros de absorção, excitação e emissão de fluorescência destes estão apresentados nos anexos.

Na Tabela 2 são mostrados os valores de máximo de absorção λ_{abs} , máximo de emissão λ_{em} e máximo de excitação λ_{exc} , em nm; os valores de ϵ , o coeficiente de absortividade molar são dados em L.mol⁻¹.cm⁻¹; os valores de deslocamento de Stokes $\Delta\nu$, em cm⁻¹; os valores de Φ_F , rendimento quântico da fluorescência baseado no padrão sulfato de quinina ($\Phi_F = 0,55$); os valores experimentais obtidos para os tempos de vida τ em ns; e os valores calculados para a constante de velocidade do decaimento radiativo por fluorescência, k_f bem como a constante de velocidade para o decaimento não radiativo, k_{nr} , ambos em 10^{-9} s⁻¹; e a energia do estado singlete, E_s , dado pela intersecção do espectro de emissão de fluorescência normalizada e o espectro de absorção.

Tabela 2. Dados de caracterização fotofísica dos compostos analisados (10^{-5} mol.L⁻¹) em acetonitrila, a 298K.

Compostos	UV-vis					Rend. Quântico (Φ_F) (%)	Tempo de Vida τ (ns)	k_f (10^9 s ⁻¹)	k_{nr} (10^9 s ⁻¹)	E_s (kJ.mol ⁻¹)
	λ_{abs} (nm)	λ_{em} (nm)	λ_{exc} (nm)	ϵ (L.mol ⁻¹ .cm ⁻¹)	$\Delta\nu$ (cm ⁻¹)
16	290, 319	378	319	13065	4893	2,44	0,196	0,125	4,98	349
39	290, 319	378	319	12523	4893	2,21	0,134	0,165	7,30	349
40	290, 319	376	319	13515	4752	1,11	0,138	0,08	7,17	349

290, 319	377	319	14151	4823	1,26	0,124	0,102	7,96	350
--	-------------	-----	-----	-------	------	------	-------	-------	------	-----

290, 319	378	319	16652	4893	1,28	0,119	0,108	8,30	349
--	-------------	-----	-----	-------	------	------	-------	-------	------	-----

290, 319	380	319	15992	5032	0,28	0,113	0,248	8,82	349
--	-------------	-----	-----	-------	------	------	-------	-------	------	-----

290, 319	380	319	20900	5032	2,40	0,13	0,184	7,51	352
--	-------------	-----	-----	-------	------	------	------	-------	------	-----

290, 319	380	319	14050	5032	1,46	0,12	0,122	8,21	350
--	-------------	-----	-----	-------	------	------	------	-------	------	-----

290, 319	380	319	17050	5032	0,27	0,164	0,017	6,08	349
--	-------------	-----	-----	-------	------	------	-------	-------	------	-----

Os compostos obtidos apresentam dois máximos de absorção característicos do núcleo cumarínico, na região de 290 e 319 nm. Estes máximos são característicos de transições $\pi-\pi^*$ (HOMO $\rightarrow$ LUMO), atribuídos à transferência de carga da densidade eletrônica do anel de benzeno à porção do anel de α -pirona da molécula. Este processo ocorre após a excitação da molécula via absorção de luz, o qual favorece a formação da estrutura de ressonância de maior contribuição (**II**) apresentada no Esquema 23, processo

também chamado de transferência de carga intramolecular (do inglês, *Intramolecular Charge Transfer*).

No caso da entidade (I), o processo de transferência eletrônica intramolecular é auxiliada pela presença do grupo hidroxila na posição C-7 do anel da benzo α -pirona, sendo este um grupo injetor de densidade eletrônica ao anel, contribuindo ainda mais para a estrutura de ressonância (II). As duplas ligações dos carbonos C-5, C-6 e C-8, C-9 estão paralelas entre si, trazendo maior rigidez e planaridade ao anel, facilitando a ocorrência do processo de fluorescência e evidenciando um efeito “push-pull” de carga⁴⁰ (do tipo doador, sistema conjugado e receptor).

Esquema 23. Transferência de carga intramolecular proposta para a 7-hidróxi-4-metil-cumarina via fotoexcitação por absorção e emissão. Adaptado de Liu, X., Cole, J. M., Waddell, P., Lin, T., Radia, J., Zeidler, A.; *The Journal of Physical Chemistry*, **2012**, 116, página 728.

Os valores de emissão dos compostos preparados, se encontram na região de 325 a 500 nm com valores de máximos de emissão variando de 377 a 380 nm. O deslocamento de Stokes ($\Delta\nu$) para os compostos está em torno de 60 nm. Esse valor de $\Delta\nu$ pequeno é um indicativo de que o principal processo de desativação do estado excitado ocorre via estado singlete ($S1 \rightarrow S0$).

Os rendimentos quânticos obtidos são muito baixos, $\Phi_F = 0,01$ para os compostos **41** e **42** e $\Phi_F = 0,00$ (0,28%) para o composto **43**. Como o rendimento quântico é a medida da razão do número de fótons emitidos pelo número de fótons absorvidos, quanto maior este valor, mais emissiva é a molécula; depreende-se, então, que os compostos preparados praticamente não apresentam emissão.

Para os compostos da série *n*-butil, os valores obtidos são muito parecidos aos da série fenil. Os valores observados para os compostos **44** é $\Phi_F = 0,02$ e para **45**, $\Phi_F = 0,01$. Para o telureto **46** o rendimento quântico é $\Phi_F = 0,00$ (0,27%), e são, portanto, praticamente não emissivos.

⁴⁰ Liu, X., Cole, J. M., Waddell, P., Lin, T., Radia, J., Zeidler, A.; *The Journal of Physical Chemistry A*, **2012**, 116, 727 – 737;

Assim como se esperava por conta do processo de transferência eletrônica fotoinduzida (PeT), a inserção dos átomos de enxofre e selênio na estrutura da molécula leva à supressão parcial da fluorescência do núcleo cumarínico, enquanto que a inserção do átomo de telúrio leva praticamente à supressão total da fluorescência do núcleo cumarínico.

Os tempos de vida dos estados excitados (τ) também foram medidos em acetonitrila, com excitação em 319 nm. Os decaimentos de fluorescência se ajustam em uma exponencial de primeira ordem com tempos de vida (τ) de 0,124; 0,119 e 0,113 ns respectivamente para os compostos **40**, **42** e **43**, e 0,188; 0,122 e 0,017 ns para os compostos **44**, **45** e **46**, respectivamente. Os valores de tempo de vida dos estados excitados obtidos experimentalmente estão na faixa de 10^{-11} s a 10^{-10} s característicos do tempo de vida para o estado singleto S_1 .

Os dados de tempo de vida (τ , ns), fatores pré-exponenciais (B) e fração de contribuição (f) relativos à fluorescência dos compostos analisados estão compilados na tabela 2, apresentada no item 5.8.

As constantes de velocidade de decaimento radiativo por fluorescência (k_f) e por decaimento não radiativo (k_{nr}) são responsáveis pela despopulação do estado excitado. A constante de velocidade de decaimento radiativo por fluorescência (k_f) descreve a velocidade de uma conversão interna, de um estado de energia mais excitado para um estado de energia menos excitado, como por exemplo, de S_1 para S_0 (estado fundamental).

A constante de velocidade não radiativa (k_{nr}), neste caso, descreve os demais processos que podem ocorrer no sistema (sendo estes aqui agrupados em uma mesma constante a fim de facilitar o entendimento dos processos estudados), como por exemplo a conversão intersistemas, permitida entre estados singletos $S_n \rightarrow S_{n-1}$, além de transições tidas por proibidas por conta de se tratarem de um cruzamento entre sistemas de multiplicidade de spin diferente (por exemplo, de $S_1 \rightarrow T_1$ ou $T_1 \rightarrow S_0$).

De modo geral, essas constantes são importantes para o entendimento do sistema no que consiste em corroborar em conjunto com os valores de rendimento quântico, o quanto uma molécula é capaz de emitir.

No caso dos compostos estudados, observa-se que os valores de k_{nr} obtidos são maiores do que os valores de k_f , assim como se esperava que fosse ocorrer para estes compostos contendo átomos de calcogênio que podem ser considerados como átomos

pesados. Além disso, os valores de rendimento quântico também são baixos, mais uma vez evidenciando que os compostos são praticamente não emissivos.

Tendo em vista os aspectos observados para os compostos obtidos, depreende-se de que o processo de absorção via fotoexcitação é derivado da excitação do estado fundamental S0 para o estado excitado S1, com energias do estado singlete (E_S) na faixa de 349 a 352 kJ.mol⁻¹. Os valores dos deslocamentos de Stokes também são próximos na série sintetizada (~ 60 nm), além dos valores de tempo de vida do estado excitado obtidos experimentalmente estarem na faixa de 10⁻¹¹s a 10⁻¹⁰s, os quais são inerentes do processo de fluorescência.

Em estudos com outras cumarinas, como a 7-amino-4-metil-cumarina⁴¹, tem-se que seu comportamento fotofísico depende do meio ao qual está solubilizada. Em solventes de menor polaridade como hexano e heptano, pouco se evidencia a emissão de fluorescência, diferente para solventes mais polares como etanol e metanol, em que os máximos de absorção e fluorescência tem um aumento no deslocamento batocrômico bastante expressivo.

Em relação as cumarinas estudadas (**14** e **37**) verifica-se que de maneira geral os valores experimentais obtidos são muito próximos àqueles observados em literatura tanto para os máximos de absorção, emissão de fluorescência e os demais dados de importância fotofísica tais como rendimento quântico e tempo de vida do estado excitado e que a análise destes compostos em acetonitrila se faz por completa.

Em virtude do que foi mencionado em relação às possibilidades de estudos com esta classe de compostos, se faz necessário ainda em uma etapa futura, o estudo solvatocrômico, em solventes com diferentes polaridades, como clorofórmio, etanol e DMSO, por exemplo, a fim de ampliar o conhecimento já adquirido a respeito dos compostos sintetizados.

3.4.2 Determinação de espécies oxidantes

Após ter sido realizada a caracterização de todos os compostos em relação às suas propriedades fotofísicas, evidenciou-se, que a inserção dos átomos de calcogênio na estrutura da molécula contendo o núcleo cumarínico, fez com que houvesse a supressão quase que por completo da emissão de fluorescência do cromóforo, verificado pelos

⁴¹ Pal, H., Nad, S., Kumbhakar, M., *J. Chem. Phys.*, **2003**, *119*, 443 – 452;

baixos valores de rendimento quântico e também por outros fatores já discutidos previamente.

Os átomos de calcogênio possuem grande suscetibilidade à oxidação. No caso dos compostos sintetizados, era pressuposto que a oxidação do calcogênio presente na molécula deveria fazer com que a emissão de fluorescência fosse aumentada à medida que o efeito PeT fosse diminuído.

Partindo desta premissa, iniciaram-se estudos para identificar a capacidade que esses compostos teriam em detectar, de maneira seletiva, diferentes espécies oxidantes. Neste caso, preferiu-se por utilizar duas entidades capazes de serem formadas em meio intracelular, por rotas distintas, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o ácido hipocloroso (HOCl), a fim de utilizar estes compostos, posteriormente, como sondas fluorescentes em meio celular.

Uma varredura inicial para peróxido de hidrogênio e ácido hipocloroso foi realizada com os compostos **41**, **42** e **43**. Inicialmente, foram registrados os espectros de emissão de fluorescência de cada uma das sondas em acetonitrila (298 K) na concentração de $10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ (10 $\mu\text{mol/L}$). Em seguida, em cubetas separadas, foi adicionado 10 equivalentes de cada espécie oxidante à solução estoque, registrando os espectros de emissão de fluorescência para cada um dos casos.

Os valores de máximo de emissão de fluorescência obtidos em 380 nm foram normalizados e os valores obtidos para cada um dos casos (solução estoque da sonda, solução estoque da sonda com adição de peróxido de hidrogênio e solução estoque da sonda com adição do ácido hipocloroso) estão apresentados no gráfico da Figura 21.

Figura 21. Seletividade dos calcogenetos frente às espécies oxidantes H_2O_2 e HOCl (10 equivalentes).

O derivado de enxofre **41**, apresentou maior reatividade com peróxido de hidrogênio. A adição deste oxidante, fez com que houvesse um maior aumento para a emissão de fluorescência, do que quando foi adicionado ácido hipocloroso. No caso do derivado de selênio **42**, houve aumento de emissão de fluorescência com a adição do ácido hipocloroso ao invés do peróxido de hidrogênio. E, no caso do derivado de telúrio **43**, houve resposta positiva para ambos os oxidantes.

3.4.3 Titulação espectrofotométrica e espectrofluorimétrica com as espécies oxidantes

Pela varredura inicial dos compostos frente à oxidantes, verificou-se a importância de estudar esses sistemas de forma minuciosa e, portanto, prosseguiu-se para os estudos de titulação espectrofotométrica e espectrofluorimétrica. Os estudos foram realizados com os compostos **41**, **42**, **43**, **44**, **45** e **46**. Para isso, foram preparadas soluções-estoque dos mesmos, em acetonitrila, na concentração de 10^{-5}mol.L^{-1} ($10\text{ }\mu\text{mol/L}$), a 298 K.

As espécies oxidantes foram previamente tituladas; o peróxido de hidrogênio através do teste iodométrico com o uso de HRP (horseradish peroxidase)⁴² e o ácido hipocloroso por metodologia espectrofotométrica⁴³. Foram preparadas soluções estoque para cada uma das espécies oxidantes na concentração de $1,5 \times 10^{-3}\text{mol.L}^{-1}$, em solução aquosa.

As titulações dos compostos foram realizadas pela adição de concentrações incrementares da espécie oxidante à cubeta contendo 1 mL da solução do composto de interesse e os espectros de absorção e emissão de fluorescência foram obtidos imediatamente após sua adição.

Os resultados obtidos nas titulações dos compostos da série fenil, **41** (Figuras 22 e 23), **42** (Figuras 23 e 24) e **43** (Figuras 25 e 26), com o ácido hipocloroso (HOCl) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) são mostradas a seguir.

⁴² Toledo Jr., J. C., Audi, R., Ogusucu, R., Monteiro, G., Netto, L. E. S., Augusto, O., *Free Radical Biology & Medicine*, **2011**, 50, 1032 – 1038;

⁴³ Hussain, A., Trudell, P., Repta, A. J., *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **1970**, 59, 1168 – 1170;

Figura 22. a) Espectros de absorção de **41**; b) Emissão de fluorescência de **41** (10 μM) em acetonitrila, com adição de concentrações incrementares de HOCl (10 em 10 μM até estabilização do λ_{em} em 240 μM) em solução aquosa. λ_{ex} = 319 nm; (c) Resposta linear de aumento de λ_{em} em 380 nm.

Figura 23. a) Espectros de absorção de **41**; b) Emissão de fluorescência de **41** (10 μM) em acetonitrila, com adição concentrações incrementares de H₂O₂ (10 em 10 μM até estabilização do λ_{em} em 200 μM) em solução aquosa. λ_{ex} = 319 nm; (c) Resposta linear de aumento de λ_{em} em 380 nm.

Figura 24. a) Espectros de absorção de **42**; b) Emissão de fluorescência de **42** (10 μM) em acetonitrila, com adição de concentrações incrementares de HOCl (10 em 10 μM até estabilização do λ_{em} em 260 μM) em solução aquosa. λ_{ex} = 319 nm; (c) Resposta linear de aumento de λ_{em} em 377 nm.

Figura 25. a) Espectros de absorção de **42**; b) Emissão de fluorescência de **42** (10 μM) em acetonitrila, com adição concentrações incrementares de H_2O_2 (10 em 10 μM até estabilização do λ_{em} em 230 μM) em solução aquosa. λ_{ex} = 319 nm; (c) Resposta linear de aumento de λ_{em} em 380 nm.

Figura 26. a) Espectros de absorção de **43**; b) Emissão de fluorescência de **43** (10 μM) em acetonitrila, com adição de concentrações incrementares de HOCl (10 em 10 μM até estabilização do λ_{em} em 170 μM) em solução aquosa. λ_{ex} = 319 nm; c) Resposta linear de aumento de λ_{em} em 380 nm.

Figura 27. a) Espectros de absorção de **43**; b) Emissão de fluorescência de **43** (10 μM) em acetonitrila, com adição concentrações incrementares de H_2O_2 (10 em 10 μM até estabilização do λ_{em} em 230 μM) em solução aquosa. λ_{ex} = 319 nm; c) Resposta linear de aumento de λ_{em} em 380 nm.

Em todos os casos, observa-se nos espectros de absorção uma diminuição de intensidade das bandas de 290 nm e 320 nm, à medida que são adicionadas as concentrações incrementares da espécie oxidante, por conta da diluição ao qual o meio é submetido.

Para as titulações realizadas com o HOCl, tanto o sulfeto **41** (Figura 22 b) quanto o seleneto **42** (Figura 24 b) possuem valores iniciais de emissão de fluorescência em 0,4 unidades arbitrárias. Tem-se uma resposta linear de aumento de intensidade de fluorescência com a concentração da entidade oxidante adicionada (Figuras 22 c e 23 c), até cerca de 25 equivalentes em que os máximos atingem valores constantes em 1 u.a.

No caso do telureto **43** (Figura 26 b), o valor inicial de emissão de fluorescência é em cerca de 0,2 u.a., também com resposta linear de aumento de intensidade com a adição do oxidante, observando-se uma estabilização em cerca de 17 equivalentes adicionados. Nesse caso, foi observado na titulação espectrofluorimétrica o aparecimento de um ombro na faixa de 450 – 500 nm, com aumento do valor de intensidade à medida que o HOCl foi sendo adicionado.

A titulação dos compostos com o peróxido de hidrogênio, demonstrou perfil espectral espectrofotométrico e espectrofluorimétrico semelhante. O sulfeto (**41**) e o seleneto (**42**) possuem valores iniciais de emissão de fluorescência em 0,4 unidades arbitrárias (Figuras 23 b e 24 b) e à medida que são adicionadas as concentrações incrementares do peróxido de hidrogênio, observa-se um aumento das intensidades dos valores de máximo de emissão, em resposta linear (Figuras 21 c e 23 c) que é estabilizado com cerca de 20 equivalentes do oxidante adicionado.

O telureto (**43**) possui valor inicial de emissão de fluorescência em 0,3 u.a. (Figura 27 b), observando-se como nos demais casos, o aumento de intensidade do máximo de emissão de fluorescência, em resposta linearmente proporcional às concentrações incrementares da espécie oxidante (Figura 27 c), estabilizando-se em valores de 1 u.a. com cerca de 23 equivalentes adicionados.

Em ambas as titulações de **42** e **43** com o H_2O_2 , foi observado o aparecimento de uma nova banda de emissão na faixa de 425 – 550 nm.

As respostas das titulações dos compostos da série *n*-butil; **44** (Figuras 28 e 29), **45** (Figuras 30 e 31) e **46** (Figuras 32 e 33), com o ácido hipocloroso (HOCl) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) também são mostradas a seguir.

Figura 28. a) Espectros de absorção de **44**; b) Emissão de fluorescência de **44** (10 μM) em acetonitrila, com adição de concentrações incrementares de HOCl (10 em 10 μM até estabilização do λ_{em} em 60 μM) em solução aquosa. $\lambda_{\text{ex}} = 319 \text{ nm}$; (c) Resposta linear de aumento de λ_{em} em 379 nm.

Figura 29. a) Espectros de absorção de **44**; b) Emissão de fluorescência de **44** (10 μM) em acetonitrila, com adição concentrações incrementares de H_2O_2 (10 em 10 μM até estabilização do λ_{em} em 80 μM) em solução aquosa. $\lambda_{\text{ex}} = 319 \text{ nm}$; (c) Resposta linear de aumento de λ_{em} em 379 nm.

Figura 30. a) Espectros de absorção de **45**; b) Emissão de fluorescência de **45** (10 μM) em acetonitrila, com adição de concentrações incrementares de HOCl (10 em 10 μM até estabilização do λ_{em} em 150 μM) em solução aquosa. $\lambda_{\text{ex}} = 319 \text{ nm}$; (c) Resposta linear de aumento de λ_{em} em 378 nm.

Figura 31. a) Espectros de absorção de **45**; b) Emissão de fluorescência de **45** (10 μM) em acetonitrila, com adição de concentrações incrementares de H_2O_2 (10 em 10 μM até estabilização do λ_{em} em 100 μM) em solução aquosa. $\lambda_{\text{ex}} = 319 \text{ nm}$; (c) Resposta linear de aumento de λ_{em} em 378 nm.

Figura 32. a) Espectros de absorção de **46**; b) Emissão de fluorescência de **46** (10 μM) em acetonitrila, com adição de concentrações incrementares de HOCl (10 em 10 μM até estabilização do λ_{em} em 150 μM) em solução aquosa. λ_{ex} = 319 nm; (c) Resposta linear de aumento de λ_{em} em 378 nm.

Figura 33. a) Espectros de absorção de **46**; b) Emissão de fluorescência de **46** (10 μM) em acetonitrila, com adição de concentrações incrementares de H_2O_2 (10 em 10 μM até estabilização do λ_{em} em 150 μM) em solução aquosa. λ_{ex} = 319 nm; (c) Resposta linear de aumento de λ_{em} em 380 nm.

Para o sulfeto **44**, observam-se valores iniciais de emissão de fluorescência com intensidade normalizada em 0,8 unidades arbitrárias (Figuras 28 b e 29 b) e à medida que se adicionam os oxidantes, os máximos de intensidade atingem 1 u.a. com 6 e 8 equivalentes, de ácido hipocloroso e peróxido de hidrogênio, respectivamente, com resposta linearmente proporcional às concentrações incrementais de oxidante (Figuras 28 c e 29 c).

Nas titulações do seleneto **45**, observa-se valor inicial de emissão de fluorescência em cerca 0,8 u.a., enquanto que se tem a adição das espécies oxidantes a até 15 e 10

equivalentes (Figuras 30 b e 31 b), respectivamente para o HOCl e H₂O₂. Em ambos os casos também foi verificada resposta linearmente proporcional (Figuras 30 c e 31 c) à adição dos oxidantes.

Em seguida, para as titulações do telureto **46**, em ambos os casos (Figuras 32 b e 33 b), observa-se valor inicial de emissão normalizada em cerca de 0,3 u.a. e que atingem patamar de estabilização de aumento de intensidade de emissão de fluorescência com a adição de 15 equivalentes das espécies oxidantes (Figuras 32 c e 33 c).

A partir das titulações realizadas com os compostos da série *n*-butil, observou-se que o comportamento de oxidação dos calcogenetos aos seus calcogenóxidos correspondentes é bastante semelhante aos da série fenil, porém que os máximos de emissão de fluorescência atingem um patamar de estabilização na faixa de 100 – 150 µmol/L da adição da espécie oxidante, 10 vezes menor que os da série fenil.

A titulação espectrofluorimétrica do composto **42** (Figura 25 b), seleneto da série fenil, apresentou o aparecimento de uma nova banda na faixa de 450 – 550 nm, a partir de poucos equivalentes de peróxido de hidrogênio adicionados (fato que também foi evidenciado para o telureto **43**). Essa banda emissiva que ocorre exclusivamente pela oxidação do peróxido de hidrogênio, poderia indicar que a espécie formada no meio possui um processo emissivo de diferente via observada para o processo de fluorescência.

Para a comprovação de qual espécie de selênio é formada pela oxidação com peróxido de hidrogênio, objetivou-se um estudo por LC – MS. Inicialmente foi injetado ao equipamento o composto **40**, como um padrão, observando tempo de retenção (*t_{r1}*) em 10,28 minutos, assim como mostrado no cromatograma na Figura 34.

Figura 34. Cromatograma do padrão da cumarina **42**.

A seguir, à solução preparada do padrão da cumarina, foi adicionado um equivalente de peróxido de hidrogênio, obtendo-se o cromatograma da Figura 34, no qual observou-se a eluição de um novo pico com tempo de retenção (t_{r1}) em 0,72 minutos, provavelmente característico da espécie oxidada de selênio, e um segundo pico com tempo de retenção (t_{r2}) em 10,07 minutos referente ao padrão da cumarina.

Figura 35. Cromatograma do padrão da cumarina (**42**) após adição de 1 equivalente de peróxido de hidrogênio.

Em seguida, foram adicionados 3 equivalentes de peróxido de hidrogênio à solução de **42**, obtendo-se o cromatograma da Figura 35, no qual observa-se a diminuição

do pico padrão do composto derivado de selênio (t_{r2}) em 10,13 minutos, ao qual o pico de menor tempo de retenção (t_{r1}) em 0,71 minutos está em maior proporção.

Figura 36. Cromatograma do padrão da cumarina (**42**) após adição de 3 equivalentes de peróxido de hidrogênio.

Deste último experimento, foram analisadas por espectrometria de massas (Figura 36 a e b) os dois componentes eluídos com tempos de retenção em t_{r1} de 0,71 minutos e em t_{r2} de 10,13 minutos.

Figura 37. a) Espectro de massas do primeiro componente com $t_{r1} = 0,71$ minutos; b) Espectro de massas do segundo componente com $t_{r2} = 10,13$ minutos.

Para o componente com maior tempo de retenção em 10, 13 minutos, do espectro de massas mostrado na figura a seguir (Figura 37 a), obteve-se o pico do íon molecular na posição do espectro correspondente a $m/z = 359,95$, sendo que o calculado para o íon molecular é $m/z = 360,02$. Para o pico de massa de uma unidade a mais do que o íon molecular, $[M + H]^+$, este é observado na posição do espectro correspondente a $m/z = 360,95$.

Para o componente de menor tempo de retenção de 0,71 minutos, observou-se pelo espectro de massas (Figura 37 b) o pico do íon molecular em m/z correspondente a 375,95, enquanto que o pico $[M + H]^+$ aparece na posição do espectro correspondente a $m/z = 376,95$.

A partir destes valores obtidos por espectrometria de massas foi possível inferir que a espécie de selênio oxidada que se forma através da oxidação por peróxido de hidrogênio é a mostrada na figura 35 b, na forma de um selenóxido. No entanto, apenas estes estudos não foram suficientes para indicar se a banda emissiva na faixa de 450 – 550 nm observada através da titulação espectrofluorimétrica é proveniente desta espécie formada no meio.

No caso, já foi possível identificar que a oxidação do seleneto **42** com o peróxido de hidrogênio forma o selenóxido correspondente, porém se faz necessário o isolamento destas espécies e possivelmente sua caracterização fotofísica.

De maneira geral, os dados obtidos através das titulações com as espécies oxidantes, evidenciam que os compostos com a ramificação fenil na molécula, são menos propensos à oxidação em relação aos compostos com a ramificação *n*-butil, por exemplo, indicando que a velocidade de reação para a oxidação destes calcogenetos ocorre mais rapidamente. Estes dados também indicam a possibilidade de aplicação dos compostos sintetizados em sistemas analíticos e biológicos como dispositivos capazes de detectar tanto o ácido hipocloroso quanto o peróxido de hidrogênio, e ainda de maneira seletiva.

Em uma etapa seguinte deste trabalho, um estudo mais aprofundado de cinética reacional para o cálculo das velocidades de reação dos compostos é necessário, até no que consta para a sua aplicação biológica verificada no capítulo a seguir.

3.5 Aplicação biológica

Os estudos biológicos foram realizados em parceria com a aluna de doutorado Railmara Pereira sob orientação da Profa. Dra. Flávia Meotti, do laboratório de Pesquisa em Processos Redox na Resposta Inflamatória, do Departamento de Bioquímica do IQ-USP. Este grupo de pesquisa investiga os mecanismos da produção de espécies oxidantes durante reações inflamatórias e como estas espécies podem afetar a resposta celular.

De maneira geral, a resposta inflamatória depende do reconhecimento de patógenos por células de defesa inata. Estas células fagocitam esses agentes estranhos a fim de destruí-los e em seguida apresentá-los às células da resposta imune adquirida. O contato do agente invasor com receptores de membrana de neutrófilos e macrófagos iniciam diferentes vias de sinalização intracelular, ativando enzimas responsáveis pela geração de espécies oxidantes endógenas. Estas espécies oxidantes são produtos de reações redox envolvendo o oxigênio (O_2) e entre elas estão inclusas o ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), peróxidos orgânicos ($ROOH$) e o ácido hipocloroso ($HOCl$)⁴⁴. A produção dessas substâncias acontece através do aumento no consumo de oxigênio durante a fagocitose, conhecido como “*burst* oxidativo”.

Entre as enzimas envolvidas no “*burst*” oxidativo, existe um grupo chamado de peroxidases, responsáveis pela redução de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em H_2O e em sequência oxidam outros substratos a fim de regenerar-se ao seu estado inicial. Dentre as peroxidases relacionadas ao sistema imune, destaca-se a mieloperoxidase (MPO), liberada pelos neutrófilos. A mieloperoxidase (Figura 38 a) é a enzima mais abundante em neutrófilos e sua versatilidade catalítica lhe confere habilidade de reagir com uma série de substratos que não somente o íon cloreto. Estes substratos incluem polifenóis, catecolaminas, aminoácidos, superóxido, nitrito, ácido ascórbico e o ácido úrico⁴⁵. A oxidação destes substratos gera intermediários como radicais livres, peróxidos orgânicos, quinonas etc., capazes de oxidar estruturas celulares do hospedeiro e alterar respostas celulares e, dependendo da extensão da oxidação, induzir o dano tecidual, levando à alteração do funcionamento de proteínas, membranas e ácidos nucleicos. Dessa maneira, a produção destas espécies está relacionada diretamente com processos patológicos como,

⁴⁴ Drummond, G. R., Selemidis, S., Griendling, K. K., Sobey, C. G., *Nat. Ver. Drug. Discov.*, **2011**, 10, 453 – 471; Hampton, M. B., Kettle, A. J., Winterbourn, C. C., *Blood*, **1998**, 92, 3007 – 3017;

⁴⁵ Meotti, C. Flavia, Jameson, G. N. L., Turner, R., Harwood, D. T., Stockwell, S., Rees, M. D., Thomas, S. R., Kettle, J. A.; *The Journal of Biological Chemistry*, **2011**, 286, 15, 12901 – 12911;

por exemplo, a aterosclerose, doenças cardiovasculares, doenças neurodegenerativas e o câncer.

Estrutura da Mieloperoxidase

Ciclo Catalítico de MPO

Figura 38. a) Estrutura da enzima mieloperoxidase (MPO); b) Atividade Catalítica da MPO: mecanismos de halogenação e peroxidação de MPO; MPO^{3+} é o complexo férrico da mieloperoxidase. RH representa os substratos orgânicos que sofrem a peroxidação, como tirosina, ascorbato e urato. $\text{R}^\bullet$ é o radical produzido frente à oxidação de RH. Fonte: Adaptado de Meotti, C. Flávia et al, *The Journal of Biological Chemistry*, **2011**, 286, 15, 12901-12911, p. 12902.

A formação de ácido hipocloroso pela mieloperoxidase pode ser avaliada pela medida indireta da cloração do aminoácido taurina⁴⁶. O ácido hipocloroso reage rapidamente com a taurina para formar um oxidante estável denominado de taurina cloroamina (Tau-Cl). A Tau-Cl é capaz de oxidar o ácido 5-tio-2-nitrobenzóico (TNB) ao ácido ditionitrobenzóico (DTNB), apresentado na figura 37. O TNB apresenta máximo de absorção em 412 nm, enquanto que o DTNB apresenta máximo de absorção na faixa de 320-330 nm (Figura 37 b). Dessa forma, é possível a verificação da mudança dos valores de absorção do meio celular após reação da Tau-Cl com o DTNB e determinar a concentração de HOCl.

⁴⁶ Kettle, A. J., Winterbourn, C. C., *Redox Rep.*, **1997**, 3, 3 – 15;

Figura 39. 1a) Formação do ácido hipocloroso catalisado pela mieloperoxidase a partir de peróxido de hidrogênio e íon cloreto, 1b) Reação de cloração da taurina a partir do ácido hipocloroso, 1c) Oxidação da Tau-Cl por TNB e formação do DTNB que possui $\lambda_{\text{abs}} = 320 - 330 \text{ nm}$; 2) Espectros de absorvância do TNB ($\lambda_{\text{abs}} = 412 \text{ nm}$) e seu produto de oxidação, o DTNB ($\lambda_{\text{abs}} = 320 - 330 \text{ nm}$).

Após a realização das titulações espectrofotométricas e espectrofluorimétricas, observou-se que os compostos derivados de telúrio demonstraram melhor resposta frente às espécies oxidantes, no que compete com um valor basal de emissão de fluorescência em cerca de 0,3 u.a. e que com a adição de poucas quantias do oxidante, esses valores aumentavam consideravelmente.

Portanto, foi realizado um estudo cinético, em meio aquoso (PBS pH 7,4), com os compostos **43** e **46** (solubilizados em DMSO e diluídas em solução estoque em PBS, pH 7,4 na concentração de $5 \mu\text{mol/L}$). Em uma placa de 48 poços, foram adicionados $150 \mu\text{L}$ da solução estoque da sonda em 5 poços. A partir do poço 2 (E2; F2) foram adicionadas quantidades de 5, 10 (E3; F3), 20 (E4; F4) e 40 (E5; F5) $\mu\text{mol/L}$ de ácido hipocloroso, totalizando volume final de $300 \mu\text{L}$ para cada poço, sendo que ao primeiro poço não se adicionou o ácido hipocloroso; apenas $150 \mu\text{L}$ de PBS para igualar o volume com os demais (E corresponde ao estudo com o composto **43** e F ao composto **46**).

Figura 40. Estruturas dos compostos **43** e **46** selecionados para os estudos de aplicação biológica.

Figura 41. Estudo cinético de **43** em meio aquoso (PBS) com adições de 5, 10, 20 e 40 $\mu\text{mol/L}$ de ácido hipocloroso; (E1 – branco, E2 – 5 $\mu\text{mol/L}$ de HOCl, E3 – 10 $\mu\text{mol/L}$ de HOCl, E4– 20 $\mu\text{mol/L}$ de HOCl, E5– 40 $\mu\text{mol/L}$ de HOCl).

Figura 42. Estudo cinético de **46** em meio aquoso (PBS) com adições de 5, 10, 20 e 40 $\mu\text{mol/L}$ de ácido hipocloroso; (F1 – branco, F2 – 5 $\mu\text{mol/L}$ de HOCl, F3 – 10 $\mu\text{mol/L}$ de HOCl, F4– 20 $\mu\text{mol/L}$ de HOCl, F5– 40 $\mu\text{mol/L}$ de HOCl).

Nas Figuras 41 e 42, são mostrados os estudos cinéticos realizados com ambos os telureto **43** e **46**, respectivamente, observando-se que logo na menor concentração do ácido hipocloroso adicionado, no caso em E2 e F2 referentes à adição de 5 $\mu\text{mol/L}$ do oxidante, que na velocidade de reação no tempo 0, as sondas já haviam sido oxidadas o suficiente para atingir o máximo de emissão de fluorescência, impossibilitando o cálculo das constantes de velocidades para estes compostos.

Desse modo, o estudo cinético em meio aquoso deverá ser realizado em uma etapa seguinte por meio de uma técnica mais sensível, “*stopped-flow*”. Esse resultado indica que as sondas contendo o átomo de telúrio possam ser melhores candidatos nos estudos biológicos para quantificação do ácido hipocloroso em meio celular. Dessa maneira, foram realizados estudos preliminares em meio celular com células promielocíticas humanas (HL-60), diferenciadas para neutrófilos maduros. Ao meio celular foi adicionado o reagente PMA (phorbol-12-myristate-13-acetate) responsável pela ativação de proteínas quinases C (PKC) a fim de iniciar a via de produção de ácido hipocloroso no meio celular.

Em seguida, adicionou-se o aminoácido taurina que reage com o ácido hipocloroso formado em excesso através do PMA, gerando a espécie Tau-Cl. Essa espécie é capaz de oxidar o TNB para a forma de DTNB e os valores de absorbância são medidos para o cálculo de HOCl formado. A última etapa do experimento ocorre pela adição da sonda (**43** e **46**), que se tiverem uma velocidade de reação elevada para a oxidação com ácido hipocloroso, competem com a taurina na reação de cloração. Quando a taurina deixa de reagir com o ácido hipocloroso, não se tem a formação de Tau-Cl, consequentemente haverá TNB presente no meio celular e os valores de absorbância em 410 nm serão maiores indicando uma menor concentração de HOCl que reagiu com a taurina.

A contagem de células foi realizada por uma câmara de Neubauer, também referida como hemocitômetro, evidenciando que a cada 150 μL do meio houvessem 1 milhão de células. Em uma placa de 48 poços foram adicionados em 8 poços, 150 μL (1×10^6 células) de meio celular de linhagem HL-60, em PBS glicose. Um dos poços continha apenas o meio celular como o branco do experimento, assim como também foi feito um controle negativo contendo o meio celular, PMA e Tau (taurina). Nos demais poços foi adicionado PMA, Tau e as sondas nas seguintes concentrações: 10, 20, 40, 80 e 100 $\mu\text{mol/L}$, no qual todos os poços foram avolumados para 300 μL com PBS glicose.

Após adição de todos os componentes e homogeneização dos poços, eles foram incubados por 2 horas a 37°C. Em seguida, o conteúdo dos poços foi coletado em microtubos e centrifugados a 1400 rpm por cinco minutos. O sobrenadante foi coletado e adicionado a novos poços. Em cada um deles foi adicionado o TNB e após 15 minutos de homogeneização, foram obtidos os valores de absorbância em 410 nm para cada poço assim como demonstrado na Tabela 3.

Tabela 3. Dados dos valores obtidos de absorção e concentração de HOCl para o estudo com células HL-60.

		HL-60	(HL-60+PMA+Tau)	HL-60+PMA+Tau+Te (10 µM)	HL-60+PMA+Tau+Te (20µM)	HL-60+PMA+Tau+Te (40µM)	HL-60+PMA+Tau+Te (80µM)	HL-60+PMA+Tau+Te (100µM)	Branco
43	λ_{abs}	0,691	0,783	0,725	0,976	0,887	0,739	0,688	0,664
	[HOCl]	0,000	-5,147	-3,015	-12,243	-8,971	-3,529	-1,654	-
46	λ_{abs}	0,802	0,446	0,640	0,591	0,689	0,650	0,887	0,643
	[HOCl]	0,000	7,243	0,110	0,000	-1,691	-0,257	-8,971	-

Para o experimento contendo a sonda **43**, observou-se um erro nos valores do controle negativo (HL-60+PMA+Tau). Esperava-se que o valor de absorbância (0,783 u.a.) fosse menor que o valor obtido para o branco (0,664 u.a.) e para o controle (HL-60) (0,691 u.a.); indicando que a oxidação do TNB para DTNB pela taurina cloroamina (Tau-Cl) formada não ocorreu como esperado.

O cálculo da concentração de HOCl no meio resultou em um valor negativo indicando a não formação de HOCl e, portanto, este experimento com a sonda **46** deverá ser refeito, pois provavelmente esse valor negativo é atribuído um erro de pipetagem de um dos componentes para o poço.

No caso do experimento com a sonda **46**, o valor de absorbância controle negativo (HL-60+PMA+Tau) é inferior (0,446 u.a.) aos dos grupos controle (Branco: 0,643 u.a., HL-60: 0,802 u.a.) indicando que houve a formação de DTNB através de reação com a Tau-cl, tal qual é esquematizada na figura 37. O cálculo da concentração de HOCl no meio celular, correspondeu a 7,2 µmol/L, valor que está dentro da faixa de concentração de ácido hipocloroso deste tipo de célula que pode estar na faixa de 7 a 11 µmol/L.

Para este experimento, observa-se que com a menor concentração da sonda **46**, no caso 10 µmol/L adicionado, que a concentração de HOCl diminui bruscamente do valor encontrado para o controle de 7,20 µmol/L (valor que varia de na faixa de 7,00 – 11,00

$\mu\text{mol/L}$ neste tipo de linhagem celular), para $0,11 \mu\text{mol/L}$, e nas seguintes concentrações crescentes da sonda adicionada no meio celular não há mais HOCl presente no meio, assim como observado na Figura 43. Isso indica que a sonda é capaz de sequestrar todo o HOCl presente no meio, mais rapidamente do que ocorre a reação de cloração do aminoácido taurina, sendo um ótimo candidato para a quantificação e detecção de HOCl.

Figura 43. Gráfico da concentração de HOCl em $\mu\text{mol/L}$ obtida no grupo controle e nos grupos contendo a sonda **46** em $10 \mu\text{mol/L}$ e em $20 \mu\text{mol/L}$.

A investigação preliminar das sondas para a detecção de HOCl, indicou a necessidade de diminuir a faixa de concentração adicionada ao meio celular. O mesmo experimento foi realizado, em duplicata, com a adição de 1, 5, 10, 20, 40 e $80 \mu\text{mol/L}$ das sondas, e nesse caso após a incubação do meio, o sobrenadante foi retirado e adicionado em uma placa de 48 poços para a verificação da emissão de fluorescência de cada um dos poços, que é demonstrado na Figura 44, na forma de um gráfico de emissão de fluorescência por concentração gradativa adicionada da sonda.

Figura 44. Gráfico de emissão de fluorescência por concentração da sonda adicionada ao meio celular (HL-60).

Pode-se verificar que ambas as sondas são oxidadas pelo ácido hipocloroso e atribuem fluorescência ao meio celular e que demonstraram comportamento semelhante em relação ao aumento de emissão de fluorescência com o aumento de concentração adicionado.

Em um poço adicional o mesmo experimento com a adição de 80 µmol/L foi realizado, porém sem a adição do aminoácido taurina, a fim de avaliar se a não formação do componente taurina cloramina afetaria na resposta de emissão de fluorescência, como um controle, e foi observado que há uma emissão de fluorescência em valores similares aos poços em que havia a presença do aminoácido taurina.

Estes resultados indicam que ambas as sondas contendo o átomo de telúrio são candidatas promissoras para a detecção de HOCl em meio intracelular, indicando a necessidade de dar continuidade com estes estudos, além da verificação do cálculo das constantes de velocidade de oxidação do átomo de telúrio, através de medidas mais rápidas com o auxílio de técnicas em “*stopped-flow*”.

4. Conclusões e Considerações Finais

O presente trabalho de mestrado depreendeu-se principalmente na preparação de seleno- e teluro-cumarinas para estudos de emissão e supressão de fluorescência. Foram realizadas as preparações dos seleno-precursores a partir da funcionalização do resorcinol, porém as rotas metodológicas seguidas não obtiveram compostos em bons rendimentos nem facilidade de isolamento, impedindo com que estes fossem utilizados na preparação de cumarinas subsequentes. Tais metodologias necessitam de otimização, bem como a proposição de novos meios para funcionalização do resorcinol ou do β -cetoéster com o átomo de calcogênio.

A inserção de Se (II) e no núcleo cumarínico, na posição C-6, também não foi realizada em bons rendimentos e facilidade de isolamento, impedindo a realização da caracterização fotofísica do produto obtido, demonstrando a busca por vias alternativas para este tipo de funcionalização.

Foi obtida uma nova cumarina, o composto **19**, em rendimento razoável (34%), o qual foi utilizada para os estudos iniciais de caracterização fotofísica, permitindo principalmente o aprendizado das técnicas experimentais e manejo dos equipamentos, além de auxiliar no entendimento das principais propriedades espectroscópicas do núcleo cumarínico.

Foram sintetizadas 6 novas cumarinas com a variação do átomo de calcogênio, todas caracterizadas por RMN de ^1H , ^{13}C , ^{77}Se e ^{125}Te . As condições reacionais empregadas mostraram-se bastantes eficientes, no que diz respeito a rendimentos de 27 a 69%, sendo os menores rendimentos associados aos compostos de telúrio.

As cumarinas contendo os átomos de calcogênio apresentaram propriedades fotofísicas promissoras no que compete aos entendimentos dos processos de desativação do estado excitado desses compostos, uma vez que não se tem muitos registros em literatura para cumarinas contendo enxofre, selênio e telúrio, ainda mais no arranjo do tipo “fluoróforo-espaçador-receptor”, de modo que este trabalho tenha importância fundamental na contribuição de informações relevantes a respeito desses tipos de sondas.

Também foi possível realizar estudos destes compostos e observar a sua resposta frente à oxidação de espécies endógenas como peróxido de hidrogênio e o ácido hipocloroso, de modo que mesmo que tivéssemos respostas interessantes, verifica-se também a necessidade de estudos complementares e mais detalhados, com técnicas de espectrometria de massas, por exemplo, para o entendimento de quais espécies de

calcogenóxidos podem ser formadas no meio e emitir, por exemplo, através de outras vias radiativas, que também precisam de elucidação.

Ademais, observou-se que os compostos derivados de telúrio **44** e **46**, por terem demonstrado maior resposta às espécies oxidantes durante os estudos de titulação espectrofotométrica e espectrofluorimétrica, foram utilizados como candidatos para a quantificação de ácido hipocloroso em meio celular. Os estudos ainda são bem iniciais, porém foi possível evidenciar que ambos são ótimos candidatos como sondas seletivas para HOCl, em células de linhagem HL-60 de neutrófilos.

5. Materiais e Métodos

5.1 Condições gerais

A vidraria utilizada foi previamente lavada com álcool comercial e colocada em uma estufa a 100°C. Os solventes foram purificados de acordo com os métodos usuais de literatura⁴⁷. O diclorometano (CH_2Cl_2) foi refluxado em CaH_2 e destilado antes do uso. O hexano e acetato de etila (EtOAc) foram destilados antes do uso. O THF usado foi destilado sob sódio metálico, benzofenona e nitrogênio, imediatamente antes do uso. Outros solventes e reagentes foram utilizados sem purificação prévia. O selênio utilizado foi obtido da marca Acros Organics. Para concentrar as soluções ou remover solventes foi utilizado um rota-evaporador Büchi, modelo R-114, conectado a uma bomba de vácuo Büchi, de modelo KNF Neuberger. As reações foram monitoradas por cromatografia por camada delgada (CCD) de marca Merck (E. Merck, tipo 5544, 0,2 mm) associada a luz UV e como agente revelador, soluções de vanilina, permanganato de potássio e iodo adsorvido em sílica. As purificações dos compostos obtidos foram realizadas em colunas com sílica gel Acros Organics (0,035 – 0,075 mm, diâmetro 6 nm) para coluna do tipo “flash”.

5.2 Ressonância magnética nuclear

Os espectros de RMN ^1H , ^{13}C e ^{77}Se e ^{125}Te foram obtidos em um espectrômetro *Bruker Avance III 200* (200MHz, ^1H ; 50MHz, ^{13}C ; 38MHz, ^{77}Se ; 63MHz, ^{125}Te). Para os espectros de RMN de ^{77}Se e ^{125}Te foram utilizados o disseleneto de difenila e o ditelureto de difenila (Ph_2Se_2 e Ph_2Te_2) como padrão externo de deslocamento químico. Os valores dos deslocamentos químicos são expressos em partes por milhão (ppm) em relação ao sinal do tetrametilsilano (TMS) ou disseleneto de difenila. Na descrição dos sinais atribuídos dos espectros de RMN utilizou-se como abreviação para singleto (s), dubleto (d), duplo dubleto (dd), tripleto (t), duplo tripleto (dt) e multipletto (m). Todas as constantes de acoplamento (J) estão descritas em hertz (Hz). Os espectros de RMN foram processados utilizando-se o software MestreNova 6.

⁴⁷ Perrin, D. D., Amarego, W. L., *Purification of Laboratory Chemicals*, Pergamon Press: London, **1980**;

5.3 Espectrometria de massas

Os espectros de massas de alta resolução foram obtidos em um espectrômetro MicroTOF, modelo Q-II, da marca Bruker, equipado com analisador do tipo “time of flight” e ionização através de elétron spray (ESI). As análises foram realizadas no laboratório do Professor Dr. Jorge Massuo, com auxílio da Dra. Lydia Yamaguchi.

5.4 Cromatografia líquida de alta eficiência

Os cromatogramas foram obtidos em um cromatógrafo líquido acoplado a um espectrofotômetro de massas (LCMS) ambos de marca Shimadzu, modelo HPLC – LC30AD, LCMS - 8030, utilizando uma coluna Shim-Pack, *C18-XR-ODSIII-100mm*, fluxo de 0,3 ml/min, fase móvel acetonitrila/água (1/1), por 20 minutos de eluição.

5.5 Espectros de infravermelho

Os espectros de infravermelho próximo (IV) foram obtidos em um espectrômetro FT-IR ALPHA da marca Bruker, modelo ATR Platinum, na região de 350 – 4500 cm^{-1} , operando em transformada de Fourier, com acessório de ATR. As análises foram realizadas no Laboratório de Espectroscopia Molecular (LEM) do Instituto de Química da USP, com o auxílio da aluna de doutorado Fernanda Pereira Carli, sob orientação do Professor Dr. Rômulo Augusto Ando.

5.6 Espectros de absorção na região do visível e do ultravioleta e espectros de emissão de fluorescência

Os espectros eletrônicos foram obtidos em um espectrofotômetro Varian Cary 50 Bio na região de 190 – 1100 nm em cubetas de quartzo com caminho óptico de 1 cm. Os espectros de emissão de fluorescência foram obtidos num espectrofluorímetro Varian Cary Eclipse em cubetas de quartzo com as quatro faces polidas e com caminho ótico de 1 cm. Os espectros eletrônicos das titulações espectrofluorimétricas e espectrofotométricas foram obtidos em um espectrofotômetro Biodrop DUO e em um espectrofluorímetro Hitachi F-2500.

5.7 Determinação do rendimento quântico de fluorescência (Φ_F)

Os rendimentos quânticos de emissão dos compostos foram determinados frente ao composto padrão sulfato de quinina em solução 0,5 mol L⁻¹ (0,1N) de H₂SO₄ ($\Phi_F = 0,55$).⁴⁸ Para tanto, calculou-se a razão entre a área do espectro de emissão do complexo de interesse com área do composto padrão, conforme a Equação 1.

$$\phi_{em} = \frac{S_{em}}{S_{em}^P} \frac{\epsilon^P C^P}{\epsilon C} \frac{n}{n^P} \phi_{em}^P \quad \text{Equação 1}$$

Em que,

ϕ_{em} = Rendimento quântico dos compostos de interesse;

S_{em} = Área da banda de emissão da amostra;

S_{em}^P = Área da banda de emissão do composto padrão;

ϵ = Absortividade molar da amostra no λ de excitação;

ϵ^P = Absortividade molar do composto padrão no λ de excitação;

C = Concentração molar da amostra;

C^P = Concentração molar do composto padrão;

ϕ_{em}^P = Rendimento quântico de fotoluminescência do composto de padrão.

n = índice de refração da solução da amostra

n^P = índice de refração da solução do padrão

5.8 Tempo de vida de fluorescência do estado excitado (τ)

As medições do tempo de vida do estado eletronicamente excitado singlete dos compostos foram realizadas em um equipamento Edinburgh FLS920 com o sistema *Time Correlated Single Photon Counting*; condições experimentais: $\lambda^{ex} = 319$ nm (LED pulsado), $\lambda^{em} = 378$ nm, 1000 counts, 1024 canais, $\Delta\lambda = 1$ nm e tempo de medição = 20 ns. A função de resposta instrumental (*i.e.*, pulso do LED, IRF) foi coletado com uma dispersão de sílica coloidal (Ludox), nas mesmas condições usadas para os compostos, exceto $\lambda^{em} = 335,6$ nm.

⁴⁸ Brouwer, A. M., *Pure Appl. Chem.*, **2011**, 83, 2213 – 2228;

Os ajustes das curvas de decaimento de fluorescência foram realizados considerando a IRF pelo software FAST (Edinburgh Photonics) através da análise de componentes discretos com o método dos mínimos quadrados descritos na equação 2⁴⁹:

$$R(t) = A + \sum_{i=1}^n B_i e^{(-\frac{t}{\tau_i})} \quad \text{Equação 2}$$

em que n está entre 1 e 4.

As frações de intensidade foram determinadas usando a equação 3:

$$f_i = \frac{B_i \tau_i}{\sum_{i=1}^n B_i \tau_i} \quad \text{Equação 3}$$

em que $\sum_{i=1}^n B_i \tau_i = \langle \tau \rangle$ Equação 4

Os dados de tempo de vida (τ , ns), fatores pré-exponenciais (B) e fração de contribuição (f) relativos à fluorescência dos compostos analisados estão compilados na tabela 4.

⁴⁹ Rodrigues, B. A. C., Dissertação de Mestrado: *Efeitos do meio sobre as propriedades fotofísicas de betalaínas e sua estabilidade na presença de Cu^{II}*, UFABC, **2012**, Santo André;

Tabela 4. Tempo de vida (τ , ns), fatores pré-exponenciais (B) e fração de contribuição (f) relativos à fluorescência dos compostos caracterizados.

Entrada	Compostos	τ_1 (ns)	τ_2 (ns)	A	B1	B2	f1	f2	χ^2	Média τ (ns)	Desvio Padrão (σ)	τ_1 (ns) $\pm \sigma$
1	16	0,1912	-	0,752	0,113	-	1	-	1,005	0,1956	0,006223	0,196
		0,2	-	0,752	0,103	-	1	-	1,035			$\pm$ 0,006
2	39	0,1448	-	0,767	0,14	-	1	-	1,066	0,13515	0,013647	0,14
		0,1255	-	0,665	0,152	-	1	-	1,213			$\pm$ 0,01
3	40	0,1431	-	0,992	0,139	-	1	-	1,234	0,1384	0,006647	0,138
		0,1337	-	1,038	0,153	-	1	-	1,088			$\pm$ 0,007
4	41	0,1271	-	0,904	0,16	-	1	-	1,229	0,1238	0,004667	0,124
		0,1205	-	0,877	0,162	-	1	-	1,244			$\pm$ 0,004
5	42	0,1197	-	1,078	0,167	-	1	-	1,466	0,11885	0,001202	0,119
		0,118	-	1,205	0,173	-	1	-	1,345			$\pm$ 0,001
6	43	0,1106	1,6021	0,53	0,175	0,001	0,93	0,07	1,061	0,1126	0,002828	0,113
		0,1146	1,6553	0,48	0,171	0,001	0,93	0,07	1,093			$\pm$ 0,003
7	44	0,1469	0,5427	0,272	0,106	0,01	0,74	0,26	1,117	0,1281	0,0188	0,13
		0,1093	0,5118	0,361	0,141	0,012	0,71	0,29	1,062			$\pm$ 0,02
8	45	0,1267	0,7373	0,532	0,151	0,001	0,96	0,04	1,093	0,1176	0,0091	0,12
		0,1085	0,7126	0,516	0,179	0,001	0,95	0,05	1,119			$\pm$ 0,01
9	46	0,1689	1,1466	0,7	0,111	0,002	0,87	0,13	1,203	0,1644	0,0045	0,164
		0,1599	1,2472	0,719	0,114	0,002	0,86	0,14	1,039			$\pm$ 0,005

5.9 Cálculo das constantes de decaimento radiativo de fluorescência (k_f) e de decaimento não radiativo (k_{nr})

As constantes de decaimento radiativo de fluorescência k_f e de decaimento não radiativo foram calculadas a partir dos valores de rendimento quântico (Φ_F) e tempo de vida do estado excitado (τ) utilizando as equações⁵⁰ 5 e 6, respectivamente:

$$k_f = \frac{\Phi_F}{\tau} \quad \text{Equação 5}$$

⁵⁰ Vasconcelos, N. S. S., Rodrigues, B. A. C., Bastos, L. E., Stefani, A. H., *Chemistry Select*, **2016**, 6, 1287 – 1291;

$$k_{nr} = \frac{1 - \Phi_F}{\tau}$$

Equação 6

6. Procedimentos Experimentais

4-(fenilselanil)-1,3-resorcinol

Metodologia 1:

Em um tubo de pressão com capacidade de 35 mL, contendo barra magnética, foram adicionados 0,11g (1 mmol) de resorcinol, 0,16g (0,5 mmol) de disseleneto de difenila, 0,013g, (0,05mmol) de iodo e 0,26 mL, (3 mmol) de DMSO. Em seguida, o sistema foi irradiado por 5 min a 80 °C em uma potência de 100 W. Posteriormente, o meio reacional foi tratado com uma mistura de acetato de etila/água (1:1) (3x30mL) e extraída com acetato de etila (3x 25mL). As fases orgânicas foram reunidas com MgSO₄ e o solvente evaporado. O produto bruto foi isolado por coluna cromatográfica em sílica flash utilizando hexano/acetato de etila como eluente (4:1). Rendimento: 0,02 g (7 %), sólido branco.

Metodologia 2:

Em um balão de fundo redondo com capacidade de 15 mL de duas bocas, contendo barra magnética, foram adicionados 0,12g (1,2 mmol) de resorcinol, 0,39g (2 mmol) de disseleneto de difenila, 1,2 mL, (2,4mmol) de KICl₂ (2 mol/L) e 30,0 mL de metanol a 0°C. Em seguida, o sistema mantido sob agitação até atingir temperatura ambiente de 25°C. O sistema permaneceu sob agitação por 2 horas. Posteriormente, o meio reacional foi tratado com uma mistura de acetato de etila/água (1:1) (3x30mL) e extraída com acetato de etila (3x 25mL). As fases orgânicas foram reunidas com MgSO₄, e o solvente filtrado foi roto-evaporado. O produto bruto foi isolado por coluna cromatográfica em sílica flash utilizando hexano/acetato de etila como eluente (3:1). Rendimento: 0,03 g (7 %), sólido branco.

RMN de ¹H (200 MHz, DMSO) δ 9.75 (s, 1H), 9.60 (s, 1H), 7.21 (s, 5H), 7.13 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 6.44 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 6.24 (dd, *J* = 8.4, 2.1 Hz, 1H). RMN de ¹³C (50 MHz, DMSO) δ 160.04, 158.93, 137.87, 133.18, 130.02, 129.36, 126.19, 108.44, 104.17, 103.19, 39.52. RMN de ⁷⁷Se (38 MHz, DMSO) 316,81. CGEM *m/z* = 266 ([M+H]⁺).

7-hidróxi-4-metil-cumarina

Em um balão de fundo redondo de 125 mL, contendo barra magnética, foram adicionados 6,60g (65,9 mmol) de resorcinol, 8,03mL (60,6 mmol) de acetoacetato de etila, 5,68g (18mmol) de Amberlyst 15 e 50mL de tolueno seco, sob atmosfera de N₂. O meio reacional foi deixado sob refluxo por 48h. Posteriormente, após filtração e evaporação do solvente do meio reacional, o produto foi recristalizado em MeOH (30 mL). Rendimento: 10,87 g (94 %) sólido branco. RMN de ¹H (200 MHz, DMSO) δ 10.55 (s, 1H), 7.60 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 6.81 (dd, *J* = 8.7, 2.4 Hz, 2H), 6.71 (d, *J* = 2.3 Hz, 2H), 6.14 (q, *J* = 1.1 Hz, 1H), 3.37 (s, 5H), 2.37 (s, 6H). RMN de ¹³C (50 MHz, DMSO) δ 161.2, 160.3, 154.9, 153.5, 126.6, 112.9, 112.1, 110.3, 102.2, 39.5, 18.1. IV (cm⁻¹): 3484, 3152, 3091, 2948, 2897, 1670, 1597, 1390, 1274, 1074, 839, 750, 530.

7-hdróxi-4-metil-6-(fenilselanil)-cumarina

Em um tubo de pressão com capacidade de 35 mL, contendo barra magnética, foram adicionados 0,18g (1 mmol) de 7-hidróxi-4-metil-cumarina, 0,16g (0,5 mmol) de disseleneto de difenila, 0,013g (0,05 mmol) de iodo e 0,26mL (3 mmol) de DMSO, em seguida, o sistema foi irradiado por 5 min a 80 °C em uma potência de 100 W. Posteriormente, o meio reacional foi tratado com uma mistura de acetato de etila/água (1:1) (3x30mL) e extraída com acetato de etila (3x 25mL). As fases orgânicas foram reunidas com MgSO₄ e o solvente evaporado sob pressão reduzida. O produto bruto foi isolado por coluna cromatográfica em sílica flash utilizando hexano/acetato de etila como eluente (4:1). Rendimento: 0,02 g (9 %) sólido amarelo. CGEM *m/z* = 322 ([M+H]⁺).

4-metil-7-(prop-2-in-1-ilóxi)-cumarina

Em um balão de 25 mL (duas bocas), contendo barra de agitação magnética, foram adicionados 0,18g (1 mmol) de 7-hidróxi-4-metil-cumarina, 0,39g (1,2 mmol) de carbonato de cézio (Cs_2CO_3) e 3 mL de DMF, sob atmosfera de N_2 , deixando o sistema sob agitação por 30 minutos. Adicionou-se brometo de propargila (1,3 eq., 1,3 mmol) a partir de uma solução estoque 80% em tolueno (1,39 mL). A reação foi acompanhada por CCD (eluente: 7:3 Hexano/ AcOEt) e foi deixada sob agitação por 12 horas à temperatura ambiente (22°C). O meio reacional foi extraído com solução saturada de NaCl , a fase orgânica foi extraída com AcOEt (3x15 mL), seca com MgSO_4 , filtrada e concentrada sob vácuo. A mistura foi purificada em coluna cromatográfica (eluente: 4:1 Hexano/ AcOEt) e o produto obtido foi ainda recrystalizado em $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$, obtido como cristais branco-esverdeados. Rendimento: 92%. RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) δ 7.59 – 7.45 (dd, 1H), 7.01 – 6.86 (m, 2H), 6.17 (d, $J = 1.1$ Hz, 1H), 4.77 (d, $J = 2.4$ Hz, 2H), 2.58 (t, $J = 2.4$ Hz, 1H), 2.41 (d, $J = 1.2$ Hz, 3H). RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) δ 160.99, 160.25, 154.88, 152.44, 125.60, 114.12, 112.55, 112.24, 102.03, 76.47, 56.09, 18.58. HRMS-ESI-TOF $[\text{M}+\text{H}]^+ = 215,0702$.

4-metil-7-(fenilselanil)pirano[3,2-g]cromen-2(8H)-ona

Em um balão de 25 mL (duas bocas), adicionou-se 241,6 mg de **18** (1 eq., 0,9 mmol) e 235,4 mg de NaHCO_3 (3 eq., 2,7 mmol), sob atmosfera inerte de N_2 . Dissolveu-se esses reagentes em diclorometano anidro sob agitação e em banho de gelo. Adicionou-se rapidamente 264,5 mg de brometo de fenilselenenila, (PhSeBr 1,2 eq., 1,08 mmol) ao meio e deixou-se sob agitação magnética por 12 horas à temperatura ambiente (22°C). Após 17h, adicionaram-se outros 1,2 eq. de brometo de fenilselenenila e manteve-se a agitação até completar 24h de reação. A reação foi acompanhada por CCD (eluente: 7:3 Hexano/ AcOEt). Ao meio reacional foi adicionado água (10mL) e a fase orgânica foi extraída com diclorometano (3x15 mL), seca com MgSO_4 , filtrada e concentrada sob vácuo. A mistura foi purificada em coluna cromatográfica (eluente: 4:2 Hexano/ AcOEt)

e o produto foi obtido como sólido amarelo claro. Rendimento: 32%. RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) δ 7.68 – 7.45 (m, 2H), 7.40 – 7.29 (m, 1H), 6.85 (dd, $J = 8.7, 2.5$ Hz, 1H), 6.79 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 6.43 (t, $J = 1.2$ Hz, 1H), 6.16 (d, $J = 1.1$ Hz, 1H), 4.91 (d, $J = 1.2$ Hz, 1H), 2.40 (d, $J = 1.1$ Hz, 2H). RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) δ 161.09, 160.78, 154.99, 152.40, 134.73, 131.94, 129.56, 128.67, 127.15, 125.58, 114.09, 112.56, 112.23, 107.59, 102.08, 68.77, 18.63.

(Z)-7-((3-cloro-2-((4-metóxi-fenil)selanil)alil)oxi)-4-metil-cumarina

Em tubo de pressão com capacidade de 10 mL, contendo barra magnética, foram adicionados 214 mg (1 mmol) de 4-metil-7-(prop-2-iniloxi)-2*H*-cromen-2-one (**18**), 292 mg (1 mmol) de tricloreto de *p*-metoxi-fenilselênio e 1,0 mL de CHCl_3 , o sistema foi irradiado por 20 min a 75 °C em uma potência de 100 W. Em seguida foi adicionado solução saturada de NaHSO_3 e de NaCl e extraída com DCM (3x 10 mL). As fases orgânicas foram reunidas e secas com MgSO_4 e o solvente evaporado. O produto bruto foi purificado por coluna de sílica gel utilizando uma mistura de DCM:MeOH 9.5:0.5. Rendimento: 148 mg (34 %) sólido amarelo claro. RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) δ 7.65 – 7.57 (m, 1H), 7.52 (dd, $J = 8.8, 4.8$ Hz, 1H), 6.92 – 6.59 (m, 1H), 6.39 (s, 1H), 6.17 (s, 1H), 4.17 (dd, $J = 26.2, 10.3$ Hz, 1H), 3.81 (s, 1H), 2.41 (s, 1H). RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) δ 161.51, 160.86, 160.30, 159.93, 154.94, 152.24, 139.88, 125.76, 118.96, 115.68, 114.93, 114.53, 112.62, 112.21, 101.91, 71.76, 69.77, 55.30, 29.64, 18.64.

(Z)-7-((3-cloro-2-((4-metóxi-fenil)tellanil)alil)oxi)-4-metil-cumarina

Em tubo de pressão com capacidade de 10 mL, contendo barra magnética, foram adicionados 214 mg (1 mmol) de 4-metil-7-(prop-2-iniloxi)-2*H*-cromen-2-one (**18**), 341 mg (1 mmol) de tricloreto de *p*-metoxi-feniltelúrio e 1,0 mL de CHCl₃, o sistema foi irradiado por 20 min a 75 °C em uma potência de 100 W. Em seguida foi adicionado solução saturada de NaHSO₃ e de NaCl e extraída com DCM (3x 10 mL). As fases orgânicas foram reunidas e secas com MgSO₄ e o solvente evaporado. O produto bruto foi purificado por coluna de sílica gel utilizando uma mistura de DCM:MeOH 9.5:0.5. Rendimento: 325 mg (82 %) sólido branco. RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃) δ 7.80 – 7.67 (m, 1H), 7.57 – 7.44 (m, 1H), 6.99 – 6.73 (m, 1H), 6.16 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H), 6.05 (t, *J* = 1.8 Hz, 1H), 4.94 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 3.81 (s, 1H), 2.41 (d, *J* = 1.1 Hz, 1H). RMN de ¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ 161.10, 160.69, 160.55, 155.03, 152.36, 142.42, 125.56, 119.47, 117.81, 115.70, 114.12, 112.67, 112.53, 112.39, 112.27, 102.14, 100.58, 77.18, 68.64, 56.12, 55.14, 18.62.

7-(2-hidróxi-2-tóxi)-4-metil-cumarina

Em um balão de 100 mL, contendo barra de agitação magnética, foram adicionados 7,03g (39,9 mmol) de 7-hidróxi-4-metil-cumarina, 6,40g (1,2 eq. 47,8 mmol) de cloroetanol, 39,21g (1,3 eq. 51,8 mmol) de carbonato de cério (Cs₂CO₃) e 35 mL de DMF, sob atmosfera de N₂, deixando o sistema sob agitação por 12 horas. O meio reacional foi vertido em um béquer com água gelada (50 mL). O precipitado formado foi filtrado e lavado com água gelada (3x15 mL). O produto obtido como sólido branco obteve rendimento de 96%. ¹H NMR (200 MHz, DMSO) δ 7.69 (dd, 1H), 7.04 – 6.94 (m, 2H), 6.22 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H), 4.98 (s, 1H), 4.11 (t, 2H), 3.75 (t, *J* = 4.8 Hz, 2H), 2.41 (d, *J* = 1.2 Hz, 3H). ¹³C NMR (50 MHz, DMSO) δ 161.84, 160.22, 154.73, 153.40, 126.38, 113.03, 112.42, 111.10, 101.16, 79.23, 70.32, 59.40, 39.52, 18.14. IV (cm⁻¹): 3456, 3330, 3185, 3070, 2953, 1677, 1608, 1513, 1444, 1388, 1286, 1388, 1286, 1267, 1070, 852, 707, 505.

2-((4-metil-2-oxo-2H-cromen-7-il)oxi)etil 4-metilbenzenosulfonato

Em um balão de 125 mL (duas bocas), contendo barra de agitação magnética, foram adicionados 7,13g de **39**, 50 mL de DCM seco, 9 mL de trietilamina, 7,95 gramas de cloreto de toсила, sob atmosfera de N₂, deixando o sistema sob agitação por 12 horas. Ao meio reacional foi adicionado uma mistura de água e acetato de etila (1:1), o meio foi extraído com acetato de etila (3x15 mL) e a fase orgânica após seca, foi rotoevaporada. Após coluna cromatográfica (1:1 hexano/ acetato de etila), obteve-se o produto como um sólido branco em 44% de rendimento. RMN de ¹H (200 MHz, DMSO) δ 7.81 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.68 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 7.48 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 6.25 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H), 4.34 (dd, *J* = 15.4, 5.4 Hz, 2H), 2.41 (d, *J* = 1.3 Hz, 3H). RMN de ¹³C (50 MHz, DMSO) δ 160.65, 160.07, 154.54, 153.27, 145.05, 132.17, 130.14, 127.71, 126.41, 113.41, 112.25, 111.38, 101.26, 68.82, 65.92, 39.52, 21.07, 18.09. IV (cm⁻¹): 3122, 3028, 3065, 2954, 2929, 1704, 1677, 1607, 1592, 1512, 1450, 1393, 1349, 1269, 921, 838, 758, 660, 551.

Y = S, Se e Te
Compostos **41**, **42** e **43**

O mesmo procedimento foi realizado para a obtenção dos compostos **41**, **42** e **43**;

Em um balão de 25 mL, foi adicionado o calcogênio elementar (1,1 mmol), 3 mL de THF seco e 0,7 mL de uma solução de PhMgBr (previamente preparada e titulada em 1,7 mol/L) a 0°C. A suspensão ficou sob agitação por 15 minutos até atingir temperatura ambiente (22°C). Foram adicionados 1 mmol (374 mg) de **40** solubilizado em 3 mL de THF seco, ao meio reacional e após 3 horas de reação, ao meio foi adicionado uma solução saturada de NH₄Cl (10 mL) e a extração se procedeu com acetato de etila (3x15 mL). Após coluna cromatográfica (2:1 hexano/acetato de etila) foi obtido **41**, produto de cor amarela e de rendimento igual a 69%; **42**, produto de cor amarela e de rendimento igual a 57%; **43**, produto de cor verde claro e de rendimento igual a 52%

4-metil-7-(2-(feniltio)etoksi)-2H-chromen-2-one

RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) δ 7.55 – 7.19 (m, 7H), 6.81 (dd, 1H), 6.73 (d, 1H), 6.13 (d, $J = 1.2$ Hz, 1H), 4.19 (t, $J = 8.9, 4.8$ Hz, 2H), 3.29 (t, 2H), 2.38 (d, $J = 1.2$ Hz, 4H). RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) δ 161.00, 160.94, 155.11, 152.32, 125.67, 114.07, 112.44, 112.29, 101.63, 68.09, 28.38, 18.59. IV (cm^{-1}): 2955, 2923, 2852, 1716, 1602, 1386, 1261, 1208, 1155, 1134, 1072, 1013, 981, 842, 516.

4-metil-7-(2-(fenilselanil)etoksi)-2H-chromen-2-one

RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) δ 7.62 – 7.54 (m, 2H), 7.47 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 7.36 – 7.27 (m, 3H), 6.78 (dd, 1H), 6.73 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 6.13 (s, 1H), 4.24 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H), 3.24 (t, 2H), 2.39 (d, $J = 1.2$ Hz, 3H). RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) δ 161.27, 161.13, 155.09, 152.44, 133.28, 129.24, 127.56, 125.55, 112.38, 112.01, 101.49, 67.92, 25.65, 18.61. IV (cm^{-1}): 3074, 3062, 2954, 2937, 2919, 2873, 2857, 1716, 1601, 1394, 1264, 1196, 1152, 1136, 1072, 1003, 982, 873, 841, 730, 685, 464. $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 383,0191$.

4-metil-7-(2-(feniltellanil)etoksi)-2H-chromen-2-one

RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) δ 7.88 – 7.12 (m, 1H), 6.94 – 6.64 (m, 1H), 6.14 (d, 1H), 4.34 (t, $J = 9.9, 5.1$ Hz, 1H), 3.22 (t, 1H), 2.40 (dd, $J = 3.7, 1.0$ Hz, 1H). RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) δ 161.17, 161.10, 155.09, 152.40, 138.88, 129.34, 128.15, 125.51, 112.25, 111.95, 101.51, 69.89, 18.58, 5.94. IV (cm^{-1}): 3076, 3062, 2977, 2956, 2938, 2915, 2874, 2857, 1715, 1603, 1391, 1261, 1193, 1152, 1135, 1072, 997, 975, 872, 840, 725, 685, 449.

Y = S, Se e Te
Compostos **44**, **45** e **46**

O mesmo procedimento foi realizado para a obtenção dos compostos **44**, **45** e **46**;

Em um balão de 25 mL, foi adicionado o calcogênio elementar (1,1mmol), 3 mL de THF seco e 2,2 mL de uma solução de *n*-BuLi (previamente titulada em 1,4 mol/L) a 0°C. A suspensão ficou sob agitação por 15 minutos até atingir temperatura ambiente (22°C). Foram adicionados 1 mmol (374 mg) de **40** solubilizado em 3 mL de THF seco, ao meio reacional e após 3 horas de reação, ao meio foi adicionado uma solução saturada de NH₄Cl (10 mL) e a extração se procedeu com acetato de etila (3x15 mL). Após coluna cromatográfica (2:1 hexano/acetato de etila) foi obtido: **44**, produto de cor amarela e de rendimento igual a 57%; **45**, produto de cor branca e de rendimento igual a 65% e **46**, produto de cor verde clara e de rendimento igual a 27%.

44

7-(2-(butiltio)etoxy)-4-metil-2H-chromen-2-one

RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃) δ 7.50 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 6.86 (dd, *J* = 8.7, 2.5 Hz, 1H), 6.80 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 6.14 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H), 4.19 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 2.93 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 2.64 (t, 2H), 2.40 (dd, *J* = 1.2 Hz, 3H), 1.77 – 1.24 (m, 5H), 0.93 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H). RMN de ¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ 161.44, 161.11, 155.15, 152.40, 125.54, 113.71, 112.40, 112.01, 101.47, 68.22, 32.42, 31.74, 30.69, 21.85, 18.58, 13.59. IV (cm⁻¹): 2954, 2925, 2869, 2857, 1717, 1603, 1391, 1273, 1195, 1153, 1070, 1002, 983, 843, 827, 813, 492.

45

7-(2-(butilselanil)etox)-4-metil-2H-chromen-2-one

RMN de ^1H (200 MHz, DMSO) δ 7.70 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 6.98 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 6.24 (s, 1H), 4.32 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H), 2.92 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H), 2.69 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 2.53 (s, 2H), 1.75 – 1.19 (m, 5H), 0.89 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H). RMN de ^{13}C (50 MHz, DMSO) δ 161.17, 160.09, 154.70, 153.27, 126.40, 113.18, 112.32, 111.19, 101.21, 68.74, 39.52, 32.23, 23.52, 22.39, 21.16, 18.11, 13.44. IV (cm^{-1}): 2952, 2930, 2870, 2857, 1718, 1602, 1391, 1271, 1194, 1155, 1070, 1001, 984, 843, 828, 813, 491. $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 363,0470$.

7-(2-(butiltellanyl)etoxy)-4-metil-2H-chromen-2-one

RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) δ 7.50 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 6.92 – 6.76 (m, $J = 6.7$, 2.2 Hz, 2H), 6.15 (s, 1H), 4.34 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 2.95 (t, $J = 18.0$, 10.5 Hz, 2H), 2.76 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 2.40 (s, 3H), 1.89 – 1.66 (m, 2H), 1.51 – 1.27 (m, $J = 14.3$, 7.2 Hz, 2H), 0.94 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H). RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) δ 161.25, 161.13, 155.14, 152.42, 125.54, 113.63, 112.43, 111.94, 101.52, 70.68, 34.25, 24.95, 18.58, 13.33, 3.56, -0.14. RMN (63 MHz, CDCl_3) δ 423.53, 215.47. IV (cm^{-1}): 3070, 3061, 2959, 2919, 2874, 2855, 1714, 1607, 1390, 1279, 1261, 1191, 1152, 1135, 1070, 973, 875, 831, 746, 710, 481.

7. Anexos

4-(fenilselanil)-1,3-resorcinol

Figura 45. Espectro de massas de baixa resolução do composto **12**; CGEM $m/z = 266$ ($[M+H]^+$).

Figura 46. Espectro de RMN de ^1H de **12** (DMSO – d_6 , 200MHz).

^{13}C NMR (50 MHz, DMSO- d_6) 160.04, 158.93, 137.87, 133.18, 130.02, 129.36, 126.19, 108.44, 104.17, 103.19, 39.52.

Figura 47. Espectro de RMN de ^{13}C de **12** (DMSO – d_6 , 50MHz).

NMR (38 MHz, DMSO- d_6) 461.44, 316.81.

Figura 48. Espectro de RMN de ^{77}Se de **12** (DMSO – d_6 , 38MHz).

7-hidróxi-4-metil-cumarina

Figura 49. Espectro de absorção (linha cheia) a temperatura ambiente ($\lambda_{\text{abs}} = 319 \text{ nm}$), emissão normalizada (linha pontilhada, $\lambda_{\text{em}} = 378 \text{ nm}$) e espectro de excitação (linha tracejada, $\lambda_{\text{exc}} = 319 \text{ nm}$) do composto **16** em acetonitrila (10^{-5} mol/L).

Figura 50. Espectro de RMN de ^1H de **16** (DMSO – d_6 , 200MHz).

Figura 51. Espectro de RMN de ^{13}C de **16** (DMSO – d_6 , 50MHz).

Figura 52. Espectro de IV de **16**.

7-hdróxi-4-metil-6-(fenilselanil)-cumarina

Figura 53. Espectro de massas de baixa resolução do composto **17**; CGEM $m/z = 332$ ($[M+H]^+$)

4-metil-7-(prop-2-in-1-ílóxi)-cumarina

Figura 54. Espectro de massas de alta resolução do composto **18**; ($[M+H]^+ = 216,07$).

Figura 55. Espectro de RMN de ¹H do composto **18** (CDCl₃, 200MHz).

Figura 56. Espectro de RMN de ¹³C do composto **18** (CDCl₃, 50MHz).

4-methyl-7-(phenylselanyl)pyrano[3,2-g]chromen-2(8H)-one

Figura 57. Espectros de absorção de **19** em Dimetilsulfóxido em diferentes concentrações.

Tabela 5. Dados fotofísicos referentes ao composto (**19**) em Dimetilsulfóxido

λ_{abs}	Concentração do Composto	Absorbância	ϵ (L.mol ⁻¹ .cm ⁻¹)	ϵ médio
320 nm	1,00x10 ⁻⁵	0,186	1700	6204
	0,667x10 ⁻⁵	0,129	3684	
	0,444x10 ⁻⁵	0,0817	8724	
	0,296x10 ⁻⁵	0,0532	20096	
291 nm	1,00x10 ⁻⁵	0,129	2694	10018
	0,667x10 ⁻⁵	0,0872	5970	
	0,444x10 ⁻⁵	0,0556	14065	
	0,296x10 ⁻⁵	0,0353	33231

Figura 58. Espectros de absorção de **19** em Acetonitrila em diferentes concentrações.

Tabela 6. Dados fotofísicos referentes ao composto (**19**) em Acetonitrila

λ_{abs}	Concentração do Composto	Absorbância	ϵ (L.mol ⁻¹ .cm ⁻¹)	ϵ médio
316 nm	$1,00 \times 10^{-5}$	0,023	13759	44544
	$0,667 \times 10^{-5}$	0,0175	27111	
	$0,444 \times 10^{-5}$	0,0115	61977	
	$0,296 \times 10^{-5}$	0,0078	137065	
288 nm	$1,00 \times 10^{-5}$	0,0167	20792	68769
	$0,667 \times 10^{-5}$	0,0127	40990	
	$0,444 \times 10^{-5}$	0,0081	96547	
	$0,296 \times 10^{-5}$	0,0052	225586

Figura 59. Espectros de absorção de **19** em Etanol em diferentes concentrações.

Tabela 7. Dados fotofísicos referentes ao composto (**19**) em Etanol

λ_{abs}	Concentração do Composto	Absorbância	ϵ (L.mol ⁻¹ .cm ⁻¹)	ϵ médio
320 nm	1,00x10 ⁻⁵	0,135	2348	8440
	0,667x10 ⁻⁵	0,0964	4922	
	0,444x10 ⁻⁵	0,0596	11959	
	0,296x10 ⁻⁵	0,0399	26795	
289 nm	1,00x10 ⁻⁵	0,0906	3832	13540
	0,667x10 ⁻⁵	0,0654	7960	
	0,444x10 ⁻⁵	0,0409	19121	
	0,296x10 ⁻⁵	0,0275	42656

Figura 60. Espectros de absorção de **19** em Clorofórmio em diferentes concentrações.

Tabela 8. Dados fotofísicos referentes ao composto (**19**) em Clorofórmio

Clorofórmio	Concentração do Composto	Absorbância	ϵ (L.mol ⁻¹ .cm ⁻¹)	ϵ médio
321 nm	1,00x10 ⁻⁵	0,133	2376	7182
	0,667x10 ⁻⁵	0,0989	4797	
	0,444x10 ⁻⁵	0,0745	9567	
	0,296x10 ⁻⁵	0,0522	20481	
290 nm	1,00x10 ⁻⁵	0,0906	3832	10855
	0,667x10 ⁻⁵	0,0695	7490	
	0,444x10 ⁻⁵	0,0550	14219	
	0,296x10 ⁻⁵	0,0404	29036

Figura 61. Espectro de RMN de ^1H de **19** (CDCl_3 , 200MHz).

Figura 62. Espectro de RMN de ^{13}C de **19** (CDCl_3 , 50MHz).

(Z)-7-((3-cloro-2-((4-metóxifenil)selanil)allilóxi)-4-metil-cumarina

Figura 63. Espectro de RMN de ¹H de **37** (CDCl₃, 200MHz).

Figura 64. Espectro de RMN de ^{13}C de **37** (CDCl_3 , 50MHz).

Figura 65. Espectro de RMN de ^{77}Se de **37** (CDCl_3 , 38MHz).

(Z)-7-((3-cloro-2-((4-metóxifenil)telanil)alilóxi)-4-metil-cumarina

Figura 66. Espectro de RMN de ¹H de **38** (CDCl₃, 200MHz).

Figura 67. Espectro de RMN de ¹³C de **38** (CDCl₃, 50MHz).

Figura 68. Espectro de RMN de ¹²⁵Te de **38** (CDCl₃, 63MHz).

Figura 69. Espectro de absorção (linha cheia) a temperatura ambiente ($\lambda_{\text{abs}} = 319 \text{ nm}$), emissão normalizada (linha pontilhada, $\lambda_{\text{em}} = 378 \text{ nm}$) e espectro de excitação (linha tracejada, $\lambda_{\text{exc}} = 319 \text{ nm}$) do composto **39** em acetonitrila (10^{-5} mol/L).

Figura 70. Espectro de massas de alta resolução do composto **39**; $([M+H]^+ = 221,08)$.

Figura 71. Espectro de RMN de ¹H de **39** (DMSO – d₆, 200MHz).

Figura 72. Espectro de RMN de ¹³C de **39** (DMSO – d₆, 50MHz).

Figura 73. Espectro de IV **39**.

2-((4-metil-2-oxo-2H-cromen-7-il)oxi)etil 4-metilbenzenosulfonato

Figura 74. Espectro de absorção (linha cheia) a temperatura ambiente ($\lambda_{\text{abs}} = 319$ nm), emissão normalizada (linha pontilhada, $\lambda_{\text{em}} = 376$ nm) e espectro de excitação (linha tracejada, $\lambda_{\text{exc}} = 319$ nm) do composto **40** em acetonitrila (10^{-5} mol/L).

Figura 75. Espectro de massas de alta resolução do composto **40**; ($[M+H]^+ = 375,08$).

Figura 76. Espectro de RMN de ¹H de **40** (DMSO – d₆, 200MHz).

Figura 77. Espectro de RMN de ^{13}C de **40** (DMSO – d_6 , 50MHz).

Figura 78. Espectro de IV **40**.

4-metil-7-(2-(feniltio)etoxi)-2*H*-cromen-2-ona

Figura 79. Espectro de absorção (linha cheia) a temperatura ambiente ($\lambda_{\text{abs}} = 319 \text{ nm}$), emissão normalizada (linha pontilhada, $\lambda_{\text{em}} = 377 \text{ nm}$) e espectro de excitação (linha tracejada, $\lambda_{\text{exc}} = 319 \text{ nm}$) do composto **41** em acetonitrila (10^{-5} mol/L).

Figura 80. Espectro de RMN de ¹H de **41** (CDCl₃, 200MHz).

Figura 81. Espectro de RMN de ¹³C de **41** (CDCl₃, 50MHz).

Figura 82. Espectro de IV **41**.

Figura 83. Espectro de absorção (linha cheia) a temperatura ambiente ($\lambda_{\text{abs}} = 319 \text{ nm}$), emissão normalizada (linha pontilhada, $\lambda_{\text{em}} = 378 \text{ nm}$) e espectro de excitação (linha tracejada, $\lambda_{\text{exc}} = 319 \text{ nm}$) do composto **42** em acetonitrila (10^{-5} mol/L).

Figura 84. Espectro de massas de alta resolução do composto **42**; ($[M+Na]^+ = 383,02$).

1H NMR (200 MHz, $CDCl_3$) δ 7.62 – 7.54 (m, 2H), 7.47 (d, 8.7 Hz, 1H), 7.36 – 7.27 (m, 3H), 6.78 (dd, 1H), 6.73 (dd, 1H), 6.13 (s, 1H), 4.24 (t, 7.1 Hz, 2H), 3.24 (t, 2H), 2.39 (d, 1.2 Hz, 2H).

Figura 85. Espectro de RMN de 1H de **42** ($CDCl_3$, 200MHz).

Figura 86. Espectro de RMN de ^{13}C de **42** (CDCl_3 , 50MHz).

Figura 87. Espectro de RMN de ^{77}Se de **42** (CDCl_3 , 38MHz).

Figura 88. Espectro de IV 42.

Figura 89. Espectro de absorção (linha cheia) a temperatura ambiente ($\lambda_{\text{abs}} = 319 \text{ nm}$), emissão normalizada (linha pontilhada, $\lambda_{\text{em}} = 380 \text{ nm}$) e espectro de excitação (linha tracejada, $\lambda_{\text{exc}} = 319 \text{ nm}$) do composto **43** em acetonitrila (10^{-5} mol/L).

Figura 90. Espectro de RMN de ^1H de **43** em (CDCl_3 , 200MHz).

Figura 91. Espectro de RMN de ^{13}C de **43** (CDCl_3 , 50MHz).

Figura 92. Espectro de RMN de ^{125}Te de **43** (CDCl₃, 63MHz).

Figura 93. Espectro de IV **43**.

7-(2-(butiltio)etoxi)-4-metil-2*H*-cromen-2-ona

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 7.50 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 6.86 (dd, *J* = 8.7, 2.5 Hz, 1H), 6.80 (dd, *J* = 2.4 Hz, 1H), 6.14 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H), 4.19 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 2.93 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 2.64 (t, 2H), 2.40 (dd, 1.2 Hz, 3H), 1.77 – 1.24 (m, 5H), 0.97 (t, 7.2 Hz, 3H).

Figura 94. Espectro de RMN de ¹H de **44** (CDCl₃, 200MHz).

Figura 95. Espectro de RMN de ¹³C de **44** (CDCl₃, 50MHz).

Figura 96. Espectro de IV **44**.

7-(2-(butilselanyl)etóxi)-4-metil-cumarina

Figura 97. Espectro de massas de alta resolução de **45**; $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 363,03$.

^1H NMR (200 MHz, DMSO-d_6) 7.68 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 6.96 (dd, $J = 2.4$ Hz, 2H), 6.21 (d, $J = 1.1$ Hz, 1H), 4.30 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H), 2.89 (t, 2H), 2.67 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 2.39 (d, $J = 1.1$ Hz, 3H), 1.45 – 1.20 (m, 2H), 0.88 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H).

Figura 98. Espectro de RMN de ^1H de **45** ($\text{DMSO} - \text{d}_6$, 200MHz).

Figura 99. Espectro de RMN de ¹³C de **45** (DMSO – d₆, 50MHz).

Figura 100. Espectro de RMN de ⁷⁷Se de **45** (DMSO – d₆, 38MHz).

Figura 101. Espectro de IV **45**.

7-(2-(butiltellanyl)etoxi)-4-metil-2H-cromen-2-ona

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 7.50 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 6.92 – 6.76 (m, 6.7, 2.2 Hz, 2H), 6.15 (s, 1H), 4.34 (t, 7.5 Hz, 2H), 2.95 (t, 18.0, 10.5 Hz, 2H), 2.76 (t, 7.5 Hz, 2H), 2.40 (s, 3H), 1.89 – 1.66 (m, 2H), 1.51 – 1.27 (m, 14.3, 7.2 Hz, 2H), 0.94 (t, 7.3 Hz, 2H).

Figura 102. Espectro de RMN de ¹H de **46** (CDCl₃, 200MHz).

¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 161.25, 161.13, 155.14, 152.42, 125.54, 113.63, 112.43, 111.94, 101.52, 70.68, 34.25, 24.95, 18.58, 13.33, 3.56, -0.14.

Figura 103. Espectro de RMN de ¹³C de **46** (CDCl₃, 50MHz).

Figura 104. Espectro de RMN de ^{125}Te de **46** (CDCl₃, 63MHz).

Figura 105. Espectro de IV **46**.

8. Referências Bibliográficas

1. Wagner, D. B., *Molecules*, **2009**, *14*, 210 – 237;
2. Pratap, R., Ram J. V., *Chemical Reviews*, **2014**, *114*, 10476 – 10526; Sethna, S., *Chemical Reviews*, **1945**, *36*, 1 – 62;
3. Asao, T., Büchi, G., Abdel-Kader, M. M., Chang, S. B., Wick, L. E., Wogan, G. N., *Journal of The American Chemical Society*, **1965**, *87*, 882 – 886;
4. Lederer, E., *Journal of The American Chemical Society*, **1949**, 2115 – 2125; Moore, B. P., *Nature*, **1962**, *195*, 1101 – 1102;
5. Soine, T. O., *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **1964**, *53*, 231 – 264;
6. Venugopala, K. N., Rashmi, V., Odhav, B., *BioMed Research International*, **2013**, 1 – 14;
7. Perkin, W. H., *Journal of The Chemical Society*, **1868**, *21*, 53 – 63; Johnson, J. R., *Organic Reactions*, John Wiley & Sons: New York, NY, EUA, **1942**, *1*, 210-285;
8. Chandrasekhar, S., Karri, P., *Tetrahedron Letters*, **2006**, 2249 – 2251;
9. Knoevenagel, E., *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, **1898**, *31*, 2596 – 2619; Jones, G., *Organic Reactions*, John Wiley & Sons: New York, NY, EUA, **1967**, *15*, 204 – 599;
10. Shriner, R. L., *Organic Reactions*, John Wiley & Sons: New York, NY, EUA, **1942**, *1*, 1 – 37;
11. Belavagi, S. N. *et al*, *RSC Advances*, **2014**, *4*, 39667; Yavari, I.; Hekmat-Shoar, R.; Zonousi, A., *Tetrahedron Letters*, **1998**, *39*, 2391 – 2392;
12. Pechmann, H. V., Duisberg, C., *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, **1883**, *16*, 2119 – 2128;
13. Daru, J., Stirling, A., *Journal of Organic Chemistry*, **2011**, *21*, 8749 – 8755; Tyndall, S., Wong, F. K., VanAlstine-Parris, A. M., *Journal of Organic Chemistry*, **2015**, *80*, 18, 8951 – 8953;
14. Lakowicz, J., *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, **2006**, Springer;
15. Masrani, K. V., Rama, H. S. Bafna, S. L., *Journal of Applied Chemical Biotechnology*, **1974**, *24*, 331 – 341;

16. Goodwin, R. H., Kavanagh, F., *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **1952**, 36, 442 – 455;
17. López-Castillo, N. N., Rojas-Rodríguez, A. D., Porta, B. M., Cruz-Gómez, J. M., *Advances in Chemical Engineering and Science*, **2013**, 3, 195 – 201;
18. Wheelock, C. E., *Journal of the American Chemical Society*, **1959**, 81, 1348 – 1352;
19. Ranjith, C., *et al*, *Spectrochimica Acta Part A*, **2010**, 75, 1610 – 1616;
20. Sugamura, K.; Keaney, J. F., *Free Radical Biology & Medicine*, **2011**, 51, 978 – 992; b) Houstis, N.; Rosen, E. D.; Lander, E. S. *Nature*, **2006**, 440, 944 – 948 ;
21. Li, G.; Zhu, D.; Liu, Q.; Xue, L.; Jiang, H. *Organic Letters*, **2013**, 15, 8, 2002 – 2005;
22. Prasanna de Silva, A., Moody, T. M., Wright, G. D., *Analyst*, **2009**, 134, 2385 – 2393;
23. Fron, E., Coutiño-Gonzalez, E., Pandey, L., Sliwa, M., Auweraer, M. V., De Schryver, F. C., Thomas, J., Dong, Z., Leen, V., Smet, M., Dehaen, W., Vosch, T., *New Journal of Chemistry*, **2009**, 33, 1490 – 1496; b) Wang, B., Yu, F., Li, P., Sun, X., Han, K., *Dyes and Pigments*, **2003**, 96, 383; c) Wang, B., Li, P., Yu, F., Cheng, J., Qu, Z., Han, K., *Chemical Communications*, **2013**, 49, 5556 – 5558 ;
24. Kavarnos, G., *Fundamentals of Photoinduced Electron Transfer*, VCH Publisher, New York, NY, EUA, **1993**; b) Freemantle, M. *Chem. Eng. News Archive*, **1998**, 76, 35.
25. Lodeiro, J. F., Pinatto, M. F. P., Soares, A. A. P., Gonçalves, A. C., Sousa, B. A., Princival, C., Dos Santos, A. A., *Dyes and Pigments*, **2014**, 110, 28 – 48;
26. Azeredo B. J., Godoi, M., Martins, G. M., Silveira, C. C., Braga, A. L., *Journal of Organic Chemistry*, **2014**, 79, 4125 – 4130;
27. Paulmier, C., *Selenium Reagents and Intermediates in Organic Synthesis*, **1986**, Pergamon Press: Oxford; b) Back, T. G., *Organoselenium Chemistry*, **1999**, Oxford University Press;
28. Sabou, R., Hoeldrich, W. F., Ramprasad, D., Weinand, R., *Journal of Catalysis*, **2005**, 232, 34 – 37;

29. Guiotto, A., Rodighiero, P., Manzini, P., Pastorini, G., Bordin, F., *Journal of Heterocyclic Chemistry*, **1987**, 24, 485 – 488, b) Guiotto, A., *et al.*, *J. Med. Chem.* **1984**, 27, 959 – 967;
30. Yadav, N. *et al*, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, **2015**, 148, 311 – 317;
31. Babu, R., Mandhavarao, V., *Der Chemica Sinica*, **2015**, 6, 1, 1 – 6;
32. Rodriguez, L., *et al*, *Dalton Transactions*, **2014**, 43, 4426 – 4436; b) Stratakis, M., *et al*, *Chemical Communications*, **2011**, 47, 803 – 805;
33. Bach, P.; Nilsson, K.; Wallberg, A.; Bauer, U.; Hammerland, L. G.; Peterson, A.; Svensson, T.; Oesterlund, K.; Karis, D.; Boije, M.; Wensbo, D., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2006**, 16, 4792;
34. Godoi, B., Sperança, A., Back, D., Brandão, R., Nogueira, C., Zeni, G., *J. Org. Chem.*, **2009**, 74, 3469 – 3477;
35. Lang, H., Keller, H., Imhof, W., Martin, S., *Chem. Ber.*, **1990**, 123, 417 – 422;
36. B. Neises, W. Steglich, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1978**, 17, 522 – 524;
37. Kawate, T., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2013**, 23, 6052 – 6059;
38. Comasseto, J. V., Dos Santos, A. A., Princival, C., *J. Braz. Chem. Soc.*, **2015**, 26, 5, 832 – 836;
39. Princival, J. L, de Oliveira, M. S. C., Dos Santos, A. A., Comasseto, J. V., *Tetrahedron: Asymmetry*, **2009**, 20, 2699 – 2703;
40. Liu, X., Cole, J. M., Waddell, P., Lin, T., Radia, J., Zeidler, A.; *The Journal of Physical Chemistry A*, **2012**, 116, 727 – 737;
41. Pal, H., Nad, S., Kumbhakar, M., *J. Chem. Phys.*, **2003**, 119, 443 – 452;
42. Toledo Jr., J. C., Audi, R., Ogusucu, R., Monteiro, G., Netto, L. E. S., Augusto, O., *Free Radical Biology & Medicine*, **2011**, 50, 1032 – 1038;
43. Hussain, A., Trudell, P., Repta, A. J., *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **1970**, 59, 1168 – 1170;
44. Drummond, G. R., Selemidis, S., Griendling, K. K., Sobey, C. G., *Nat. Ver. Drug. Discov.*, **2011**, 10, 453 – 471; Hampton, M. B., Kettle, A. J., Winterbourn, C. C., *Blood*, **1998**, 92, 3007 – 3017;
45. Meotti, C. Flavia, Jameson, G. N. L., Turner, R., Harwood, D. T., Stockwell, S., Rees, M. D., Thomas, S. R., Kettle, J. A.; *The Journal of Biological Chemistry*, **2011**, 286, 15, 12901 – 12911;
46. Kettle, A. J., Winterbourn, C. C., *Redox Rep.*, **1997**, 3, 3 – 15;

47. Perrin, D. D., Amarego, W. L., *Purification of Laboratory Chemicals*, Pergamon Press: London, **1980**;
48. Brouwer, A. M., *Pure Appl. Chem.*, **2011**, 83, 2213 – 2228;
49. Rodrigues, B. A. C., Dissertação de Mestrado: *Efeitos do meio sobre as propriedades fotofísicas de betalainas e sua estabilidade na presença de Cu^{II}*, UFABC, **2012**, Santo André;
50. Vasconcelos, N. S. S., Rodrigues, B. A. C., Bastos, L. E., Stefani, A. H., *Chemistry Select*, **2016**, 6, 1287 – 1291.

SÚMULA CURRICULAR

DADOS PESSOAIS

Nome: Victor Fernandes Cavalcante

Local e data de nascimento: São José do Rio Preto, 14/09/1991

EDUCAÇÃO

Ensino Médio: Colégio Rio Branco - Campinas, Campinas, 2008.

Ensino Superior: Bacharelado em Química, Universidade Federal de São Paulo, *campus* Diadema, 2013.

OCUPAÇÃO

01/2017 – 04/2017: Operador Especializado: LIBBS Farmacêutica

08/2014 – 07/2016: Bolsista de Mestrado, Agência FAPESP, Processo: 2014/07626-5

PUBLICAÇÕES (Artigos Completos e Resumos em Congressos)

Participações em congressos:

16th BMOS - Brazilian Meeting on Organic Synthesis, BMOS, Búzios - RJ (2015)

2nd NANODay NanoAtlantic: Brazil@Portugal Meet NanoBioScience; Universidade Nova de Lisboa – Portugal (2014)

1st International Caparica Conference on Chromogenic and Emissive Materials; Universidade de Lisboa – Portugal (2014)

XIX SIBEE - Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, SIBEE, Campos do Jordão – SP (2013)