

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO**

**Síntese, caracterização e aplicações de fluoróforos derivados do  
BODIPY**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos

**Orientado:** Lucas Cunha Dias de Rezende

**Orientador:** Prof. Dr. Flavio da Silva Emery

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas em 23/03/2016. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto

2016

## Resumo

Rezende, L. C. D. **Síntese caracterização e aplicações de fluoróforos derivados do BODIPY**. 2016. 172f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

O desenvolvimento de técnicas analíticas, espectroscópicas e de imagem baseadas na detecção da fluorescência está associado com a necessidade por marcadores fluorescentes com variadas características e aplicabilidades. Dentre os diversos marcadores fluorescentes disponíveis, os derivados de borodipirrometenos (BODIPY), descobertos no final da década de 1960, passaram a ser amplamente utilizados desde o final da década de 1980. Esta tese de doutorado se trata de um estudo pioneiro no Brasil, envolvendo a síntese, modificação química e caracterização fotofísica de BODIPYs. Na primeira etapa do projeto métodos de obtenção de BODIPYs foram estabelecidos e aplicados na síntese de uma biblioteca de sondas fluorescentes. O estudo fotofísico dessa biblioteca de fluoróforos nos possibilitou identificar e estudar particularidades de alguns fluoróforos, como o solvatocromismo, halocromismo e ionocromismo. A segunda etapa do projeto envolveu o estabelecimento de métodos de modificação química de BODIPYs visando a diversificação fotofísica e estrutural da biblioteca de compostos. Foram sintetizados BODIPYs reativos que foram submetidos a reações de substituição nucleofílica, Suzuki, Sonogashira, Knoevenagel e arilação direta, levando à obtenção de compostos com propriedades ópticas diversas. Por fim, na terceira etapa do projeto, está descrito o desenvolvimento de novos métodos de modificação química de fluoróforos BODIPY. Foi desenvolvido um método simples de tiocianação direta dessa classe de compostos com bons rendimentos, baseado na utilização de tiocianato de amônio e oxone<sup>®</sup>. O escopo e as limitações do novo método de tiocianação foi estudado em BODIPYs com propriedades eletrônicas diversas. Foi mostrada ainda a conversão de BODIPYs tiocianados a derivados tioalquilados com características ópticas particulares. Em conclusão, com esta tese de doutorado foi estabelecida uma linha de pesquisa inovadora envolvendo a síntese e modificação química de uma classe de compostos com ampla aplicação tecnológica.

*Palavras-chave: Fluorescência, BODIPY, síntese, espectroscopia, sonda.*

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Fluorescência: Teoria e aplicabilidade analítica

O termo “luminescência” foi introduzido no final do século XIX para descrever fenômenos luminosos que, em oposição à incandescência, não estão relacionados com aumento de temperatura.<sup>1,2</sup> Em termos atuais, a luminescência pode ser descrita como a liberação de fótons a partir de um estado eletrônico excitado.<sup>1</sup> O estado excitado pode ser alcançado em resposta a diversos estímulos que são levados em conta para classificação dos tipos de luminescência. A eletroluminescência, por exemplo, é a luminescência em resposta a um estímulo elétrico, enquanto a bioluminescência ocorre em resposta a um processo bioquímico. Nesse contexto, a fluorescência, assim como a fosforescência, se insere no conceito de fotoluminescência, ou seja, ambos são fenômenos de liberação de fótons no qual o estado eletrônico excitado é obtido após excitação luminosa.<sup>1,3</sup>

Em geral, a primeira descrição do fenômeno da fluorescência é atribuída a Nicolas Monardes, um botânico espanhol que já no século XVI descreveu o aparecimento de uma cor azul peculiar em uma infusão medicinal conhecida como *Lignum Nephriticum*.<sup>4</sup> Todavia, apenas em meados do século XIX, após estudo minucioso do fenômeno da fluorescência em soluções de sulfato de quinina, que John Herschel publicou um tratado acerca do fenômeno, descrito por ele como refrangibilidade da luz.<sup>1,3,5</sup> Pouco depois, Sir George Gabriel Stokes se aprofundou no estudo de soluções de sulfato de quinina e publica uma série de observações acerca do fenômeno, propondo pela primeira vez o uso do termo “fluorescência”, cunhado a partir de *fluorspath*, nome dado a uma rocha que também emite fluorescência.<sup>1,3,6</sup>

Em 1933, em um artigo publicado na *Nature*,<sup>7</sup> Jablonski propõe um diagrama de níveis energéticos que pode ser visto como precursor de diagramas de transições eletrônicas modernos, conhecidos até hoje como diagramas de Jablonski.<sup>8</sup> Esse tipo de diagrama é utilizado como modelo para explicar os processos físicos que ocorrem no fenômeno de fotoluminescência.

Segundo o modelo (Figura 1), com a absorção de um fóton a espécie fluorescente passa de um estado singlete não excitado (estado S<sub>0</sub>) para um dos níveis vibracionais de um estado singlete excitado (níveis S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>), num processo que ocorre na ordem de 10<sup>-15</sup> segundos. A fluorescência resulta do retorno ao estado fundamental que ocorre na ordem de 10<sup>-9</sup> segundos. Processos não radiativos de conversão interna e relaxação vibracional ocorrem na ordem de 10<sup>-12</sup> segundos, de maneira que a transição radiativa da fluorescência ocorre a partir do nível vibracional 0 do

estado S1, caracterizando a regra de Kasha.<sup>9</sup> Na fosforescência, antes da transição radiativa, ocorre um cruzamento inter-sistemas levando a espécie química a um estado tripleto, cuja transição radiativa ocorre na ordem de  $10^{-3}$  segundos<sup>1,3</sup>.

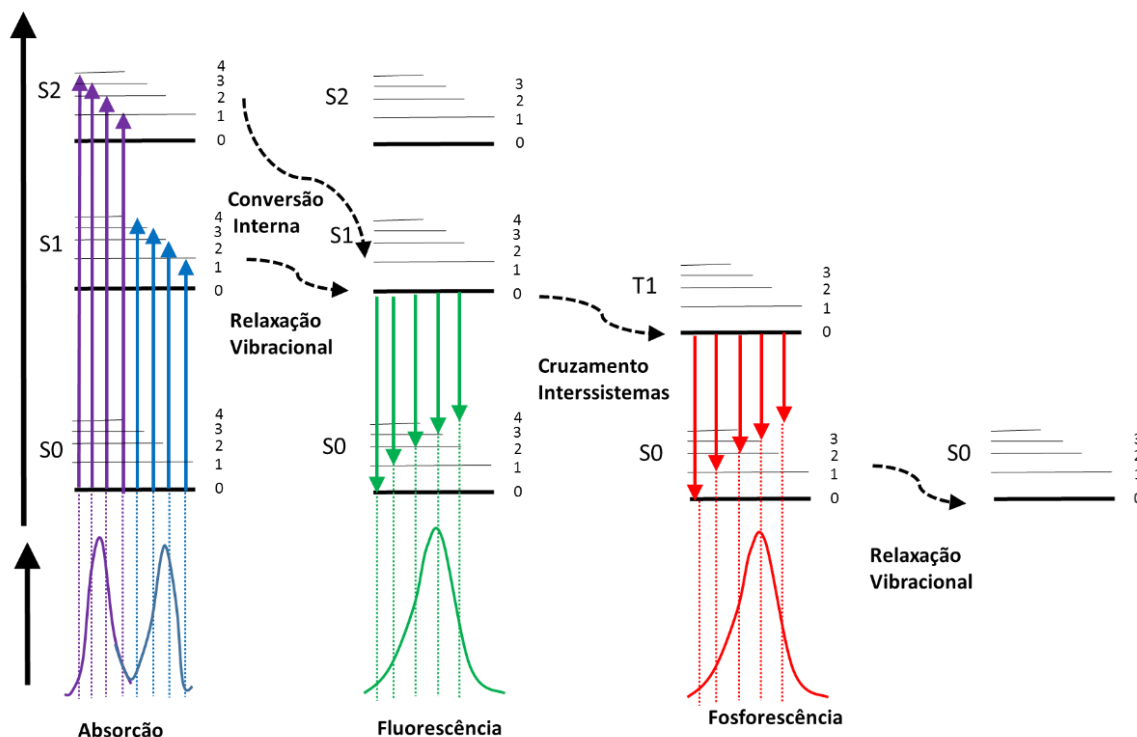


Figura 1. Representação do diagrama de Jablonski. Estão mostrados: absorção com excitação aos níveis S1 (roxo) e S2 (azul); emissão de fluorescência a partir do nível S1 (verde); e emissão de fosforescência a partir do nível T1 (vermelho). Transições não radiativas estão mostradas na forma de setas tracejadas pretas.

Em seus experimentos com sulfato de quinina, Sir Stokes foi perspicaz em observar que a emissão de fluorescência depende da natureza da luz utilizada para excitação.<sup>3,6</sup> Ocorre que a fluorescência é observada sempre em comprimentos de onda maiores do que a fonte de excitação, resultado da perda energética relacionada aos processos não radiativos. Devido à perda energética resultante do cruzamento inter-sistemas, espera-se um desvio ainda maior na emissão da fosforescência. Em homenagem aos seus estudos pioneiros, a diferença entre o comprimento de onda de máxima absorção ( $\lambda_{abs}$ ) e o de máxima emissão ( $\lambda_{abs}$ ) é conhecido como o desvio de Stokes.<sup>1,3</sup>

Nem todos os fótons absorvidos resultam em emissão de fluorescência, uma vez que transições não radiativas competem com transições radiativas. A razão entre fótons emitidos e fótons absorvidos é conhecido como rendimento quântico de fluorescência ( $\Phi_f$ ), grandeza que, assim como o coeficiente de absorvidade molar, determina o brilho de um fluoróforo. O tempo médio que a espécie fluorescente permanece no estado excitado antes da transição radiativa

também é uma propriedade importante, conhecida como tempo de vida de fluorescência ( $\tau$ ). Ambas são propriedades determinadas pela natureza da espécie fluorescente e o meio em que está dissolvida.<sup>1,3</sup>

Além dos seus trabalhos pioneiros acerca do fenômeno de fluorescência, Sir George Stokes também pode ser considerado o primeiro a propor a fluorescência como uma importante ferramenta analítica.<sup>10</sup> Em um discurso realizado aos colegas da sociedade de química no ano de 1864<sup>11</sup> o pesquisador previu que a fluorescência teria potencial analítico. Em 1867, Goppelsroder publicou<sup>12</sup> a primeira análise fluorimétrica da história,<sup>10</sup> ao explorar a fluorescência do complexo entre o cátion Al(III) e o flavonol morina para a determinação do cátion em questão. Nesse artigo é introduzido o termo “Fluoreszenzanalyse”, que pode ser traduzido do alemão como “análise por fluorescência”, “análise fluorimétrica” ou “fluorimetria”, marcando o início dessa ciência.

O uso de técnicas baseadas em fluorescência traz uma série de vantagens em relação a outras técnicas. Quando comparado a métodos colorimétricos baseados na absorbância, técnicas fluorimétricas são muito mais sensíveis e seletivas.<sup>10</sup> Além disso, a baixa prevalência de espécies fluorescentes em relação às espécies cromofóricas também está relacionado com melhor desempenho da fluorescência como técnica analítica.<sup>10</sup> Cabe salientar, ainda, que a fluorescência é um fenômeno muito influenciado pelo meio, fator explorado no desenvolvimento de sensores de diversos tipos.<sup>13,14</sup>

A natureza do solvente pode ter efeitos profundos na emissão de um fluoróforo, caracterizando o fenômeno de solvatocromismo. Em geral, o efeito de solventes resulta do fenômeno de relaxação induzida por solventes, no qual a reorganização das moléculas de solvente leva à estabilização do estado excitado e diminuição da energia do sistema.<sup>1,3</sup> Solventes mais polares estabilizam de maneira mais eficiente o estado excitado, de maneira que uma das principais aplicações do solvatocromismo é o estudo da polaridade local de macromoléculas.<sup>3,13,14</sup>

A supressão ou “*quenching*” da fluorescência é um fenômeno no qual a fluorescência de uma espécie fluorescente é suprimida na presença de algum analito, devido a colisões (*quenching* dinâmico) ou complexação (*quenching* estático) entre analito e fluoróforo.<sup>3,15</sup> No *quenching* dinâmico, a colisão do analito com a espécie fluorescente no estado excitado resulta na sua deexcitação por uma via não radiativa, enquanto no *quenching* estático um complexo não fluorescente entre a espécie fluorescente e o analito é formado.<sup>3</sup> O *quenching* da fluorescência é uma abordagem muito explorada no desenho de sensores fluorescentes, principalmente para cátions e ânions.<sup>3,16</sup> Métodos analíticos baseados na diminuição da intensidade da fluorescência

são conhecidos como métodos “*turn-off*”, enquanto a abordagem oposta, no qual observa-se o aumento da fluorescência, é conhecida como método “*turn-on*”.

Outro fenômeno com aplicações analíticas é a transferência de energia de ressonância por fluorescência, ou FRET (do inglês *Fluorescence Resonance Energy Transfer*).<sup>3</sup> Esse fenômeno ocorre entre uma espécie doadora no estado excitado que, por interação dipolar, excita uma espécie aceptora, resultando por fim na emissão da fluorescência desta última espécie.<sup>17</sup> Para que o processo ocorra é necessário um *overlap* entre o espectro de emissão do doador e o espectro de absorção do acceptor, todavia sem que haja emissão de fóton pelo doador ou absorção pelo acceptor. A dependência entre a transferência de energia e a distância entre doador e acceptor é utilizada extensivamente como base para desenvolvimento de métodos analíticos.<sup>17</sup> Uma das aplicações mais comuns do FRET é na medição da distância entre dois pontos de uma macromolécula,<sup>18</sup> sendo uma técnica muito utilizada na determinação estrutural deste tipo de compostos, no desenho de sensores fluorescentes de alta seletividade e no estudo espacial e temporal das interações moleculares por microscopia.<sup>19</sup>

A intensidade da emissão é um parâmetro comumente utilizado em técnicas analíticas, todavia outra vantagem da fluorescência é a sua multidimensionalidade, de maneira que diversos parâmetros podem ser analisados.<sup>20</sup> Em algumas situações, desvios no espectro de emissão de fluorescência são utilizados como parâmetro analítico. Algumas sondas fluorescentes são desenhadas para que ocorra desvio espectral na presença de um analito, conhecidas como sondas ratiométricas.<sup>21</sup> A polarização, ou anisotropia, da luz emitida por fluorescência é um outro parâmetro utilizado em métodos analíticos.<sup>22</sup> e a sua aplicação se baseia na relação inversa entre o grau de rotação de um sistema e polarização da fluorescência emitida.<sup>23</sup> O tempo de vida de fluorescência também é utilizado como parâmetro analítico com algumas vantagens. O tempo de vida independe da concentração e da intensidade de emissão da espécie fluorescente,<sup>3</sup> sendo uma maneira eficaz de evitar a necessidade de medições quantitativas da intensidade da fluorescência.

O século XX acompanhou um crescimento tanto na quantidade quanto na complexidade de métodos analíticos baseados na fluorescência, de maneira que é seguro dizer que grande parte do progresso científico desse período não existiria sem a aplicação da fluorescência como ferramenta analítica. Nas áreas biológicas e da saúde a fluorescência encontra aplicação na microscopia, imunoenaios, biologia molecular, engenharia genética, análises clínicas, análises toxicológicas dentre outras áreas, e a tabela 1 sumariza algumas das principais técnicas baseadas em fluorescência.

**Tabela 1. Informações gerais sobre algumas das técnicas laboratoriais baseadas em fluorescência disponíveis atualmente.**

Técnica	Desenvolvimento	Observações gerais
Microscopia de fluorescência	Início do séc. XX	- Alternativa viável para aumentar a especificidade e o contraste das técnicas microscópicas <sup>24</sup> - Diversas técnicas avançadas de microscopia por fluorescência estão disponíveis atualmente
Imunofluorescência <sup>25</sup>	Década de 1950	- Microscopia baseada em anticorpos fluorescentes - Visualização de estruturas celulares específicas
Microscopia confocal <sup>26</sup>	Segunda metade do séc. XX	- Desenvolvida após a descoberta do laser e a focalização pontual - Alta resolução e melhor contraste - Estudos de amostras vivas em tempo real - Possibilidade de imagens tridimensionais
Microscopia de dois fótons <sup>27,28</sup>	Aplicada partir da década de 1990	- Excitação por dois fótons de baixa energia ao invés de um fóton de alta energia, com menos dano à amostra - Emissão com desvio anti-Stokes - Imagens de alta resolução em espécies vivas - Eliminação da contaminação do laser de excitação
Microscopia por tempo de vida de fluorescência <sup>29,30</sup>	Década de 1990	- Imagem é obtida a partir do tempo de vida de fluorescência ao invés da intensidade de fluorescência - Menos dano à amostra e contaminação - Imagens de alta resolução em espécies vivas
Imunoensaios por fluorescência <sup>31,32</sup>	Década de 1970	- Baseados na utilização de anticorpos fluorescentes - Alternativa segura a ensaios com radioisótopos - Existem ensaios baseados em anisotropia, <sup>33</sup> tempo de vida <sup>34</sup> e FRET <sup>35</sup>
Citometria de fluxo <sup>36</sup>	Década de 1970	- Análise de suspensões de células baseada na fluorescência - Muito utilizada na análise de células sanguíneas
PCR em tempo real <sup>37</sup>	Fim do século XX	- Adaptação da técnica de PCR utilizando sondas fluorescentes para análises quantitativas

## 1.2 Sondas Fluorescentes

O desenvolvimento de diversas classes de espécies fluorescentes foi fundamental para disseminação da fluorescência como parâmetro analítico. A fluorescência não é um fenômeno corriqueiro, de maneira que sondas fluorescentes são primordiais para grande maioria das técnicas laboratoriais baseadas em fluorescência. A exceção são os experimentos baseados na fluorescência intrínseca de algumas amostras ou biomoléculas (Figura 2). O sulfato de quinina,<sup>38</sup> produto natural isolado no séc. XIX de espécies da cinchona<sup>39</sup> e explorado por Stokes e Herschel em seus estudos, é considerado o primeiro fluoróforo quimicamente definido

da história.<sup>40</sup> Outros produtos naturais com fluorescência endógena incluem aminoácidos aromáticos, como o triptofano, tirosina e fenilalanina; vitaminas, como o retinol, ácido fólico; coenzimas como NADH e FAD; e pigmentos como melanina e clorofila.<sup>3</sup>

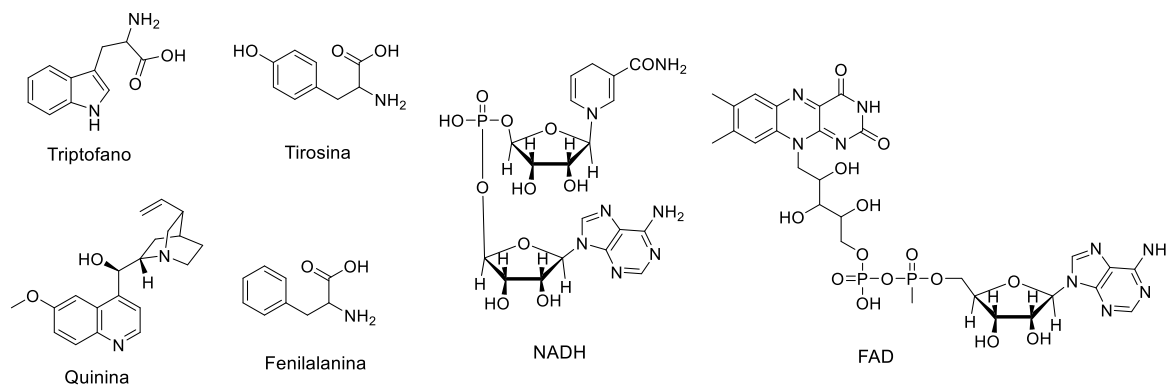


Figura 2. Exemplos de compostos orgânicos fluorescentes de ocorrência natural.

Na grande maioria das vezes o analito de interesse não possui fluorescência intrínseca, sendo necessário a aplicação de fluoróforos para realização de ensaios baseados em fluorescência. Atualmente vários tipos de fluoróforos são conhecidos e, no que se refere à diversidade estrutural e ao número de publicações, as sondas fluorescentes são principalmente pequenas moléculas orgânicas aromáticas. Todavia, outros tipos de sondas fluorescentes estão disponíveis atualmente.<sup>41</sup>

Em geral, cátions metálicos não são fluorescentes, todavia, duas exceções a essa regra têm sido exploradas como sondas fluorescentes: európio ( $\text{Eu}^{3+}$ ) e térbio ( $\text{Tb}^{3+}$ ).<sup>42</sup> A emissão desses lantanídeos, resultante de transições eletrônicas envolvendo o orbital  $4f$ , possui duas características peculiares: tempo de vida de fluorescência longo e desvio de Stokes grande,<sup>43</sup> o que estimulou a aplicação em bioensaios e microscopia baseados no tempo de vida de fluorescência. A aplicação de lantanídeos possibilita filtrar o sinal da autofluorescência presente em amostras biológicas, uma vez que decaimento temporal da autofluorescência ocorre na escala de nanosegundos. Ao ajustar o detector para coleta de emissão mais tardia é possível obter resultados com alta sensibilidade sem a interferência da autofluorescência.<sup>43</sup>

Outra espécie fluorescente de origem inorgânica são os *quantum dots*, termo que engloba uma série de nanocristais de materiais semicondutores, como cádmio, enxofre, selênio, telúrio, cujas características fotofísicas variam com a composição e o tamanho.<sup>44</sup> Uma das peculiaridades dos *quantum dots* é a larga banda no espectro de absorção e excitação, o que possibilita a sua excitação eficiente numa faixa extensa do espectro eletromagnético. Essa característica possibilita, por exemplo, a excitação simultânea e eficiente de diversos *quantum dots* distintos



utilizando um mesmo feixe de excitação. Outra aplicação relacionada à banda de excitação é o uso de *quantum dots* como aceptores em sistemas de transferência de energia. Quanto à fluorescência, a banda de emissão é bem estreita e relativamente fácil de manipular, sendo possível construir *quantum dots* com características de emissão desejadas com modificações pontuais no processo de síntese.<sup>45</sup>

Proteínas fluorescentes possuem grande importância como sondas fluorescentes, principalmente na área biológica. Esta aplicação somente se tornou possível e viável após a descoberta, determinação estrutural e clonagem da GFP (*green fluorescent protein*), isolada de espécies marinhas bioluminescentes.<sup>46</sup> Atualmente, outras proteínas fluorescentes similares à GFP já foram descritas e são utilizadas na rotina laboratorial. Em geral, essas proteínas possuem um cromóforo formado a partir de uma reação de ciclização do esqueleto proteico que forma um anel do tipo imidazol ou imidazolona, e pequenas modificações nesses cromóforos estão por trás de desvios espectrais em algumas proteínas da família do GFP.<sup>47</sup> A natureza proteica dessas sondas abre a possibilidade de diversificação da emissão através de mutagênese, a partir da qual diversas proteínas fluorescentes nunca isoladas na natureza e com emissão diversificada já foram obtidas. Outra vantagem é a possibilidade de clonar os genes e expressar essas proteínas em sistemas biológicos, sendo que esses genes são rotineiramente aplicados como gene repórter e a obtenção de linhagens celulares fluorescentes possibilita diversos estudos aplicando técnicas baseada na fluorescência.

### 1.2.1 Pequenas moléculas orgânicas

Apesar da importância das sondas citadas anteriormente, pequenas moléculas orgânicas constituem o principal tipo de sondas fluorescentes disponíveis e por muitas décadas a fluorescência foi estudada exclusivamente nesse tipo de composto<sup>48</sup>. A emissão do *Lignum Nephriticum* descrita por Nicolas Monardes, por exemplo, ocorria devido à presença de matlalina que, assim como o sulfato de quinina utilizado por Herschel e Stokes, é uma pequena molécula orgânica fluorescente. A existência de insaturações em um sistema planar, que possibilite a formação de longos sistemas pi conjugados, é um pré-requisito estrutural para corantes fluorescentes orgânicos.<sup>49</sup> Diversos padrões estruturais desse tipo são conhecidos e aplicados como fluoróforos, e nesta sessão serão introduzidos os principais cromóforos fluorescente utilizados extensivamente como sondas.

Dentre as pequenas moléculas orgânicas, derivados sintéticos da xantona, como a fluoresceína e a rodamina, estão entre as sondas mais populares (Figura 3). A fluoresceína foi sintetizada

pela primeira vez em 1871 por acilação de Friedel Crafts a partir do resorcinol e do anidrido ftálico.<sup>50</sup> A rodamina se diferencia estruturalmente da fluoresceína pela substituição dos oxigênios ligado ao anel xantona por átomos de nitrogênio, tendo sido sintetizada pela primeira vez em 1905, numa reação similar partindo *meta*-amino fenóis.<sup>51</sup> Uma peculiaridade da fluoresceína e da rodamina é a formação de uma espirolactona não fluorescente cuja reação de abertura já foi extensivamente explorada em ensaios analíticos do tipo “*turn-on*”.<sup>52</sup>

A importância analítica dessa classe de compostos é bem refletida pela quantidade e diversidade de derivados xantênicos disponíveis comercialmente. O isotiocianato da fluoresceína, mais conhecido como FITC, é provavelmente a sonda fluorescente para marcação de biomoléculas mais conhecida, e se baseia na reatividade do grupo isotiocianato frente a aminas biológicas. O Texas Red, e muitos dos fluoróforos comercializados sob a marca AlexaFluor® e CAL Fluor®, também são derivados xantênicos. Outros fluoróforos derivados do xanteno incluem a pironina Y, um corante fluorescente para ácidos nucleicos; o DHR123, cuja a fluorescência só é observada após oxidação por espécies reativas de oxigênio; o BCECF, utilizado na medição de pH citoplasmático; e o DAF-2, sensor de óxido nítrico.

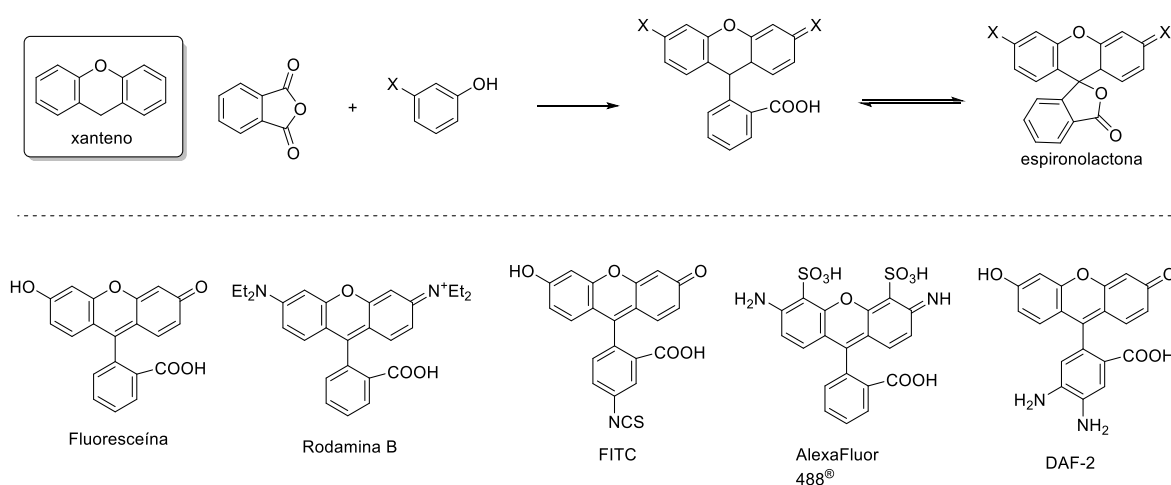


Figura 3. Estrutura do núcleo xanteno e de alguns derivados xantênicos utilizados como sondas fluorescentes. O método geral de síntese de fluoróforos xantênicos e a formação da forma espirolactona também estão mostrados.

Derivados  $\alpha$ -benzopirona, mais conhecidos como cumarinas, são caracterizados por um anel benzeno fundido a um anel pirona, e emitem fluorescência azulada relativamente intensa, sendo muito aplicados como sondas fluorescentes (Figura 4).<sup>53,54</sup> Ainda que diversas cumarinas de origem natural sejam conhecidas, métodos sintéticos de obtenção são conhecidos desde o século XIX<sup>55,56</sup> e amplamente aplicados na síntese de sensores fluorescentes.<sup>57</sup> Além da própria cumarina, diversos outros derivados cumarínicos, são conhecidos, sendo que derivados da umbeliferona e da 7-amino cumarina estão entre os mais populares. Os fluoróforos

AlexaFluor350®, DiFMU, Pacific Blue®, AMC são todos derivados cumarínicos.

Diversos substratos enzimáticos, sintetizados a partir da estrutura da cumarina, estão disponíveis e refletem bem o desenho racional de sondas fluorescentes. Uma abordagem bastante empregada na construção de substratos enzimáticos é a modificação da hidroxila livre da umbeliferona, que resulta numa espécie menos fluorescente. Nesse caso, a conversão enzimática resulta na liberação da umbeliferona com o reestabelecimento da fluorescência. Cumarinas desenhadas especificamente para bioconjugação (funcionalizadas com succinimidil éster ou iodoacetamida) e para coloração de células (como a linha de fluoróforos CellTracker®), também são utilizadas frequentemente em ensaios biológicos.

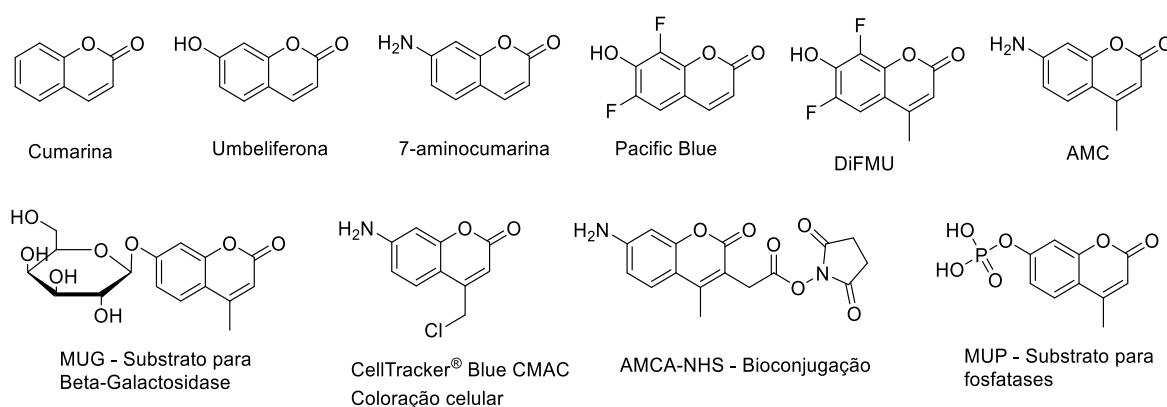


Figura 4. Estrutura da cumarina e de alguns derivados utilizados como sondas fluorescentes.

Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos são muito conhecidos como poluentes ambientais, todavia, a emissão de fluorescência é uma característica comum nesse grupo de compostos (Figura 5).<sup>58</sup> A espectroscopia de fluorescência é amplamente utilizada como um método simples e barato para detecção ambiental desses compostos,<sup>58</sup> todavia alguns hidrocarbonetos aromáticos policíclicos encontraram aplicações analíticas com sondas fluorescentes exógenas.

O naftaleno e o pireno podem ser citados como os hidrocarbonetos aromáticos mais utilizados como sondas fluorescentes em diversas aplicações. Fluoróforos naftalênicos de uso comum incluem a sonda tio-reativa Badan, e o sensor de fluidez membranar laurdan.<sup>59</sup> Outro exemplo é o ANS,<sup>60</sup> cujo solvatocromismo é explorado até hoje na caracterização de sítios hidrofóbicos em proteínas.<sup>61</sup> O amarelo lúcifer e as sondas da classe dansyl também possuem o anel naftaleno em sua estrutura. Dentre os fluoróforos pirênicos, derivados sulfonados como o ácido pirenosulfônico, o AlexaFluor405® e o HPTS são muito utilizados.

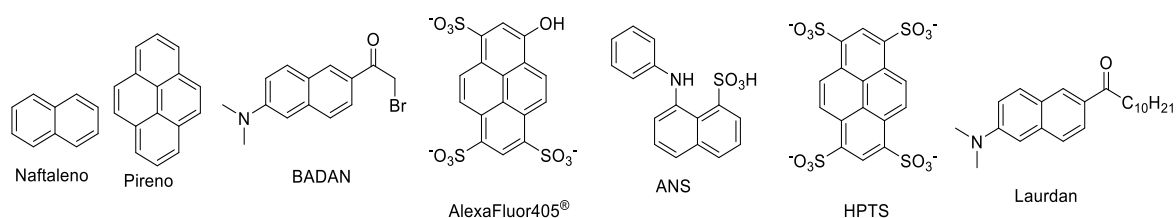


Figura 5. Estrutura do naftaleno e do pireno com alguns derivados utilizados como sondas fluorescentes.

As cianinas são corantes formados por um nitrogênio quaternário e um terciário, geralmente partes de uma estrutura heterocíclica, ligados por uma cadeia polimetínica ressonante com número ímpar de carbonos a um nitrogênio neutro (Figura 6).<sup>62</sup> Sintetizadas pela primeira vez em 1856, são utilizados desde o século XIX em diversas aplicações tecnológicas e mais recentemente como sondas fluorescentes.<sup>63</sup> As merocianinas são compostos similares no qual um dos nitrogênios é substituído por um oxigênio, com a forma neutra e zwitterionica em ressonância.<sup>64</sup>

Dentre as cianinas utilizadas como sondas fluorescentes, derivados da indocianina, contendo o núcleo indólico estão entre as mais difundidas e podem ser exemplificadas pelos fluoróforos da linha “Cy”, comercializados pela *Molecular Probes*® e os fluoróforos da linha “quasar” comercializados pela Biosearch Technologies (Figura 6). Cianinas com a estrutura fechada, como o Cy3b em geral possuem melhores propriedades fotofísicas devido à rigidez do sistema. Sondas cianínicas derivadas do benzoxazol, como o DiOC5(3), DiOC6(3) e DODC; do benzimidazol, como JC-1; e do benzotiazol, como o DiSC2(3) e o DTDCI também são encontrados. Entre as merocianinas, vale citar a merocianina 540, um corante fluorescente aplicado na coloração do axônio.

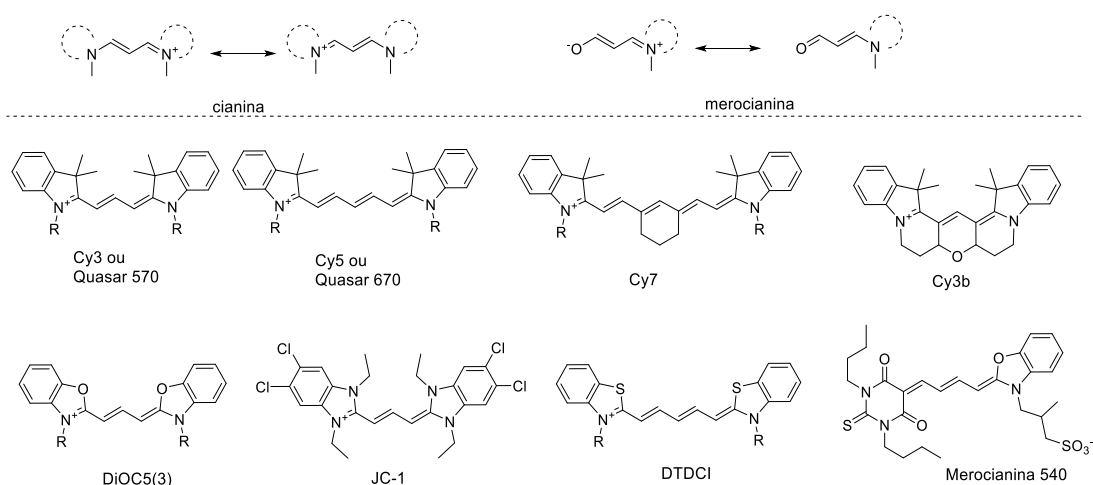


Figura 6. Estrutura do esqueleto básico das cianinas e merocianinas e de alguns derivados utilizados como sondas fluorescentes

Além das classes de fluoróforos orgânicos citadas, diversos outros compostos encontraram aplicações como sondas fluorescentes. Outros núcleos presentes em corantes fluorescentes disponíveis comercialmente incluem a acridina, acridona, fenoxazina, fenantridina, bimane, bisbenzimidaz, indol, esquaraina, diarilmetano, nitrobezoxidiazol (NBD), oxonol dentre outros (Figura 7). O foco do nosso grupo de pesquisa e desse relatório são derivados borodipirrometenos, que serão mais discutidos nas próximas sessões.

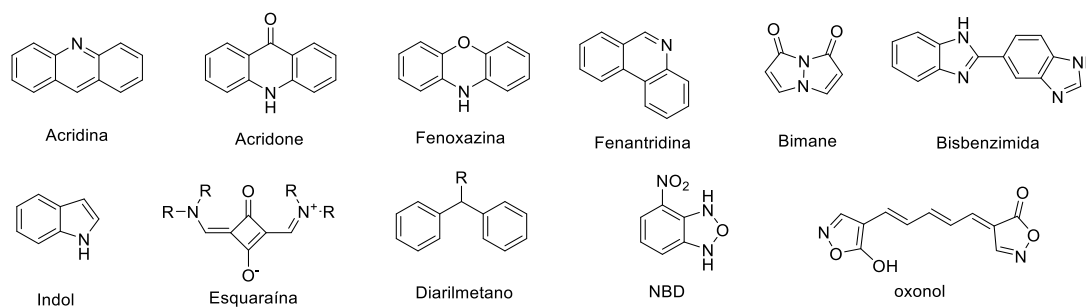
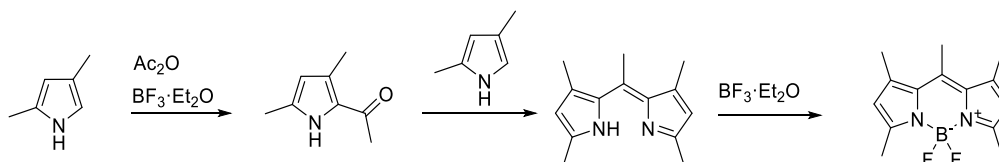


Figura 7. Estrutura de diversos esqueletos encontrados em fluoróforos disponíveis comercialmente

### 1.3 BODIPYs: Estrutura e propriedades gerais

Os borodipirrometenos são compostos contendo o núcleo 4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno, mais conhecidos pelo acrônimo “BODIPY”, termo que será utilizado nesse texto para se referir a esse grupo de fluoróforos.<sup>65</sup> Os BODIPYs estão entre os fluoróforos mais conhecidos e com aplicação mais difundida, e são o objeto de estudo do nosso grupo de pesquisa e o tema principal desta tese de doutorado. A descoberta desse núcleo fluorescente ocorreu em 1968, quando Treibs e Kreuzer,<sup>66</sup> na tentativa de realizar a acetilação do 2,4-dimetil pirrol com anidrido acético e  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ , obtiveram um produto desconhecido fluorescente. A estrutura desse composto inesperado foi elucidada como sendo o primeiro BODIPY (Esquema 1).



Esquema 1. Rota sintética proposta por Treibs e Kreuzer para acetilação do pirrol que resultou na obtenção sintética do primeiro BODIPY

Embora conhecidos desde o final da década de 1960, poucos artigos científicos abordando esse novo grupo de compostos foram publicadas nas duas décadas seguintes. Foi apenas em 1987, com a publicação de uma patente<sup>67</sup> da *Molecular Probes*®, empresa especializada em comércio de produtos fluorescentes, que esta classe de fluoróforos teve sua aplicação tecnológica reconhecida e difundida. A *Molecular Probes*®, atualmente subsidiária do conglomerado *Life*

*Technologies*®, continua sendo a principal companhia envolvida na comercialização de BODIPYs. Com o reconhecimento da aplicabilidade desses compostos, observou-se um aumento exponencial na quantidade de artigos científicos e patentes descrevendo compostos desta classe (Figura 8).<sup>68</sup>

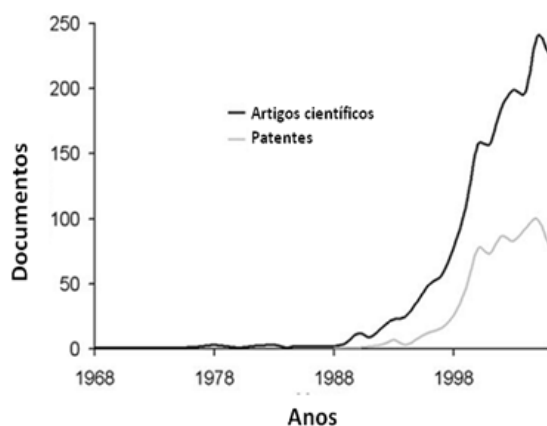


Figura 8. Quantidade anual de publicações científicas descrevendo fluoróforos BODIPY nos 40 anos seguindo a publicação do primeiro BODIPY (adaptado de Ulrich et al., 2008, com permissão da editora).<sup>68</sup>

Estruturalmente, os BODIPYs possuem um núcleo formado por duas unidades pirrólicas, unidas por uma ponte metino, que estão complexadas, através do par de elétrons não ligantes do nitrogênio pirrólico, a um átomo de boro (geralmente um grupo difluoroboril),<sup>69</sup> sendo derivados pirrólicos similares a porfirinas, porfirazinas e ftalocianinas (Figura 9). As dipirrininas, assim como as porfirinas, são conhecidas pela capacidade de complexação com íons metálicos. Ainda que diversos complexos metálicos de dipirrininas com propriedades interessantes tenham sido publicados,<sup>70</sup> em geral as propriedades fotofísicas dos BODIPYs são superiores às de outros complexos, o que estimulou o interesse maior por essa classe.

As formas canônicas do núcleo BODIPY (Figura 9) se assemelham às de um corante cianina monometínico,<sup>71</sup> todavia com rigidez estrutural resultante da complexação.<sup>68</sup> A ausência de fluorescência nas dipirrininas reflete a necessidade da complexação para a obtenção de uma espécie fluorescente. Acredita-se que a rigidez estrutural do núcleo BODIPY esteja por trás dos seus altos rendimentos quânticos de fluorescência, o que, aliado ao coeficiente de absorvidade molar relativamente alto, confere brilho intenso a esse grupo de fluoróforos.<sup>68</sup> O sucesso do BODIPY estimulou a utilização da coordenação com boro tetravalente como meio de fixar a estrutura de outros cromóforos com o intuito de obter novos corantes com propriedades fotofísicas melhoradas.<sup>72</sup>

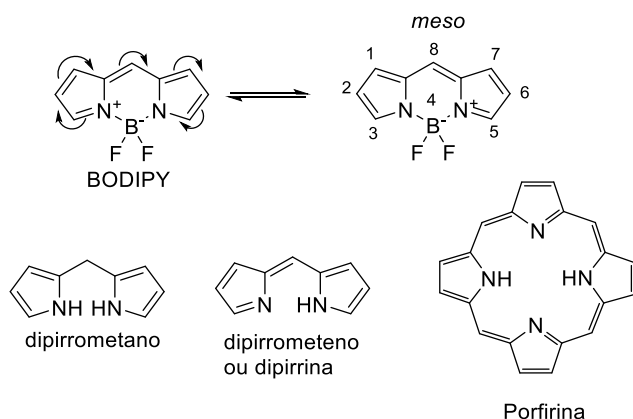


Figura 9. Acima: Estrutura básica do núcleo BODIPY mostrando as formas de ressonância e a numeração do anel. Abaixo: Estrutura de outros derivados pirrólicos relevantes

Além do brilho intenso, algumas outras características típicas dos BODIPYs estão relacionadas com sua ampla aplicação como sondas fluorescentes. Em geral, observa-se um pico intenso de absorção na região visível do espectro eletromagnético referente à transição  $S_0-S_1$  ( $\pi-\pi^*$ ) entre 500 e 525 nm (coeficiente de absorvidade molar entre 40.000 a 80.000  $M^{-1}cm^{-1}$ ). A transição vibracional 0-1 é em geral observada como um ombro do pico principal e a transição  $S_0-S_2$  pode ser observada como uma banda larga e pouco intensa de absorção abaixo de 480 nm.<sup>73</sup> A emissão é observada como um pico fino e intenso com desvio de Stokes pequeno.<sup>73-75</sup> Com algumas exceções<sup>76,77</sup> o estado tripleto dos BODIPYs é raramente populado e a fosforescência não é comumente observada. Vale citar que os BODIPYs são relativamente estáveis, bem como solúveis em solventes orgânicos e em geral não formam agregados.

A versatilidade química é sem dúvida um outro ponto positivo dos BODIPYs. Atualmente existem diversos métodos de modificação química do núcleo BODIPY que são aplicados para funcionalização e diversificação fotofísica. A biblioteca de BODIPYs disponíveis comercialmente na *Molecular Probes*® (Figura 10) reflete não só a importância dos BODIPYs como sondas fluorescentes, mas também a possibilidade de obtenção de BODIPYs com propriedades diversas através de modificações pontuais na estrutura do núcleo BODIPY. Métodos de síntese e modificação química e fotofísica dos BODIPYs serão abordados com mais detalhes posteriormente.

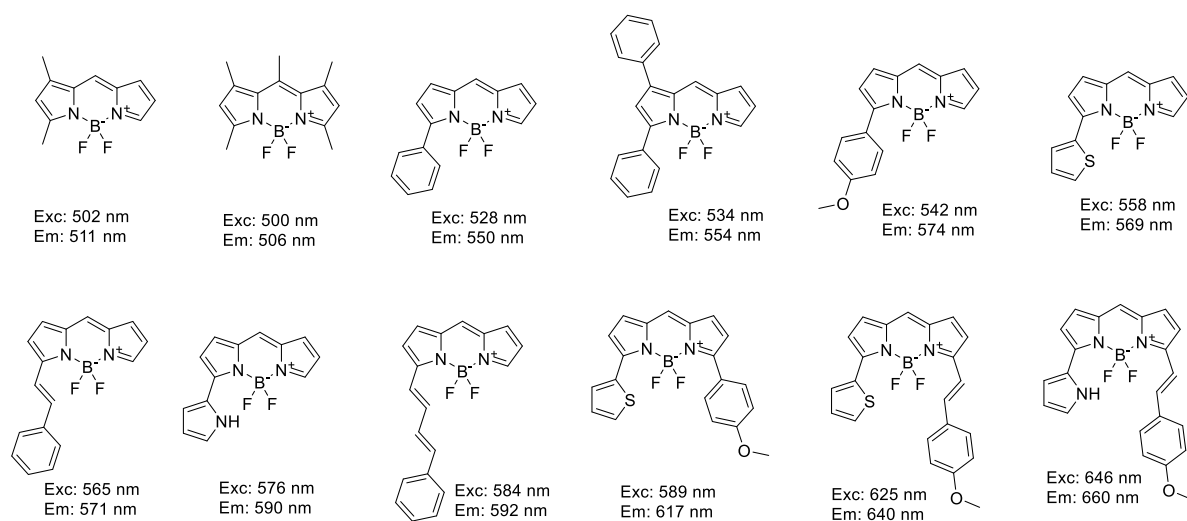
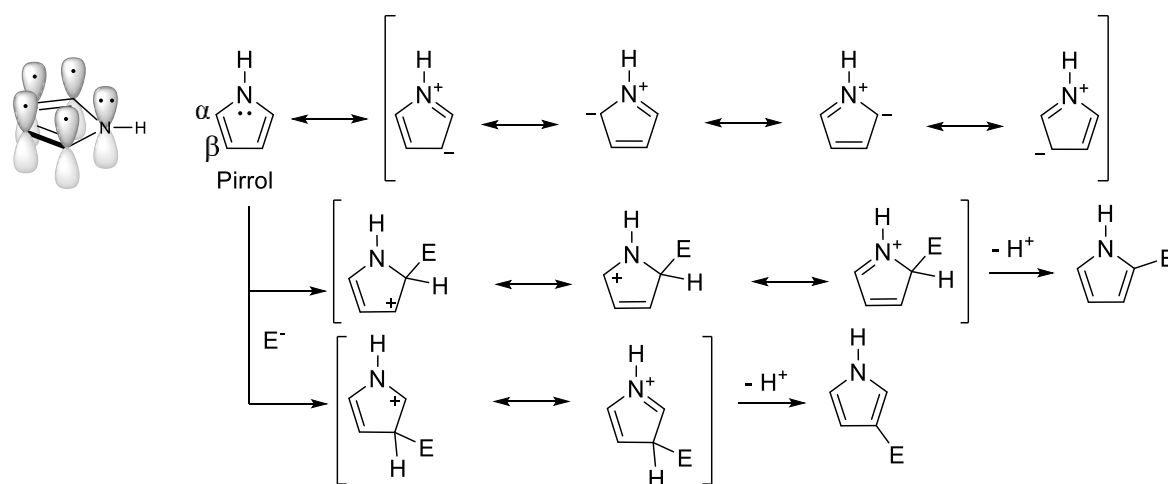


Figura 10. Estrutura química e comprimento de onda de máxima absorção e emissão de alguns BODIPYs disponíveis comercialmente. É possível notar que modificações estruturais no núcleo BODIPY possibilitam o desenho de sondas com emissão de fluorescência em uma faixa extensa do espectro eletromagnético

#### 1.4 Rotas de obtenção do BODIPY

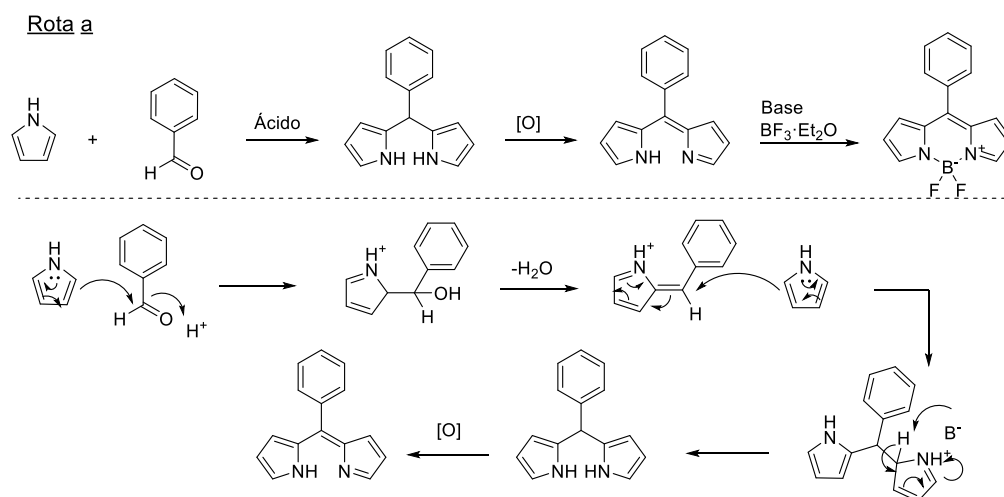
A síntese de BODIPYs é realizada a partir de derivados pirrólicos, explorando a nucleofilicidade da posição  $\alpha$  desse heterociclo. O pirrol é um heterociclo aromático de cinco átomos, contendo um nitrogênio cujo par de elétrons não ligante está em ressonância com as insaturações, assemelhando-se em reatividade às enaminas. O caráter doador do nitrogênio no pirrol faz dele um heterociclo rico em elétrons e com alta propensão a reações de substituição eletrofílica (Esquema 2). Como pode ser visto nas formas de ressonância do pirrol, todas as posições possuem caráter nucleofílico, todavia a posição  $\alpha$  é mais propensa a substituição eletrofílica devido à maior estabilidade do intermediário formado (Esquema 2).<sup>78</sup>



Esquema 2. Estrutura, formas de ressonância e reatividade do pirrol, heterociclo usado como material de partida para a síntese de BODIPYs.

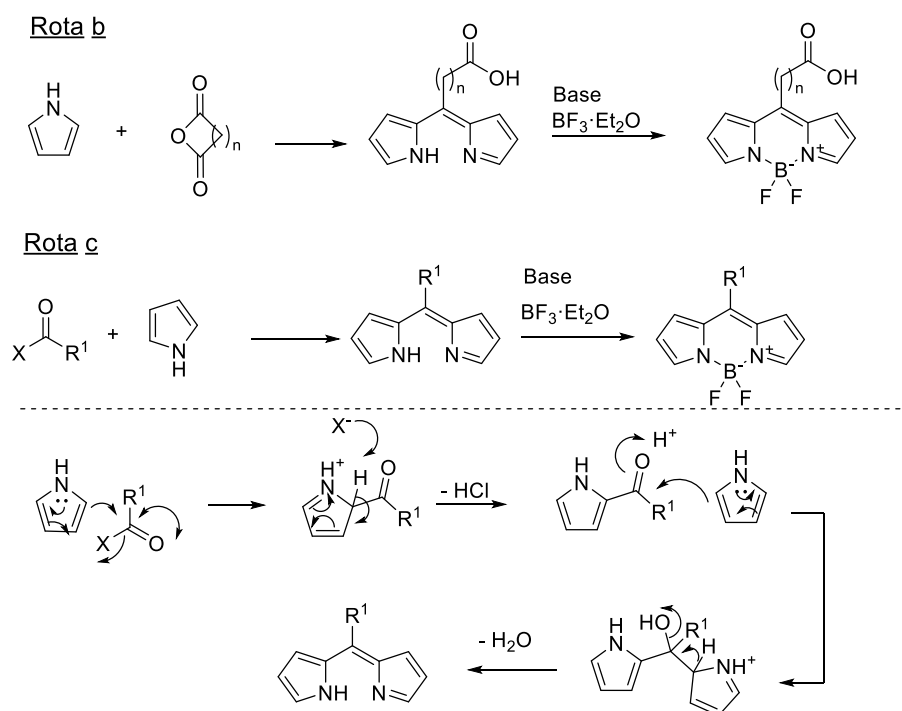


BODIPYs *meso*-substituídos podem ser obtidos a partir da reação de unidades pirrólicas com aldeídos aromáticos, cloretos ácidos ou anidridos cíclicos (Esquema 3, rota a). A reação de unidades pirrólicas com aldeído aromático em meio ácido resulta na formação de um dipirrometano *meso*-substituído, método geralmente conhecido como método de Lindsey.<sup>70,79-81</sup> A oxidação do dipirrometano, normalmente realizada com DDQ ou cloranil, leva à formação da dipirrina,<sup>70</sup> que pode ser convertida ao BODIPY numa reação de complexação com  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ , em meio básico. A polimerização de pirrol é uma reação paralela muito comum que pode dificultar a purificação e afetar o rendimento do produto desejado. Uma adaptação metodológica utilizada para driblar esses problemas é a utilização de grande excesso de pirrol, que em geral possibilita a obtenção do produto desejado com rendimentos melhores. O uso de unidades pirrólicas com uma das posições  $\alpha$  protegida é comumente empregado na síntese de BODIPYs, pois são menos propícias a polimerização e não demandam a utilização de grande excesso do heterociclo.<sup>65,68,69</sup>



Esquema 3. Síntese de BODIPYs a partir da reação de uma unidade pirrólica e um aldeído aromático pelo método de Lindsey.

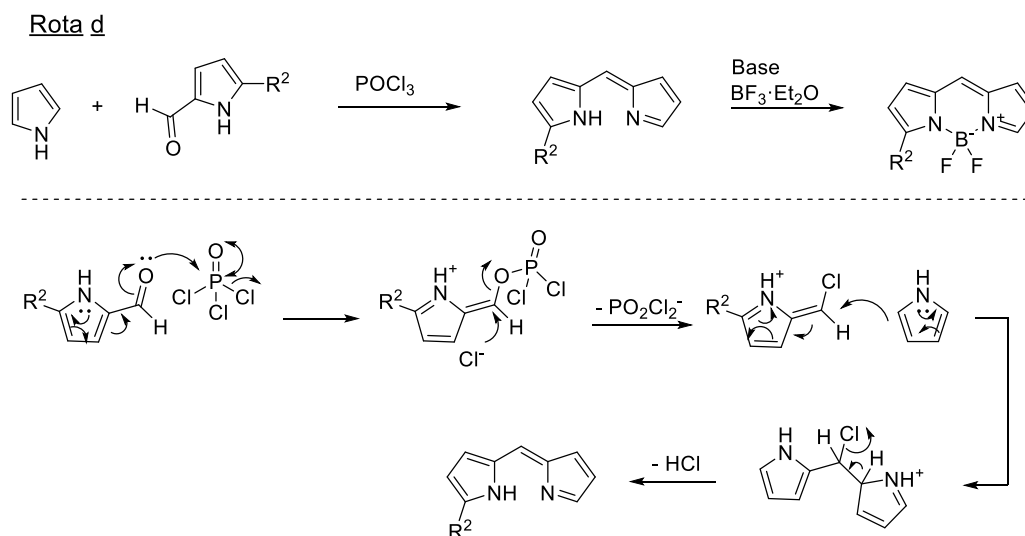
Diferentemente da rota citada anteriormente, a reação com anidrido cíclico (Esquema 4, rota b) ou cloreto de acila (Esquema 4, rota c) geralmente não demanda a utilização de um ácido para catalisar a reação.<sup>82,83</sup> Outra diferença está no fato de que com essas abordagens observa-se a formação direta da dipirrina, o que pode ser uma vantagem. A ausência de etapa de oxidação permite a síntese de BODIPYs com substituintes *meso* não-aromático, que são impossíveis de serem obtidos a partir de aldeídos, uma vez que a oxidação de dipirrometanos com substituintes *meso* não-aromáticos em geral não é trivial.<sup>65</sup> A preparação de BODIPYs a partir de anidridos cíclicos, como anidrido maleico, anidrido succínico e anidrido ftálico, é uma rota valiosa pois possibilita a obtenção de BODIPYs carboxilados, que podem ser aplicados em acoplamentos.<sup>82</sup>



Esquema 4. Síntese de BODIPYs a partir da reação de uma unidade pirrólica com haletos ácidos ou anidridos cíclicos.

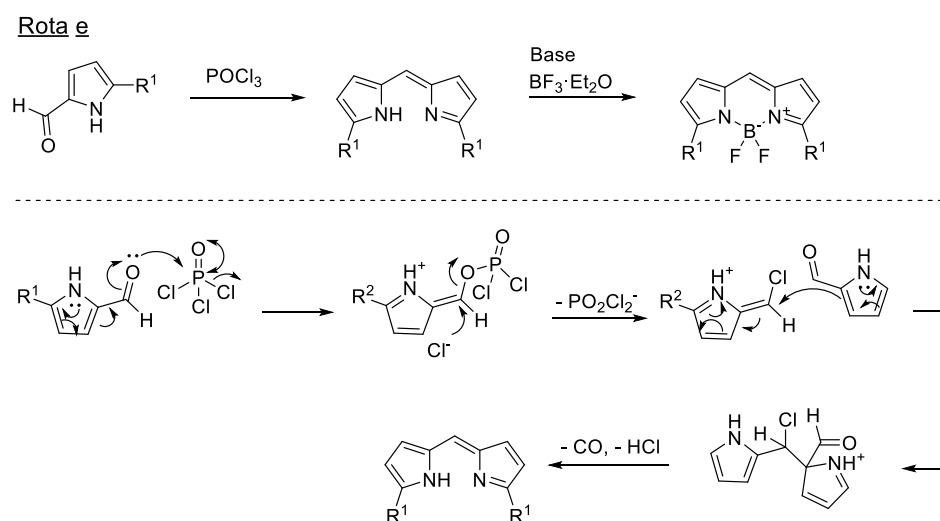
Outra rota explorada para síntese de BODIPYs se baseia na utilização unidades pirrólicas carboniladas na posição  $\alpha$  do anel. O ataque nucleofílico de uma outra unidade pirrólica, geralmente na presença de cloreto de fosforila ( $\text{POCl}_3$ ), resulta na formação da dipirrina que é por fim convertida ao BODIPY (Esquema 5, rota d).<sup>84</sup> O  $\text{POCl}_3$  reage com a carbonila por um mecanismo semelhante às etapas iniciais da reação de *Vilsmeier-Haack*, a partir do qual um intermediário halogenado eletrofílico é obtido e convertido à dipirrina após o ataque da segunda unidade pirrólica.

Os materiais de partida para essa síntese pode ser uma unidade pirrólicas formilada, sendo um BODIPY não *meso*-substituído formado,<sup>84</sup> enquanto o uso de unidades pirrólicas aciladas resulta em um BODIPY *meso*-substituído.<sup>85</sup> A vantagem dessa abordagem está na possibilidade de sintetizar BODIPYs assimétricos, ou seja, com diferentes substituintes em cada unidade pirrólica.



Esquema 5. Síntese de BODIPYs a partir da reação de uma unidade pirrólica com outra unidade pirrólica formilada ou acilada.

Mais recentemente uma rota baseada na autocondensação de unidades pirrólicas formiladas para a síntese de BODIPYs foi descoberta casualmente (Esquema 6, rota e). Foi demonstrado que a partir da reação de dois equivalentes de 2-formil pirróis com 1 equivalente de  $\text{POCl}_3$  um BODIPY simétrico não *meso*-substituído pode ser obtido. Essa reação pode ser aplicada em diversos derivados pirrólicos  $\alpha$ -formilados e é um tanto inesperada, por se basear no ataque do carbono  $\alpha$  formilado de uma das unidades pirrólicas sobre a um intermediário pirrólico helogenado, obtido da reação com  $\text{POCl}_3$ . Após a eliminação de monóxido de carbono e ácido clorídrico é obtida a dipirrina (Esquema 6, rota e).<sup>86</sup>



Esquema 6. Síntese de BODIPYs a partir da autocondensação de duas unidades pirrólicas formiladas.

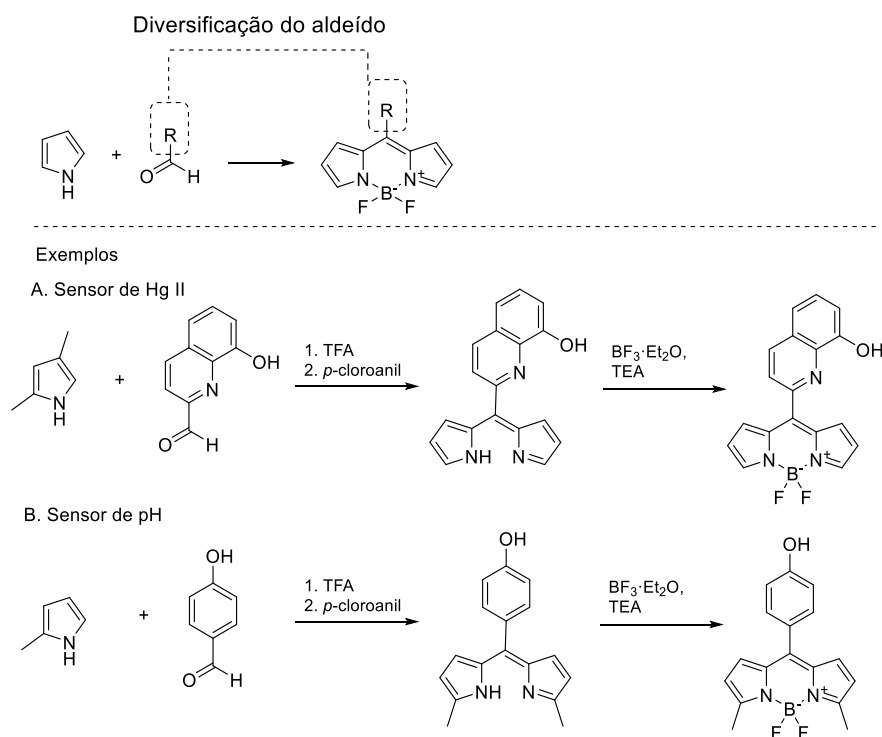
## 1.5 Funcionalização e modificação química e de BODIPYs

Desde a descoberta do BODIPY, diversos grupos de pesquisa trabalharam no desenvolvimento de métodos visando a modificação estrutural de BODIPYs. Em geral modificações na estrutura química do BODIPYs são necessárias para a derivatização de sondas para aplicações específicas e para a diversificação das propriedades fotofísicas. Nesta seção algumas das principais rotas utilizadas visando a modificação de BODIPYs serão abordadas.

### 1.5.1 Modificação dos materiais de partida e intermediários

A diversificação do material de partida utilizado na síntese de BODIPYs ou dos intermediários da reação, é uma estratégia muito utilizada na obtenção de sondas fluorescente. Os métodos de modificação direta só começaram a surgir recentemente, sendo que a diversificação do material de partida foi por algum tempo a maneira mais viável de preparar derivados dos BODIPYs. Essa é uma abordagem versátil utilizada até hoje na preparação de BODIPYs funcionalizados.

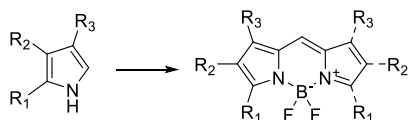
Várias sondas foram obtidas simplesmente aplicando o método de Lindsey com aldeídos contendo o grupo desejado. A partir da reação do 2,4-dimetil pirrol com a 8-hidroxiquinolina-2-carboxaldeído pelo método de Lindsey, por exemplo, foi sintetizado um sensor fluorescente para o cátion mercúrio II, no qual o grupo 8-hidroxiquinolina atua como unidade sensorial. Uma abordagem semelhante foi explorada para sintetizar o sensor “DAMBO”, no qual um grupo 3,4-diaminofenil serve como unidade sensorial para o óxido nítrico,<sup>88</sup> e também um sensor de pH,<sup>89</sup> com um grupo 4-hidroxifenil na posição *meso*. A aplicação de aldeídos aromáticos para posterior modificação também está presente na literatura, dentre os quais, vale citar a aplicação de derivados halogenados,<sup>90</sup> a exploração de alcinos em reações do tipo *click chemistry*,<sup>91</sup> e a utilização de ácidos carboxílicos<sup>92</sup> aromáticos na formação de ésteres e amidas (esquema 7).



Esquema 7. Funcionalização de BODIPYs através da diversificação do aldeído aromático. Os exemplos mostram a aplicação dessa abordagem para a síntese de um sensor de Hg II e de um sensor de pH.

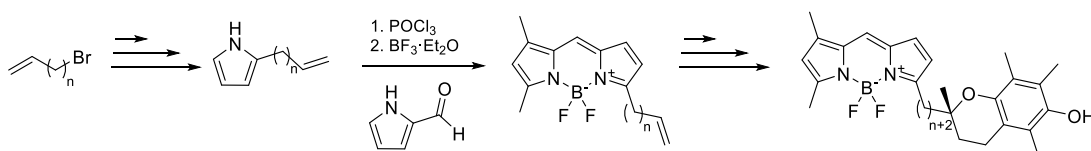
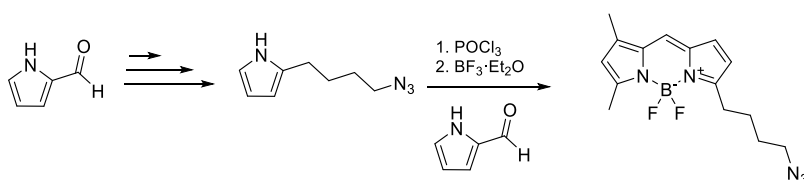
Outra estratégia bastante utilizada é a modificação do pirrol, estimulada pela existência de diversos métodos de modificação conhecidos para esse heterociclo. Muitas das sondas fluorescentes destinadas à bioconjugação presentes na patente<sup>67</sup> seminal da *Molecular Probes*®, e comercializadas até hoje em dia, foram obtidas a partir de pirróis funcionalizados. Um outro exemplo da modificação do pirrol para obtenção de BODIPYs foi a síntese de um pirrol substituído com um grupo azida, que foi posteriormente aplicado na obtenção de um BODIPY aplicável em reações do tipo “*click chemistry*”<sup>93</sup>. Outro exemplo que vale citar é a síntese de um derivado fluorescente do tocoferol, cuja estrutura permitiu a ligação no sítio de ligação do tocoferol da proteína ligadora de tocoferol.<sup>94</sup> Esse composto, com potencial aplicação biotecnológica, foi obtido a partir de um derivado pirrólico funcionalizado com um alceno terminal, mostrando a aplicabilidade da modificação de unidades pirrólicas para síntese de fluoróforos funcionais (Esquema 8).

## Funcionalização do pirrol



## Exemplos

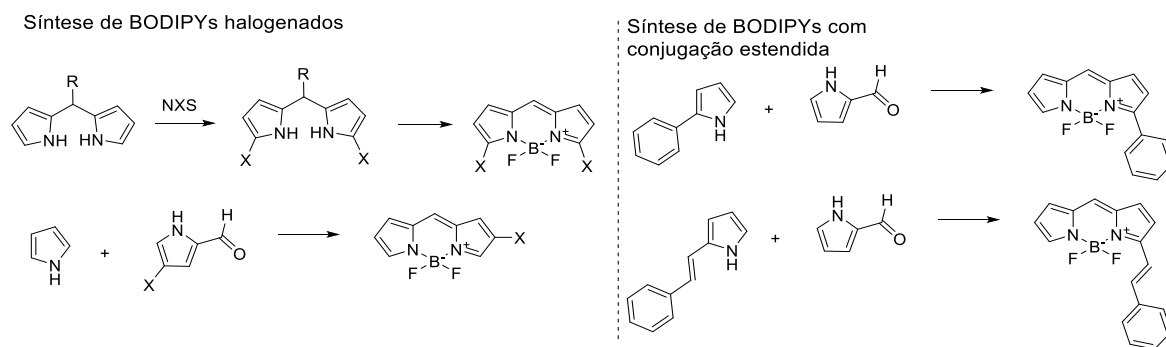
## A. Síntese de um derivado fluorescente do tocoferol

B. Síntese de uma sonda fluorescente para *click chemistry*

Esquema 8. Funcionalização de BODIPYs através da diversificação da unidade pirrólica. Os exemplos mostram a aplicação dessa abordagem para a síntese de um derivado fluorescente do tocoferol e de uma sonda fluorescente para *click chemistry*.

BODIPYs halogenados podem ser vistos como ótimos materiais de partida, pois possibilitam a funcionalização do fluoróforo aplicando reações de substituição nucleofílica ou de acoplamento cruzado. Uma das abordagens mais utilizadas para esse fim é a halogenação do dipirrometano que, após as etapas de oxidação e complexação, possibilita a obtenção de BODIPYs 3,5-dihalogenados (Esquema 9).<sup>95</sup> Mais recentemente, a síntese de BODIPYs mono halogenados em posições específicas do anel foram descritas. Esses métodos, baseados na utilização de 2-acetil halopirróis, aumentaram consideravelmente o arsenal sintético disponível para o desenho de sondas baseadas nos BODIPYs.<sup>96,97</sup>

As primeiras abordagens para a diversificação das propriedades ópticas do BODIPY se baseavam na utilização de pirróis com extensão de conjugação. A inserção de grupos aromáticos na posição *meso* não é eficiente para esse fim, devido à falta de coplanaridade entre os grupos *meso*-aromáticos e anel BODIPY, sendo que as posições 3 e 5 são as mais exploradas para esse fim. Antes do desenvolvimento de métodos mais modernos para funcionalização direta do BODIPY, derivados 2-estiril pirrol,<sup>98</sup> 2-aryl pirrol,<sup>99,100</sup> isoindólicos, dentre outros pirróis com extensão de conjugação<sup>101</sup>, foram aplicados na síntese de BODIPYs com emissão desviada para o vermelho (Esquema 9).



Esquema 9. Exemplos de abordagens sintéticas visando a modificação do material de partida para a síntese de BODIPYs halogenados e com conjugação estendida.

### 1.5.2 Modificação direta dos BODIPYs

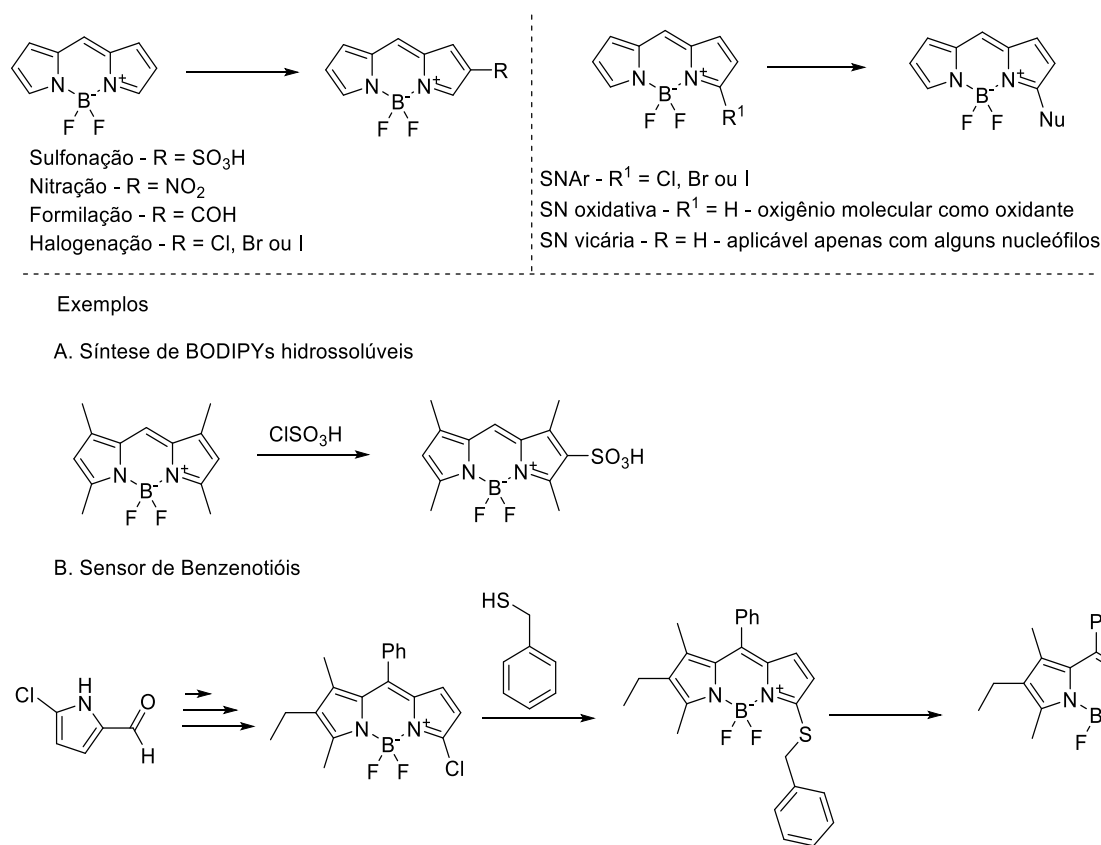
Dentre as poucas publicações envolvendo BODIPYs no início da década 1980, está a descrição do primeiro método de modificação direta de BODIPYs, a reação com cloreto de sulfonila para obtenção de derivados sulfonados.<sup>102</sup> Baseada no ataque dos carbonos 2 e 6 do anel ao eletrófilo em questão, essa reação possibilitou a síntese dos primeiros BODIPYs hidrossolúveis. Esta é uma estratégia ainda muito empregada na obtenção de sondas fluorescentes para aplicações em meio aquoso.

Outras reações de substituição eletrofílica estão descritas na literatura (Esquema 6, esquerda), em geral nas posições 2 e 6 do anel BODIPY.<sup>68</sup> A nitração do BODIPY com ácido nítrico já foi relatada,<sup>103-105</sup> assim como reações de bromação,<sup>106-108</sup> cloração<sup>109</sup> e iodação,<sup>109</sup> que, em geral, ocorrem preferencialmente nas posições 2 e 6. A nucleofilicidade dessas posições também já foi explorada em reações de formilação pelo método de Vilsmeier, que permite a obtenção de sondas formiladas<sup>110</sup>.

A partir de derivados halogenados reações de substituições nucleofílicas são amplamente utilizadas na síntese de sondas fluorescentes. Essas reações ocorrem principalmente, mas não exclusivamente, nas posições 3 e 5 do anel (Esquema 10, direita), tendo sido realizada com nucleófilos de nitrogênio, oxigênio, enxofre e carbono.<sup>95,97,111-114</sup> A alta eletrofilicidade das posições 3 e 5 do anel possibilitam a aplicação de substituição nucleofílica direta no anel não-halogenado, utilizando alguns nucleófilos específicos (substituição nucleofílica vicária)<sup>115,116</sup> ou um oxigênio molecular como aditivo (substituição nucleofílica oxidativa).<sup>117,118</sup>

Para exemplificar a aplicação dos métodos expostos na síntese de compostos funcionais, vale relatar o desenvolvimento de um sensor para benzenotióis, cuja propriedade sensorial se baseia na redução do grupo sulfóxido por benzenotióis. A síntese se inicia com a aplicação de uma

unidade 2-formil pirrólica halogenada, que é aplicada na síntese de um BODIPY halogenada. Em uma reação de substituição nucleofílica com  $\alpha$ -toluenotiol o intermediário tio éter é obtido e, finalmente, oxidado ao sensor em questão.<sup>113</sup> O desenvolvimento dessa sonda fluorescente é um bom exemplo da versatilidade sintética de BODIPYs aplicada à síntese de sondas fluorescentes inovadoras.

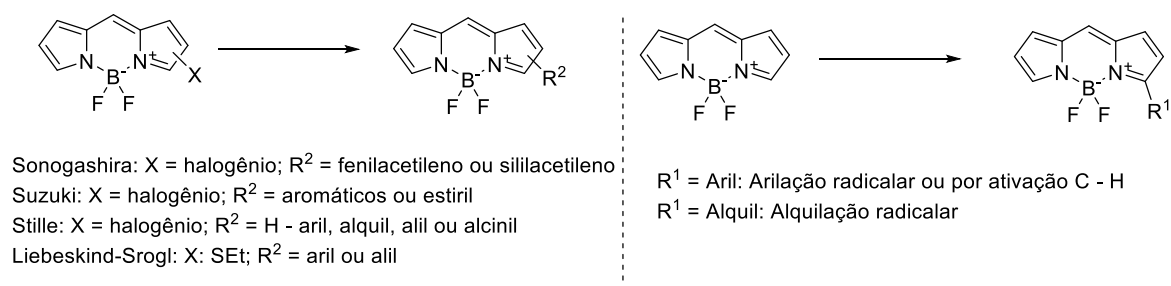


Esquema 10. Exemplo de substituições eletrofílicas (em cima, à esquerda) e nucleofílicas (em cima, à direita) do anel BODIPY.

Além das reações de substituição nucleofílica, os BODIPYs halogenados também são bons substratos para a aplicação de acoplamentos catalisados por metais de transição (Esquema 11). Em geral, é possível encontrar a aplicação dessas reações em todas as posições do anel BODIPY.<sup>97,112</sup> Derivados do fenilacetileno e de sililacetileno foram utilizados com sucesso na inserção de alcinos, através da reação de Sonogashira.<sup>107,112,119,120</sup> A reação de Suzuki, baseada em derivados do ácido borônico, foi utilizada para inserção de grupos aril ou estiril,<sup>106,112,121</sup> enquanto estananas possibilitam também a inserção de grupos alil, alcil e alquil pela reação de Stille.<sup>97,112,122</sup> Outro acoplamento que merece menção, devido ao seu amplo uso na química de BODIPYs, é a reação de Liebeskind-Srogl, na qual derivados tioalquílicos funcionam como pseudohaletos, reagindo tanto com ácidos borônicos quanto com estananas.<sup>123-125</sup>



Outras reações permitem explorar a reatividade das posições 3 e 5 de BODIPYs não-halogenados. Já foi mostrada que a ativação da ligação C – H catalisada por paládio permite a aplicação de brometos aromáticos para inserção de substituintes aromáticos nessas posições do anel.<sup>126</sup> Outra abordagem para arilação direta de BODIPYs é a aplicação de um método radicalar baseado em sais de diazônio,<sup>127</sup> sendo que recentemente um método de alquilação radicalar com trifluorboratos também foi descrito na literatura.<sup>128</sup>

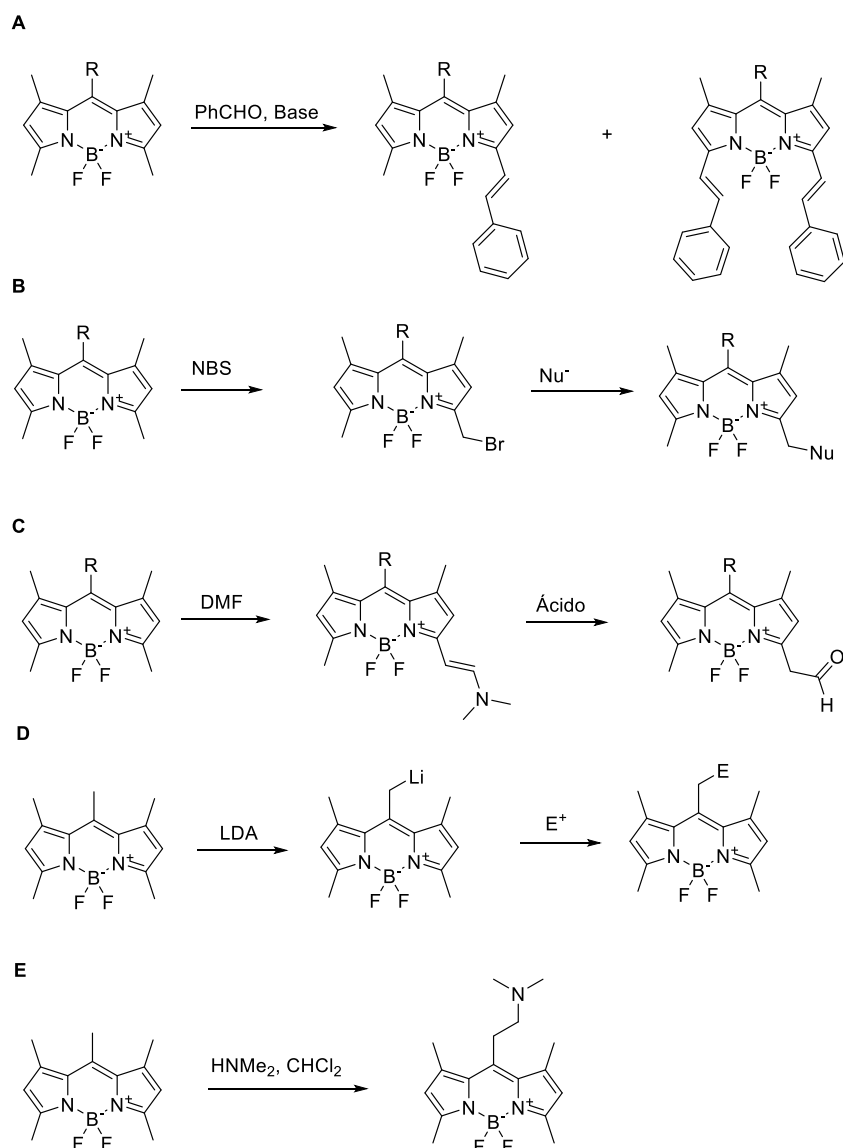


Esquema 11. Exemplos da aplicação de BODIPYs halogenados (esquerda) e não halogenados (direita) para a funcionalização direta do anel.

Muito comumente BODIPYs metilados são preferidos, devido à maior estabilidade e a síntese relativamente mais simples. Ainda que a estrutura de BODIPYs metilados impeça a aplicação de uma série de abordagens para modificação molecular, existem alguns métodos descritos para modificação dessas metilas. Uma das reações aplicadas há mais tempo na modificação de BODIPYs é a condensação das metilas na posição 3 e 5 com aldeídos aromáticos, numa reação similar à condensação de Knoevenagel (Esquema 12A). Ainda que não ocorra com bons rendimentos, esse tipo de condensação é muito explorado, principalmente devido ao efeito batocrômico na emissão dos produtos obtidos, BODIPYs 3,5 estiril-substituídos.<sup>129-131</sup>

A reatividade de metilas ligadas às posições 3 e 5 de BODIPYs também permite a sua bromação direta, de maneira que o brometo formado se mostrou um bom substrato para reações de substituição nucleofílica (Esquema 12B).<sup>132</sup> Outra abordagem é a formação de uma enamina a partir da reação com o dimetil acetal da dimetilformamida, que pode ser convertida a um aldeído<sup>133,134</sup> (Esquema 12C).

Reações em metilas na posição *meso* também estão descritas na literatura. BODIPYs *meso*-metilados reagem com LDA para formação de derivados *meso* metileno litiados (Esquema 12D). Esse tipo de estrutura serve como um bom material de partida para reação de substituição com eletrófilos<sup>135</sup>. Cabe mencionar que *meso* metilas são suscetíveis a uma reação tipo Mannich, na qual aminas secundárias são inseridas nessa posição de BODIPYs (Esquema 12E).<sup>136</sup>

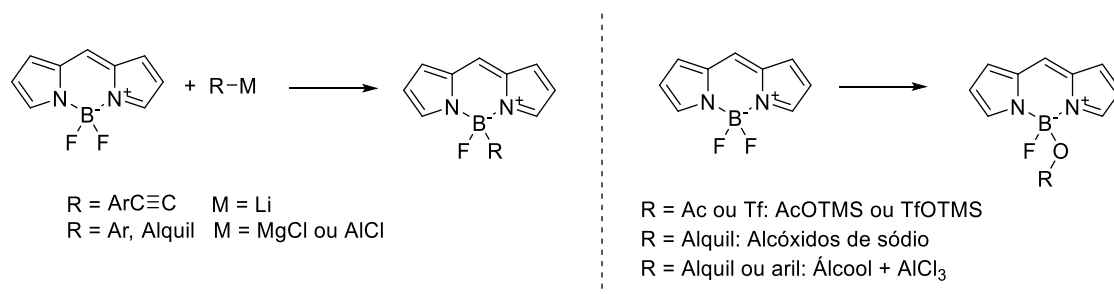


Esquema 12. Modificação química de metilas ligadas ao núcleo BODIPY. A: Reação de Knoevenagel aplicada a metilas de BODIPYs para obtenção de derivados estiril-substituídos. B: Bromação de metilas na posição 3 do BODIPY seguida de substituição por nucleófilos. C: Reação de metilas para formação de uma enamina e conversão a um aldeído. D: Litação de *meso*-metila seguida de substituição nucleofílica. E: Reação tipo Mannich resultando na aaminação de *meso*-metilas.

Além das modificações nos carbonos do anel BODIPY, o centro borônico também pode ser explorado para modificação molecular de BODIPYs (Esquema 13). A partir da reação de BODIPYs com derivados etinil-litiados o átomo de boro pode ser substituído por um grupo benzoetinil.<sup>137,138</sup> A reação de BODIPYs com reagentes de Grignard é um método eficiente para substituição dos átomos de flúor ligado ao boro por grupos alquílicos ou arílicos.<sup>138-140</sup>

Nucleófilos de oxigênio também podem ser utilizados para substituição dos átomos de flúor dos BODIPYs, formando espécies conhecidas como O-BODIPYs. O acetato ou triflato de

trimetil silil, por exemplo, já foram utilizados para realizar a adição de um acetil ou triflato ao centro borônico de BODIPYs.<sup>141,142</sup> Derivados alcóxi ou fenóxi substituídos também podem ser obtidos através da aplicação de alcóxidos de sódio, utilização de álcool na presença de cloreto de alumínio, ou ainda por substituição do grupo triflato.<sup>143,144</sup>



Esquema 13. Métodos para realizar substituições no centro borônico de BODIPYs. São conhecidas reações com nucleófilos de carbono (esquerda) ou oxigênio (direita).

Neste contexto, o interesse desta tese de doutorado foi de explorar a química de BODIPYs no desenvolvimento de sondas fluorescentes. Até recentemente a química de BODIPYs nunca havia sido explorada por grupos de pesquisa brasileiros, tendo sido pioneirizada pelo nosso grupo. Neste trabalho estão descritas as diversas etapas do projeto, desde o estabelecimento dos métodos sintéticos até o desenvolvimento de novas abordagens para a modificação química de BODIPYs, passando pela diversificação estrutural, estudo das propriedades ópticas e potenciais aplicações desse tipo de sondas fluorescentes.

## 4. CONCLUSÕES GERAIS

O foco deste trabalho foi direcionado a uma classe de fluoróforos de grande importância tecnológica cuja obtenção sintética jamais havia sido estudada por grupos de pesquisa no Brasil, os BODIPYs. Nas etapas iniciais do trabalho foram estabelecidos métodos de síntese de BODIPYs a partir de unidades pirrólicas metiladas, utilizando algumas abordagens descritas na literatura para a síntese de **1**, **2**, **3** e **4**. As reações baseadas em pirróis metilados são geralmente mais simples e de fácil purificação pois resultam em menos subprodutos, todavia os materiais de partida necessários são mais dispendiosos. Essas reações iniciais de formação de BODIPYs ocorreram com rendimentos ruins a regulares, similar ao que é geralmente relatado na literatura. Esta foi uma etapa importante para estabelecer métodos até então não disponíveis no grupo de pesquisa, sendo que tais abordagens sintéticas serão utilizadas por outros estudantes envolvidos com a química de BODIPY, bem como os produtos obtidos, que foram explorados como substratos em outras reações de modificação.

Uma vez estabelecidos métodos de síntese de BODIPYs, uma pequena biblioteca de fluoróforos foi obtida a partir da aplicação do método de Lindsey com diversos aldeídos aromáticos. Muitos dos compostos obtidos nessa etapa foram desenhados vislumbrando aplicações tecnológicas específicas, e passaram por estudos fotofísicos. Foi sintetizado um composto substituído com grupo piperidina **5**, que se mostrou um fluoróforo aplicável como marcador de complexos de rutênio além de ter sido mostrada sua aplicação como sensor de pH e de cátion férrico. O composto **10**, com um grupo catecol na posição *meso*, é um bom sensor de polaridade, de pH e de cátions metálicos, além da sua conhecida aplicação como sensor de oxidação. O estudo do comportamento composto aminado **11**, sintetizado a partir da redução do derivado nitrado **7**, também mostrou a influência do pH e da polaridade de solventes sobre suas propriedades ópticas.

Apesar da diversidade de compostos obtida aplicando a reação de Lindsey, o espectro de emissão de fluorescência dos compostos era muito similar, o que nos motivou a aplicar métodos de modificação química de BODIPYs para a diversificação fotofísica da biblioteca de compostos. Nessa etapa do projeto, com a colaboração com um grupo de pesquisa na Bélgica, foram transferidos, ao nosso grupo de pesquisa, diversos métodos de síntese e modificação estrutural de BODIPYs. Uma das tecnologias mais úteis foi a síntese de BODIPYs a partir do pirrol, que nos permitiu aumentar a escala da obtenção de BODIPYs utilizando materiais de partida menos dispendiosos, como mostrado para a síntese dos compostos **15** e **16**. A síntese de BODIPYs halogenados por diversas abordagens também foi um avanço importante, como nas

reações aplicadas na síntese dos derivados **19**, **20**, **22** e **23**.

A substituição nucleofílica de BODIPYs halogenados foi utilizada na síntese de sondas fluorescentes com propriedades químicas e ópticas diversas, exemplificado pelos compostos **24** – **36**, muitos dos quais inéditos na literatura. Reações de condensação e acoplamento também foram exploradas visando diversificar as propriedades fotofísicas de BODIPYs, como a condensação de Knoevenagel, reação de Suzuki, reação de Sonogashira, arilação radicalar e reação de Trofimov. Diversos compostos com propriedades fotofísicas particulares foram obtidos, como os derivados **39** – **57** que, com algumas exceções, não haviam sido relatados na literatura.

Outro aspecto importante deste projeto foi o desenvolvimento de um novo método de modificação química de BODIPYs, a tiocianação direta, baseada num método simples, de fácil purificação, rápido e com bons rendimentos. Os resultados obtidos mostraram que BODIPYs metilados são bons substratos para essa reação, tendo sido explorados na síntese dos compostos **58** – **65**, todos inéditos. Interessantemente, ausência de metilas nos compostos **15** – **17** impediu a aplicação da reação em questão, todavia, a inserção do grupo piperidina, doador de elétrons, para a formação de **24**, reestabeleceu a reatividade resultando na formação do derivado inédito **66**. Vale ressaltar que foi observada a tiocianação de BODIPYs substituídos nas posições 3 e/ou 5 pelos grupos morfolino, metóxi ou tiopropil, possibilitando a síntese dos derivados **67** – **74**. Ao nosso ver, os dados obtidos são condizentes com um mecanismo de substituição eletrofílica, no qual a oxidação do tiocianato resulta na formação *in situ* de espécies eletrofílicas que reagem com o carbono nucleofílico de BODIPYs.

Por fim, vale salientar a aplicação de BODIPYs tiocianados como precursores na síntese de derivados tioalquilados. Essa conversão pôde ser realizada na presença de um álcool e de trifetilfosfina, todavia, os derivados **75** -**79** foram obtidos com rendimentos baixos. Ainda assim, mostramos a propriedades peculiares desses compostos, como o desvio batocrômico e alargamento do espectro de fluorescência, resultando em um desvio de Stokes mais pronunciado.

## 6. REFERÊNCIAS

1. VALEUR, B.; BERBERAN-SANTOS, M. N. **Molecular Fluorescence: Principles and Applications**. John Wiley & Sons, 2012.
2. WIEDEMANN, E. Ueber Fluorescenz und Phosphorescenz I. Abhandlung. **Annalen der Physik**, v. 270, n. 7, p. 446-463, 1888.
3. LAKOWICZ, J. R. (Ed.). **Principles of Fluorescence Spectroscopy**. Springer Science & Business Media, 2013.
4. ACUNA, A. U.; AMAT-GUERRI, F. Early history of solution fluorescence: the Lignum nephriticum of Nicolás Monardes. In: **Fluorescence of Supermolecules, Polymers, and Nanosystems**. Springer Berlin Heidelberg, 2008, p. 3-20.
5. HERSCHEL, J. F. W. On a Case of Superficial Colour Presented by a Homogeneous Liquid Internally Colourless. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London**, p. 143-145, 1845.
6. STOKES, G. G. On the change of refrangibility of light. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London**, p. 463-562, 1852.
7. JABLONSKI, A. Efficiency of anti-Stokes fluorescence in dyes. **Nature**, v. 131, n. 839-840, p. 21, 1933.
8. NICKEL, B. From the Perrin diagram to the Jablonski diagram. **EPA Newsletter - European Photochemistry Association**, p. 9-38, 1996.
9. KASHA, M. Characterization of electronic transitions in complex molecules. **Discussions of the Faraday Society**, v. 9, p. 14-19, 1950
10. O'HAVER, T. C. Development of luminescence spectrometry as an analytical tool. **Journal of Chemical Education**, v. 55, n. 7, p. 423, 1978.
11. STOKES, G. G. XXXIV.—On the application of the optical properties of bodies to the detection and discrimination of organic substances. **Journal of the Chemical Society**, v. 17, p. 304-318, 1864.
12. GOPPELSRÖDER, F. Ueber eine fluorescirende Substanz aus dem Kubaholze (Fortsetzung) und über Fluorescenzanalyse. **Journal für Praktische Chemie**, v. 104, n. 1, p. 10-27, 1868.
13. MARINI, Alberto et al. What is solvatochromism?. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 114, n. 51, p. 17128-17135, 2010.
14. REICHARDT, C.. Solvatochromic dyes as solvent polarity indicators. **Chemical Reviews**, v. 94, n. 8, p. 2319-2358, 1994.
15. GEDDES, C. D. Optical halide sensing using fluorescence quenching: theory, simulations and applications-a review. **Measurement Science and Technology**, v. 12, n. 9, p. R53, 2001.
16. FABBRIZZI, L. et al. Sensing of transition metals through fluorescence quenching or enhancement. A review. **Analyst**, v. 121, n. 12, p. 1763-1768, 1996.

17. WU, P. G.; BRAND, L. Resonance energy transfer: methods and applications. **Analytical Biochemistry**, v. 218, n. 1, p. 1-13, 1994.
18. SABANAYAGAM, C. R.; EID, J. S.; MELLER, A. Using fluorescence resonance energy transfer to measure distances along individual DNA molecules: Corrections due to nonideal transfer. **The Journal of Chemical Physics**, v. 122, n. 6, 061103, 2005.
19. JARES-ERIJMAN, E. A.; JOVIN, T. M. FRET imaging. **Nature Biotechnology**, v. 21, n. 11, p. 1387-1395, 2003.
20. WARNER, I. M.; PATONAY, G.; THOMAS, M. P. Multidimensional luminescence measurements. **Analytical Chemistry**, v. 57, n. 3, p. 463A-483A, 1985.
21. LEE, M. H.; KIM, J. S.; SESSLER, J. L. Small molecule-based ratiometric fluorescence probes for cations, anions, and biomolecules. **Chemical Society Reviews**, v. 44, p. 4185-4191, 2015.
22. GRADINARU, C. C. et al. Fluorescence anisotropy: from single molecules to live cells. **Analyst**, v. 135, n. 3, p. 452-459, 2010.
23. JAMESON, D. M.; ROSS, J. A. Fluorescence polarization/anisotropy in diagnostics and imaging. **Chemical Reviews**, v. 110, n. 5, p. 2685-2708, 2010.
24. MASTERS, B. R. The Development of Fluorescence Microscopy. In: **Encyclopedia of Life Sciences (ELS)**. John Wiley & Sons, Chichester, 2010
25. COONS, A. H.; KAPLAN, M. H. Localization of antigen in tissue cells II. Improvements in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 91, n. 1, p. 1-13, 1950.
26. SINGH, A.; GOPINATHAN, K. P. Confocal microscopy: A powerful technique for biological research. **Current Science**, v. 74, n. 10, p. 841-851, 1998.
27. DENK, W.; STRICKLER, J. H.; WEBB, W. W. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. **Science**, v. 248, n. 4951, p. 73-76, 1990.
28. OHEIM, M. et al. Principles of two-photon excitation fluorescence microscopy and other nonlinear imaging approaches. **Advanced drug delivery reviews**, v. 58, n. 7, p. 788-808, 2006.
29. OIDA, T.; SAKO, Y.; KUSUMI, A.. Fluorescence lifetime imaging microscopy (flimscopy). Methodology development and application to studies of endosome fusion in single cells. **Biophysical Journal**, v. 64, n. 3, p. 676, 1993.
30. LI, D. D.-U. et al. Time-domain fluorescence lifetime imaging techniques suitable for solid-state imaging sensor arrays. **Sensors**, v. 12, n. 5, p. 5650-5669, 2012.
31. SOINI, E.; HEMMILÄ, I. Fluoroimmunoassay: present status and key problems. **Clinical Chemistry**, v. 25, n. 3, p. 353-361, 1979.
32. HEMMILÄ, I. Fluoroimmunoassays and immunofluorometric assays. **Clinical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 359-370, 1985.
33. NIELSEN, K. et al. Fluorescence polarization immunoassay: detection of antibody to Brucella abortus. **Methods**, v. 22, n. 1, p. 71-76, 2000.

34. SANCHEZ, F. G.; NAVAS, A.; LOVILLO, J. Phase-modulation fluorescence lifetime immunoassay of dichlorprop. **Analytical Biochemistry**, v. 214, n. 2, p. 359-365, 1993.
35. YOUN, H. J. et al. Fluorescence Energy Transfer Immunoassay Based on a Long-Lifetime Luminescent Metal-Ligand Complex. **Analytical Biochemistry**, v. 232, n. 1, p. 24-30, 1995.
36. HERZENBERG, L. A. et al. The history and future of the fluorescence activated cell sorter and flow cytometry: a view from Stanford. **Clinical Chemistry**, v. 48, n. 10, p. 1819-1827, 2002.
37. HEID, C. A. et al. Real time quantitative PCR. **Genome Research**, v. 6, n. 10, p. 986-994, 1996.
38. KAUFMAN, T. S.; RUVEDA, E. A. The quest for quinine: those who won the battles and those who won the war. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 44, n. 6, p. 854-885, 2005.
39. KYLE, R. A.; SHAMPE, M. A. Discoverers of quinine. **JAMA: The Journal of the American Medical Association**, v. 229, n. 4, p. 462, 1974.
40. LAVIS, L. D.; RAINES, R. T. Bright ideas for chemical biology. **ACS Chemical Biology**, v. 3, n. 3, p. 142-155, 2008.
41. UENO, T.; NAGANO, T. Fluorescent probes for sensing and imaging. **Nature Methods**, v. 8, n. 8, p. 642-645, 2011.
42. RICHARDSON, F. S. Terbium (III) and europium (III) ions as luminescent probes and stains for biomolecular systems. **Chemical Reviews**, v. 82, n. 5, p. 541-552, 1982.
43. YUAN, J.; WANG, G. Lanthanide complex-based fluorescence label for time-resolved fluorescence bioassay. **Journal of Fluorescence**, v. 15, n. 4, p. 559-568, 2005.
44. MICHALET, X. et al. Quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics. **Science**, v. 307, n. 5709, p. 538-544, 2005.
45. JAMIESON, T. et al. Biological applications of quantum dots. **Biomaterials**, v. 28, n. 31, p. 4717-4732, 2007.
46. KREMERS, G.-J. et al. Fluorescent proteins at a glance. **Journal of Cell Science**, v. 124, n. 2, p. 157-160, 2011.
47. CHUDAKOV, D. M. et al. Fluorescent proteins and their applications in imaging living cells and tissues. **Physiological Reviews**, v. 90, n. 3, p. 1103-1163, 2010.
48. DEMCHENKO, A. P. **Introduction to Fluorescence Sensing**. Springer Science & Business Media, 2008.
49. MIKHEEV, Y. A.; GUSEVA, L. N.; ERSHOV, Y. A. The nature of chromaticity of triphenylmethane, xanthene, phthalocyanine, and thiazine dyes. **Russian Journal of Physical Chemistry A**, v. 84, n. 10, p. 1778-1791, 2010.
50. BAEYER, A.. Ueber eine neue Klasse von Farbstoffen. **Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft**, v. 4, n. 2, p. 555-558, 1871.
51. NOELTING, E.; DZIEWOŃSKI, K. Zur Kenntniss der Rhodamine. **Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft**, v. 38, n. 3, p. 3516-3527, 1905.
52. CHEN, X. et al. Fluorescent chemosensors based on spiroring-opening of xanthenes and related



- derivatives. **Chemical Reviews**, v. 112, n. 3, p. 1910-1956, 2011.
53. SETHNA, S. M.; SHAH, N. M. The Chemistry of Coumarins. **Chemical Reviews**, v. 36, n. 1, p. 1-62, 1945.
54. WAGNER, B. D. The use of coumarins as environmentally-sensitive fluorescent probes of heterogeneous inclusion systems. **Molecules**, v. 14, n. 1, p. 210-237, 2009.
55. PERKIN, W. H. VI. – On the artificial production of coumarin and formation of its homologues. **Journal of the Chemical Society**, v. 21, p. 53-63, 1868.
56. PECHMANN, H. V.; DUISBERG, C. Neue Bildungsweise der Cumarine. Synthese des Daphnetins. **Chem. Ber.**, v. 17, p. 929-936, 1884.
57. KATERINOPOULOS, H. E. The coumarin moiety as chromophore of fluorescent ion indicators in biological systems. **Current Pharmaceutical Design**, v. 10, n. 30, p. 3835-3852, 2004.
58. RODRIGUEZ, J. J.; Santana; S. C. P.. Fluorescence techniques for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in marine environment: an overview. **Analisis**, v. 28, n. 8, p. 710-717, 2000.
59. HARRIS, F. M.; BEST, K. B.; BELL, J. D. Use of laurdan fluorescence intensity and polarization to distinguish between changes in membrane fluidity and phospholipid order. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1565, n. 1, p. 123-128, 2002.
60. STRYER, L. The interaction of a naphthalene dye with apomyoglobin and apohemoglobin: a fluorescent probe of non-polar binding sites. **Journal of Molecular Biology**, v. 13, n. 2, p. 482-495, 1965.
61. HAWE, A.; SUTTER, M.; JISKOOT, W. Extrinsic fluorescent dyes as tools for protein characterization. **Pharmaceutical Research**, v. 25, n. 7, p. 1487-1499, 2008.
62. DOJA, M. Q. The Cyanine Dyes. **Chemical Reviews**, v. 11, n. 3, p. 273-321, 1932.
63. MISHRA, A. et al. Cyanines during the 1990s: a review. **Chemical Reviews**, v. 100, n. 6, p. 1973-2012, 2000.
64. ERNST, L. A. et al. Cyanine dye labeling reagents for sulfhydryl groups. **Cytometry**, v. 10, n. 1, p. 3-10, 1989.
65. BOENS, N.; LEEN, V.; DEHAEN, W. Fluorescent indicators based on BODIPY. **Chemical Society Reviews**, v. 41, n. 3, p. 1130-1172, 2012.
66. TREIBS, A.; KREUZER, F. H.. Difluoroboryl-Komplexe von Di-und Tripyrrylmethenen. **Justus Liebigs Annalen der Chemie**, v. 718, n. 1, p. 208-223, 1968.
67. MOLECULAR PROBES Inc. Richard P. Haugland, Hee C. Kang. **Chemically Reactive Dipyrrrometheneboron Difluoride Dyes**. U.S. Patent n. 4,774,339, 27 set. 1988.
68. ULRICH, G.; ZIESSEL, R.; HARRIMAN, A. The chemistry of fluorescent bodipy dyes: versatility unsurpassed. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 47, n. 7, p. 1184-1201, 2008.
69. LOUDET, A.; BURGESS, K. BODIPY dyes and their derivatives: syntheses and spectroscopic properties. **Chemical Reviews**, v. 107, n. 11, p. 4891-4932, 2007.

70. WOOD, T. E.; THOMPSON, A. Advances in the chemistry of dipyrrens and their complexes. **Chemical Reviews**, v. 107, n. 5, p. 1831-1861, 2007.
71. OSORIO-MARTÍNEZ, C. A. et al. 8-AminoBODIPYs: cyanines or hemicyanines? The effect of the coplanarity of the amino group on their optical properties. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 77, n. 12, p. 5434-5438, 2012.
72. FRATH, D. et al. Luminescent Materials: Locking  $\pi$ -Conjugated and Heterocyclic Ligands with Boron (III). **Angewandte Chemie International Edition**, v. 53, n. 9, p. 2290-2310, 2014.
73. QIN, W. et al. Photophysical properties of borondipyrromethene analogues in solution. **The Journal of Physical Chemistry A**, v. 109, n. 33, p. 7371-7384, 2005.
74. BARUAH, M. et al. Solvent and pH dependent fluorescent properties of a dimethylaminostyryl borondipyrromethene dye in solution. **The Journal of Physical Chemistry A**, v. 110, n. 18, p. 5998-6009, 2006.
75. KAROLIN, J. et al. Fluorescence and absorption spectroscopic properties of dipyrrometheneboron difluoride (BODIPY) derivatives in liquids, lipid membranes, and proteins. **Journal of the American Chemical Society**, v. 116, n. 17, p. 7801-7806, 1994.
76. YOGO, T. et al. Highly efficient and photostable photosensitizer based on BODIPY chromophore. **Journal of the American Chemical Society**, v. 127, n. 35, p. 12162-12163, 2005.
77. WU, W.; CUI, X.; ZHAO, J.. Hetero Bodipy-dimers as heavy atom-free triplet photosensitizers showing a long-lived triplet excited state for triplet-triplet annihilation upconversion. **Chemical Communications**, v. 49, n. 79, p. 9009-9011, 2013.
78. JOULE, J. A.; MILLS, Keith. **Heterocyclic Chemistry**. John Wiley & Sons, 2008.
79. LEE, C.-H.; LINDSEY, J. S. One-flask synthesis of meso-substituted dipyrromethanes and their application in the synthesis of trans-substituted porphyrin building blocks. **Tetrahedron**, v. 50, n. 39, p. 11427-11440, 1994.
80. WAGNER, R. W.; LINDSEY, J. S. Boron-dipyrromethene dyes for incorporation in synthetic multi-pigment light-harvesting arrays. **Pure and Applied Chemistry**, v. 68, n. 7, p. 1373-1380, 1996.
81. LITTLER, B. J. et al. Refined synthesis of 5-substituted dipyrromethanes. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 64, n. 4, p. 1391-1396, 1999.
82. WANG, D. et al. Carboxyl BODIPY dyes from bicarboxylic anhydrides: one-pot preparation, spectral properties, photostability, and biolabeling. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 74, n. 20, p. 7675-7683, 2009.
83. KIM, H. et al. Synthesis and spectroscopic properties of a new 4-bora-3a, 4a-diaza-s-indacene (BODIPY®) dye. **Chemical Communications**, n. 18, p. 1889-1890, 1999.
84. WAN, C.-W. et al. Anthracene-BODIPY cassettes: syntheses and energy transfer. **Chemistry-A European Journal**, v. 9, n. 18, p. 4430-4441, 2003.
85. ONO, N. et al. A new synthesis of functional dyes from 2-acenaphtho [1, 2-c] pyrrole.

- Heterocycles**, v. 61, n. 1, p. 433-447, 2003.
86. WU, L.; BURGESS, K.. A new synthesis of symmetric boraindacene (BODIPY) dyes. **Chemical Communications**, n. 40, p. 4933-4935, 2008.
87. MOON, S. Y. et al. New Hg<sup>2+</sup>-selective chromo- and fluoroionophore based upon 8-hydroxyquinoline. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 69, n. 1, p. 181-183, 2004.
88. GABE, Y. et al. Highly sensitive fluorescence probes for nitric oxide based on boron dipyrromethene chromophore rational design of potentially useful bioimaging fluorescence probe. **Journal of the American Chemical Society**, v. 126, n. 10, p. 3357-3367, 2004.
89. BARUAH, M. et al. BODIPY-based hydroxyaryl derivatives as fluorescent pH probes. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 70, n. 10, p. 4152-4157, 2005.
90. LI, L.; NGUYEN, B.; BURGESS, K.. Functionalization of the 4, 4-difluoro-4-bora-3a, 4a-diaza-s-indacene (BODIPY) core. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 18, n. 10, p. 3112-3116, 2008.
91. LI, Z.; BITTMAN, R.. Synthesis and spectral properties of cholesterol- and FTY720-containing boron dipyrromethene dyes. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 72, n. 22, p. 8376-8382, 2007.
92. INOUE, Naoko et al. Novel fluorescent probe for analysis of hydroperoxides based on boron dipyrromethane fluorophore. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 73, n. 5, p. 1215-1217, 2009.
93. HANSEN, A. M. et al. Tunable BODIPY derivatives amenable to 'click' and peptide chemistry. **Tetrahedron**, v. 69, n. 39, p. 8527-8533, 2013.
94. WEST, R.; PANAGABKO, C.; ATKINSON, J. Synthesis and characterization of BODIPY- $\alpha$ -tocopherol: a fluorescent form of vitamin E. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 75, n. 9, p. 2883-2892, 2010.
95. ROHAND, T. et al. Functionalisation of fluorescent BODIPY dyes by nucleophilic substitution. **Chemical Communications**, n. 3, p. 266-268, 2006.
96. LEEN, V. et al. A versatile, modular synthesis of monofunctionalized BODIPY dyes. **Chemical Communications**, n. 30, p. 4515-4517, 2009.
97. LEEN, V. et al. 2- and 3-Monohalogenated BODIPY Dyes and Their Functionalized Analogues: Synthesis and Spectroscopy. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 2011, n. 23, p. 4386-4396, 2011.
98. RURACK, K.; KOLLMANNBERGER, M.; DAUB, J.. A highly efficient sensor molecule emitting in the near infrared (NIR): 3, 5-distyryl-8-(p-dimethylaminophenyl) difluoroboradiaza-s-indacene. **New Journal of Chemistry**, v. 25, n. 2, p. 289-292, 2001.
99. THORESEN, L. H. et al. Synthesis of 3, 5-Diaryl-4, 4-Difluoro-4-Bora-3a, 4a-Diaza-S-Indacene (Bodipy) Dyes. **Synlett**, n. 11, p. 1276-1278, 1998.
100. BURGHART, A. et al. 3, 5-Diaryl-4, 4-difluoro-4-bora-3a, 4a-diaza-s-indacene (BODIPY) dyes: synthesis, spectroscopic, electrochemical, and structural properties. **The Journal of Organic**

- Chemistry**, v. 64, n. 21, p. 7813-7819, 1999.
101. CHEN, J. et al. 4, 4-Difluoro-4-bora-3a, 4a-diaza-s-indacene (BODIPY) dyes modified for extended conjugation and restricted bond rotations. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 65, n. 10, p. 2900-2906, 2000.
  102. WORIES, H. J. et al. A novel water-soluble fluorescent probe: Synthesis, luminescence and biological properties of the sodium salt of the 4-sulfonato-3, 3', 5, 5'-tetramethyl-2, 2'-pyrromethene-1, 1'-BF<sub>2</sub> complex. **Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas**, v. 104, n. 11, p. 288-291, 1985.
  103. PAVLOPOULOS, T.e G. et al. Laser action from 2, 6, 8-position trisubstituted 1, 3, 5, 7-tetramethylpyrromethene-BF<sub>2</sub> complexes: part 1. **Applied Optics**, v. 29, n. 27, p. 3885-3886, 1990.
  104. ESNAL, I. et al. Nitro and amino BODIPYS: crucial substituents to modulate their photonic behavior. **RSC Advances**, v. 3, n. 5, p. 1547-1556, 2013.
  105. GUPTA, M. et al. Rational Design of Boradiazaindacene (BODIPY)-Based Functional Molecules. **Chemistry-A European Journal**, v. 19, n. 52, p. 17766-17772, 2013.
  106. JIAO, L. et al. Regioselective stepwise bromination of boron dipyrromethene (BODIPY) dyes. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 76, n. 24, p. 9988-9996, 2011.
  107. LI, X.; HUANG, S.; HU, Y. Diversity-oriented derivatization of BODIPY based on regioselective bromination. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 10, n. 12, p. 2369-2372, 2012.
  108. WANG, L. et al. Regioselective 2, 6-dihalogenation of BODIPYs in 1, 1, 1, 3, 3, 3-hexafluoro-2-propanol and preparation of novel meso-alkyl polymeric BODIPY dyes. **RSC Advances**, v. 3, n. 24, p. 9219-9222, 2013.
  109. ORTIZ, M. J. et al. Synthesis and functionalization of new polyhalogenated BODIPY dyes. Study of their photophysical properties and singlet oxygen generation. **Tetrahedron**, v. 68, n. 4, p. 1153-1162, 2012.
  110. ZHU, S. et al. Controlled Knoevenagel reactions of methyl groups of 1,3,5,7-tetramethyl BODIPY dyes for unique BODIPY dyes. **RSC Advances**, v. 2, n. 2, p. 404-407, 2012.
  111. FRON, E. et al. Synthesis and photophysical characterization of chalcogen substituted BODIPY dyes. **New Journal of Chemistry**, v. 33, n. 7, p. 1490-1496, 2009.
  112. LEEN, Volker et al. Synthesis of meso-halogenated BODIPYs and access to meso-substituted analogues. **Organic Letters**, v. 14, n. 24, p. 6150-6153, 2012.
  113. ZHAO, C. et al. BODIPY-based sulfoxide: Synthesis, photophysical characterization and response to benzenethiols. **Dyes and Pigments**, v. 96, n. 2, p. 328-332, 2013.
  114. LEEN, V. et al. 1,7-Disubstituted boron dipyrromethene (BODIPY) dyes: synthesis and spectroscopic properties. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 76, n. 20, p. 8168-8176, 2011.
  115. KNIGHT, J. G.; ALNOMAN, R. B.; WADDELL, P. G. Synthesis of 3-aminoBODIPY dyes via

- copper-catalyzed vicarious nucleophilic substitution of 2-halogeno derivatives. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 13, n. 12, p. 3819-3829, 2015.
116. LEEN, V. et al. Vicarious nucleophilic substitution of  $\alpha$ -hydrogen of BODIPY and its extension to direct ethenylation. **Organic Letters**, v. 13, n. 6, p. 1470-1473, 2011.
117. ZHANG, M. et al. Synthesis of pyrrolyldipyrrinato BF<sub>2</sub> complexes by oxidative nucleophilic substitution of boron dipyrromethene with pyrrole. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 10, n. 10, p. 2139-2145, 2012.
118. LEEN, V. et al. Direct functionalization of BODIPY dyes by oxidative nucleophilic hydrogen substitution at the 3-or 3, 5-positions. **Chemical Communications**, v. 46, n. 27, p. 4908-4910, 2010.
119. WANG, H. et al. Functionalization of 3, 5, 8-Trichlorinated BODIPY Dyes. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 79, n. 21, p. 10342-10352, 2014.
120. WIRTZ, M. et al. Two-color emissive probes for click reactions. **Chemical Communications**, v. 50, n. 84, p. 12694-12697, 2014.
121. LAKSHMI, V.; RAVIKANTH, M. Polyarylated boron-dipyrromethenes containing three different types of aryl groups. **RSC Advances**, v. 4, n. 84, p. 44327-44336, 2014.
122. AHRENS, J. et al. Conjugated BODIPY DYEimers by Metathesis Reactions. **Chemistry-A European Journal**, v. 20, n. 10, p. 2901-2912, 2014.
123. HAN, J. et al. 3-and 5-Functionalized BODIPYs via the Liebeskind-Srogl reaction. **Org. Biomol. Chem.**, v. 7, n. 1, p. 34-36, 2008.
124. LAGER, E. et al. Novel meso-polyarylamine-BODIPY hybrids: synthesis and study of their optical properties. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 74, n. 5, p. 2053-2058, 2009.
125. BETANCOURT-MENDIOLA, L. et al. Scope and Limitations of the Liebeskind-Srogl Cross-Coupling Reactions Involving the Biellmann BODIPY. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 80, n. 11, p. 5771-57782, 2015.
126. VERBELEN, Bram et al. Direct palladium-catalysed C-H arylation of BODIPY dyes at the 3- and 3, 5-positions. **Chemical Communications**, v. 48, n. 73, p. 9129-9131, 2012.
127. VERBELEN, B. et al. Radical C-H Arylation of the BODIPY Core with Aryldiazonium Salts: Synthesis of Highly Fluorescent Red-Shifted Dyes. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 127, n. 15, p. 4695-4699, 2015.
128. VERBELEN, B. et al. Radical C-H Alkylation of BODIPY Dyes Using Potassium Trifluoroborates or Boronic Acids. **Chemistry-A European Journal**, v. 21, n. 36, p. 12667-12675, 2015.
129. RURACK, K.; KOLLMANNNSBERGER, M.; DAUB, J.. Molecular switching in the near infrared (NIR) with a functionalized boron-dipyrromethene dye. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 40, n. 2, p. 385-387, 2001.
130. COSKUN, A.; AKKAYA, E. U. Difluorobora-s-diazaindacene dyes as highly selective

- dosimetric reagents for fluoride anions. **Tetrahedron Letters**, v. 45, n. 25, p. 4947-4949, 2004.
131. COSKUN, A.; AKKAYA, E. U. Ion sensing coupled to resonance energy transfer: a highly selective and sensitive ratiometric fluorescent chemosensor for Ag (I) by a modular approach. **Journal of the American Chemical Society**, v. 127, n. 30, p. 10464-10465, 2005.
132. ULRICH, G.; ZIESSEL, R.; HAEFELE, A. A general synthetic route to 3, 5-substituted boron dipyrromethenes: applications and properties. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 77, n. 9, p. 4298-4311, 2012.
133. SHANDURA, M. P.; YAKUBOVSKYI, V. P.; KOVTUN, Y. P. (4, 4-Difluoro-4-bora-3a, 4a,-diazas-indacen-3-yl) acetaldehyde: Synthesis and chemical properties. **Journal of Heterocyclic Chemistry**, v. 46, n. 6, p. 1386-1391, 2009.
134. SHANDURA, M. P.; YAKUBOVSKYI, V. P.; KOVTUN, Y. P. 3, 5-Bis (acetaldehyde) substituted BODIPY. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 11, n. 5, p. 835-841, 2013.
135. PALAO, E. et al. Selective Lateral Lithiation of Methyl BODIPYs: Synthesis, Photophysics, and Electrochemistry of New Meso Derivatives. **Organic Letters**, v. 16, n. 17, p. 4364-4367, 2014.
136. YANG, L.; YAN, H. A Mannich-Type Reaction at the meso-Methyl Position of the BODIPY Fluorophore. **Synlett**, n. 10, p. 1526-1528, 2012.
137. ULRICH, G. et al. Pyrromethene dialkynyl borane complexes for "Cascatelle" energy transfer and protein labeling. **Angewandte Chemie**, v. 117, n. 24, p. 3760-3764, 2005.
138. ULRICH, G. et al. New fluorescent aryl- or ethynylaryl-boron-substituted indacenes as promising dyes. **New Journal of Chemistry**, v. 30, n. 7, p. 982-986, 2006.
139. MORE, A. B. et al. Masking and Demasking Strategies for the BF<sub>2</sub>-BODIPYs as a Tool for BODIPY Fluorophores. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 79, n. 22, p. 10981-10987, 2014.
140. GOZE, C. et al. Synthesis and photophysical properties of borondipyrromethene dyes bearing aryl substituents at the boron center. **Journal of the American Chemical Society**, v. 128, n. 31, p. 10231-10239, 2006.
141. JIANG, X.-D. et al. Development of mono-and di-AcO substituted BODIPYs on the boron center. **Organic Letters**, v. 14, n. 1, p. 248-251, 2011.
142. COURTIS, A. M. et al. Monoalkoxy BODIPYs. A Fluorophore Class for Bioimaging. **Bioconjugate Chemistry**, v. 25, n. 6, p. 1043-1051, 2014.
143. GABE, Y. et al. Tunable design strategy for fluorescence probes based on 4-substituted BODIPY chromophore: improvement of highly sensitive fluorescence probe for nitric oxide. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 386, n. 3, p. 621-626, 2006.
144. BRIZET, B. et al. Boron functionalization of BODIPY by various alcohols and phenols. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 11, n. 44, p. 7729-7737, 2013.
145. KENNEDY, D. P.; KORMOS, C. M.; BURDETTE, S. C. FerriBRIGHT: a rationally designed fluorescent probe for redox active metals. **Journal of the American Chemical Society**, v. 131, n. 24, p. 8578-8586, 2009.

146. KIM, T.-I. et al. Visualization of tyrosinase activity in melanoma cells by a BODIPY-based fluorescent probe. **Chemical Communications**, v. 47, n. 47, p. 12640-12642, 2011.
147. DOLMAN, D. M. et al. A quantitative method for the estimation of parthenolide and other sesquiterpene lactones containing  $\alpha$ -methylenebutyrolactone functions present in feverfew, *Tanacetum parthenium*. **Phytochemical Analysis**, v. 3, n. 1, p. 26-31, 1992.
148. HAUGLAND, Richard P. **The Handbook: A guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies**. Molecular probes, 2005.
149. ZIESSEL, R. et al. Isocyanate-, isothiocyanate-, urea-, and thiourea-substituted boron dipyrromethene dyes as fluorescent probes. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 71, n. 8, p. 3093-3102, 2006.
150. MALATESTI, N. et al. Isothiocyanato Boron Dipyrromethenes – The First BODIPY Analogues of Fluorescein Isothiocyanate. **Photochemistry and Photobiology**, v. 82, n. 3, p. 746-749, 2006.
151. PRIETO, J. B. et al. Photophysical properties of a new 8-phenyl analogue of the laser dye PM567 in different solvents: internal conversion mechanisms. **Chemical Physics Letters**, v. 385, n. 1, p. 29-35, 2004.
152. LI, F. et al. Design, synthesis, and photodynamics of light-harvesting arrays comprised of a porphyrin and one, two, or eight boron-dipyrin accessory pigments. **Journal of the American Chemical Society**, v. 120, n. 39, p. 10001-10017, 1998.
153. DE REZENDE, L. C. D. et al. Synthesis, Photophysical Properties and Solvatochromism of Meso-Substituted Tetramethyl BODIPY Dyes. **Journal of Fluorescence**, v. 24, n. 1, p. 257-266, 2014.
154. KEAWWANGCHAI, T.; MORAKOT, N.; WANNO, B. Fluorescent sensors based on BODIPY derivatives for aluminium ion recognition: an experimental and theoretical study. **Journal of Molecular Modeling**, v. 19, n. 3, p. 1435-1444, 2013.
155. REZENDE, L. C. D.; EMERY, F. S. Fluorescence Quenching of Two meso-Substituted Tetramethyl BODIPY Dyes by Fe (III) Cation. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 26, n. 5, p. S1-S17, 2015.
156. ROHAND, T. et al. Efficient synthesis of aryldipyrromethanes in water and their application in the synthesis of corroles and dipyrromethenes. **Arkivoc**, v. 10, p. 307-324, 2007.
157. QIN, W. et al. Synthesis, spectroscopy, crystal structure, electrochemistry, and quantum chemical and molecular dynamics calculations of a 3-anilino difluoroboron dipyrromethene dye. **The Journal of Physical Chemistry A**, v. 113, n. 2, p. 439-447, 2008.
158. ZHOU, X. et al. Highly Regioselective  $\alpha$ -Chlorination of the BODIPY Chromophore with Copper (II) Chloride. **Organic Letters**, v. 17, n. 18, p. 4632-4635, 2015.
159. BAÑUELOS, J. et al. Photophysical Characterization of new 3-amino and 3-acetamido BODIPY dyes with solvent sensitive properties. **Journal of Fluorescence**, v. 18, n. 5, p. 899-907, 2008.

160. GANAPATHI, E. et al. Synthesis, structure, spectral, electrochemical and sensing properties of 3-amino boron-dipyrromethene and its derivatives. **Dyes and Pigments**, v. 102, p. 218-227, 2014.
161. ROHAND, T. et al. Photophysics of 3, 5-diphenoxy substituted BODIPY dyes in solution. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 6, n. 10, p. 1061-1066, 2007.
162. REZENDE, L. C. D.; EMERY, F. S. A review of the synthetic strategies for the development of BODIPY dyes for conjugation with proteins. **Orbital-The Electronic Journal of Chemistry**, v. 5, n. 1, p. 62-83, 2013.
163. TROFIMOV, B. A. II. Vinylpyrroles. In: JONES, R. A. (Ed.). **Chemistry of Heterocyclic Compounds: Pyrroles, Part 2: The Synthesis, Reactivity, and Physical Properties of Substituted Pyrroles**. v. 48 John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, 1992.
164. SCHMIDT, E. Y. et al. A straightforward synthesis of pyrroles from ketones and acetylene: a one-pot version of the Trofimov reaction. **Arkivoc**, v. 7, p. 11-17, 2005.
165. WU, G. et al. Regioselective thiocyanation of aromatic and heteroaromatic compounds using ammonium thiocyanate and oxone. **Tetrahedron Letters**, v. 46, n. 35, p. 5831-5834, 2005.
166. FOTOUHI, L. NIKOOFAR, K.. Electrochemical thiocyanation of nitrogen-containing aromatic and heteroaromatic compounds. **Tetrahedron Letters**, v. 54, n. 23, p. 2903-2905, 2013.
167. NIKOOFAR, K.. A brief on thiocyanation of N-activated arenes and N-bearing heteroaromatic compounds. **Chem Sci Trans**, v. 2, p. 691-700, 2013.
168. WU, Guaili et al. Regioselective thiocyanation of aromatic and heteroaromatic compounds using ammonium thiocyanate and oxone. **Tetrahedron Letters**, v. 46, n. 35, p. 5831-5834, 2005.
169. CUI, A. et al. Synthesis, spectral properties and photostability of novel boron-dipyrromethene dyes. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 186, n. 1, p. 85-92, 2007.
170. DE REZENDE, L. C. D. et al. Thiocyanation of BODIPY dyes and their conversion to thioalkylated derivatives. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 13, n. 21, p. 6031-6038, 2015.
171. WEI, Z.-L.; KOZIKOWSKI, A. P. A short and efficient synthesis of the pharmacological research tool GW501516 for the peroxisome proliferator-activated receptor  $\delta$ . **The Journal of Organic Chemistry**, v. 68, n. 23, p. 9116-9118, 2003.
172. FOLKINS, P. L.; HARPP, D. N. A general methodology for the synthesis of [2.2. 1],[3.2. 1+], and [4.2. 1] bridged bicyclic disulfide systems. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 57, n. 7, p. 2013-2017, 1992.
173. BERGBREITER, D. E. et al. Synthesis and characterization of electronically varied XCX palladacycles with functional arene groups. **Inorganica chimica acta**, v. 359, n. 6, p. 1912-1922, 2006.
174. BRATTON, L. D. et al. Discovery of highly potent and selective benzyloxybenzyl-based peroxisome proliferator-activator receptor (PPAR)  $\delta$  agonists. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 17, n. 13, p. 3624-3629, 2007.



175. BOYER, F. E. et al. 5, 6-dihydropyran-2-ones possessing various sulfonyl functionalities: potent nonpeptidic inhibitors of HIV protease. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, n. 5, p. 843-858, 2000.
176. YU, Y.; LIEBESKIND, L. S. Copper-mediated, palladium-catalyzed coupling of thiol esters with aliphatic organoboron reagents. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 69, n. 10, p. 3554-3557, 2004.
177. FLOWERS, W. T. et al. Alkyl aryl sulphides from the interaction of aryl thiocyanates and alcohols under the influence of triphenylphosphine or of trialkyl phosphites. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1**, n. 22, p. 2394-2398, 1976.
178. FLOWERS, W. T. et al. Interaction of aryl thiocyanates and ethylene glycol under the influence of triphenylphosphine: formation of 1,2-bis (arylthio) ethanes and of aryl 2-aryloxyethyl sulphides. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1**, p. 1309-1312, 1979.
179. TOSTE, F. D.; LARONDE, F.; STILL, I. W. J. Thiocyanate as a versatile synthetic unit: Efficient conversion of ArSCN to aryl alkyl sulfides and aryl thioesters. **Tetrahedron Letters**, v. 36, n. 17, p. 2949-2952, 1995.
180. TOSTE, F. D.; STILL, I. W. J. Preparation of t-butyl sulfides by a novel ligand-transfer reaction of aryl thiocyanates. **Tetrahedron Letters**, v. 36, n. 25, p. 4361-4364, 1995.