

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

KADJA LUANA CHAGAS MONTEIRO

**DESENVOLVIMENTO DE NOVOS DERIVADOS INDÓLICOS E
BENZIMIDAZÓLICOS COMO POTENCIAIS SONDAS FLUORESCENTES**

Maceió
2021

KADJA LUANA CHAGAS MONTEIRO

**DESENVOLVIMENTO DE NOVOS DERIVADOS INDÓLICOS E
BENZIMIDAZÓLICOS COMO POTENCIAIS SONDAS FLUORESCENTES**

Dissertação de mestrado apresentada ao programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Thiago Mendonça de Aquino.

Coorientador: Prof. Dr. Josué Carinhanha Caldas Santos.

Maceió
2021

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho Freitas Neto – CRB-4 – 1767

M775d Monteiro, Kadja Luana Chagas.

Desenvolvimento de novos derivados indólicos e benzimidazólicos como potenciais sondas fluorescentes / Kadja Luana Chagas Monteiro. – 2021.

132 f. : il. color.

Orientador: Thiago Mendonça de Aquino.

Co-orientador: Josué Carinhonha Caldas Santos.

Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Farmacêuticas. Maceió, 2021.

Bibliografia: f. 92-98.

Apêndices: f. 100-132.

1. DNA. 2. Soroalbumina bovina. 3. Albumina sérica humana. 4. Compostos heterocíclicos. 5. Corantes fluorescentes. I. Título.

CDU: 547.75

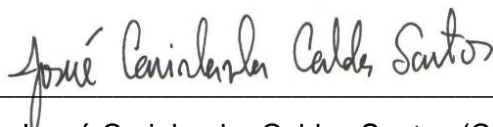
FOLHA DE APROVAÇÃO

DESENVOLVIMENTO DE NOVOS DERIVADOS INDÓLICOS E BENZIMIDAZÓLICOS COMO POTENCIAIS SONDAS FLUORESCENTES

Dissertação submetida ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alagoas e aprovada em 22 de fevereiro de 2021.



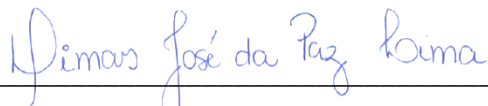
Prof. Dr. Thiago Mendonça de Aquino (Orientador)



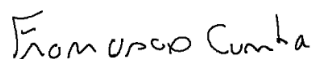
Prof. Dr. Josué Carinhanha Caldas Santos (Co-Orientador)



Prof. Dr. Luciano Aparecido Meireles Grillo (Examinador Interno)



Prof. Dr. Dimas José da Paz Lima (Examinador Externo)



Dr. Francisco Antônio da Silva Cunha (Examinador Externo)

RESUMO

Pequenas moléculas orgânicas com propriedades fluorescentes quando em contato com um analito tornaram-se um tópico de intensa pesquisa nos últimos anos. Rotuladas como sondas fluorescentes, essas atuam como sinalizadores celulares e apresentam diversos mecanismos de fluorescência. Os núcleos benzimidazol e indol são exemplos de importantes fluoróforos encontrados em diversos corantes e sondas orgânicas, além de apresentar reconhecida afinidade por diversas biomoléculas, tais como o DNA e albuminas séricas; por esse motivo, foram selecionados para a síntese das sondas propostas nesse trabalho. A estratégia de síntese consiste na condensação dos heterociclos mencionados com aldeídos p-funcionalizados por aminas aromáticas, aminas alifáticas e ácidos borônicos através da formação de uma ligação azometina, promovendo a extensão do deslocamento de elétrons, essencial para a fluorescência. Os intermediários de reação foram sintetizados através de reações de Buchwald-Hartwig, Suzuki-Miyaura e S_NAr , onde foram obtidos oito benzaldeídos. Os rendimentos variaram de 23-84% para os derivados indólicos e 10-37% para os derivados benzimidazólicos. Os compostos foram avaliados quanto ao grau de pureza por cromatografia, assim como pela determinação do intervalo de fusão. A caracterização estrutural foi realizada por RMN 1H e ^{13}C . Através de uma análise preliminar, quatro das treze sondas sintetizadas apresentaram resposta de fluorescência significativa em contato com BSA. Dessas, a sonda KCH60 ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ = 415/555 nm) foi selecionada para ensaios de otimização dos parâmetros analíticos. O tampão Britton-Robinson a 10 mM (pH 6) e a concentração da sonda a 5 μM apresentaram a máxima sensibilidade. A estequiometria do complexo sonda-BSA foi 1:1 (método de Job). O intervalo linear foi de 0,5 - 4,0 μM com limite de detecção de 0,38 μM e RSD < 6,0% para BSA. Por fim, espera-se que esses resultados possibilitem a utilização desses derivados em ensaios de quantificação de albuminas séricas em amostras reais, além de propiciar o desenho de novas moléculas ativas e/ou com propriedades fluorescentes.

Palavras Chave: interação, DNA, BSA, HSA, heterociclos, sonda off-on.

ABSTRACT

Small organic molecules with fluorescent properties when in contact with an analyte have become a topic of intense research in recent years. Labeled as fluorescent probes, these act as cellular beacons and have several fluorescence mechanisms. The benzimidazole and indole derivatives are examples of important fluorophores found in several dyes and organic probes, in addition to having a recognized affinity for several biomolecules, such as DNA and serum albumin; for this reason, they were selected for the synthesis of the probes proposed in this work. The synthesis strategy consists in the condensation of the mentioned heterocycles with p-functionalized aldehydes by aromatic amines, aliphatic amines and boronic acids through the formation of an azomethine bond, promoting the extension of electron displacement, essential for fluorescence. The reaction intermediates were synthesized through Buchwald-Hartwig, Suzuki-Miyaura and S_NAr reactions, where eight benzaldehydes were obtained. Yields ranged from 23-84% for indole derivatives and 10-37% for benzimidazole derivatives. The compounds were evaluated for purity by chromatography, as well as by determining the melting range. Structural characterization was performed by 1H and ^{13}C NMR. Through a preliminary analysis, four of the thirteen synthesized probes showed a significant fluorescence response in contact with BSA. Of these, the KCH60 probe ($\lambda_{ex} / \lambda_{em} = 415/555$ nm) was selected for tests to optimize analytical parameters. The Britton-Robinson buffer at 10 mM (pH 6) and the probe concentration at 5 μ M showed maximum sensitivity. The stoichiometry of the probe-BSA complex was 1:1 (Job method). The linear range was 0.5 - 4.0 μ M with a detection limit of 0.38 μ M and RSD <6.0% for BSA. Finally, it is expected that these results will enable the use of these derivatives in assays for the quantification of serum albumin in real samples, in addition to enabling the design of new active molecules and/or with fluorescent properties.

Keywords: interaction, DNA, BSA, HSA, heterocycles, off-on probe.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida. Agradeço a meus pais, Nadjane e Adjer, os quais tenho como guias e referência para todos os meus passos, além de estarem ao meu lado em todos os desafios. Agradeço a minha irmã, Redja, por ser sempre minha fiel confidente e amiga em todos os momentos que eu preciso. Agradeço a meu namorado, Marcone, por todo amor, por me acalmar em momentos de estresse e confiar em mim sempre que eu mesma duvidei.

Agradeço a meus amigos de colegial, Maria Clara e Eli, pela amizade e parceria ao longo dos anos. Agradeço a meus amigos de faculdade, Íris, Pedro e Cláudio, por continuarmos amigos e torcendo sempre uns pelos outros. Agradeço aos meus colegas e amigos do laboratório de química medicinal (LQM), Érica, Igor, Paulo, Nathalia, Ana Beatriz, Garbiel, Grécia, Manu e Matheus pelo compartilhamento de ideias e pela amizade dentro e fora do laboratório sempre. Agradeço ainda ao prof. Dr. Edeildo por ter me dado oportunidades de publicação ao longo do meu mestrado, além dos ensinamentos e amizade.

Agradeço aos meus colegas e amigos do Laboratório de Instrumentação e Desenvolvimento em Química Analítica (LINQA) por terem me recebido e auxiliado com toda a amizade e parceria durante a execução desse projeto. Em especial, Jaelson, Ari, Karlly e Thamilla, meu muito obrigada. Agradeço ao professor Dr. Josué Carinhanha, líder do LINQA, pelos ensinamentos, pela paciência e por dedicar o seu tempo e conhecimento na minha coorientação.

Agradeço ao prof. Dr. João Xavier, por me receber no LQM durante todos esses anos. Um agradecimento constante e muito especial ao meu orientador, o prof. Dr. Thiago Aquino, que sempre me confiou grandes projetos e sempre acreditou na execução desses por mim, além de guiar sempre.

Agradeço aos órgãos de fomento, CNPq e CAPES pelos recursos destinados a esse projeto. A banca julgadora, prof. Dr. Dimas Paz e Dr. Francisco Cunha pelas contribuições na minha formação e a todos os professores e técnicos do PPGCF e PPGQB que de alguma forma contribuíram para minha formação.



*“Escolha um trabalho que você ame e não terás
que trabalhar um único dia em sua vida.”*

Confúcio



LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática do DNA.	18
Figura 2. Estruturas e conformações do DNA.	19
Figura 3. Modos de ligação de compostos com o DNA.	20
Figura 4. Estrutura de corantes intercalantes de DNA.	21
Figura 5. Estruturas de cianinas simétricas representativas.	22
Figura 6. Estruturas de sondas que se ligam ao sulco menor.	23
Figura 7. Estruturas de corantes Hoechst utilizados para coloração de DNA. .	23
Figura 8. Estrutura dos heterociclos estudados: Benzimidazol e Indol.	24
Figura 9. Representação estrutural das proteínas HSA e BSA, domínios e subdomínios.	26
Figura 10. Estrutura de sondas de HSA baseadas em heterociclos e <i>N</i> -bifenila.	28
Figura 11. Estruturas de sondas HSA/BSA contendo os núcleos indol, benzotiazol e dimetil amino.	29
Figura 12. Diagrama de Jablonksi representando níveis e espectros de energia.	30
Figura 13. Mecanismos de fluorescência de sondas.	31
Figura 14. Reação de acoplamento cruzado C-N catalisada por paládio.	31
Figura 15. Reação de acoplamento cruzado C-C catalisada por paládio.	32
Figura 16. Mecanismo de adição-eliminação para S_NAr	33
Figura 17. Mecanismo de síntese de Iminas.	34
Figura 18. Esquema de síntese de reações de Buchwald-Hartwig.	42
Figura 19. Esquema de síntese para reações de S_NAr	44
Figura 20. Esquema de síntese de reações de Suzuki-Miyaura.	46
Figura 21. Esquema de síntese dos derivados imina incorporadas à fração indol.	47
Figura 22. Esquema de síntese dos derivados imina incorporadas à fração benzimidazol.	51
Figura 23. Sondas inicialmente propostas e sondas sintetizadas.	60
Figura 24. Proposta inicial de sondas utilizando como ponto de partida o cinamaldeído e proposta executada com benzaldeídos.	61

Figura 25. Mecanismo reacional para síntese dos benzaldeídos de interesse por reações de Buchwald-Hartwig.....	62
Figura 26. Espectro de RMN ¹ H dos intermediários 01 e 02.....	63
Figura 27. Mecanismo de reação para os intermediários sintetizados por S _N Ar.	64
Figura 28. Espectro RMN ¹ H de INT 05	65
Figura 29. Espectros de RMN ¹ H de INT 07 e INT 08.....	66
Figura 30. Proposta de mecanismo de reações de Suzuki-Miyaura para os intermediários 07 e 08.....	67
Figura 31. Comparação entre espectros de RMN ¹ H de INT 01 e KCH 51.....	70
Figura 32. Espectro de RMN ¹ H de KCH 57.....	73
Figura 33. Perfil de absorção e estabilidade em meio aquoso das sondas sintetizadas em diferentes pH.	74
Figura 34. Espectros de absorção e emissão das sondas KCH 56 e KCH 45 por pH em diferentes concentrações de DNA.	76
Figura 35. Intensidade de fluorescência de emissão para as sondas.....	77
Figura 36. Absorbância e intensidade de fluorescência de excitação e emissão das melhores sondas para BSA em diferentes pH.....	78
Figura 37. Intensidade de fluorescência das sondas para BSA em função do pH	79
Figura 38. a) Espectro de emissão indicando o aumento da intensidade de fluorescência em função da concentração de BSA; b) Valor de intensidade de fluorescência em função da concentração de BSA.	80
Figura 39. pK _a de grupos ionizáveis da sonda KCH 60.....	81
Figura 40. Avaliação do efeito da concentração hidrogeniônica na intensidade de fluorescência do complexo.	82
Figura 41. Avaliação do efeito do tipo de tampão na intensidade de fluorescência do complexo. Condições: [sonda]= 2,5 μM; [BSA] = 4 μM; [tampão] = 10 mM; pH= 6,0; λ _{ex} /λ _{em} = 415/555 nm.	82
Figura 42. Avaliação do efeito da concentração do tampão na intensidade de fluorescência do complexo.	84
Figura 43. Avaliação do efeito da concentração da sonda na intensidade de fluorescência do complexo.	85
Figura 44. Avaliação do efeito da concentração da sonda na intensidade de fluorescência do complexo e da sonda livre.....	85

Figura 45. Avaliação do efeito da força iônica na intensidade de fluorescência do complexo.....	86
Figura 46. Gráfico de Job para determinação da estequiometria do complexo.	87
Figura 47. Avaliação da cinética e estabilidade do complexo.	87
Figura 48. Curva analítica a partir de concentrações crescentes de BSA.....	88
Figura 49. a) Curva de titulação fluorimétrica e b) Linearização da equação de Benesi-Hildebrand para determinação da constante de ligação.	89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Intervalo de fusão e principais deslocamentos químicos dos intermediários obtidos por S _N Ar.	63
Tabela 2. Intervalo de fusão e principais deslocamentos químicos dos derivados incorporados à fração indol.....	68
Tabela 3. Rendimento e principais deslocamentos químicos dos derivados incorporados à fração benzimidazol.....	72
Tabela 4. Máximos de absorção, excitação, emissão e deslocamento de Stokes* das melhores sondas para BSA.....	79

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DNA	Ácido desoxirribonucleico
(A)	Adenina
(T)	Timina
(C)	Citosina
(G)	Guanina
UV	Ultravioleta
EtBr	Brometo de Etídio
PI	Iodeto de Propídio
FRET	Transferência de energia de ressonância de Förster
ActOEt	Acetato de Etila
ctDNA	DNA calf thymus
PF	Ponto de fusão
CCD	Cromatografia em camada delgada
Hex	Hexano
Hz	Hertz
MHz	Megahertz
IV	Infravermelho
AT	Adenina-Timina
GC	Guanina-Citosina
nm	Nanômetros
BSA	Albumina do soro bovino
HSA	Albumina do soro humano
INT	Intermediário
$\lambda_{\text{máx}}$	Máximo de comprimento de onda

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	17
2.1 Estrutura do DNA.....	17
2.2 Modos de interação DNA-ligante	19
2.3 Moléculas orgânicas como sondas fluorescentes de DNA	21
2.4 Estrutura e características de proteínas de transporte: BSA e HSA....	25
2.5 Moléculas orgânicas como sondas fluorescentes de HSA e BSA	26
2.5 Aspectos gerais relacionados a moléculas orgânicas fluorescentes.....	29
2.6 Reações envolvidas na síntese das sondas propostas.....	31
2.6.1 Reações de acoplamento C-N: Aminoação de Buchwald-Hartwig	31
2.6.2 Reações de acoplamento C-C: Suzuki-Miyaura	31
2.6.3 Substituição Nucleofílica Aromática (S _N Ar).....	32
2.6.4 Síntese de Iminas	33
3. OBJETIVOS.....	36
3.2 Objetivo Geral	36
3.2 Objetivos Específicos.....	36
4. MATERIAIS E MÉTODOS	38
4.1 Caracterização estrutural e determinação de propriedades físico-químicas	38
4.1.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD), Cromatografia Líquida de Média pressão e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	38
4.1.2 Determinação do ponto de Fusão.....	38
4.1.3 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN ¹³ C e ¹ H)	38
4.2 Reagentes, solventes e equipamentos utilizados na síntese.....	39
4.3 Planejamento para a síntese	39
4.4 Procedimento experimental para síntese das sondas propostas.....	42
4.4.1 Obtenção dos benzaldeídos <i>p</i> -funcionalizados por reações de acoplamento cruzado C-N (Buchwald-Hartwig)	42
4.4.2 Obtenção dos benzaldeídos <i>p</i> -funcionalizados por reações de S _N Ar.....	43
4.4.3 Obtenção dos benzaldeídos <i>p</i> -funcionalizados por reações de acoplamento cruzado C-C (Suzuki-Miyaura)	45
4.4.4 Condensação de benzaldeídos <i>p</i> -funcionalizados com 5-aminoindol para formação de iminas	47

4.4.5	Condensação de benzaldeídos <i>p</i> -funcionalizados com 2-aminobenzimidazol para formação de iminas.....	51
4.5	Procedimento experimental para os ensaios de bioanalíticos	54
4.5.1	Reagentes e preparo das soluções	54
4.5.2	Equipamentos.....	55
4.5.3	Determinação da concentração do ctDNA e BSA.....	55
4.5.3	Avaliação da cinética e da estabilidade em meio aquoso das sondas por UV-vis	56
4.5.4	Estudo da interação do ctDNA com sondas por fluorescência molecular e UV-vis.....	56
4.5.5	Estudo da interação da BSA com sondas por fluorescência molecular e UV-vis	56
4.5.6	Determinação da estequiometria do complexo sonda-BSA.....	56
4.5.7	Avaliação da cinética e estabilidade do complexo por fluorescência molecular	57
4.5.8	Determinação das figuras de mérito e constante de ligação	57
4.5.9	Tratamento dos dados	58
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
5.1	Planejamento das sondas	60
5.2	Síntese e caracterização dos intermediários	61
5.2.1	Intermediários sintetizados por reações de Buchwald-Hartwig.....	61
5.2.2	Intermediários sintetizados por reações de S _N Ar.....	63
5.2.3	Intermediários sintetizados por reações de Suzuki-Miyaura.....	65
5.2	Síntese e caracterização dos derivados de indol e benzimidazol	67
5.2.1	Derivados imínicos incorporados à fração indol.....	67
5.2.2	Derivados imínicos incorporados à fração benzimidazol	70
5.3	Estudos de cinética e estabilidade da sonda livre em meio aquoso	73
5.4	Estudos de interação com ctDNA	75
5.5	Estudos de interação com BSA.....	77
5.5.1	Estudos preliminares	77
5.5.2	Avaliação da variação da concentração da proteína para a sonda KCH 60	80
5.5.3	Avaliação da variação de pH para a sonda KCH 60.....	80
5.5.4	Avaliação do tipo e concentração da solução tampão para a sonda KCH 60	82
5.5.5	Avaliação da concentração da sonda KCH 60.....	84

5.5.6 Avaliação da interferência da força iônica para a sonda KCH 60	86
5.5.7 Determinação da estequiometria do complexo para a sonda KCH 60	86
5.5.8 Avaliação da cinética e estabilidade do complexo para a sonda KCH 60	87
5.5.9 Determinação das figuras de mérito e constante de ligação para a sonda KCH 60	88
6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	90
7. REFERÊNCIAS	92
8. APÊNDICES	100

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O ácido desoxirribonucleico (DNA) é uma das moléculas biológicas de maior importância em todos os seres vivos, a qual desempenha ampla gama de atividades essenciais para a vida, como reprodução biológica, desenvolvimento e crescimento. No entanto, o mesmo apresenta importante papel em algumas atividades anormais e/ou incompatíveis com a vida, como mutação e carcinogênese (LONG et al., 2018). Dentro deste contexto, o uso de pequenas moléculas orgânicas capazes de exibir fluorescência por meio da interação com o DNA desempenha um papel importante na espectroscopia de fluorescência, diagnóstico por imagem e biomedicina (NARAYANASWAMY et al., 2014).

Por outro lado, as albuminas do soro são as proteínas mais abundantes do plasma sanguíneo. Sua função é realizar o transporte de diversos compostos importantes para o organismo, como fármacos, vitaminas e hormônios para seu local alvo (NAIK; CHIMATADAR; NANDIBEWOR, 2010). Adicionalmente, possuem a característica de aumentar a solubilidade de fármacos pouco solúveis, apenas pela interação. Frequentemente a albumina do soro bovino (BSA) é utilizada em substituição da albumina do soro humano (HSA) em estudos de interação, pois estas apresentam alta similaridade estrutural e fisiológica. A detecção e quantificação de albuminas do soro têm se demonstrado um importante campo de pesquisa, logo que alterações na concentração normal dessas proteínas podem estar associada a doenças renais ou insuficiência hepática (DA SILVA et al., 2014). Além disso, é possível estudar o perfil de distribuição, concentração e metabolismo de diversos fármacos pela vinculação com albuminas (BECKFORD, 2010).

O desenvolvimento de sondas contendo corantes orgânicos é justificado pelo seu potencial uso em biologia molecular, quantificação e teranóstica de doenças humanas relacionadas a genes, como o câncer, infecções virais e parasitárias (HURLEY, 2002; NEIDLE, 2001). Os núcleos benzimidazol e indol são frequentemente encontrados em corantes orgânicos como componentes heterocíclicos de cianinas e outras importantes sondas fluorescentes, além de apresentar reconhecida afinidade por diversas biomoléculas (FARAHAT et al., 2018; KUBOTA). Neste sentido, o presente trabalho visa o planejamento, síntese, caracterização estrutural e avaliação espectroscópica de sondas fluorescentes *off-on* contendo os núcleos benzimidazol e indol.

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

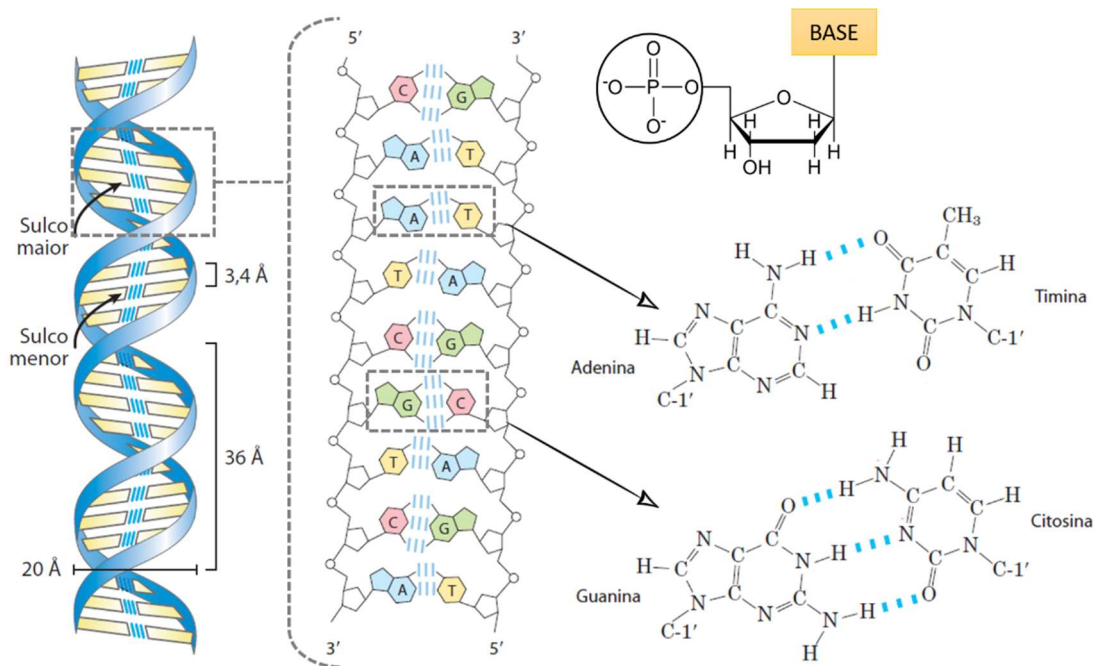
2.1 Estrutura do DNA

O DNA é uma importante biomolécula formada por ácidos nucleicos, que são polímeros semelhantes a fios longos constituídos por uma matriz linear de monômeros chamados nucleotídeos (BLACKBURN et al., 2007). Os nucleotídeos apresentam uma base heterocíclica nitrogenada, uma pentose (desoxirribose) e um ou mais fosfatos. As bases nitrogenadas são as pirimidinas monocíclicas citosina (C) e timina (T) e as purinas dicíclicas adenina (A) e guanina (G). Esses heterociclos são hidrofóbicos e relativamente insolúveis em água no pH neutro celular. No entanto, em pH ácido ou alcalino, tornam-se carregados e conseqüentemente sua solubilidade em água aumenta (NELSON; COX, 2018).

O empilhamento de bases ajuda a reduzir a hidrofobicidade pela redução do contato com a água. Esse tipo de interação hidrofóbica consiste no posicionamento de duas ou mais bases com o plano de seus anéis em paralelo, auxiliadas por interações dipolo-dipolo e de van der Waals (NELSON; COX, 2018). Também importante para a estabilização da estrutura tridimensional do DNA, as ligações de hidrogênio entre as bases através dos grupos carbonila e amino são a forma de interação mais importante entre duas ou mais cadeias complementares de ácidos nucleicos. O padrão mais comum de ligação de hidrogênio, definido por James D. Watson e Francis Crick em 1953, consiste na ligação específica de adenina à timina e de guanina à citosina (PRAY, 2008) (Figura 1, página 18).

Watson e Crick, utilizando informações já acumuladas, criaram o modelo tridimensional da estrutura do DNA. O modelo consiste em duas cadeias helicoidais enroladas em torno do mesmo eixo para formar uma dupla hélice, onde os esqueletos hidrofílicos de grupos fosfato e desoxirribose alternados ficam do lado externo da dupla hélice, enquanto as bases nitrogenadas hidrofóbicas estão empilhadas por dentro (WATSON; CRICK, 2016). Corroborando com o padrão descrito por Franklin e Wilkins em 1950, o pareamento das fitas complementares cria um sulco maior, de 34 Å e outro menor de 3,4 Å na superfície do duplex (NELSON; COX, 2018).

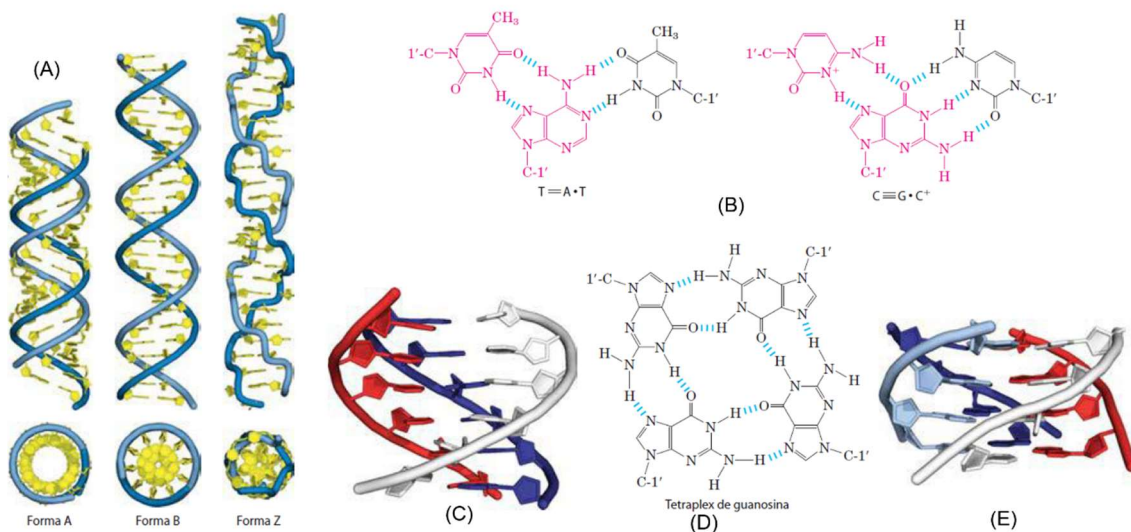
Figura 1. Representação esquemática do DNA. Em destaque, a interação entre bases nitrogenadas através de duas ligações de hidrogênio que associam as bases A e T e três ligações de hidrogênio entre G e C.



Fonte: Adaptado de Nelson; Cox, 2018.

Além da estrutura proposta por Watson e Crick (também chamada de B-DNA), dependendo do meio em que se encontra, o DNA pode apresentar outras duas isoformas: (i) A-DNA e (ii) Z-DNA (Figura 2 (A), página 19). A primeira está presente em ambientes com baixa concentração de água, como solventes orgânicos, enquanto que a segunda é observada em meios com alta concentração de cátions. Outras estruturas incomuns envolvem três ou até quatro cadeias de DNA, formadas através de ligações de hidrogênio adicionais. Esse tipo de pareamento, chamado de Hoogsteen (não Watson-Crick), pode ocorrer quando um resíduo de citidina (se protonado) parear com um resíduo de guanidina de um par $G \equiv C$ assim como uma timidina pode parear com uma adenosina de um par $A = T$ (Figura 2 (B, C), página 19). Por outro lado, o DNA tetraplex (quadruplex) ocorre apenas para sequência de DNA com uma alta proporção de guanosina (Figura 2 (D, E), página 19).

Figura 2. Estruturas e conformações do DNA. (A) Comparação entre A-DNA, B-DNA e Z-DNA. (B) Pareamento de bases nitrogenadas no DNA triplex. (C) DNA helicoidal triplo contendo duas cadeias pirimidínicas (vermelho e branco) e uma cadeia púrica (azul). (D) Pareamento de bases no DNA quadruplex de guanosina. (E) Estrutura de quadruplex com quatro tetrapletes sucessivos.

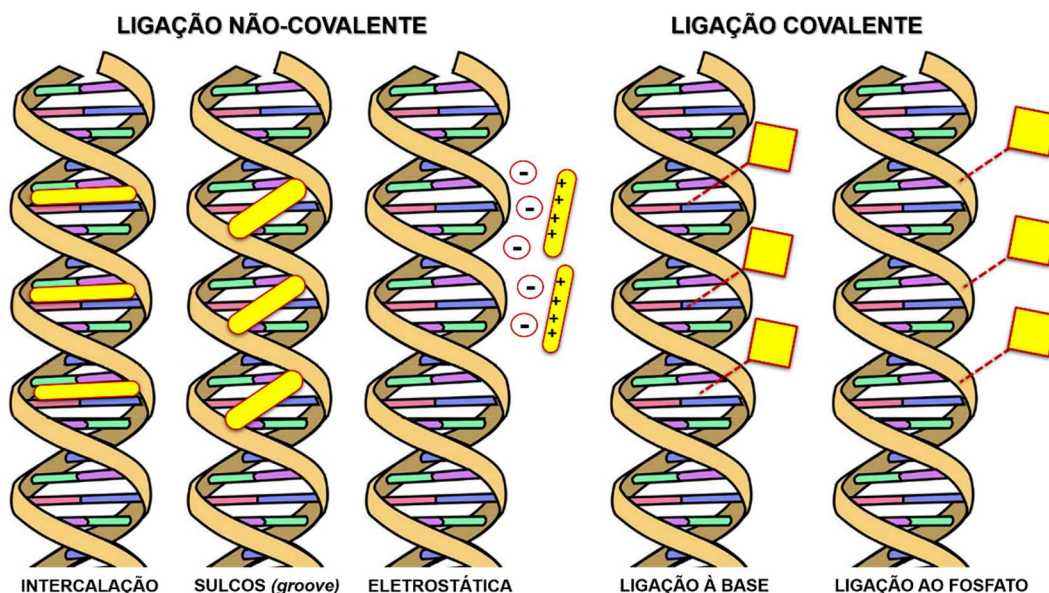


Fonte: Adaptado de Nelson; Cox, 2018.

2.2 Modos de interação DNA-ligante

Assim como observado com pequenas moléculas orgânicas na modulação de atividades farmacológicas, a interação e marcação do DNA com diferentes fluoróforos pode ocorrer através de dois modos de interação: (i) interações covalentes e (ii) interações não covalentes (Figura 3, página 20). O modo de interação covalente é irreversível, provocando a inibição da atividade do DNA e frequentemente a morte celular. Estas interações covalentes podem ocorrer nas bases nitrogenadas ou nos grupos fosfato (BARRA; NETTO, 2015). Um exemplo de ligante covalente é o fármaco antineoplásico cisplatina, o qual se liga covalentemente às guanidinas adjacentes no sulco principal do DNA, e consequentemente dobra o DNA na direção do sulco principal (HURLEY, 2002).

Figura 3. Modos de ligação de compostos com o DNA.



Fonte: Inspirado em Barra; Netto, 2015

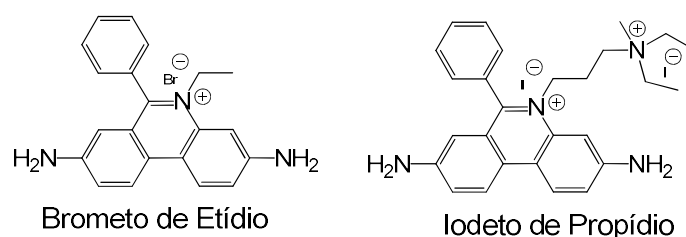
Existem três maneiras mais comuns pelas quais os ligantes e corantes não covalentes de baixo peso molecular podem interagir com o DNA: (i) intercalação; (ii) ligação ao sulco (ou groove); e (iii) interação eletrostática (ou ligação pela borda externa) (Figura 3, página 20). As interações eletrostáticas ocorrem por interações entre a carga negativa presente nos grupos fosfato e espécies carregadas positivamente (REHMAN et al., 2015). Os ligantes de sulco não oferecem grandes alterações conformacionais na dupla hélice do DNA. A ligação ao sulco menor é estabilizada por uma combinação de interações eletrostáticas, de van der Waals e ligações de hidrogênio, em especial próximas a regiões contendo pares de bases AT. Já no sulco maior, a estabilização se dá por interações eletrostáticas (PALCHAUDHURI; HERGENROTHER, 2007).

A intercalação consiste na inserção de uma molécula plana entre os pares de bases adjacentes da dupla hélice do DNA. Essas interações são estabilizadas por interações de empilhamento π - π entre a molécula intercalante e o par de bases adjacentes, além de apresentar frequentemente ligações de hidrogênio (SISCHKA et al., 2005). Ao contrário da interação nos sulcos, a intercalação induz uma importante alteração conformacional no DNA para criação de uma cavidade de intercalação, podendo estender e frequentemente desenrolar parcialmente as fitas duplas do DNA (MCMURRAY; SMALL; VAN HOLDE, 1991).

2.3 Moléculas orgânicas como sondas fluorescentes de DNA

O DNA apresenta emissão intrínseca muito fraca e muito distante no UV para aplicações práticas. No intuito de suprir esse problema, sondas que se ligam espontaneamente ao DNA foram criadas e exibem emissão otimizada. O brometo de etídio (EtBr) e o iodeto de propídio (PI) (Figura 4, página 21) são dois intercalantes de fenatridínio estruturalmente semelhantes, são impenetráveis em células viáveis, porém são bons indicadores de células com membranas danificadas (CRISSMAN; HIRONS, 1994; JOHNSON, I; SPENCE, 2010). Uma vez ligados à ácidos nucleicos, sua fluorescência é aumentada em aproximadamente 10 vezes, e os máximos de excitação são desviados de 30 a 40 nm para o vermelho e de emissão aproximadamente 15 nm para o azul. Estudos espectrais do iodeto de propídio ligado ao calf thymus DNA (ctDNA) apresentam dois picos de excitação, um na região de 340 nm e um maior em cerca de 540 nm. Estudos de interação com o ctDNA podem ser realizados através da utilização de brometo de etídio como sonda através de um mecanismo de extinção da fluorescência (ZHU et al., 2014). O modo de ligação parece ser devido a intercalação do anel aromático plano entre os pares de bases do DNA (LAKOWICZ, 2006).

Figura 4. Estrutura de corantes intercalantes de DNA.

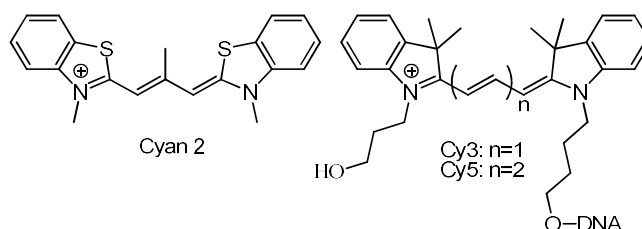


Fonte: Johnson, I; Spence, 2010.

Outra classe de grande importância na marcação do DNA e de especial atenção nesse trabalho, é a de corantes de cianina. Estes corantes consistem em dois centros de nitrogênio, um destes carregado positivamente, ligados por uma cadeia conjugada de número ímpar de carbonos (MISHRA et al., 2000). Na prática, os nitrogênios são parte de grupos aromáticos heterocíclicos frequentemente *N*-alquilados, como a quinolina, bezoxazol, benzotiazol e indol (ARMITAGE, 2005). Esses corantes podem ser moléculas simétricas, com dois heterociclos idênticos ligados na mesma posição, ou assimétricos, em que a

posição ou o grupo heterocíclico é alterado. Alguns corantes simétricos intercalantes de DNA são representados na Figura 5 (página 22). Por exemplo, Cy3 e Cy5 são fluoróforos muito utilizados e constituem um importante par doador-aceptor para estudos de Transferência de energia de forma não radiativa (FRET) (ARMITAGE, 2005).

Figura 5. Estruturas de cianinas simétricas representativas.



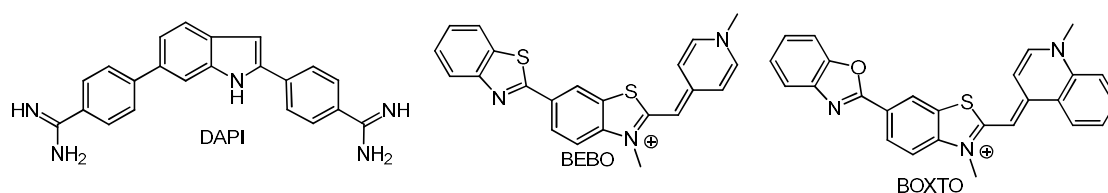
Fonte: Adaptado de Armitage, 2005.

Além da interação por intercalação, outras sondas podem se ligar ao sulco menor do DNA. A maioria das moléculas pequenas apresentam quatro características estruturais para este tipo de ligação: uma carga positiva, curvatura, flexibilidade e grupos doadores e aceptores de ligação de hidrogênio (ARMITAGE, 2005). Adicionalmente, diferente dos intercalantes, moléculas de ligação ao sulco exibem especificidade significativa para as sequências de bases AT e pouca ou nenhuma preferência por GC (DASH et al., 2011).

Dentre as sondas que se ligam ao sulco, a mais conhecida é o 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) (Figura 6, página 23). Esta sonda se encaixa no caminho do sulco menor do DNA, tornando esse modo de interação preferencial comparado ao modo de intercalação. Quando ligada ao DNA, essa sonda apresenta um aumento da fluorescência de 200 vezes, sendo o melhor aumento para um ligante de sulco (DASH et al., 2011). O corante monometina cianina ou BEBO (Figura 6, página 23), possui forma crescente semelhante ao DAPI. O mesmo se liga preferencialmente ao sulco menor nas sequências AT alternadas, mas intercala em sequências GC (KARLSSON; LINCOLN; WESTMAN, 2003). A alteração de BEBO através da mudança de benzotiazol e piridina por benzoxazol e quinolina exibiram melhores marcadores de sulco menor (KARLSSON et al., 2003). Um deles, o corante BOXTO (Figura 6, página 23), apresentou aumento de 50 vezes no rendimento quântico quando ligada ao ctDNA, exibindo

fluorescência no intervalo de 500 a 600 nm no espectro visível (KARLSSON et al., 2003).

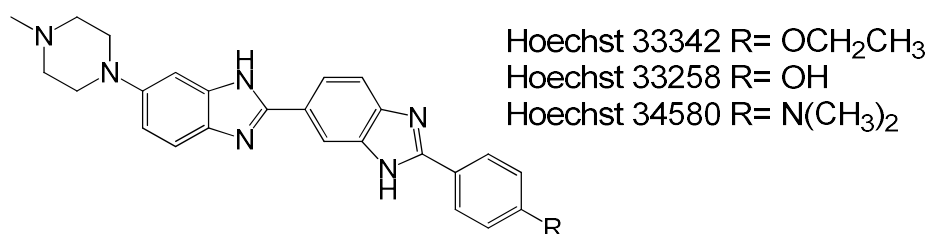
Figura 6. Estruturas de sondas que se ligam ao sulco menor



Fonte: Autora, 2021.

Embora muitas sondas se destaquem na marcação fluorescente de ácido nucleico, o uso dos corantes fluorescentes azuis DAPI e Hoechst ainda constitui um método de escolha simples, de baixo custo e baixa citotoxicidade (BUCEVIČIUS; LUKINAVIČIUS; GERASIMAITE, 2018). As bisbenzimidazóis Hoechst 33258, Hoechst 33342 e Hoechst 34580 (Figura 7, página 23) são corantes excitados em 360 nm e emitem um amplo espectro de azul com máximo na região de 460 nm (JOHNSON, I; SPENCE, 2010). Podem se ligar ao DNA no sulco menor em regiões ricas de AT, não apresentando propriedades intercalantes. Quando ligados, podem exibir um aumento de até 30 vezes na fluorescência, devido a supressão do relaxamento rotacional e da redução da hidratação após a ligação com o DNA (HAN; TAULIER; CHALIKIAN, 2005; PAL; ZHAO; ZEWAİL, 2003). Embora associada a diversas vantagens, a geração de imagens com Hoechst na região UV/azul pode interferir na autofluorescência tecidual e na foto toxicidade da luz UV, dificultando sua aplicação em células e tecidos.

Figura 7. Estruturas de corantes Hoechst utilizados para coloração de DNA.

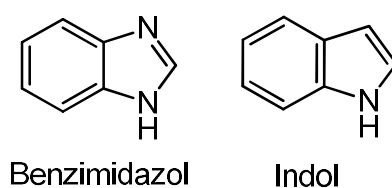


Fonte: Adaptado de Johnson, I; Spence, 2010.

Para qualquer molécula atuar como sonda, as seguintes características são desejadas: (i) excitação/emissão de longo prazo; (ii) fluorescência em comprimentos de onda longos; (iii) aumento da permeabilidade celular; (iv) baixa toxicidade para células vivas; (v) fidelidade ao dsDNA; e (vi) sensibilidade em baixas concentrações (LONG et al., 2018; NARAYANASWAMY et al., 2014). O uso de corantes de cianina para rotular tecidos biológicos específicos tornou-se uma área de pesquisa de grande interesse. Muitos tipos de corantes de cianinas são amplamente distribuídos da luz UV ao IV distante, na faixa de absorção de 350 a 1200 nm, com significativa comparabilidade e seletividade (NARAYANASWAMY et al., 2014). As suas características físicas podem ser facilmente alteradas com modificações estruturais simples de forma a melhorar suas propriedades biológicas.

Frequentemente mencionados e estudados nesse tópico, os heterociclos benzimidazol e indol serão de fundamental importância para esse trabalho (Figura 8, página 24). Indóis e imidazóis são corantes clássicos de ligação ao sulco menor e são representados por sondas importantes como os já mencionados DAPI e Hoechst (JOHNSON, I; SPENCE, 2010). Esses heterociclos são estudados como sensores ou sondas em novas moléculas fluorescentes ou mesmo quanto à suas atividades farmacológicas através da interação com o DNA ou outros alvos.

Figura 8. Estrutura dos heterociclos estudados: Benzimidazol e Indol.



Fonte: Autora, 2021.

É conhecido que o núcleo benzimidazol pode interagir com o DNA por intercalação ou pela ligação ao sulco, dependendo do número de anéis benzimidazol ou da conformação e tamanho da molécula (CZARNY et al., 1995; KUBOTA et al., 2001; KUBOTA; IWAMOTO; SEKI, 1999). Novos análogos são constantemente estudados, não só pelas características de interação ao DNA, mas também por suas propriedades fluorescentes (BARWIOLEK et al., 2019; TABUCHI; TAKI, 2018).

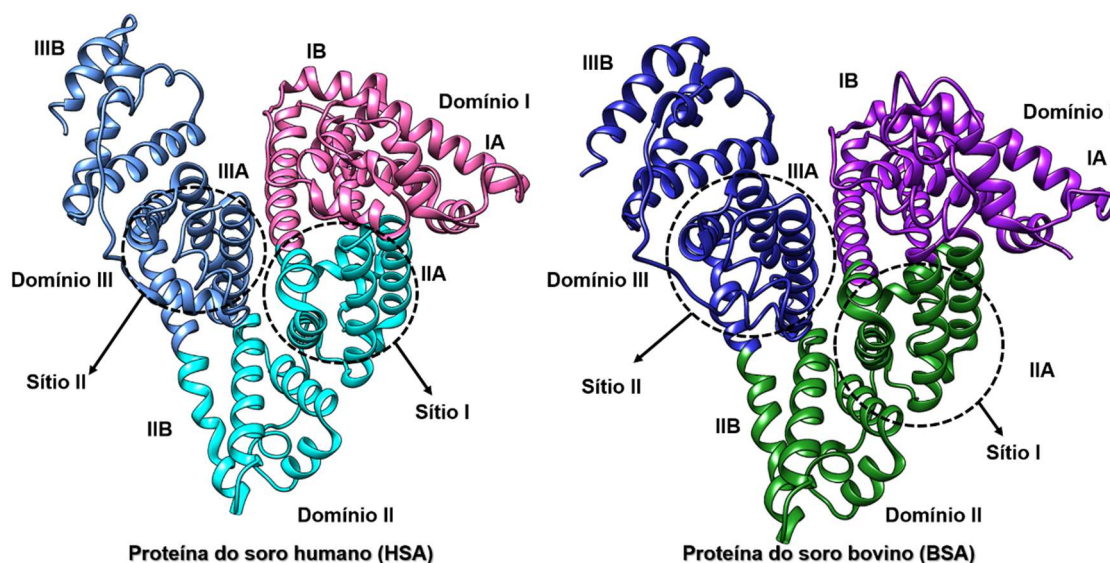
Indóis também são frequentemente observados em corantes. Esse heterociclo exibe propriedades características devido à presença da fração pirrol rica em elétrons, os quais podem interagir de forma não covalente com outras moléculas pela formação de ligações de hidrogênio ou por empilhamento π - π (SHIMAZAKI et al., 2009). Esse composto recebe grande interesse no desenvolvimento de derivados biologicamente ativos por estar presente em diversas proteínas na forma de resíduos de triptofano, além de apresentar ampla gama de atividades farmacológicas (LAFAYETTE et al., 2017).

2.4 Estrutura e características de proteínas de transporte: BSA e HSA

A albumina do soro humano (HSA) é a proteína mais abundante no plasma humano e desempenha um papel importante na manutenção da pressão osmótica do compartimento sanguíneo (FAN et al., 2014). Atua como o principal transportador de drogas e compostos endógenos, uma vez que esses podem se ligar reversivelmente ao HSA (BECKFORD, 2010). Em contraste, a albumina do soro bovino (BSA) é amplamente utilizada como uma substituição ao HSA em muitas aplicações bioquímicas e farmacológicas, devido ao seu baixo custo e a boa similaridade (75,8%) em funções biológicas quando comparado ao HSA (SHEN et al., 2017).

A HSA e a BSA consistem principalmente em dois locais de ligação, o sítio I e o sítio II (Figura 9, página 26), os quais estão localizados nos subdomínios IIA e IIIA da região hidrofóbica (HE; CARTER, 1992; RAMEZANI; RAFII-TABAR, 2015). A BSA é constituído de 582 resíduos de aminoácidos, enquanto que a HSA contém 585 resíduos, distribuídos nos domínios I, II e III (BOURASSA; HASNI; TAJMIR-RIahi, 2011). Dentre os aminoácidos de BSA, encontram-se os resíduos de triptofano Trp 134 e Trp 213, localizados na superfície do subdomínio IB e na cavidade hidrofóbica do domínio IIA respectivamente (BOURASSA; HASNI; TAJMIR-RIahi, 2011). A HSA, no entanto, contém apenas um resíduo de triptofano, o Trp 214, localizado no subdomínio IIA (DA SILVA et al., 2014).

Figura 9. Representação estrutural das proteínas HSA e BSA, domínios e subdomínios



Fonte: Adaptado de Hudson, 2017 e Ramezani; Rafii-Tabar, 2015. Código PDB: 2VUE (HSA) e 6QS9 (BSA).

Sabe-se que a distribuição, concentração e metabolismo de vários medicamentos podem ser alterados significativamente pela vinculação ao HSA. A HSA também é frequentemente associado ao aumento da solubilidade aparente de drogas normalmente hidrofóbicas no plasma (BECKFORD, 2010). Além disso, no diagnóstico clínico, o reconhecimento da HSA na urina humana é um sinal precoce da doença renal iniciante, enquanto que uma quantidade insuficiente no soro sanguíneo é um sinal de insuficiência hepática (DA SILVA et al., 2014). Diversos métodos para detecção de albuminas do soro foram desenvolvidos, no entanto consistem em procedimentos complicados e utilizam reagentes e instrumentos caros (LIU et al., 2018). Dessa forma, sensores fluorescentes têm recebido especial atenção, associados a uma operação simples, análise rápida, boa seletividade, alta sensibilidade e características não destrutivas (LIU et al., 2018; YIN et al., 2015; ZHANG et al., 2015).

2.5 Moléculas orgânicas como sondas fluorescentes de HSA e BSA

Embora muito esforço tenha sido realizado para descoberta de novas moléculas utilizadas na detecção de albumina sérica (AS), um problema comum é que quase todas as sondas apresentam excitação (<500 nm) e emissão (<600 nm) em comprimentos de onda muito baixos, onde assim não conseguem evitar a interferência da autofluorescência biológica. Adicionalmente, a pouca

seletividade para HSA sobre a BSA ou seus limites de detecção não tão baixos para aplicações reais, tornou a busca por novas sondas ainda mais importante nos últimos anos. Em laboratórios clínicos, embora a técnica de radioimunoensaio (RIA) seja frequentemente utilizada, esta requer rotulagem de proteínas com isótopos radioativos (FAN et al., 2014).

Baseando-se no potencial de emissão em comprimentos de onda longos apresentado por derivados Dicianometileno-4H-cromeno, um estudo analisou o potencial fluorescente do derivado DH1 quando ligado ao HSA (FAN et al., 2014). O derivado DH1 (Figura 10, página 28) apresentou alta seletividade e sensibilidade para HSA em relação a outras biomoléculas. O comprimento de onda de emissão de DH1 após a resposta ao HSA foi de 620 nm, enquanto que para a BSA, foi de 645 nm. Adicionalmente, o aumento da intensidade de fluorescência foi de 70 vezes para HSA e de 9 vezes para a BSA, facilitando, portanto, a distinção entre eles. Estudos de acoplamento molecular foram utilizados para constatar a preferência de DH1 ao sítio I da HSA (FAN et al., 2014).

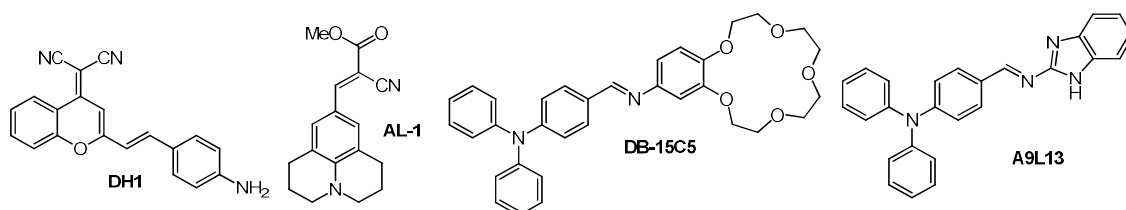
Outra sonda, projetada como um rotor molecular, apresentou um aprimoramento da fluorescência dependente da concentração (WU et al., 2014). Na ausência da HSA, AL-1 (Figura 10, página 28) apresenta um máximo de absorção de 464 nm e um máximo de emissão de 500 nm. Quando na presença da HSA, apresenta máximos de 456 nm e 490 nm respectivamente. Os autores destacam a importância do anel hidrofóbico e da porção éster presente na sonda. Adicionalmente, ensaios de competição demonstraram uma vinculação específica ao domínio IIA da HSA e a possível aplicação na quantificação da HSA na urina (WU et al., 2014).

Mais tarde, uma base de Schiff contendo a porção hidrofóbica *N*-bifenila, DB-15C5, apresentou fluorescência fraca ou ausente em ambiente fisiológico devido às típicas propriedades de transferência intramolecular torcida (Figura 10, página 28) (SHEN et al., 2017). No entanto, quando em contato com a HSA (5 μ M), apresentou um aumento de 32 vezes na intensidade de fluorescência, além de se mostrar seletiva para outras proteínas, incluindo a BSA. Além disso, em amostras de urina, houve um aumento pronunciado de sete vezes na intensidade de emissão (SHEN et al., 2017).

Outro trabalho explorou o potencial da porção hidrofóbica *N*-difênica através de uma biblioteca combinatória dinâmica de bases de Schiff para a

escolha de um farmacóforo de baixo peso molecular que mantivesse sua propriedade fluorescente por mais tempo quando ligado ao HSA. Além de encontrar novamente os bons resultados descritos por Shen e colaboradores (2017), outra molécula apresentando o núcleo benzimidazol também foi descoberta, A9L13 (Figura 10, página 28). Esta apresentou fluorescência intensa quando excitada a 365 nm, apresentando solvatocromismo e retenção da intensidade de fluorescência após 100 minutos de incubação à temperatura ambiente (TABUCHI; TAKI, 2018).

Figura 10. Estrutura de sondas de HSA baseadas em heterociclos e *N*-bifenila



Fonte: Adaptado de Fan et al. (2014), Wu et al. (2014), Shen et al. (2017) e Tabuchi; Taki (2018).

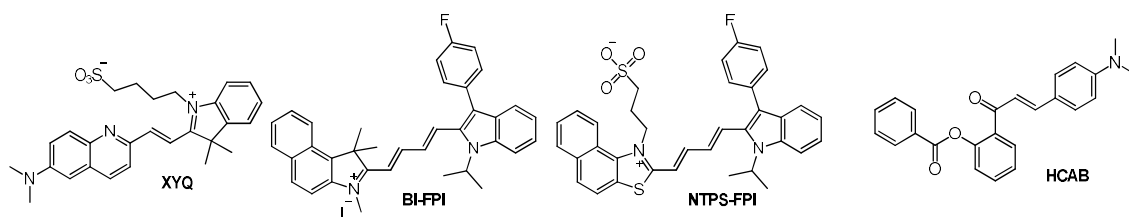
Em outro importante trabalho, Xu e colaboradores (2018) desenvolveram com sucesso uma sonda fluorescente baseada nos anéis quinolina e indol. A nova sonda, chamada XYQ (Figura 11, página 29), apresentou um pico de emissão em 465 nm após adição de HSA, chegando a um aumento de 500 vezes na intensidade de fluorescência com excelente linearidade e variação da concentração de HSA de 0 a 0,2 g/L. Resultados interessantes também foram observados para a detecção da HSA na urina humana, não sendo prejudicado pela interferência de outras substâncias biológicas (XU et al., 2018).

Mais tarde, duas novas sondas de estrutura crescente similar foram descobertas, apresentando emissão próxima ao infravermelho (LIU et al., 2018). Os máximos de absorção para BI-FPI e NTPS-FPI (Figura 11, página 29) foram de 540 nm e 510 nm, respectivamente. Os espectros de fluorescência do BI-FPI mostraram emissões duplas bem divididas com o máximo de 611 nm e 665 nm, respectivamente. O NTPS-FPI mostrou emissão única com máximo de 665 nm. Em contato com a HSA e BSA, o comprimento de onda de emissão de BI-FPI estava em 676 nm e 664 nm, e o aumento da fluorescência foi de 100 e 33 vezes, respectivamente. Para o NTPS-FPI, o máximo de emissão em BSA foi significativamente deslocada para o azul, 55 nm a mais do que no HSA, e a

intensidade na BSA também foi quase 2,5 vezes maior do que para HSA (LIU et al., 2018).

Finalmente, outra sonda baseada no mecanismo de transferência de carga intramolecular torcida, o HCAB (Figura 11, página 29) contendo a porção 4-dimetilamino demonstrou excelente seletividade para a HSA entre diferentes proteínas, com aprimoramento da fluorescência de 160 vezes. Quando testado no plasma humano, os resultados obtidos foram semelhantes aos apresentados em métodos clínicos padrão (LI et al., 2018).

Figura 11. Estruturas de sondas HSA/BSA contendo os núcleos indol, benzotiazol e dimetil amino



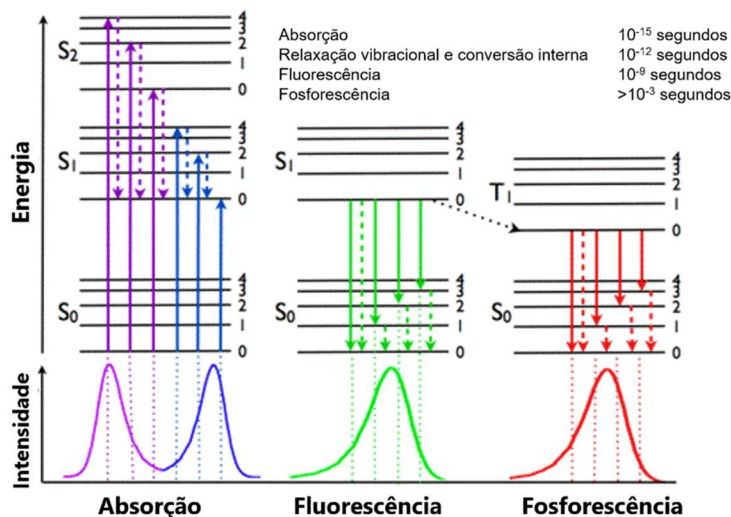
Fonte Adaptado de Xu et al. (2018), Liu et al. (2018), Li et al. (2018).

2.5 Aspectos gerais relacionados a moléculas orgânicas fluorescentes

O fenômeno de luminescência consiste na emissão de luz por qualquer substância, ocorrendo a partir de estados eletronicamente excitados (LAKOWICZ, 2006). A luminescência é dividida em duas categorias, dependendo da natureza do estado excitado: fluorescência e fosforescência (Figura 12, página 30). Na fluorescência, a direção do spin do elétron que é promovido para um orbital de maior energia é preservada, tem-se o estado singleto. Por outro lado, na fosforescência, ocorre um cruzamento Inter sistemas, levando o elétron excitado a um estado tripleto. Nesse caso, a emissão da luz se dá a partir de estados tripleto excitados, em que o orbital excitado tem a mesma orientação do elétron no estado fundamental (LAKOWICZ, 2006).

É comum que moléculas orgânicas apresentem apenas fluorescência eficiente, apresentando assim uma transição permitida. A força de transição do estado tripleto para o estado fundamental, no entanto, é quanticamente proibida, exigindo que o elétron sofra uma rotação (SALAS REDONDO et al., 2017).

Figura 12. Diagrama de Jablonksi representando níveis e espectros de energia. Setas preenchidas indicam transições radiativas de absorção (violeta, azul) ou emissão (verde para fluorescência; vermelho para fosforescência) de um fóton. As setas tracejadas representam transições não radiativas. Abaixo do diagrama, são mostrados os esboços dos espectros de absorção, fluorescência e fosforescência.

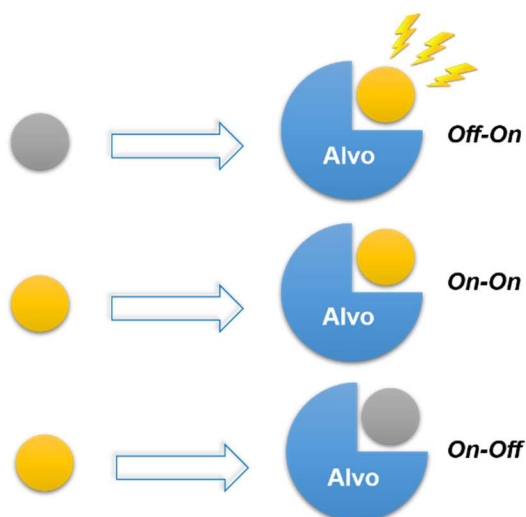


Fonte: ROLINSKI, 2020.

Nos últimos anos, o uso e a síntese de moléculas orgânicas para detecção baseada em técnicas de fluorescência obtiveram notável progresso. Fluoróforos orgânicos podem formar ligações covalentes ou não covalentes com as biomoléculas a serem analisadas, produzindo conjugados ou complexos que podem fluorescer desde comprimentos de onda curtos a muito longos (GONÇALVES, 2009).

Sondas fluorescentes são compostos que apresentam fluorescência quando ligados a biomoléculas, atuando, portanto, como sinalizadores em meio biológico. Existem vários mecanismos pelos quais sondas podem apresentar fluorescência (Figura 13, página 31) (TABUCHI; TAKI, 2018). Entre estes, o mecanismo *off-on* (ou *turn-on*) consiste na baixa intensidade de fluorescência ou sua ausência total enquanto a sonda estiver na forma livre (*off*) enquanto que na presença de uma biomolécula, ocorra um aumento na intensidade de fluorescência (*on*). Algumas sondas podem ainda exibir o mecanismo *on-on* (*always on*) ou *on-off* (*turn-off*).

Figura 13. Mecanismos de fluorescência de sondas.



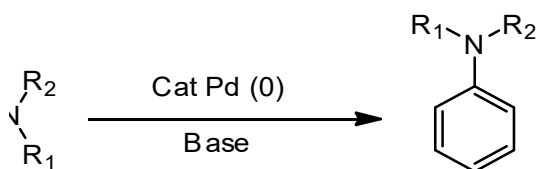
Fonte: Adaptado de Tabuchi; Taki, 2018.

2.6 Reações envolvidas na síntese das sondas propostas

2.6.1 Reações de acoplamento C-N: Aminoação de Buchwald-Hartwig

Importante para a síntese das sondas projetadas nesse trabalho, as reações acoplamento C-N, conhecidas como aminoação de Buchwald-Hartwig, são reações catalisadas por paládio entre aminas e haletos de arila na presença de um ligante e uma base (Figura 14, página 31) (HARTWIG, 2007). Os ligantes mais utilizados são as fosfinas BINAP (2,2'-bis(difenilfosfino)-1,1'-binafitil) e DPPF (1,1'-Bis (difenilfosfino) ferroceno) e o organofosforado xantphos. Bases como t-BuONa, Cs₂CO₃ e K₂CO₃ são frequentemente utilizadas (LU et al., 2013). O mecanismo de reação desses compostos será discutido em mais detalhes para as moléculas propostas nesse trabalho.

Figura 14. Reação de acoplamento cruzado C-N catalisada por paládio



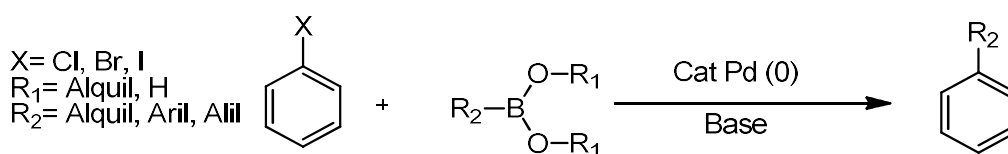
Fonte: Adaptado de Hartwig et al., 2019.

2.6.2 Reações de acoplamento C-C: Suzuki-Miyaura

Uma das mais importantes metodologias envolvendo metais de transição para a formação de ligações carbono-carbono é a reação de Suzuki-Miyaura.

Esta consiste no acoplamento cruzado de compostos borônicos com haletos orgânicos catalisados por um complexo de paládio na presença de uma base (Figura 15, página 32) (SUZUKI, 2005). Diversas vantagens estão associadas a esse tipo de reação, como realização em condições amenas, grande disponibilidade dos ácidos borônicos utilizados, estabilidade frente ao calor, oxigênio e água, e a facilidade de manuseio e separação de subprodutos do boro (MARTIN; BUCHWALD, 2008). Diversos complexos de paládio já foram utilizados com ou sem a presença de fosfinas (ex. PPh₃). Outros complexos como 5% Pd-C, Pd(OAc)₂, Pd(dba)₃, P(*t*-Bu)₃ com ou sem a presença de fosfinas também são eficazes (CEPANEC, 2004; HERAVI et al., 2018). Adicionalmente, bases como K₂CO₃, KO^tBu, Cs₂CO₃, K₃PO₄, NaOH e NEt₃ são frequentemente utilizadas (BATALHA; SAGRILLO; GAMA, 2014). O mecanismo dessas reações será abordado com mais detalhes para os intermediários aqui estudados.

Figura 15. Reação de acoplamento cruzado C-C catalisada por paládio.



Fonte: Adaptado de Name-Reaction, 2020.

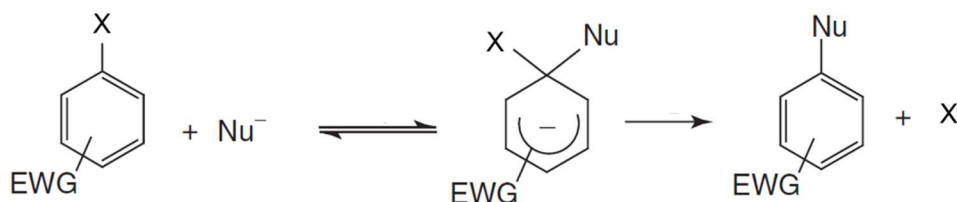
2.6.3 Substituição Nucleofílica Aromática (S_NAr)

Reações de substituição nucleofílica aromática (S_NAr) envolvendo haletos de arila não ocorrem normalmente (SOLOMONS; FRYHLE, 2014). A realização da substituição através de um mecanismo S_N2 é impossibilitada pois o átomo de carbono é tetraédrico e a ligação C-X (X=halogênio) não está no plano do anel. Embora haja a possibilidade de realização via mecanismo S_N1, esta é improvável devido à instabilidade de cátions arila (CLAYDEN; GREEVES; WARREN, 2012).

No entanto, sob condições adequadas essas reações ocorrem pelo mecanismo de adição-eliminação (Figura 16, página 33). É importante a presença de um grupo retirador de elétrons (EWG) como um grupo carbonila, nitro ou cianeto, *orto* ou *para* ao grupo de saída, de forma a estabilizar o ânion formado (CLAYDEN; GREEVES; WARREN, 2012). Entre os grupos de saída mais adequados, o flúor se destaca com a ordem de reatividade frequentemente obedecendo F⁺ > Cl ≈ Br > I, devido à forte polarização C^{δ+}-F^{δ-} em comparação a

outras ligações C-X (TERRIER, 2013). O mecanismo de reação detalhado será analisado para as moléculas propostas.

Figura 16. Mecanismo de adição-eliminação para S_NAr. X= halogênio, ou grupo de saída; EWG= Grupo retirador de elétrons; Nu= nucleófilo.



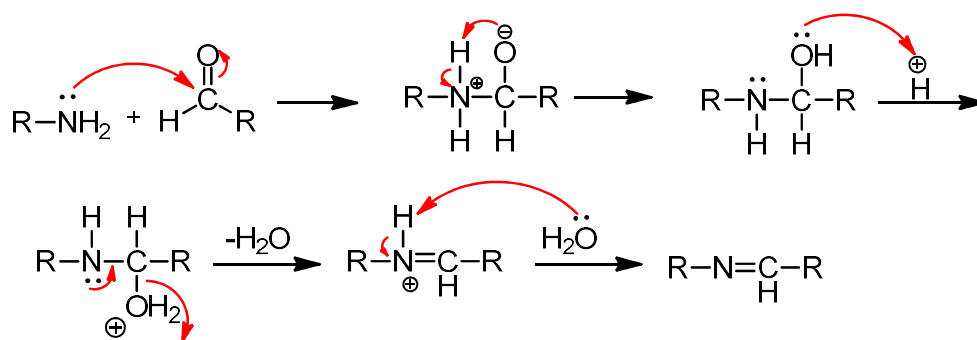
Fonte: Adaptado de Terrier, 2013.

2.6.4 Síntese de Iminas

Iminas são formadas quando uma amina primária reage com um aldeído ou uma cetona, formando uma ligação azometina ($-C=NR_1R_2$) (DA SILVA et al., 2011). Ao longo dos anos, diversas metodologias foram propostas, sendo a utilização de substâncias que funcionem como ácidos de Lewis (ex. AcOH e HCl) para ativação do grupo carbonila e remoção da água, as mais utilizadas. Adicionalmente, alguns agentes secantes como MgSO₄ e peneiras moleculares também são utilizados, no intuito de se deslocar o equilíbrio para a formação do produto (KAJAL et al., 2013).

O ácido representa um importante papel no mecanismo de síntese de iminas, no entanto a sua concentração deve ser controlada. Em pH alto, não haverá ácido suficiente para protonar o grupo OH do intermediário e permitir a remoção de água, enquanto que em pH extremamente baixo, a amina formará seu ácido conjugado tornando-se não nucleofílica. Sugere-se que o mecanismo de síntese de iminas ocorra pela adição nucleofílica do grupo amino à carbonila levando a transferência de um próton do nitrogênio para o oxigênio, levando a formação de um intermediário hemiaminal estável ($-C(OH)(NHR)-$) seguido da eliminação de água para formação da imina (Figura 17, página 34) (ABID; RAMADAN, 2018).

Figura 17. Mecanismo de síntese de Iminas.



R= Grupos Alquil ou Aril

Fonte: Adaptado de Abid; Ramadan, 2018.

Neste sentido, utilizando-se as reações orgânicas descritas anteriormente (Buchwald-Hartwig, Suzuki-Miyaura, $\text{S}_{\text{N}}\text{Ar}$ e condensação para formação de iminas), e considerando o potencial de derivados sintéticos contendo os núcleos benzimidazol e indol como sondas de DNA, o presente trabalho objetivou o planejamento e síntese de novos compostos que atuem como potenciais sondas de DNA e BSA/HSA. Além da síntese e comprovação estrutural, todos os compostos foram avaliados experimentalmente utilizando-se técnicas espectroscópicas e de fluorescência.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.2 Objetivo Geral

Planejamento, síntese, caracterização estrutural e realização de ensaios envolvendo aplicações bioanalíticas de compostos que atuem como sondas fluorescentes *off-on* para quantificação de DNA e BSA.

3.2 Objetivos Específicos

- Síntese de novas sondas fluorescentes contendo os núcleos benzimidazol e indol, bem como a caracterização estrutural dos intermediários e compostos finais através da técnica de Ressonância Magnética Nuclear (RMN ^1H e ^{13}C).
- Caracterização fotoquímica das sondas sintetizadas na forma livre e na presença de DNA (de Calf thymus) e BSA (proteína do soro bovino) utilizando diferentes técnicas espectroscópicas;
- Avaliar a influência das principais variáveis químicas (concentração da sonda, pH, força iônica, tampão: tipo/concentração, entre outras) para obtenção da melhor resposta analítica;
- Avaliar a estequiometria, a cinética e a estabilidade do complexo formado;
- Determinar as figuras de mérito analíticas e a constante de ligação;

MATERIAIS E MÉTODOS

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Caracterização estrutural e determinação de propriedades físico-químicas

4.1.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD), Cromatografia líquida de Média pressão e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

As cromatografias em camada delgada (CCD) foram realizadas em placas de Sílica Gel 60 F254 (MERCK®) de 0,25 mm de espessura, reveladas por luz emissora de radiação ultravioleta (UV) no comprimento de onda (λ) de 254 nm e 365 nm. A purificação dos intermediários e compostos finais foi realizada por meio de cromatografia líquida de média eficiência desenvolvida no aparelho flashes Mart AIT acoplado ao detector UV no comprimento de onda de 254 nm em colunas simply connect BS-SUP (20-40 μ m).

A determinação do grau de pureza dos respectivos compostos foi realizada por meio de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplado ao detector UV no comprimento de onda de 254 nm (CLAE/HPLC-UV), utilizando o equipamento Shimadzu®, modelo SIL-20AHT, coluna C-18 Supelco Discovery®, 25 cm x 4.6 mm, 5 μ M. Foi utilizado como fase móvel metanol 100%. O volume de injeção da amostra foi de 5 μ L e o fluxo de injeção 1mL/min. As amostras foram analisadas em corridas de 12 minutos.

4.1.2 Determinação do ponto de Fusão

Para a determinação do ponto de fusão, utilizou-se o equipamento MSTecnopon®, modelo PFMII Digital, em tubos capilares abertos. O equipamento não foi calibrado.

4.1.3 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN ^{13}C e ^1H)

Os espectros de RMN 1D e 2D (^1H , ^{13}C , HSQC, HMBC) foram obtidos em equipamentos *Brüker*®, modelos *avance DRX 600 MHz e 400 MHz – UltraShield*®, utilizando DMSO- d_6 e CDCl_3 como solventes deuterados. Os deslocamentos químicos (δ) foram computados em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento (J) foram computadas em Hertz (Hz). As multiplicidades dos sinais foram instituídas da seguinte maneira: simpleto (s),

simpleto largo (sl), duplete (d), tripleto (t), quarteto (qua), quinteto (qui) e multiplete (m).

4.2 Reagentes, solventes e equipamentos utilizados na síntese

Os reagentes utilizados na síntese foram do fabricante *Sigma-Aldrich*[®] (Grau de pureza $\geq 99\%$). Os solventes utilizados foram padrão P.A. (para análise) dos fabricantes *Synth* ou *Sigma-Aldrich*[®].

REAGENTES	
5-Aminoindol	2,2'-bis (difenilfosfino) -1,1'-binaftil (BINAP)
2-Aminobenzimidazol	Fenil piperazina
Anilina	Sulfato de Sódio (Na ₂ SO ₄)
Pirrolidina	Ácido 4-hidroxifenil borônico
Ácido Acético (AcOH)	Ácido 4-N,N'- dietilamino fenil borônico
4-Clorobenzaldeído	Solução de Ácido Clorídrico 1M (HCl)
4-Bromobenzaldeído	Carbonato de Potássio (K ₂ CO ₃)
4-Flúorbenzaldeído	Solução saturada de Cloreto de Sódio
Difenilamina	Hidróxido de Potássio (KOH)
Piperidina	Carbonato de Césio (Cs ₂ CO ₃)
Morfolina	Acetato de Paládio (II) (Pd(OAc) ₂)

SOLVENTES	
Acetato de Etila absoluto	Hexano absoluto
Metanol absoluto	Água destilada
1,4-Dioxano anidro	Dimetilformamida anidra (DMF)

EQUIPAMENTOS
Balança analítica (<i>Bel Engineering/Mark M214</i>)
Bomba de vácuo (<i>Edwards/ RVS</i>)
Vidrarias de laboratório (<i>SkyLab</i>)
Evaporador rotativo (<i>IKA[®] / Hb10 Digital</i>)
Estufa (<i>Nova ética/ 404/1D</i>)
Capela com exaustão (<i>Lucadema</i>)
Placas de agitação e aquecimento (<i>IKA/ C-MAG HS7</i>)

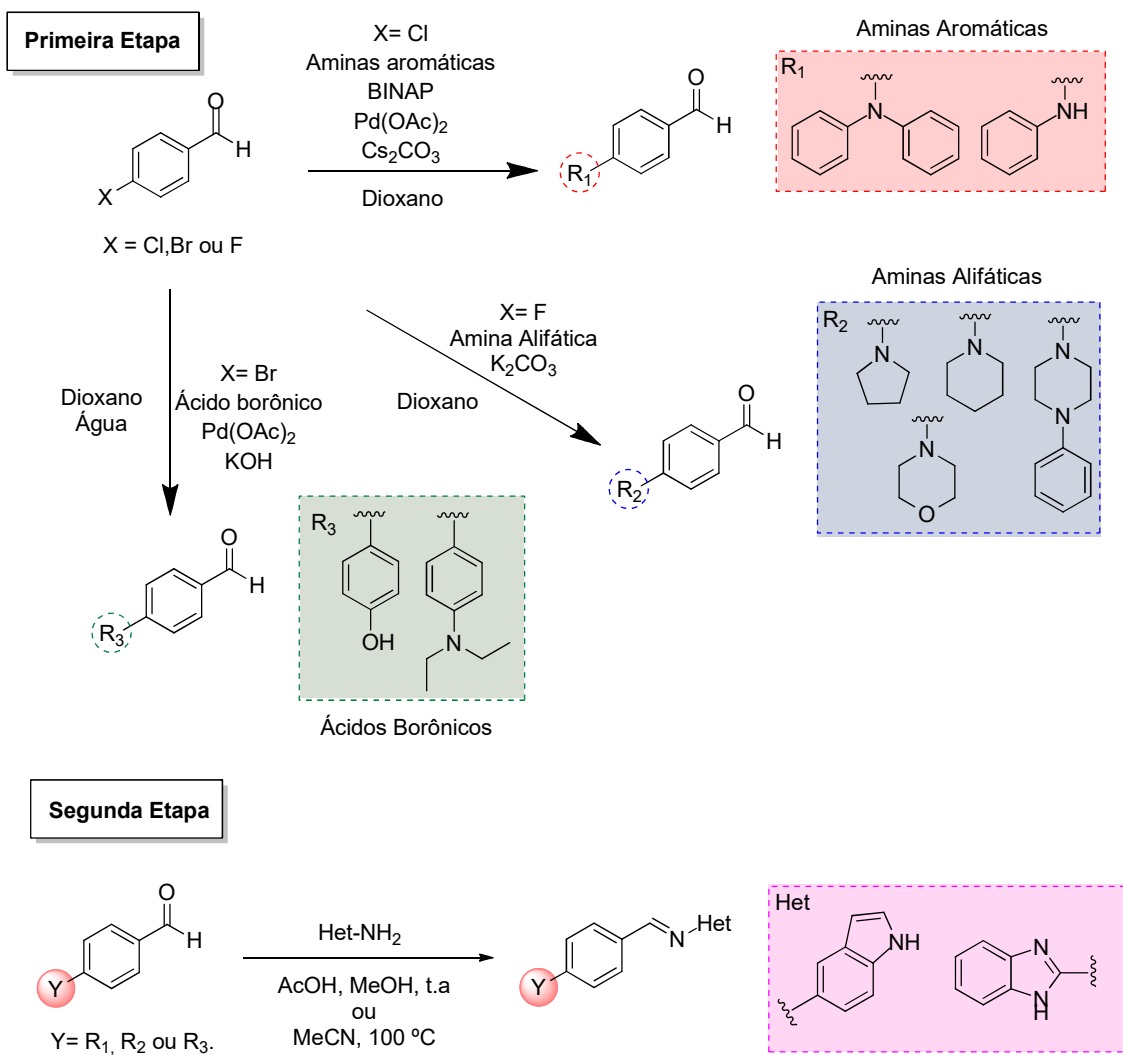
4.3 Planejamento para a síntese

As sondas planejadas nesse trabalho foram sintetizadas através da condensação de aldeídos aromáticos *para*-funcionalizados com os heterociclos 2-aminobenzimidazol e 5-aminoindol para formação de uma função imina.

A primeira etapa consistiu na funcionalização do benzaldeído na posição 4 (utilizando-se os produtos de partida 4-clorobenzaldeído, 4-flúorobenzaldeído e 4-bromobenzaldeído) com aminas aromáticas, aminas alifáticas, ou a partir de reações com ácidos fenil borônicos substituídos (Esquema 1: primeira etapa, página 41). Esses grupos foram escolhidos por apresentarem substituintes adequados à geração de uma deslocalização eletrônica necessária para a formação de compostos fluorescentes, como grupos doadores de elétrons não ligantes. Estes podem ser exemplificados pelos substituintes OH, NH₂, OR e NR₂ (SORKIN et al., 2020).

A segunda etapa de síntese consistiu na condensação dos aldeídos aromáticos funcionalizados com os heterociclos 5-aminoindol e 2-aminobenzimidazol, através da formação de uma função imina (Esquema 1: segunda etapa, página 41). Esses núcleos foram escolhidos pela sua presença em diversos corantes e sondas orgânicas, além de apresentar reconhecida afinidade pelo DNA.

Esquema 1. Rota sintética das sondas propostas. Primeira etapa: funcionalização de aldeídos aromáticos; Segunda etapa: Condensação de aldeídos funcionalizados com os heterociclos.



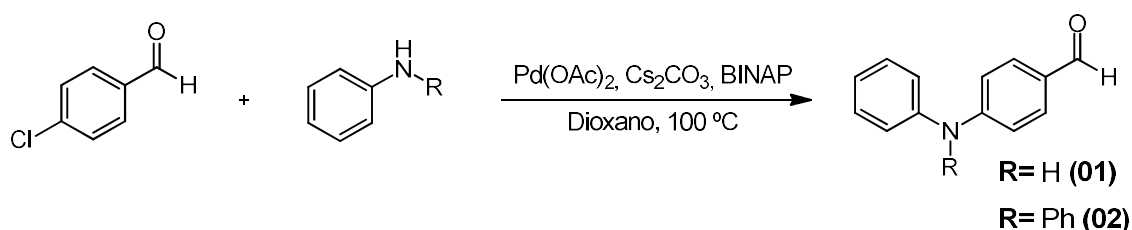
Fonte: Autora, 2021.

4.4 Procedimento experimental para síntese das sondas propostas

4.4.1 Obtenção dos benzaldeídos *p*-funcionalizados por reações de acoplamento cruzado C-N (Buchwald-Hartwig)

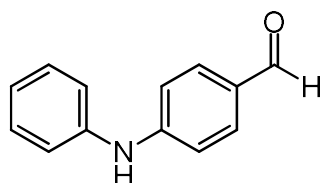
As reações de acoplamento para formação de ligações C-N entre aminas ligadas a anéis aromáticos foram realizadas através de reações de aminação de Buchwald-Hartwig (Figura 18, página 42). Para isso, em um tubo de vidro (Biotage®) foram adicionados 1 mmol de 4-clorobenzaldeído, 1,2 mmol de anilina ou difenilamina, 4 %mmol de Pd(OAc)₂, 2 mmol de Cs₂CO₃, 6 %mmol de BINAP e 10mL de dioxano anidro. Adicionados todos os reagentes, o tubo foi selado e uma purga foi realizada com a inserção do gás argônio. A reação foi agitada à 100 °C por 24 horas. Após seu término ser constatado por CCD, a mistura foi seca sob pressão reduzida e submetida a uma extração líquido-líquido utilizando acetato de etila como solvente orgânico, uma solução de HCl 1M (10 mL) e uma solução saturada de NaCl (10 mL). A fase orgânica foi coletada, seca com Na₂SO₄, e o solvente foi removido sob pressão reduzida. Para o composto **01**, a purificação foi realizada por cromatografia utilizando como fase móvel Hexano/ActOEt 9:1. Para o composto **02**, foi realizada uma recristalização em MeOH fornecendo o produto puro.

Figura 18. Esquema de síntese de reações de Buchwald-Hartwig



Fonte: Autora, 2021.

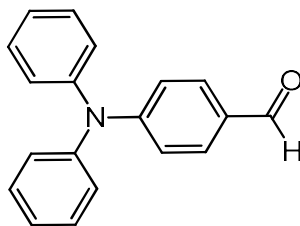
4.4.1.1 Dados e caracterização de 4-(fenilamino) benzaldeído (INT 01)



- Sólido amarelo; Rendimento: 55,0%; PF: 94-97 °C; Massa molar: 197,08 g/mol; Fórmula molecular: C₁₃H₁₁NO, Fator de retenção: 0,4 (Hex:ActOEt 9:1).

- RMN ^1H (400MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 7,03 (*t*, 1H, $J= 7,4$ Hz, H-Ar); 7,10 (*d*, 2H, $J= 8,4$ Hz, H-Ar); 7,21 (*d*, 2H, $J= 7,5$ Hz, H-Ar); 7,35 (*t*, 2H, $J= 7,5$ Hz, H-Ar); 7,72 (*d*, 2H, $J= 8,4$ Hz, H-Ar); 9,00 (*s*, 1H, NH); 9,70 (*s*, 1H, CHO).
- RMN ^{13}C (100MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 114,42; 120,55; 123,03; 127,82; 129,87; 132,33; 141,18; 150,46; 190,61. (Apêndice A).

4.4.1.2 Dados e caracterização de 4-(difenilamino) benzaldeído (INT 02)

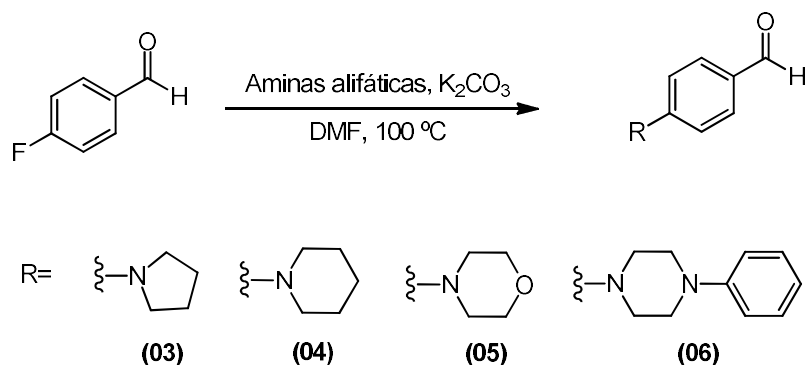


- Sólido amarelo; Rendimento: 49,68%; PF: 129-133 °C; Massa molar: 273,12 g/mol; Fórmula molecular: $\text{C}_{19}\text{H}_{15}\text{NO}$, Fator de retenção: 0,4 (Hex:ActOEt 9:1).
- RMN ^1H (400MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 6,88 (*d*, 2H, $J= 8,7$ Hz, H-Ar); 7,19 (*d*, 4H, $J= 7,4$ Hz, H-Ar); 7,25 (*t*, 2H, $J= 7,4$ Hz, H-Ar); 7,42 (*t*, 4H, $J= 7,5$ Hz, H-Ar); 7,51 (*d*, 2H, $J= 8,7$ Hz, H-Ar); 9,77 (*s*, 1H, CHO).
- RMN ^{13}C (100MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 118,0; 152,3; 126,3; 128,4; 129,9; 131,20; 145,4; 152,6; 190,4. (Apêndice B).

4.4.2 Obtenção dos benzaldeídos *p*-funcionalizados por reações de $\text{S}_{\text{N}}\text{Ar}$

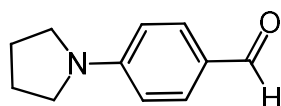
Para as reações entre 4-fluorobenzaldeído e aminas alifáticas, foram realizadas reações de substituição nucleofílica aromática ($\text{S}_{\text{N}}\text{Ar}$) (Figura 19, página 44). Dessa forma, em 10 mL de DMF foram adicionados 1 mmol do respectivo benzaldeído, 1,1 mmol da requerida amina e 2 mmol de K_2CO_3 . A mistura foi agitada à 100 °C durante 24 horas. Constatado o término da reação verificado por CCD, foi realizada uma extração líquido-líquido com acetato de etila e água (3 x 10 mL). A fase orgânica foi seca com Na_2SO_4 e o solvente foi evaporado sob pressão reduzida. Para os compostos **03-05** a purificação foi realizada por cromatografia utilizando-se como fase móvel Hexano/ActOEt 9:1. Já para composto **06**, ao término da reação foram adicionados 5 mL de água destilada, fornecendo assim um precipitado amarelo.

Figura 19. Esquema de síntese para reações de S_NAr



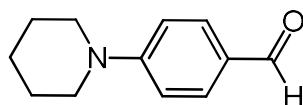
Fonte: Autora, 2021.

4.4.2.1 Dados e caracterização de 4-(pirrolidin-1-il) benzaldeído (INT 03)



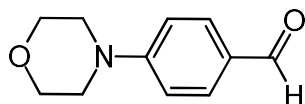
- Sólido amarelo; Rendimento: 61,0 %; PF: 85-86 °C; Massa molar: 175,10 g/mol; Fórmula molecular: C₁₁H₁₃NO; Fator de retenção: 0,3 (Hex:ActOEt 9,5:0,5).
- RMN ¹H (600MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 1,97 (*qui*, 4H, *J*= 3,6 Hz, CH₂); 3,34 (*t*, 4H, *J*= 6,7 Hz, NCH₂); 6,63 (*d*, 2H, *J*= 8,8 Hz, H-Ar); 7,67 (*d*, 2H, *J*= 8,8 Hz, H-Ar); 9,64 (*s*, 1H, CHO)
- RMN ¹³C (100MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 25,38; 47,82; 111,73; 124,69; 132,19; 125,12; 190,15. (Apêndice C).

4.4.2.2 Dados e caracterização de 4-(piperidin-1-il) benzaldeído (INT 04)



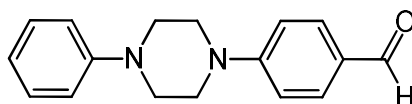
- Sólido rosa; Rendimento: 55,0 %; PF: 67-68 °C; Massa molar: 189,12 g/mol; Fórmula molecular: C₁₂H₁₅NO; Fator de retenção: 0,3 (Hex:ActOEt 9,5:0,5).
- RMN ¹H (600MHz, CDCl₃) δ (ppm): 1,69 (*sl*, 6H, CH₂); 3,39-3,44 (*m*, 4H, NCH₂); 6,94 (*s*, 2H, H-Ar); 7,74 (*d*, 2H, *J*= 8,6 Hz, H-Ar); 9,76 (*s*, 1H, CHO).
- RMN ¹³C (100MHz, CDCl₃) δ (ppm): 24,21; 25,20; 48,80; 113,78; 131,97; 190,30. (Apêndice D).

4.4.2.3 Dados e caracterização de 4-morfolino benzaldeído (INT 05)



- Sólido branco; Rendimento: 50,0 %; PF: 69-70 °C; Massa molar: 191,09 g/mol; Fórmula molecular: C₁₁H₁₃NO₂; Fator de retenção: 0,4 (Hex:ActOEt 8:2).
- RMN ¹H (600MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 3,34 (t, 4H, J= 4,88 Hz, NCH₂); 3,37 (t, 4H, J= 5,03 Hz, OCH₂); 7,06 (d, 2H, J= 8,9 Hz, H-Ar); 7,73 (d, 2H, J= 8,9 Hz, H-Ar); 9,73 (s, 1H, CHO).
- RMN ¹³C (100MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 47,03; 66,26; 113,67; 127,14; 131,89; 155,40; 190, 90. (Apêndice E).

4.4.2.4 Dados e caracterização de 4-fenilpiperazin-1il benzaldeído (INT 06)



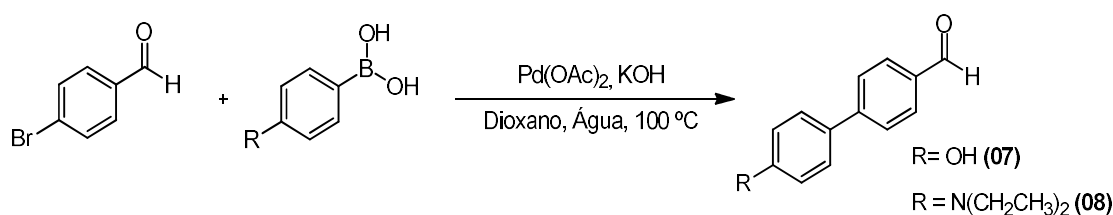
- Sólido amarelo; Rendimento: 80,0 %; PF: 134 °C; Massa molar: 266,14 g/mol; Fórmula molecular: C₁₇H₁₈N₂O, Fator de retenção: 0,3 (Hex:ActOEt 9:1).
- RMN ¹H (600MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 3,28 (t, 4H, J= 5,1 Hz, CH₂); 3,55 (t, 4H, J= 5,0 Hz, CH₂); 6,81 (t, 1H, J= 7,2 Hz, H-Ar); 6,99 (d, 2H, J= 7,8 Hz, H-Ar); 7,11 (d, 2H, J= 8,9 Hz, H-Ar); 7,23-7,26 (m, 2H, H-Ar); 7,74 (d, 2H, J= 8,9 Hz, H-Ar); 9,73 (s, 1H, CHO).
- RMN ¹³C (100MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 46,76; 48,37; 113,86; 116,05; 119,63; 126,87; 129,48; 131,99; 151,16; 155,03; 190,81. (Apêndice F).

4.4.3 Obtenção dos benzaldeídos *p*-funcionalizados por reações de acoplamento cruzado C-C (Suzuki-Miyaura)

Para as reações de acoplamento cruzado C-C (Suzuki-Miyaura), foram adicionados à um tubo 1 mmol de 4-bromobenzaldeído, 0,2 %mmol de Pd(OAc)₂, 3 mL de dioxano e 1 mL de água destilada. A mistura foi agitada na temperatura ambiente por 5 minutos. Após esse período, foram adicionados 1 mmol do requerido ácido borônico e 2 mmol de KOH. O tubo foi selado e uma purga foi realizada com a inserção do gás argônio. A reação permaneceu sob agitação

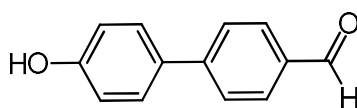
constante à 100 °C por 3 horas. Constatado o término da reação por CCD, foi realizada uma extração líquido-líquido utilizando acetato de etila como solvente orgânico, uma solução de HCl 1M (10 mL) e uma solução saturada de NaCl (10 mL). A fase orgânica foi coletada e seca com Na₂SO₄. Finalmente o solvente foi seco sob pressão reduzida. O intermediário **07** foi purificado por cromatografia utilizando como fase móvel Hexano/ActOEt 9:1. Já o composto **08** foi purificado através de uma recristalização em EtOH:H₂O.

Figura 20. Esquema de síntese de reações de Suzuki-Miyaura



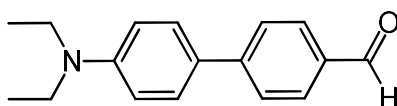
Fonte: Autora, 2021.

4.4.3.1 Dados e caracterização de 4'-hidroxi-[1,1'-bifenil]-4-carbaldeído (INT **07**)



- Sólido branco; Rendimento: 15,0%; PF: 181-182 °C; Massa molar: 198,07 g/mol; Fórmula molecular: C₁₃H₁₀O₂; Fator de retenção: 0,32 (Hexano: ActOEt 8,5:1,5).
- RMN ¹H (600MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 6,88 (*d*, 2H, *J* = 8,5 Hz, H-Ar); 7,62 (*d*, 2H, *J* = 8,7 Hz, H-Ar); 7,82 (*d*, 2H, *J* = 8,3 Hz, H-Ar); 7,92 (*d*, 2H, *J* = 8,3 Hz, H-Ar); 9,80 (*s*, 1H, OH); 10,00 (*s*, 1H, CHO).
- RMN ¹³C (100MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 116,43; 126,80; 128,84; 129,79; 130,62; 134,67; 146,42; 158,70; 192,99. (Apêndice G).

4.4.3.2 Dados e caracterização de 4'-(dietilamino)-[1,1'-bifenil]-4-carbaldeído (INT **08**)

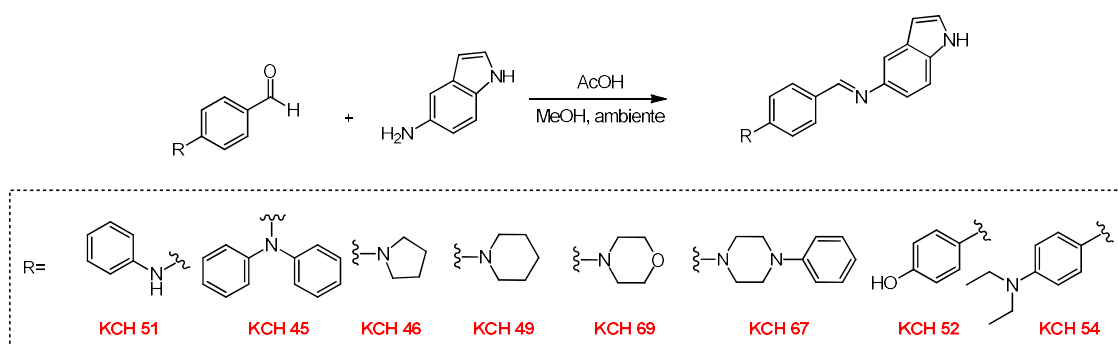


- Sólido amarelo; Rendimento: 20,0 %; PF: 138-139 °C; Massa molar: 253,15 g/mol; Fórmula molecular: C₁₇H₁₉NO; Fator de retenção: 0,5 (Hexano).
- RMN ¹H (600MHz, CDCl₃) δ (ppm): 1,23 (t, 6H, J= 7,0 Hz, CH₃CH₃); 3,44 (qua, 4H, J= 7,0 Hz, CH₂CH₂); 6,77 (d, 2H, J= 8,6 Hz, H-Ar); 7,58 (d, 2H, J= 8,8, H-Ar); 7,73 (d, 2H, J= 8,2, H-Ar); 7,91 (d, 2H, J= 8,0, H-Ar); 10,01 (s, 1H, CHO).
- RMN ¹³C (100MHz, CDCl₃) δ (ppm): 12,1; 44,42; 111,82; 125,80; 126,00; 128,28; 130,37; 133,85; 147,29; 148,09. (Apêndice H).

4.4.4 Condensação de benzaldeídos *p*-funcionalizados com 5-aminoindol para formação de iminas

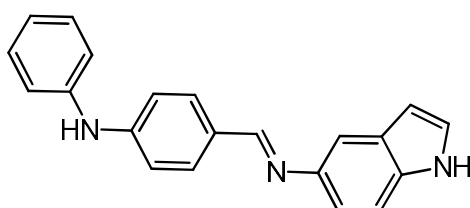
Utilizando como referência a metodologia desenvolvida por Halawa et al., 2017, uma solução contendo 1 mmol dos aldeídos aromáticos (01-08), 5 mL de MeOH, e uma gota de ácido acético foi agitada por 5 minutos. Após esse tempo, foi adicionado 1 mmol de 5-aminoindol, e a mistura permaneceu sob agitação a temperatura ambiente por 12 horas. Após o término da reação ser constatada por CCD, o precipitado formado foi filtrado e lavado com MeOH gelado.

Figura 21. Esquema de síntese dos derivados imina incorporadas à fração indol



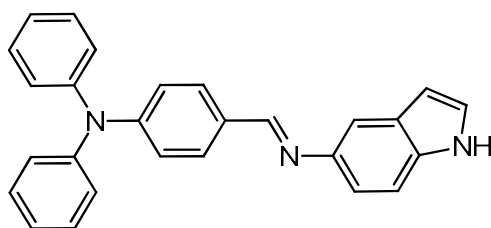
Fonte: Adaptado de Halawa et al. (2017).

4.4.4.1 Dados e caracterização de (*E*)-*N*-(4-(fenilamino)benzilideno)-1*H*-indol-5-amina (KCH 51)



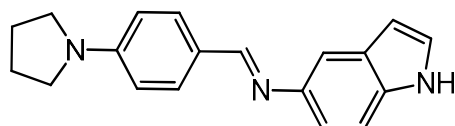
- Sólido amarelo; Rendimento: 35,17 %; PF: 184-185 °C; Massa molar: 311,14 g/mol; Grau de Pureza: 99,99%; Fórmula molecular: C₂₁H₁₇N₃, Fator de retenção: 0,25 (Hex:ActOEt 8:2).
- RMN ¹H (600 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 6,42 (s, 1H, H-Ar); 6,93 (t, 1H, J= 7,3 Hz, H-Ar); 7,09 (d, 2H, J= 8,4 Hz, H-Ar); 7,13 (d, 2H, J= 8,4 Hz, H-Ar); 7,18 (d, 2H, J= 8,0 Hz, H-Ar); 7,30 (t, 2H, J= 7,7 Hz, H-Ar); 7,34 (s, 1H, H-Ar); 7,37-7,41 (m, 2H, H-Ar); 7,78 (d, 2H, J= 8,2 Hz, H-Ar); 8,51 (s, 1H, CH=N); 8,64 (s, 1H, NH); 11,09 (s, 1H, NH-Indol).
- RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 101,92; 111,83; 112,11; 115,57; 116,24; 118,91; 121,54; 126,54; 128,27; 128,64; 129,76; 130,32; 134,93; 142,48; 144,60; 146,73; 157,23. (Apêndice I).

4.4.4.2 Dados e caracterização de (*E*)-*N*-(4-(difenilamino) benzilideno)-1*H*-indol-5-amina (KCH 45)



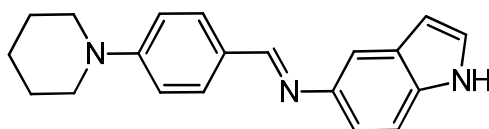
- Sólido amarelo; Rendimento: 63,95 %; PF: 90-92 °C; Massa molar: 387,17 g/mol; Grau de Pureza: 98,21%; Fórmula molecular: C₂₇H₂₁N₃, Fator de retenção: 0,3 (Hex:ActOEt 9:1).
- RMN ¹H (600 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 6,42 (s, 1H, H-Ar); 6,98 (d, 2H, J= 8,7 Hz, H-Ar); 7,09-7,14 (m, 7H, H-Ar); 7,34-7,39 (m, 6H, H-Ar); 7,42 (m, 1H, H-Ar); 7,79 (d, 2H, J= 8,6 Hz, H-Ar); 8,56 (s, 1H, CH=N); 11,09 (s, 1H, NH).
- RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 102,01; 112,07; 112,15; 116,18; 121,60; 124,56; 125,53; 126,63; 128,62; 130,03; 130,23; 130,56; 135,11; 144,30; 147,02; 150,03; 156,91. (Apêndice J).

4.4.4.3 Dados e caracterização de (*E*)-*N*-(4-(pirrolidin-1-il)benzilideno)-1*H*-indol-5-amina (KCH 46)



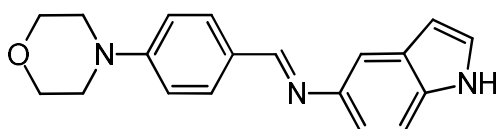
- Sólido amarelo; Rendimento: 78,06 %; PF: 210-211 °C; Massa molar: 289,16 g/mol; Grau de Pureza: 99,99%; Fórmula molecular: C₁₉H₁₉N₃; Fator de retenção: 0,3 (Hex:ActOEt 8:2).
- RMN ¹H (600 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 2,04 (*m*, 4H, CH₂); 3,37 (*t*, 4H, *J*= 6,2 Hz, CH₂); 6,55 (*s*, 1H, H-Ar); 6,60 (*d*, 2H, *J*= 8,6 Hz, H-Ar); 7,18-7,21 (*m*, 2H, H-Ar); 7,37 (*d*, 1H, *J*= 8,5 Hz, H-Ar); 7,49 (*s*, 1H, H-Ar); 7,80 (*d*, 2H, *J*=8,4 Hz, H-Ar); 8,30 (*s*, 1H, NH); 8,43 (*s*, 1H, CH=N).
- RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 25,47; 47,59; 102,93; 111,22; 111,48; 111,59; 117,08; 124,27; 124,84; 128,53; 130,38; 134,19; 145,99; 149,82; 158,90. (Apêndice K).

4.4.4.4 Dados e caracterização de (*E*)-*N*-(4-(piperidin-1-il)benzilideno)-1*H*-indol-5-amina (KCH 49)



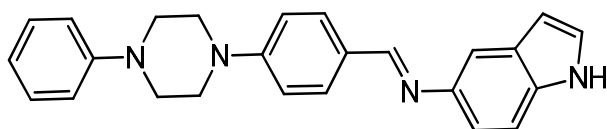
- Sólido amarelo pálido; Rendimento: 23,70 %; PF: 160-161 °C; Massa molar: 303,17 g/mol; Grau de Pureza: 99,99%; Fórmula molecular: C₂₀H₂₁N₃; Fator de retenção: 0,22 (Hex:ActOEt 9:1).
- RMN ¹H (600 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 1,58 (*s*, 6H, CH₂); 3,29 (*s*, 4H, CH₂); 6,41 (*s*, 1H, H-Ar); 6,99 (*d*, 2H, *J*= 7,4 Hz, H-Ar); 7,06-7,07 (*m*, 1H, H-Ar); 7,33 (*s*, 1H, H-Ar); 7,36-7,38 (*m*, 2H, H-Ar); 7,73 (*d*, 2H, *J*= 7,5 Hz, H-Ar); 8,48 (*s*, 1H, CH=N); 11,08 (*s*, 1H, NH).
- RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 101,89; 111,73; 112,08; 114,76; 116,24; 126,50; 126,65; 128,64; 130,13; 134,86; 144,70; 153,25; 157,32. (Apêndice L).

4.4.4.5 Dados e caracterização de (*E*)-*N*-(4-morfolinobenzilideno)-1*H*-indol-5-amina (KCH 69)



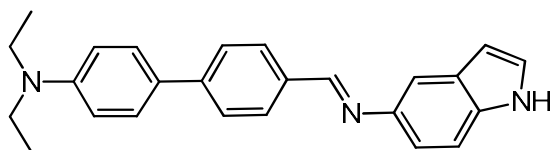
- Sólido branco; Rendimento: 58,44 %; PF: 244-245 °C; Massa molar: 305,15 g/mol; Grau de Pureza: 99,99%; Fórmula molecular: C₁₉H₁₉N₃O; Fator de retenção: 0,25 (Hexano: ActOEt 8:2).
- RMN ¹H (600 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 3,23 (t, 4H, J= 4,9 Hz, CH₂); 3,74 (t, 4H, J= 4,8 Hz, CH₂); 6,42 (s, 1H, H-Ar); 7,02 (d, 2H, J=8,6 Hz, H-Ar); 7,08 (m, 1H, H-Ar); 7,34 (t, 1H, J= 2,25 Hz, H-Ar); 7,37-7,41 (m, 2H, H-Ar); 7,77 (d, 2H, J= 8,6 Hz, H-Ar); 8,25 (s, 1H, CH=N); 11,08 (s, 1H, NH).
- RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 47,89; 66,42; 101,93; 111,86; 112,10; 114,56; 116,23; 126,54; 127,79; 128,64; 130,02; 134,95; 144,54; 153,13; 157,27. (Apêndice M).

4.4.4.6 Dados e caracterização de (*E*)-*N*-(4-(4-fenilpiperazin-1-il)benzilideno)-1*H*-indol-5-amina (KCH 67)



- Sólido amarelo; Rendimento: 84,0 %; PF: 257-258 °C; Massa molar: 380,20 g/mol; Grau de Pureza: 99,99%; Fórmula molecular: C₂₅H₂₄N₄; Fator de retenção: 0,25 (Hexano:ActOEt 8:2).
- RMN ¹H (600 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 3,27 (s, 4H, CH₂); 3,38-3,45 (m, 4H, CH₂); 6,42 (s, 1H, H-Ar); 6,81 (t, 1H, J= 6,2 Hz, H-Ar); 6,98 (d, 2H, J= 7,7 Hz, H-Ar); 7,07-7,10 (m, 3H, H-Ar); 7,23 (t, 2H, J= 7,5 Hz, H-Ar); 7,34-7,42 (m, 3H, H-Ar); 7,79 (d, 2H, J= 8,3 Hz, H-Ar); 8,53 (s, 1H, CH=N); 11,09 (s, 1H, NH).
- RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 47,69; 48,61; 101,96; 111,87; 112,11; 114,95; 116,14; 116,22; 119,65; 126,53; 127,61; 128,5; 129,47; 130,10; 134,94; 144,55; 151,30; 152,88; 157,29. (Apêndice N).

4.4.4.7 Dados e caracterização de (*E*)-*N*-((4'-(dietilamino)-[1,1'-bifenil]-4-il)metileno)-1*H*-indol-5-amina (KCH 54)



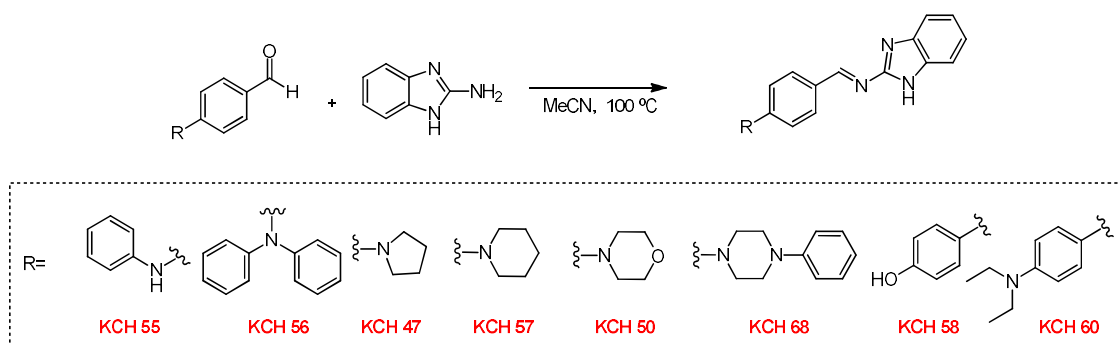
- Sólido amarelo; Rendimento: 56,53%; PF: 209-210 °C; Massa molar: 367,20 g/mol; Grau de Pureza: 99,99%; Fórmula molecular: C₂₅H₂₅N₃; Fator de retenção: 0,4 (Hex:ActOEt 8:2).
- RMN ¹H (600 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 1,10 (t, 6H, CH₃, J= 6,9 Hz); 3,37 (m, 4H, CH₂) [^]; 6,45 (sl, 1H, H-Ar); 6,74 (d, 2H, H-Ar, J= 8,6 Hz); 7,17 (d, 1H, H-Ar, J= 8,5 Hz); 7,36 (sl, 1H, H-Ar); 7,42 (d, 1H, H-Ar, J= 8,2 Hz); 7,50 (s, 1H, H-Ar); 7,58 (d, 2H, H-Ar, J= 8,6 Hz); 7,71 (d, 2H, H-Ar, J= 7,9 Hz); 7,93 (d, 2H, H-Ar, J= 8,1 Hz); 8,69 (s, 1H, CH=N); 11,14 (s, 1H, NH).
- RMN ¹³C (600 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 12,95; 44,15; 102,09; 112,20; 112,27; 112,38; 116,23; 125,69; 125,84; 126,70; 127,98; 128,64; 129,32; 134,52; 135,27; 142,93; 144,07; 147,78; 157,29. (Apêndice O).

[^] Esse sinal apareceu no mesmo deslocamento que a água, o ensaio 2D HSQC provou a presença desses hidrogênios no deslocamento.

4.4.5 Condensação de benzaldeídos *p*-funcionalizados com 2-aminobenzimidazol para formação de iminas

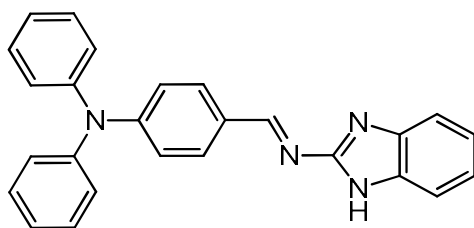
Utilizando como referência a metodologia desenvolvida por Laursen et al., 2006, em um tubo foram adicionados 1 mmol dos aldeídos (01-08), 5 mL de MeCN e 1,1 mmol de 2-aminobenzimidazol. Adicionados todos os reagentes, o tubo foi selado e uma purga foi realizada com a inserção do gás argônio. A mistura foi agitada a 100 °C overnight. O precipitado formado foi filtrado e lavado com MeCN (Figura 22, página 51).

Figura 22. Esquema de síntese dos derivados imina incorporadas à fração benzimidazol



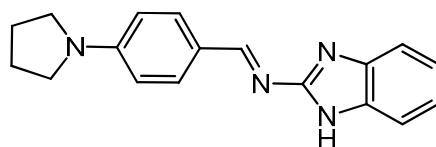
Fonte: Adaptado de Laursen et al. (2006).

4.4.5.1 Dados e caracterização de (*E*)-*N*-(4-(difenilamino)benzilideno)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-amina (KCH 56)



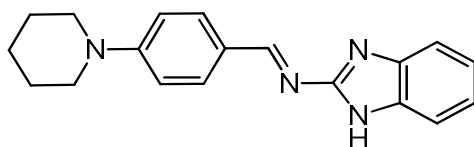
- Sólido laranja; Rendimento: 10,0%; Massa molar: 388,17 g/mol; Fórmula molecular: C₂₆H₂₀N₄; Grau de Pureza: 96,28% Fator de retenção: 0,4 (Hex:ActOEt 9:1).
- RMN ¹H (600 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 6,95 (*d*, 2H, *J*= 8,6 Hz, H-Ar); 7,13-7,15 (*m*, 2H, H-Ar); 7,18-7,22 (*m*, 6H, H-Ar); 7,52-7,53 (*m*, 1H, H-Ar); 7,89 (*d*, 2H, *J*= 8,6 Hz, H-Ar); 9,29 (*s*, 1H, CH=N); 12,53 (*s*, 1H, NH).
- RMN ¹³C (600 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 110,83; 118,26; 119,30; 121,25; 121,71; 125,03; 125,99; 127,35; 129,92; 131,09; 134,16; 142,45; 145,85; 151,45; 156,26; 164,02 (Apêndice P).

4.4.4.2 Dados e caracterização de (*E*)-*N*-(4-(pirrolidin-1-il)benzilideno)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-amina (KCH 47)



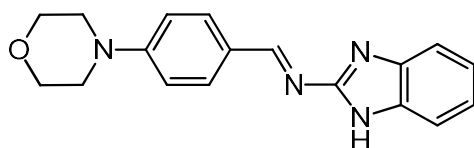
- Sólido amarelo escuro; Rendimento: 13,97 %; Massa molar: 289,16 g/mol; Fórmula molecular: C₁₈H₁₈N₄; Grau de Pureza: 99,99% Fator de retenção: 0,15 (Hex:ActOEt 8:2).
- RMN ¹H (600 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 1,97-2,00 (*m*, 4H, CH₂); 3,34-3,37 (*m*, 4H, CH₂); 6,67 (*d*, 2H, *J*= 8,7 Hz, H-Ar); 7,10-7,11 (*m*, 2H, H-Ar); 7,34 (*d*, 1H, *J*= 5,5 Hz, H-Ar); 7,49 (*d*, 1H, *J*= 6,0 Hz, H-Ar); 7,84 (*d*, 2H, *J*= 8,6 Hz, H-Ar); 9,20 (*s*, 1H, CH=N); 12,32 (*s*, 1H, NH).
- RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 25,41; 47,83; 111,04; 112,20; 118,40; 121,74; 122,57; 132,13; 134,62; 143,14; 151,26; 157,59; 164,91 (Apêndice Q).

4.4.4.3 Dados e caracterização de (*E*)-*N*-(4-(piperidin-1-il)benzilideno)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-amina (KCH 57)



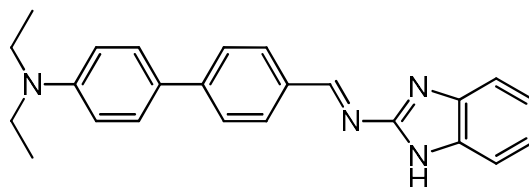
- Sólido laranja; Rendimento: 12,50 %; Massa molar: 304,17 g/mol; Fórmula molecular: C₁₉H₂₀N₄; Grau de Pureza: 99,99% Fator de retenção: 0,3 (Hex:ActOEt 8:2).
- RMN ¹H (600 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 1,60 (s, 6H, CH₂); 3,37-3,41 (m, 4H, CH₂); 7,04 (d, 2H, *J*= 8,0 Hz, H-Ar); 7,13 (s, 2H, H-Ar); 7,44 (s, 2H, H-Ar); 7,85 (d, 2H, *J*= 8,0 Hz, H-Ar); 9,23 (s, 1H, CH=N); 12,42 (s, 1H, NH).
- RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 24,45; 25,38; 48,29; 114,16; 121,87; 124,14; 131,97; 154,26; 157,33; 164,70 (Apêndice R).

4.4.4.4 Dados e caracterização de (*E*)-*N*-(4-morfolinobenzilideno) -1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-amina (KCH 50)



- Sólido amarelo; Rendimento: 37,45 %; Massa molar: 306,15 g/mol; Fórmula molecular: C₁₈H₁₈N₄O; Grau de Pureza: 99,99%; Fator de retenção: 0,37 (Hexano:ActOEt 7:3).
- RMN ¹H (600 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 3,32 (t, 4H, *J*= 4,8 Hz, CH₂); 3,74 (t, 4H, *J*= 4,9 Hz, CH₂); 7,07 (d, 2H, *J*= 8,8 Hz, H-Ar); 7,12-7,14 (m, 2H, H-Ar); 7,40-7,50 (m, 2H, H-Ar); 7,90 (d, 2H, *J*= 8,8 Hz, H-Ar); 9,27 (s, 1H, CH=N); 12,45 (s, 1H, NH).
- RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 47,28; 66,32; 111,0; 114,22; 118,3; 121,98; 125,48; 131,74; 154,43; 157,12; 164,84 (Apêndice S).

4.4.4.5 Dados e caracterização de (*E*)-*N*-((4'-(dietilamino)-[1,1'-bifenil]-4-il)metileno)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-amina (KCH 60)



- Sólido laranja; Rendimento: 10,0 %; Massa molar: 368,20 g/mol; Fórmula molecular: C₂₄H₂₄N₄; Fator de retenção: 0,25 (Hexano:ActOEt 9:1).
- RMN ¹H (600 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 1,21 (t, 6H, J= 7,1 Hz, CH₃); 3,42 (qua, 4H, J= 7,0 Hz, CH₂); 6,76 (d, 2H, J= 8,7 Hz, H-Ar); 7,23-7,24 (m, 1H, H-Ar); 7,28 (m, 1H, H-Ar); 7,35-7,36 (m, 1H, H-Ar); 7,57 (d, 2H, J= 8,7 Hz, H-Ar); 7,69 (d, 2H, J= 8,3 Hz, H-Ar); 7,76-7,77 (m, 1H, H-Ar); 8,02 (d, 2H, J= 8,2 Hz, H-Ar); 9,59 (s, 1H, CH=N); 9,89 (s, 1H, NH).
- RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 12,63; 44,24; 110,63; 111,86; 119,30; 122,74; 126,12; 128,12; 130,45; 132,40; 145,85; 147,95; 155,78; 165,79 (Apêndice T).

4.5 Procedimento experimental para os ensaios de bioanalíticos

4.5.1 Reagentes e preparo das soluções

Os reagentes utilizados foram de grau de pureza analítica, sendo estes o DNA (*Calf thymus*, ctDNA) tipo I na forma de fibras (Sigma-Aldrich[®]) e a albumina do soro bovino (BSA). As soluções estoque dos compostos sintetizados foram preparadas pela diluição de 1,0 mg de cada sonda em 2 mL de DMSO e armazenadas sob refrigeração a 4 °C.

A solução tampão Britton-Robinson (pH 3 - 10) foi preparada a partir da mistura de H₃BO₃ (Merck[®]), NaH₂PO₄ (Dinâmica[®]) e CH₃COONa (Sigma-Aldrich[®]) ambos na concentração de 10 mM. As soluções de tampão fosfato de sódio - NaH₂PO₄ (Vetec[®]), citrato de sódio - Na₃C₆H₅O₇ (Synth[®]), acetato de sódio - C₂H₃NaO₂ (Vetec[®]), ácido succínico - C₄H₆O₄ (Merck[®]), biftalato de potássio - C₈H₅KO₄, ácido 1,4- piperazinodietanosulfônico (PIPES, Sigma-Aldrich[®]), ácido 3-(N- morfolino)propanossulfônico (MOPS, Sigma-Aldrich[®]), Ácido 2-(N-Morfolino)etanosulfônico (MES, Sigma-Aldrich[®]), foram preparadas na concentração de 10 mM e o pH foi ajustado para 6,0 com HCl 0,1 M (Merck[®]) ou NaOH 0,1 M (Vetec[®]).

Para o preparo da solução estoque de ctDNA, pesou-se 2,0 mg da biomolécula e esta foi solubilizada em 2 mL da solução tampão Britton-Robinson

(10 mM, pH 7,0). A solução foi deixada sob agitação durante 24h e para garantir melhor solubilidade e homogeneidade, foi levada a banho ultrassom (Quimis modelo Q335D, Brasil) por 30 minutos. Finalmente, esta foi mantida sob refrigeração a 4 °C. A solução estoque de BSA foi preparada pela solubilização de 20 mg da proteína em 20 mL de solução tampão Britton-Robinson (10 mM, pH 7,0), e armazenada a 4 °C.

4.5.2 Equipamentos

Os espectros de absorção foram realizados em um espectrofotômetro Micronal (modelo AJX-6100PC, Brasil) de duplo feixe equipado com cubetas de quartzo de 1,0 cm de caminho óptico e capacidade de 4 mL. Os estudos de fluorescência molecular foram realizados em um espectrofluorímetro Shimadzu (modelo RF-5301PC, Japão) equipado com uma lâmpada de xenônio de 150 W. Utilizou-se ainda uma cubeta de quartzo com 1,0 cm de caminho óptico e capacidade de 4 mL.

Os ajustes de pH foram realizados em um medidor de pH Gehaka (modelo PG 1800, Brasil). As massas dos reagentes foram medidas em uma balança Gehaka (AG 200, Brasil) com precisão de 0,1 mg para medidas ≥ 10 mg e em uma balança analítica Mettler Toledo (AG245, EUA) com precisão de 0,01 mg (massa < 10 mg).

4.5.3 Determinação da concentração do ctDNA e BSA

Para determinação da concentração da solução estoque de ctDNA, foi realizada uma diluição 1:100 desta solução e analisada no espectrofotômetro na faixa de 200 - 300 nm. Os valores de absorbância de 260 e 280 nm foram coletados e a razão entre eles (A_{260}/A_{280}) indicou se a solução estava livre de proteínas, sendo, portanto, entre 1,8 - 1,9. Obedecido este critério, o valor da absorbância em 260 nm foi utilizado na equação de Lambert-Beer para o cálculo da concentração estoque, utilizando o coeficiente de extinção de 6600 L mol^{-1} .

A concentração de BSA foi determinada inicialmente a partir de uma diluição na proporção 1:5, onde o valor de absorbância em 280 nm foi coletado e empregado na equação de Lambert-Beer, utilizando coeficiente de extinção de 44300 L mol^{-1} .

4.5.3 Avaliação da cinética e da estabilidade em meio aquoso das sondas por UV-vis

Para análise da cinética das sondas, estas foram diluídas em DMSO (15-30%) onde foi adicionado quantidade suficiente de tampão Britton-Robinson para 2 mL. Os ensaios foram realizados em pH 5, 7 e 9 no período de 30 minutos (com leituras a cada 5 segundos) através de exposição direta à fonte de radiação (lâmpadas de deutério e tungstênio).

4.5.4 Estudo da interação do ctDNA com sondas por fluorescência molecular e UV-vis

O estudo de interação foi realizado através de titulações espectrofluorimétricas com base no monitoramento do sinal de emissão e absorção da sonda, mantendo-se a concentração de 5 μM da sonda e variando a concentração de ctDNA (0 μM , 1 μM , 5 μM e 10 μM). As análises foram realizadas em pH 5, 7 e 9, o tempo de incubação foi de 1 hora, e as medidas analíticas foram realizadas à temperatura ambiente.

4.5.5 Estudo da interação da BSA com sondas por fluorescência molecular e UV-vis

O estudo de interação foi realizado através de titulações espectrofluorimétricas com base no monitoramento do sinal de emissão e absorção da sonda, mantendo-se a concentração de 2,5 μM da sonda e de 10 μM de BSA em pH 7. O tempo de incubação foi de 1 hora e as medidas analíticas foram realizadas à temperatura ambiente. Após essa triagem inicial, escolhida a melhor sonda, foram variados outros parâmetros experimentais, tais como a concentração da biomolécula (entre 0,5 – 10 μM), o pH (entre 3 e 10), o tipo de tampão e a concentração de íons (força iônica). Essa última foi analisada através da adição de concentrações crescentes de NaCl (0 - 300 mM) ao preparo da solução tampão.

4.5.6 Determinação da estequiometria do complexo sonda-BSA

A estequiometria do complexo foi determinada pelo método das variações contínuas (método de Job). Dessa forma, foram preparadas soluções contendo a sonda e a BSA variando-se a fração molar das duas espécies de 0 a 1 mantendo a soma das concentrações constante e igual 4 μM . A partir do gráfico

de intensidade de fluorescência em função da fração molar foi estabelecida a proporção estequiométrica em função do valor máximo obtido.

4.5.7 Avaliação da cinética e estabilidade do complexo por fluorescência molecular

Para análise da cinética e estabilidade do complexo sonda-BSA, esta foi preparada a partir das condições otimizadas utilizando 5 μM de sonda e 4 μM de BSA, sendo o volume completado com o tampão Britton-Robinson 10 mM, pH= 6,0 e $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}= 415/555$ nm. Foi realizada ainda a análise da sonda livre sobre as mesmas condições experimentais. A análise foi realizada durante 120 minutos com leituras a cada 60 segundos, sob exposição direta da fonte de radiação (lâmpada de Xe de 150 W de potência) durante todo tempo de análise.

4.5.8 Determinação das figuras de mérito e constante de ligação

O limite de detecção (LOD, menor quantidade de analito na amostra que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada), o limite de quantificação (LOQ, menor quantidade do analito na amostra que pode ser quantitativamente determinada) e o desvio padrão relativo (RSD) foram calculados utilizando as seguintes equações:

$$\text{LOD} = \frac{mb + 3sb}{a} \quad \text{eq. 1}$$

$$\text{LOQ} = \frac{mb + 10sb}{a} \quad \text{eq. 2}$$

$$\text{RSD} = \frac{sp}{xp} \times 100 \quad \text{eq. 3}$$

Onde sb e mb são o desvio padrão e a média do branco analítico ($n = 10$), a é o coeficiente angular da curva analítica, sp é o desvio padrão a um determinado nível de concentração e xp é valor médio encontrado para este ponto da curva ($n = 10$). Já as curvas analíticas foram construídas com o mínimo de cinco pontos de acordo com a equação:

$$IF = aC_{[\text{BSA}]} + b \quad \text{eq. 4}$$

Onde IF é o valor de intensidade de fluorescência, $[\text{BSA}]$ a concentração de BSA, a é o coeficiente angular da curva analítica e b o coeficiente linear. O

coeficiente de correlação linear (r) para a curva analítica também foi calculado visando avaliar a disposição dos pontos quanto à adequação ao comportamento linear. As figuras de mérito foram determinadas preparando uma curva analítica de 0,5- 4,0 μM ($n = 5$).

Finalmente, a constante de ligação foi determinada a partir de uma titulação espectrofluorimétrica, onde a concentração da sonda foi mantida em 5 μM e a concentração de BSA variou de 0-50 μM de forma a garantir a saturação do sistema. Após as medidas de fluorescência, a constante de ligação foi calculada por meio da equação modificada de Benesi-Hildebrand (eq. 5) (GHOSH; GUCHHAIT, 2009; SINGH et al., 2009):

$$\frac{1}{F - F_{\min}} = \frac{1}{K_b (F_{\max} - F_{\min})[\text{BSA}]} + \frac{1}{F_{\max} - F_{\min}} \quad \text{eq. 5}$$

Nessa equação, os termos F_{\min} , F e F_{\max} representam as intensidades de emissão da sonda na ausência de BSA (branco), em uma dada concentração intermediária da proteína e em uma concentração de interação completa (saturação), respectivamente; K_b é a constante de ligação.

4.5.9 Tratamento dos dados

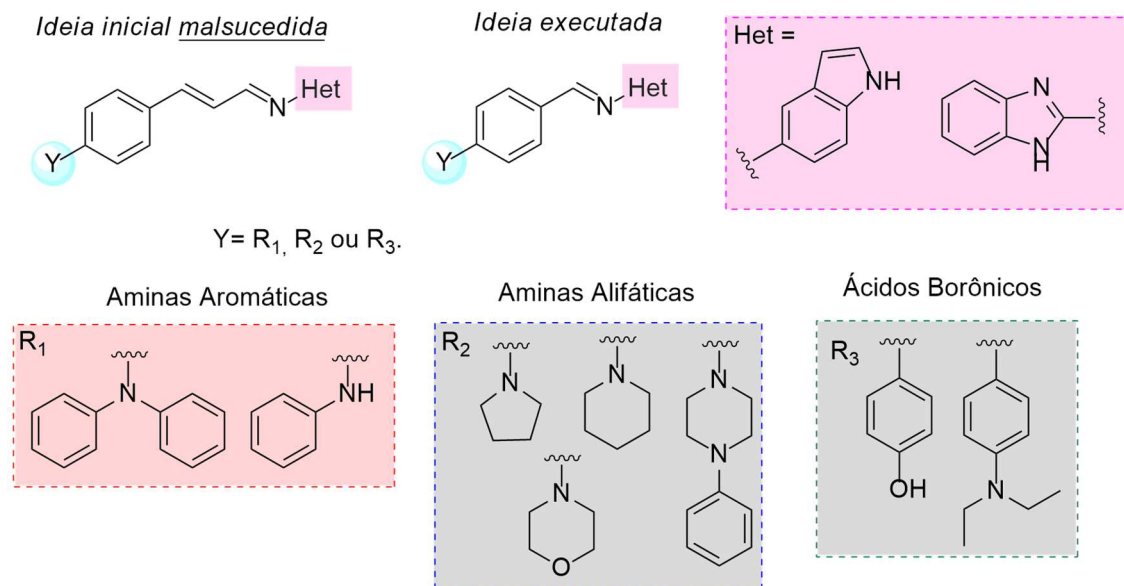
O tratamento estatístico dos resultados foi realizado utilizando o programa Originlab versão 9.0 (Northampton, USA) e o Excel 2016 (Microsoft Office). Nas etapas de otimização dos diferentes parâmetros analíticos, o sinal de fluorescência do branco analítico foi empregado como referência para seleção da melhor condição.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O planejamento das sondas aqui descritas sofreu modificações devido a dificuldades na síntese, mas sem alteração da função imina (Figura 23, página 60). A ideia inicial e a ideia executada serão melhor discutidas nos tópicos adiante.

Figura 23. Sondas inicialmente propostas e sondas sintetizadas.

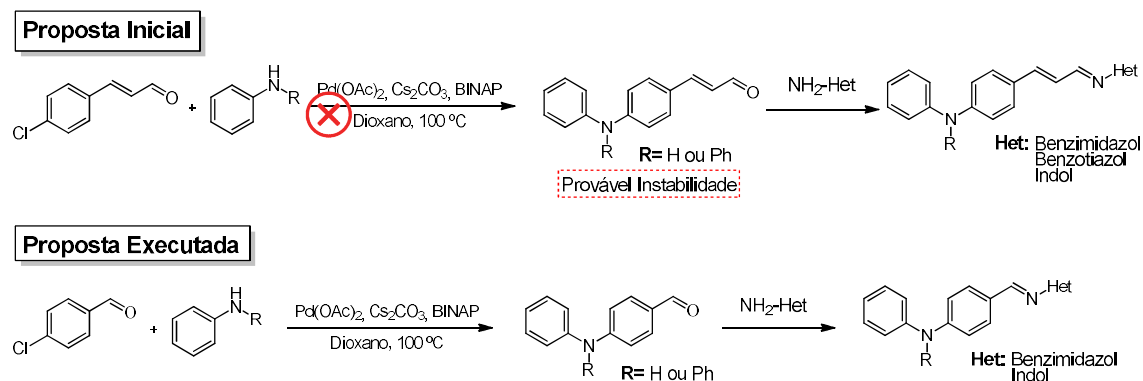


Fonte: Autora, 2021.

5.1 Planejamento das sondas

A proposta inicial das sondas para esse trabalho constituía na hibridação de cinnaldeídos substituídos com os núcleos benzotiazol, benzimidazol e indol (Figura 24, página 61). No entanto, observou-se que os intermediários, sintetizados através das reações de Buchwald-Hartwig apresentaram provável instabilidade e rendimento inferiores a 20%, dificultando seu uso nas reações posteriores. A alteração para os benzaldeídos substituídos foi suportada inicialmente pela já relatada fluorescência de uma das sondas proposta nesse trabalho. O segundo problema encontrado na síntese das sondas foi relacionado a reatividade de 2-aminobenzotiazol. Embora variações na metodologia de síntese tenham sido realizadas, não foi possível obter o produto final em quantidade satisfatória, além da dificuldade de purificação dos compostos finais devido a formação de vários produtos secundários.

Figura 24. Proposta inicial de sondas utilizando como ponto de partida o cinamaldeído e proposta executada com benzaldeídos.



Fonte: Autora, 2020.

A alteração para aldeídos aromáticos substituídos, além de representar melhor estabilidade para utilização como intermediários de reação, ao contrário dos cinamaldeídos inicialmente planejados, representa a utilização de intermediários já descritos na literatura, bem como custo reduzido. As metodologias de síntese realizada através de Buchwald-Hartwig, S_NAr e Suzuki-Miyaura para os intermediários 01-08 já é relatada por diversos autores, e também foi adaptada recentemente em nosso grupo de pesquisa (RODRIGUES, 2019).

5.2 Síntese e caracterização dos intermediários

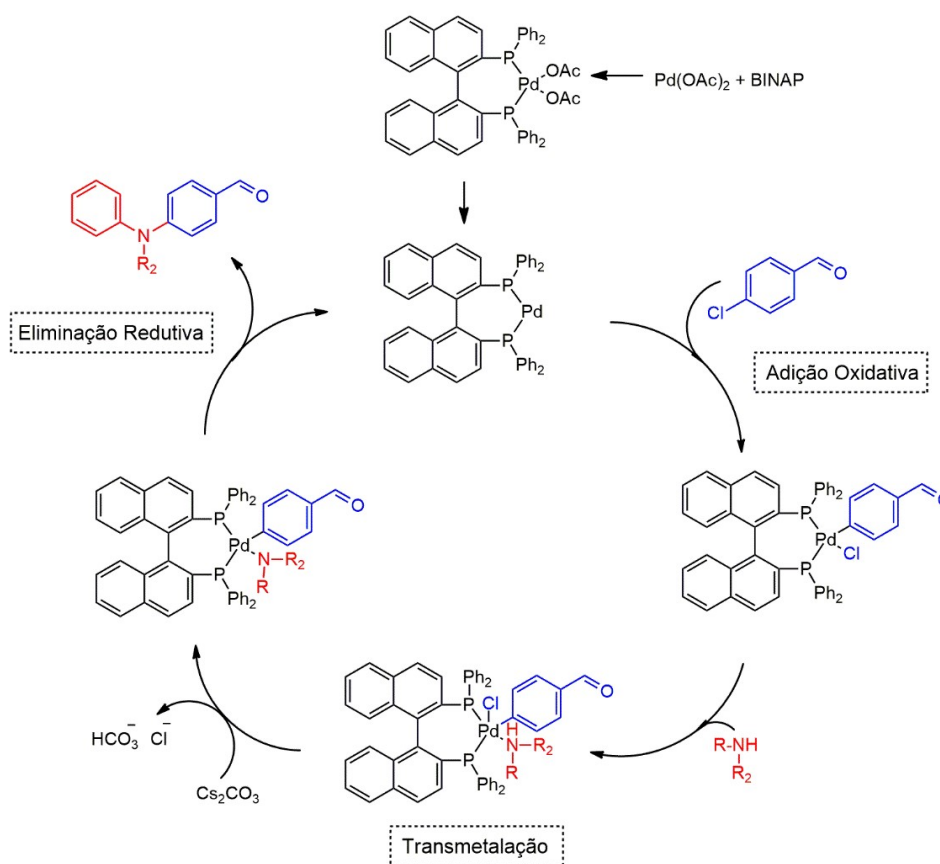
5.2.1 Intermediários sintetizados por reações de Buchwald-Hartwig

Os intermediários **01** e **02** (Figura 18, página 42) foram sintetizados por reações de Buchwald-Hartwig. O mecanismo consiste no acoplamento cruzado catalisado por paládio para formação de ligações C-N que não ocorreriam por S_NAr . Essa metodologia se mostrou eficaz, com um rendimento entre 55 e 49,68%. O ponto de fusão conferiu com o já relatado (BROWN; CARTER; TOMLINSON, 1958; SOUZA, 2012) com intervalo de fusão inferior a 3 °C.

Rodrigues, 2019 propõe o mecanismo observado na Figura 25 (página 62) para a síntese desses compostos. Este inicia-se na redução do Pd(OAc)₂ pelo BINAP, gerando a espécie catalítica de paládio (0). Após isso, ocorre a adição oxidativa do 4-clorobenzaldeído, formando um complexo que sofre coordenação com as aminas. Posteriormente, o complexo formado pela

desprotonação sofre uma eliminação redutiva, restaurando a espécie de paládio (0) e formando o produto de interesse.

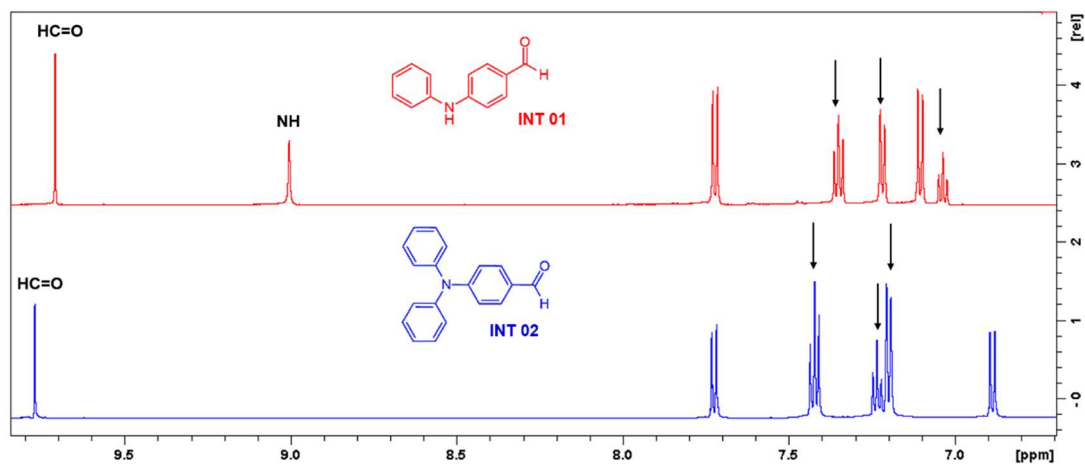
Figura 25. Mecanismo reacional para síntese dos benzaldeídos de interesse por reações de Buchwald-Hartwig. R= Ph, R₂= Ph ou H.



Fonte: Adaptado de Rodrigues, 2019.

Através dos espectros de RMN ¹H foi possível verificar a presença de sinais característicos para os dois benzaldeídos. Os hidrogênios pertencentes aos grupos aromáticos foram identificados e podem ser observados na Figura 26 (página 63). Para **INT 01** observa-se um tripleto em 7,03 ppm referente a um dos hidrogênios da nova fenila, junto a um duplete e um tripleto em 7,21 ppm e 7,35 ppm, respectivamente, que completam o novo anel inserido, além da presença do hidrogênio referente a amina secundária em 9,00 ppm. No intermediário contendo o grupo difenilamina, foram observados um duplete em 7,19 ppm, seguido de um tripleto 7,25 ppm e um tripleto em 7,42 ppm, integrados para quatro, dois e quatro hidrogênios, respectivamente, correspondentes à estrutura simétrica do aldeído.

Figura 26. Espectro de RMN ^1H dos intermediários 01 e 02. Representado com setas, os novos sinais que representam a inserção dos novos anéis aromáticos nas estruturas. Para verificar os deslocamentos químicos e integrais, consultar apêndices A e B.



Fonte: Autora, 2021.

5.2.2 Intermediários sintetizados por reações de $\text{S}_{\text{N}}\text{Ar}$

Para esses intermediários, foram obtidos rendimentos entre 50-80% e o intervalo de fusão foi semelhante ao descrito na literatura, conforme pode ser observado na Tabela 1, página 63.

Tabela 1. Intervalo de fusão e principais deslocamentos químicos dos intermediários obtidos por $\text{S}_{\text{N}}\text{Ar}$.

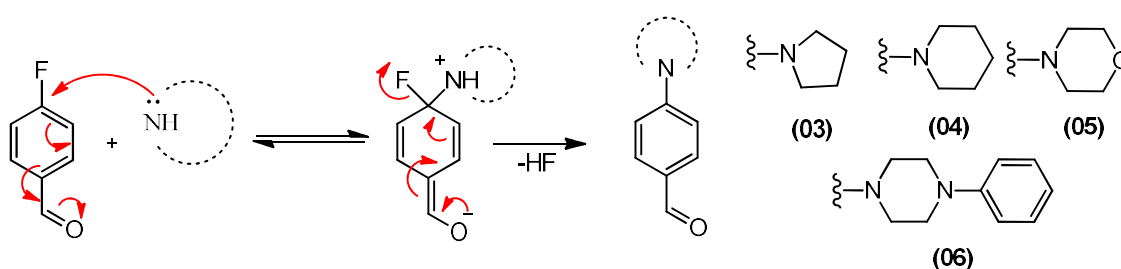
Cód.	Intervalo de fusão	Principais sinais ^1H RMN	Referência
03	85-86 °C	1,97 (<i>qui</i> , 4H, $J= 3,6$ Hz, CH_2) 3,34 (<i>t</i> , 4H, CH_2) 9,64 (<i>s</i> , 1H, HC=O)	(ABDEL-ATTY et al., 2014; RASBURN; STEWART, 1957)
04	67-68 °C	1,69 (<i>sl</i> , 6H, CH_2) 3,39-3,44 (<i>m</i> , 4H, CH_2) 9,76 (<i>s</i> , 1H, HC=O)	(ABDEL-ATTY et al., 2014; ABDEL-AZIZ et al., 2009)

05	69-70 °C	3,34 (t, 4H, $J= 4,8$ Hz, CH ₂)	(ABDEL-ATTY et al., 2014; TINTORI et al., 2016)
		3,37 (t, 4H, $J=5,03$ Hz, CH ₂)	
		9,73 (s, 1H, HC=O)	
06	134 °C	3,28 (t, 4H, $J= 5,1$ Hz, CH ₂)	(ABDEL-ATTY et al., 2014)
		3,55 (t, 4H, $J=5,0$ Hz, CH ₂)	
		9,73 (s, 1H, HC=O)	

Fonte: Autora, 2021.

Como já mencionado, esses intermediários foram sintetizados através de reações de S_NAr de adição-eliminação (Figura 27, página 64). Com relação ao mecanismo reacional, inicialmente ocorre um ataque nucleofílico da amina ao átomo de carbono ligado ao grupo de saída (C-F) formando o intermediário ciclohexadienila. Este intermediário é estabilizado pela carbonila e após a eliminação do haleto, a aromaticidade é restaurada resultando nos benzaldeídos *N*-substituídos (CLAYDEN; GREEVES; WARREN, 2012; RODRIGUES, 2019; TERRIER, 2013).

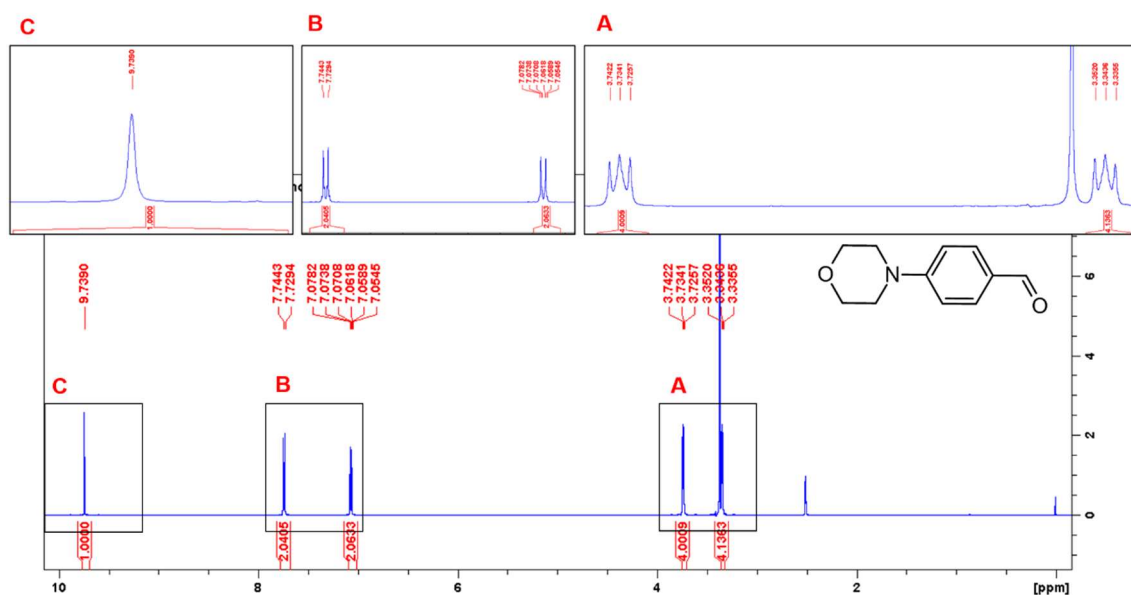
Figura 27. Mecanismo de reação para os intermediários sintetizados por S_NAr.



Fonte: Autora, 2021.

Os principais sinais de RMN ¹H estão descritos na Tabela 1 (página 63), e correspondem a região de hidrogênios alifáticos, confirmando a inserção dos anéis nitrogenados presente em todos os intermediários. Como exemplo, o espectro de RMN ¹H do composto **INT 05** (Figura 28, página 65) apresentou dois tripletos referentes aos quatro hidrogênios do anel morfolina em 3,34 e 3,37 ppm (Figura 28-A, página 65) ($J= 4,8$ e $5,0$ Hz, respectivamente). Os demais sinais estão esquematizados na Figura 28, página 65. Nos espectros de RMN ¹³C os sinais característicos para estes intermediários foram observados na região de carbonos alifáticos, entre 24,21 ppm e 47,03 ppm, referente aos grupos metilênicos (consultar apêndices C-F).

Figura 28. Espectro RMN ¹H de INT 05



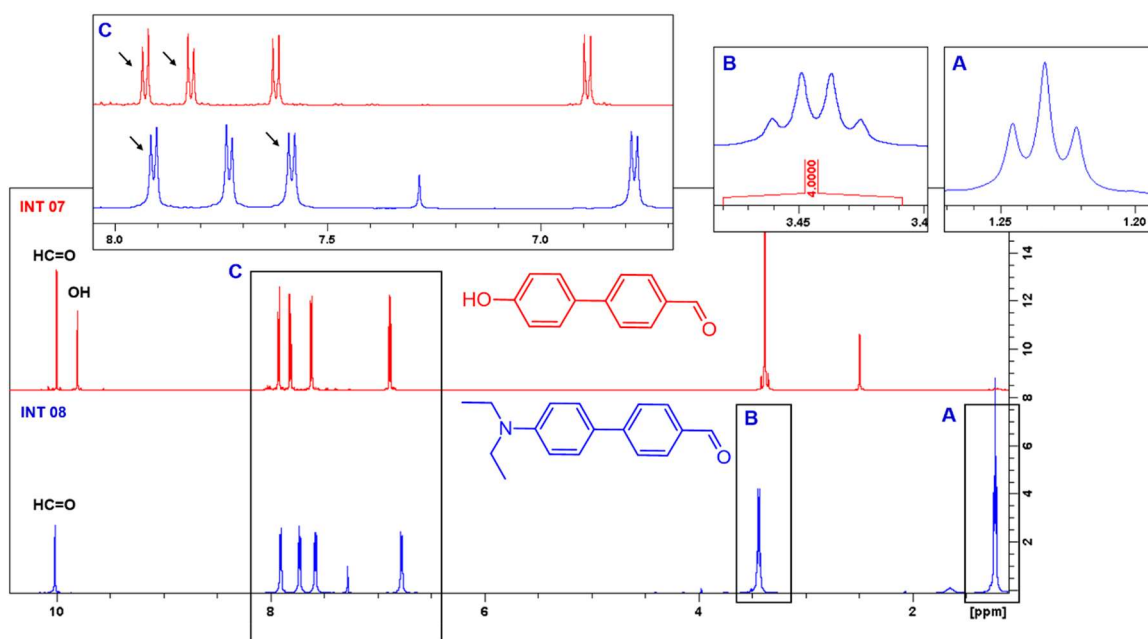
Fonte: Autora, 2021.

5.2.3 Intermediários sintetizados por reações de Suzuki-Miyaura

Algumas adaptações na metodologia convencional de síntese foram realizadas, como a não utilização do ligante, comum em reações de acoplamento. Através da adaptação da metodologia de Obermoser et al., 2016, mesmo com o término da reação sendo constatado por CCD, os intermediários foram obtidos com rendimento de no máximo 20,0%, e apresentaram intervalo de ponto de fusão condizente com o descrito na literatura (HU et al., 2008; NAM; BOURY; PARK, 2006).

Nos espectros de RMN ¹H, para o intermediário **07** foi observado um simpleto em 9,80 ppm, correspondente ao hidrogênio da hidroxila, enquanto que para o composto **INT 08**, observou-se a presença de um tripleto, em 1,23 ppm e um quarteto em 3,44 ppm, correspondentes aos hidrogênios alifáticos da metila e dos metilenos, respectivamente. Além destes, novos sinais foram identificados na região de aromáticos, correspondentes ao novo anel proveniente do ácido borônico. Alguns desses sinais característicos estão destacados na Figura 29 (página 66). Adicionalmente, nos espectros de RMN ¹³C foram identificados todos os carbonos provenientes da inserção de um novo anel aromático, além dos carbonos alifáticos de **INT 08** em 12,11 ppm e 44,42 ppm (verificar os apêndices G e H).

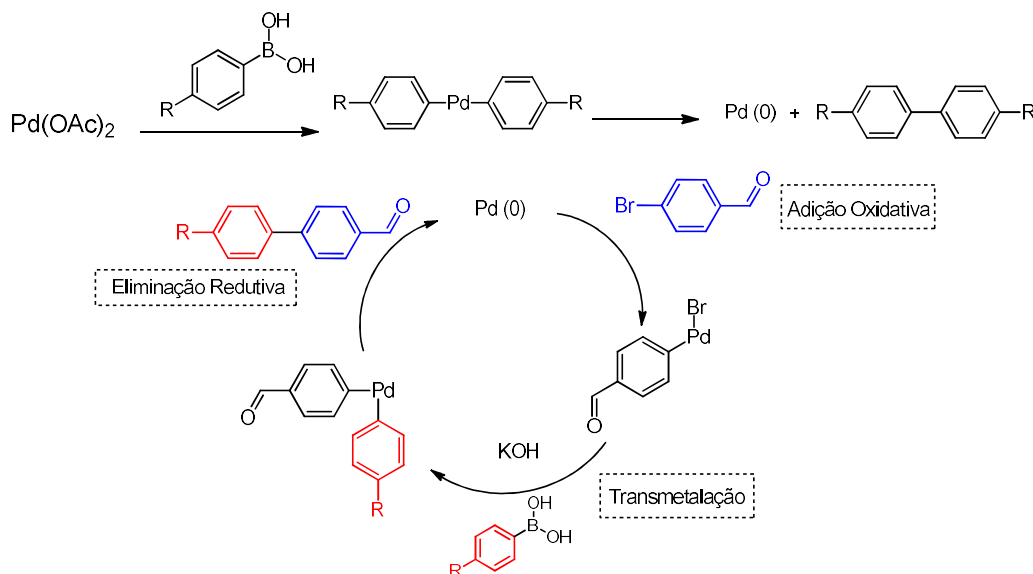
Figura 29. Espectros de RMN ^1H de INT 07 e INT 08. A: Ampliação de δ 1.20 a 1.3 ppm, nas setas, os novos sinais correspondentes ao novo anel aromático; C: Ampliação de 6.72 a 10.06 ppm.



Fonte: Autora, 2021.

Um mecanismo reacional sem o uso de ligantes foi proposto por Pan et al., 2008 e pode ser visto na Figura 30 (página 67). Sugeriu-se que as espécies cataliticamente ativas de Pd (0) são formadas por uma transmetalização dupla entre o $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ e o ácido borônico seguida de uma eliminação redutiva. Uma vez gerada a espécie reativa, inicia-se o ciclo de catálise envolvendo a adição oxidativa do 4-bromobenzaldeído ao Pd (0), formando um complexo que sofre transmetalização com o ácido borônico e a base, gerando um novo complexo que sofre eliminação redutiva, com regeneração do catalisador e liberação do produto de interesse (PAN et al., 2008; RODRIGUES, 2019).

Figura 30. Proposta de mecanismo de reações de Suzuki-Miyaura para os intermediários 07 e 08. R= -OH (INT 07); R= -N(CH₂CH₃)₂ (INT08).



Fonte: Adaptado de Rodrigues, 2019.

5.2 Síntese e caracterização dos derivados de indol e benzimidazol

5.2.1 Derivados imínicos incorporados à fração indol

Para os derivados indólicos, várias metodologias foram testadas, no entanto, a que melhor se adaptou à síntese das iminas propostas foi a utilização de metanol seco como solvente à temperatura ambiente. As reações foram conduzidas por 12 horas, e após a precipitação, o produto foi filtrado e lavado com o mesmo solvente. Essa metodologia se mostrou eficaz para a maioria dos compostos da série, exceto o derivado contendo um substituinte -OH, o qual apresentou a formação de diversos subprodutos, impossibilitando sua purificação. A utilização de altas temperaturas para a síntese desses compostos levou a formação de diversos subprodutos, dessa forma, a temperatura ambiente demonstrou-se mais eficaz, sempre com a utilização de quantidades catalíticas de ácido acético, conforme já observado por outros autores (HALAWA et al., 2017; SHIM et al., 2014).

O intervalo de fusão desses compostos foi determinado, não sendo superior a 3 °C, o que reforça o adequado grau de pureza (superior a 98,21%) encontrado nas análises de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Foram obtidos rendimentos entre 23,7-84% (Tabela 2, página 68).

Para estes compostos, o sinal característico no espectro de RMN ¹H para confirmação estrutural é a presença de um simpleto, correspondente a ligação azometina (–C=NH–). Para os derivados indólicos, esse simpleto foi observado entre 8,25-8,69 ppm. Alguns sinais característicos foram observados para o heterociclo indol, entre eles, a presença de um simpleto entre 6,41-6,55 ppm. Dependendo da quantidade de anéis aromáticos, outros sinais relacionados ao indol foram identificados como multipletos ou no mesmo deslocamento de aromáticos comuns, como observado para **KCH 45** e **KCH 67**. Foram também identificados nos espectros de RMN ¹³C novos carbonos aromáticos referentes à fração indol. A presença de um carbono entre 156,91 e 158,90 ppm para todos os derivados da série foi atribuído ao carbono da função imina, junto a supressão do carbono em aproximadamente 190,0 ppm, referente ao grupo aldeído.

Tabela 2. Intervalo de fusão e principais deslocamentos químicos dos derivados incorporados à fração indol.

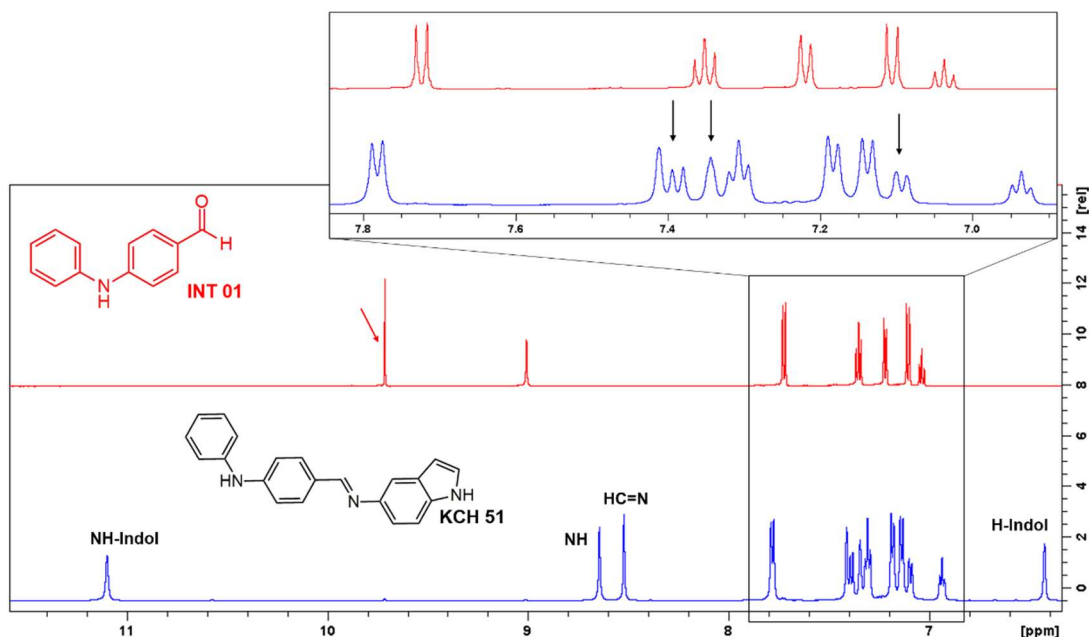
Cód.	Intervalo de fusão	Rend.	Principais sinais ¹ H RMN
51	184-185 °C	35,17%	6,42 (s, 1H, H-Ar); 6,93 (t, 1H, J= 7,3 Hz, H-Ar); 7,09 (d, 2H, J= 8,4 Hz, H-Ar); 7,34 (s, 1H, H-Ar); 7,37-7,41 (m, 2H, H-Ar); 8,51 (s, 1H, CH=N); 11,09 (s, 1H, NH-Indol).
45	90-92 °C	63,95%	6,42 (s, 1H, H-Ar); 6,98 (d, 2H, J= 8,7 Hz, H-Ar); 7,09-7,14 (m, 7H, H-Ar); 7,34-7,39 (m, 6H, H-Ar); 7,42 (m, 1H, H-Ar); 8,56 (s, 1H, CH=N);
46	210-211 °C	78,06%	6,55 (s, 1H, H-Ar); 7,18-7,21 (m, 2H, H-Ar); 7,37 (d, 1H, J= 8,5Hz, H-Ar); 7,49 (s, 1H, H-Ar); 7,80 (d, 2H, J=8,4 Hz, H-Ar); 8,43 (s, 1H, CH=N).
49	160-161 °C	23,7%	6,41 (s, 1H, H-Ar); 7,06-7,07 (m, 1H, H-Ar); 7,33 (s, 1H, H-Ar); 7,36-7,38 (m, 2H, H-Ar); 8,48 (s, 1H, CH=N);

69	244-245 °C	58,44%	6,42 (s, 1H, H-Ar); 7,08 (m, 1H, H-Ar); 7,34 (t, 1H, J= 2,2 Hz, H-Ar); 7,37-7,41 (m, 2H, H-Ar); 8,25 (s, 1H, CH=N).
67	257-258 °C	84,00%	6,42 (s, 1H, H-Ar); 7,07-7,10 (m, 3H, H-Ar); 7,34-7,42 (m, 3H, H-Ar); 8,53 (s, 1H, CH=N).
54	209-210 °C	56,53%	6,45 (sl, 1H, H-Ar); 7,17 (d, 1H, H-Ar, J= 8,5 Hz); 7,36 (sl, 1H, H-Ar) 7,42 (d, 1H, H-Ar, J= 8,2 Hz); 7,50 (s, 1H, H-Ar); 8,69 (s, 1H, CH=N).

Fonte: Autora, 2021.

Como exemplo, o espectro de RMN ¹H de KCH 51 pode ser visto na Figura 31, página 70. Observa-se a presença de um simpleto em 6,42 ppm presente em todos os espectros dos derivados contendo a fração indol. Em 6,93 ppm e 7,09 ppm foram observados um tripleto e um duplete correspondentes à um e a dois hidrogênios respectivamente, derivados da fração indol, seguidos de dois dupletos referentes a um dos anéis aromáticos. Finalmente, outro simpleto foi identificado em 7,34 ppm para um hidrogênio e um multiplete entre 3,37-7,41 ppm para dois hidrogênios que junto ao sinal de 11,09 ppm (um simpleto para um hidrogênio) completam a estrutura do heterociclo. Outros sinais importantes foram identificados como um simpleto em 7,78 ppm (H-Ar) e outro em 8,51 ppm (HC=N), além de um simpleto largo em 8,64 ppm para NH. Importante destacar a supressão do sinal em 9,71 ppm do aldeído presente no intermediário, mas não no composto final (seta vermelha em Figura 31, página 70).

Figura 31. Comparação entre espectros de RMN ^1H de INT 01 e KCH 51. Ampliação de 6.23 a 7.78 ppm. Nas setas: Novos sinais correspondentes a inserção do aromático indol.

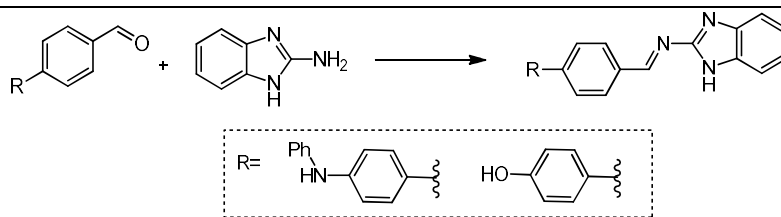


Fonte: Autora, 2021.

5.2.2 Derivados imínicos incorporados à fração benzimidazol

Ao contrário dos derivados indólicos, na síntese dos derivados benzimidazólicos correspondentes houve a necessidade de utilização de altas temperaturas e atmosfera livre de oxigênio. No entanto, mesmo nessas condições, os rendimentos dos compostos obtidos foram baixos (10 a 37%), como grau de pureza superior a 96%. Resultado semelhante foi demonstrado por Tabuchi e Taki (2018) seguindo os mesmos parâmetros reacionais e purificação. Em contrapartida, para os derivados **KCH 55** e **KCH 58** não foi possível isolar o produto de interesse devido a formação de diversos subprodutos a partir de diferentes condições reacionais (Quadro 1, página 71).

Quadro 1. Parâmetros reacionais para síntese de benzimidazóis a partir de INT 01, INT 07; Tempo de reação de até 78 horas.



Solvente	Catalisador	Condições Adicionais	Referência
MeCN	-	100 °C, atmosfera inerte	(Laursen et al., 2006)
MeCN ou DMF	AcOH ou AcONa	100 °C, atmosfera inerte	(Huo et al., 2019)
EtOH	-	proteção da luz; 95 °C.	(Tabuchi; Taki, 2018)
MeOH	PTSA*	100 °C, atmosfera inerte	(Wang; Qian; li, 2015)
DCM	CuSO ₄	Temp. ambiente; atmosfera inerte.	(Liu et al., 1999)
THF	B(OCH ₂ CF ₃) ₃	Temp. ambiente; atmosfera inerte.	(Reeves et al., 2015)
DCM	Pirrolidina	60 °C; Peneira molecular.	(Morales et al., 2014)

*Ácido p-toluenossulfônico

Fonte: Autora, 2021.

Todos os benzimidazóis derivados de aminas alifáticas foram caracterizados e apresentaram rendimentos entre 12-37%. Até a temperatura de 330 °C, nenhum dos derivados benzimidazol fundiu, portanto não foi possível estabelecer seu intervalo de fusão. Os dados de rendimento e principais deslocamentos químicos estão sumarizados na Tabela 3, página 73. O derivado benzimidazol **KCH 68** (Tabela 2, página 73) apresentou péssima solubilidade em todos os solventes disponíveis para a realização do espectro de RMN, portanto não foi possível confirmá-lo através deste método.

Assim como para os derivados indólicos, o sinal confirmatório no espectro de RMN ¹H consiste em um simpleto para o hidrogênio da função imina. Para os derivados benzimidazólicos sintetizados, este apareceu entre 9,2-9,27 ppm. Os demais sinais referentes a fração benzimidazol foram identificados de forma diferente para cada composto da série. Para os derivados **KCH 47**, **KCH 56** e **KCH 50** observa-se a presença de multipletos entre 7,1-7,15 ppm, enquanto que para **KCH 47** foi identificado um duplete para os mesmos hidrogênios em 7,13

ppm, (Tabela 3, página 73). Nos espectros de RMN ^{13}C , além dos novos carbonos aromáticos, foram identificados sempre dois carbonos em aproximadamente 157 ppm e 164 ppm, onde o primeiro corresponde ao carbono sp^2 do benzimidazol, enquanto que o segundo refere-se ao carbono da função imina. Destaca-se ainda a ausência do carbono referente ao aldeído em aproximadamente 190,0 ppm.

Tabela 3. Rendimento e principais deslocamentos químicos dos derivados incorporados à fração benzimidazol.

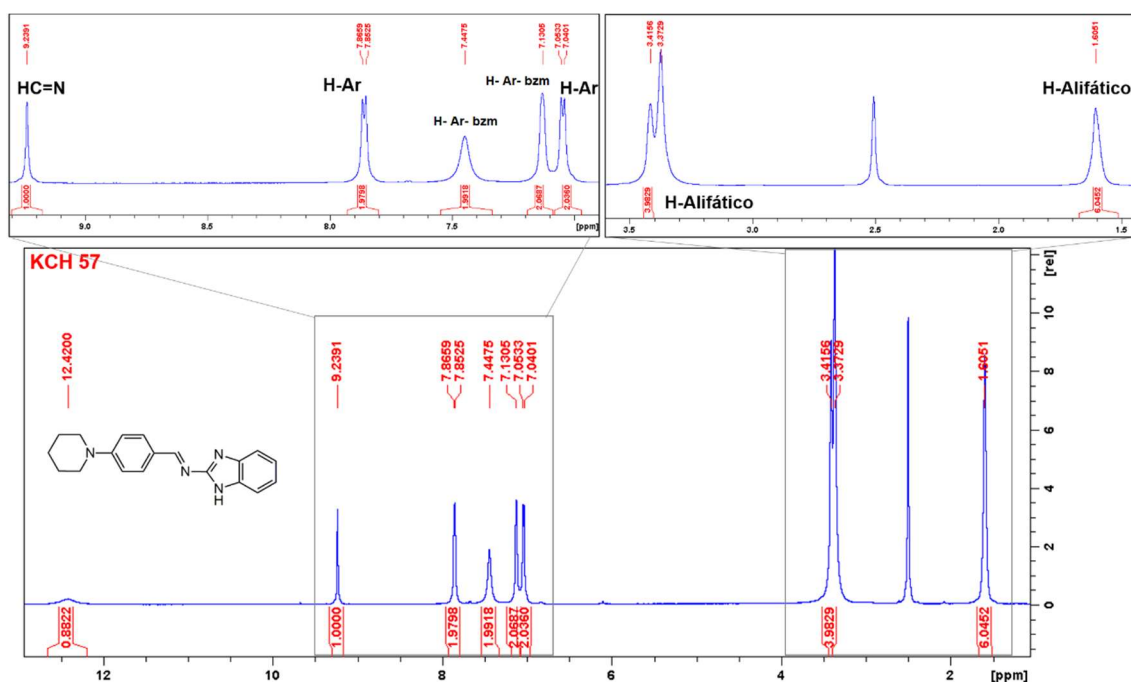
Cód.	Rend.	Principais sinais ^1H RMN
47	13,97%	1,97-2,00 (<i>m</i> , 4H, CH_2); 3,34-3,37 (<i>m</i> , 4H, CH_2); 7,10-7,11 (<i>m</i> , 2H, H-Ar); 7,34 (<i>d</i> , 1H, $J= 5,5$ Hz, H-Ar); 7,49 (<i>d</i> , 1H, $J= 6,0$ Hz, H-Ar); 9,20 (<i>s</i> , 1H, $\text{CH}=\text{N}$).
56	10%	7,13-7,15 (<i>m</i> , 2H, H-Ar); 7,18-7,22 (<i>m</i> , 6H, H-Ar); 7,52-53 (<i>m</i> , 1H, H-Ar); 9,29 (<i>s</i> , 1H, $\text{CH}=\text{N}$).
57	12,5%	1,60 (<i>s</i> , 6H, CH_2); 3,37-3,41 (<i>m</i> , 4H, CH_2); 7,13 (<i>s</i> , 2H, H-Ar); 7,44 (<i>s</i> , 2H, H-Ar); 9,23 (<i>s</i> , 1H, $\text{CH}=\text{N}$).
50	37,49%	3,32 (<i>t</i> , 4H, $J= 4,8$ Hz, CH_2); 3,74 (<i>t</i> , 4H, $J= 4,9$ Hz, CH_2); 7,12-7,14 (<i>m</i> , 2H, H-Ar); 7,03-7,50 (<i>m</i> , 2H, H-Ar); 9,27 (<i>s</i> , 1H, $\text{CH}=\text{N}$).
60	10%	7,23-7,24 (<i>m</i> , 1H, H-Ar); 7,28 (<i>m</i> , 1H, H-Ar); 7,35-7,36 (<i>m</i> , 1H, H-Ar); 7,76-7,77 (<i>m</i> , 1H, H-Ar); 8,02 (<i>d</i> , 2H, $J= 8,2$ Hz, H-Ar); 9,59 (<i>s</i> , 1H, $\text{CH}=\text{N}$); 9,89 (<i>s</i> , 1H, NH).

Fonte: Autora, 2021.

Como exemplo, no espectro de RMN ^1H de **KCH 57** (Figura 32, página 73) observa-se a presença de um simpleto em 1,60 ppm e um multiplete entre 3,37-3,41 ppm, referente aos hidrogênios alifáticos. Como para outras moléculas derivadas de benzimidazol e de indol, esse sinal se sobrepôs ao sinal da água residual do solvente empregado (DMSO-d_6). Adicionalmente, foram identificados

dois simpletos em 7,13 ppm e 7,44 ppm, integrados para dois hidrogênios cada, referentes ao heterociclo benzimidazol, além de um simpleto em 9,23 ppm para o hidrogênio da ligação azometina. Destaque importante é a supressão do sinal do hidrogênio correspondente ao aldeído intermediário em 9,73 ppm (Apêndice D).

Figura 32. Espectro de RMN ^1H de KCH 57. Ampliações de 1,60- 3,41 ppm e 7,04-9,23 ppm. bzm: benzimidazol.

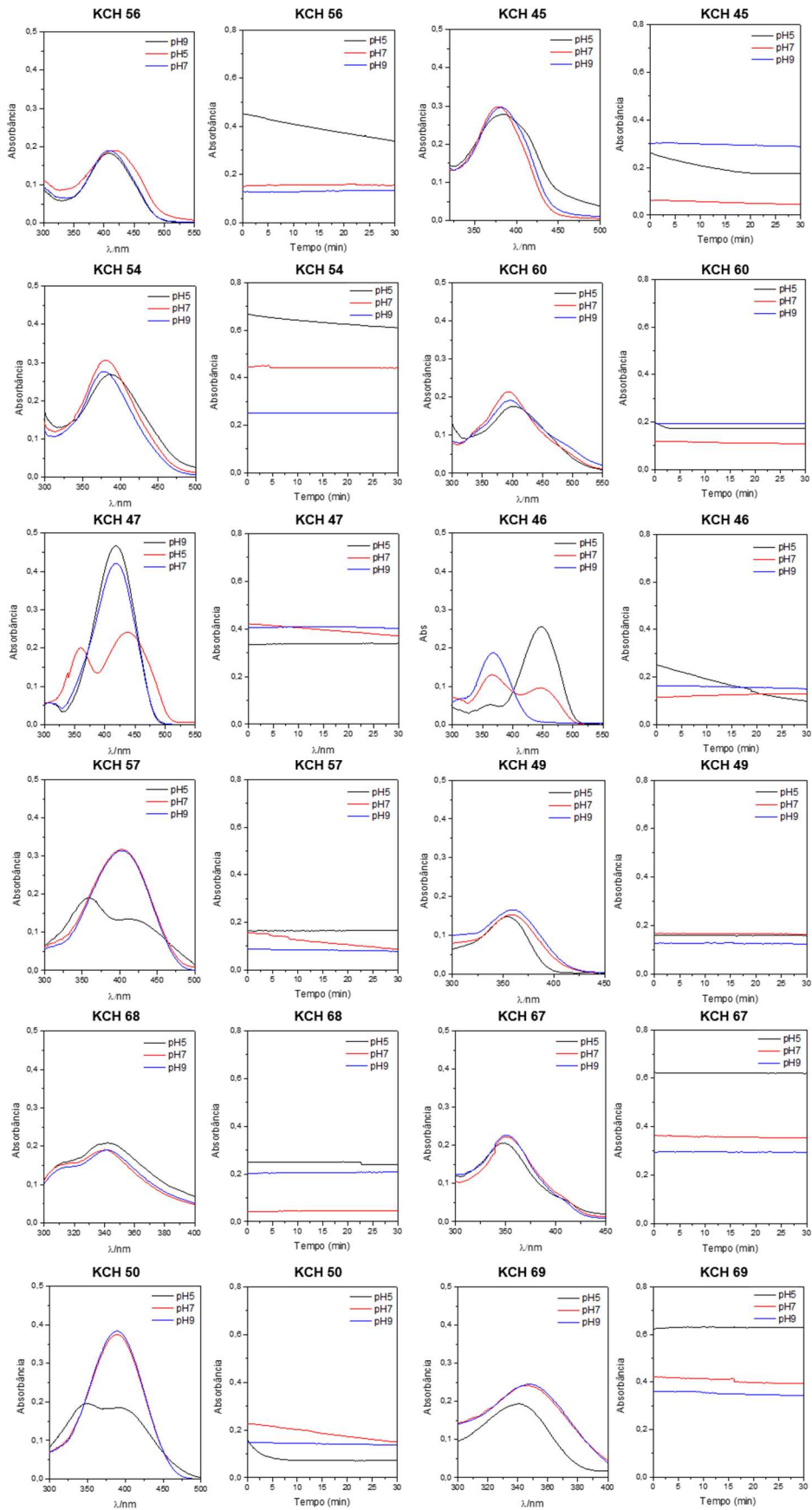


Fonte: Autora, 2021.

5.3 Estudos de cinética e estabilidade da sonda livre em meio aquoso

Ao passo que todas as etapas de síntese de iminas a partir de compostos carbonílicos são reversíveis, é possível que ocorra a hidrólise dessas ligações gerando novamente os componentes de partida (CORDES; JENCKS, 1962; LAYER, 1963). É comum o uso de ácidos para esse processo, mas este não é um componente obrigatório para o sucesso da hidrólise. Embora fatores estéricos ou substituintes doadores de elétrons possam facilitar a hidrólise de ligações azometina, o estudo cinético de novos derivados é de significativa importância, logo que os estudos de interação são realizados em meios majoritariamente aquosos (SILVA, 2016). Dessa forma, foi determinado o perfil cinético em meio aquoso das sondas sintetizadas nesse trabalho (Figura 33, página 74).

Figura 33. Perfil de absorção e estabilidade em meio aquoso das sondas sintetizadas em diferentes pH.



Fonte: Autora, 2021.

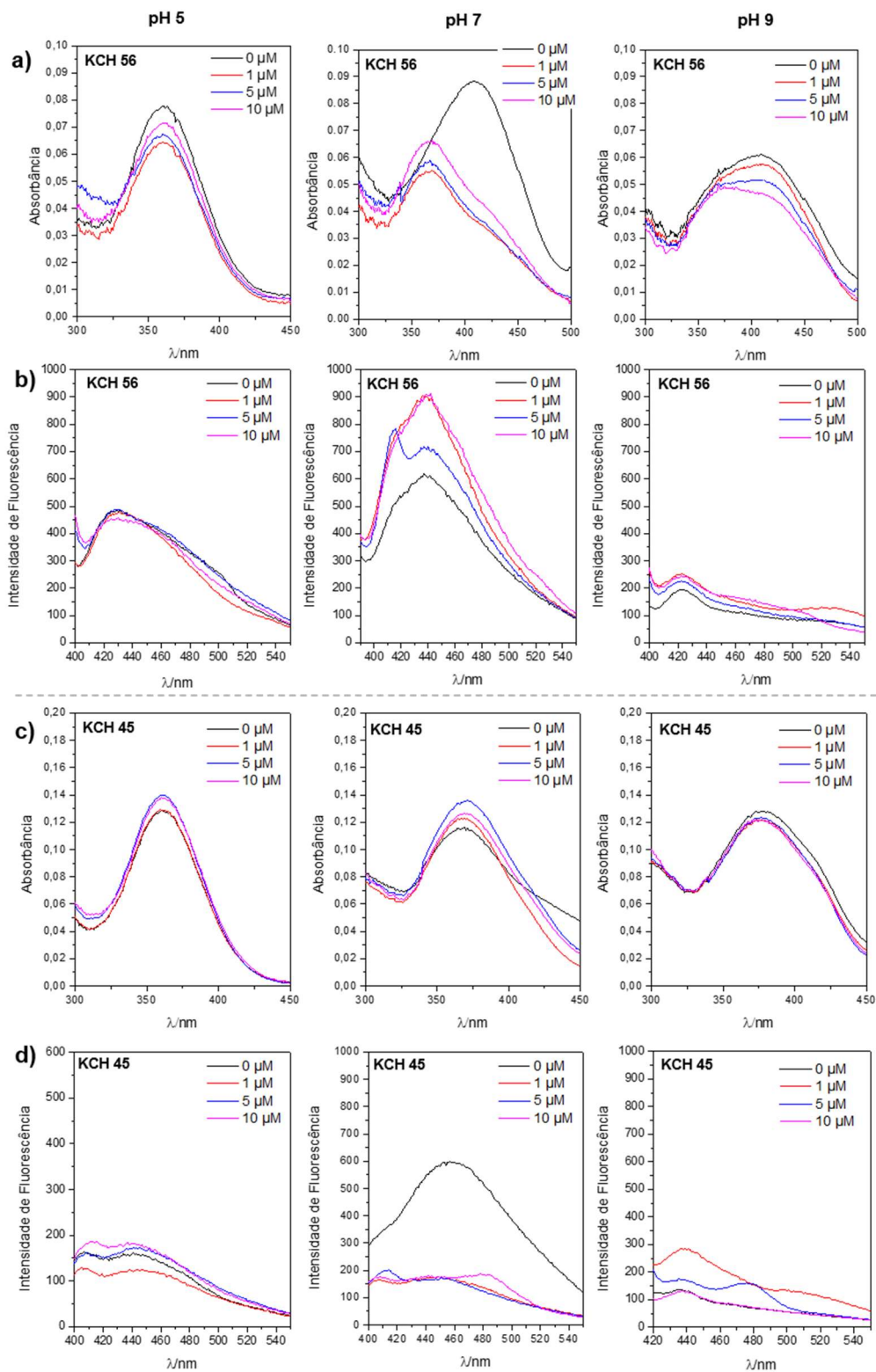
A partir do monitoramento do perfil espectral, é possível determinar alterações reacionais em função do tempo e quantificar a produção de novos componentes em determinados processos (TREVISAN, 2009). Para monitorar alterações espectrais em decorrência da hidrólise das iminas propostas, estas foram monitoradas quanto a seu perfil de absorção fixado o comprimento de onda previamente determinado. Não foram observadas alterações significativas no perfil de absorção das sondas no período de 30 minutos, o que possibilita sua utilização em ensaios posteriores de interação.

5.4 Estudos de interação com ctDNA

O estudo da interação de moléculas com o DNA pode ser realizado através da espectroscopia no UV-vis em função das alterações nas propriedades de absorção do ligante ou do DNA. Embora outros aspectos devam ser considerados, alterações no $\lambda_{\text{máx}}$, se comparado ao perfil na presença e na ausência do ligante, em geral são indicativos de interação (GONZLEZ-RUIZ et al., 2011; JAUMOT; GARGALLO, 2012). Adicionalmente, a espectroscopia de fluorescência molecular é uma das técnicas mais utilizadas em estudos de interação. As alterações espectrais relacionadas a fluorescência são monitoradas usando como referência o ligante livre ou o complexo formado, uma vez que o DNA não apresenta propriedades fluorescentes (GONZLEZ-RUIZ et al., 2011).

Neste trabalho, foi realizada uma titulação em três concentrações de DNA, 1,0 μM , 5 μM e 10 μM , mantendo-se fixa a concentração de 5 μM da sonda. Como pode ser observado na Figura 34, página 76, para as sondas **KCH 56** e **KCH 45**, derivados benzimidazol e indol respectivamente, não foi observado um perfil espectral de sonda, uma vez que não há linearidade entre a intensidade de fluorescência e o aumento da concentração da biomolécula. No entanto, para algumas sondas houveram alterações no perfil de absorção e emissão quando na presença do DNA, o que pode ser um indicativo de interação (REHMAN et al., 2015).

Figura 34. Espectros de absorção e emissão das sondas KCH 56 e KCH 45 por pH em diferentes concentrações de DNA. a) e c) espectros de absorção de KCH 56 e KCH 45 respectivamente. b) e d) espectros de emissão de KCH 56 e KCH 45 respectivamente.



Fonte: Autora, 2021.

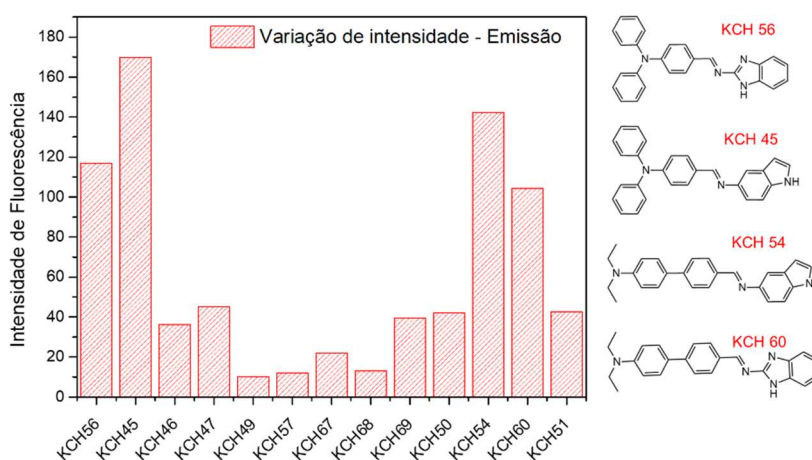
5.5 Estudos de interação com BSA

5.5.1 Estudos preliminares

Incentivados pelos bons resultados obtidos por Tabuchi e Taki (2018) e pela semelhança estrutural com outras sondas descritas na literatura, uma triagem entre as sondas sintetizadas foi realizada junto a proteína BSA. Para isso, foi selecionado o tampão Britton-Robinson (10 mM), logo que este pode ser utilizado em um amplo intervalo de pH. O pH 7,0 foi selecionado por ser próximo a condições fisiológicas. Fixou-se a concentração de 2,5 μM para as sondas e 10,0 μM para BSA.

Foram observadas diferenças entre as intensidades de fluorescência de algumas sondas na ausência e na presença da BSA (Verificar Apêndice U). Observa-se que os melhores resultados se referem as sondas **KCH 45**, **KCH 56**, **KCH 54** e **KCH 60** (Figura 35, página 77). Novamente a sonda contendo as porções N-difenila e benzimidazol (**KCH 56**) apresentou fluorescência significativa quando ligada ao BSA. Adicionalmente, outras três sondas também apresentaram significativo aumento da fluorescência na presença da proteína. A sonda **KCH 45** contém em sua estrutura o mesmo anel bifênila presente na sonda **KCH 56**, o que confirma a importância da porção hidrofóbica para a fluorescência e interação. Além destas, as sondas **KCH 54** e **KCH 60** também apresentaram resultados promissores. Em posse dessas informações, as quatro melhores sondas foram selecionadas para novos estudos.

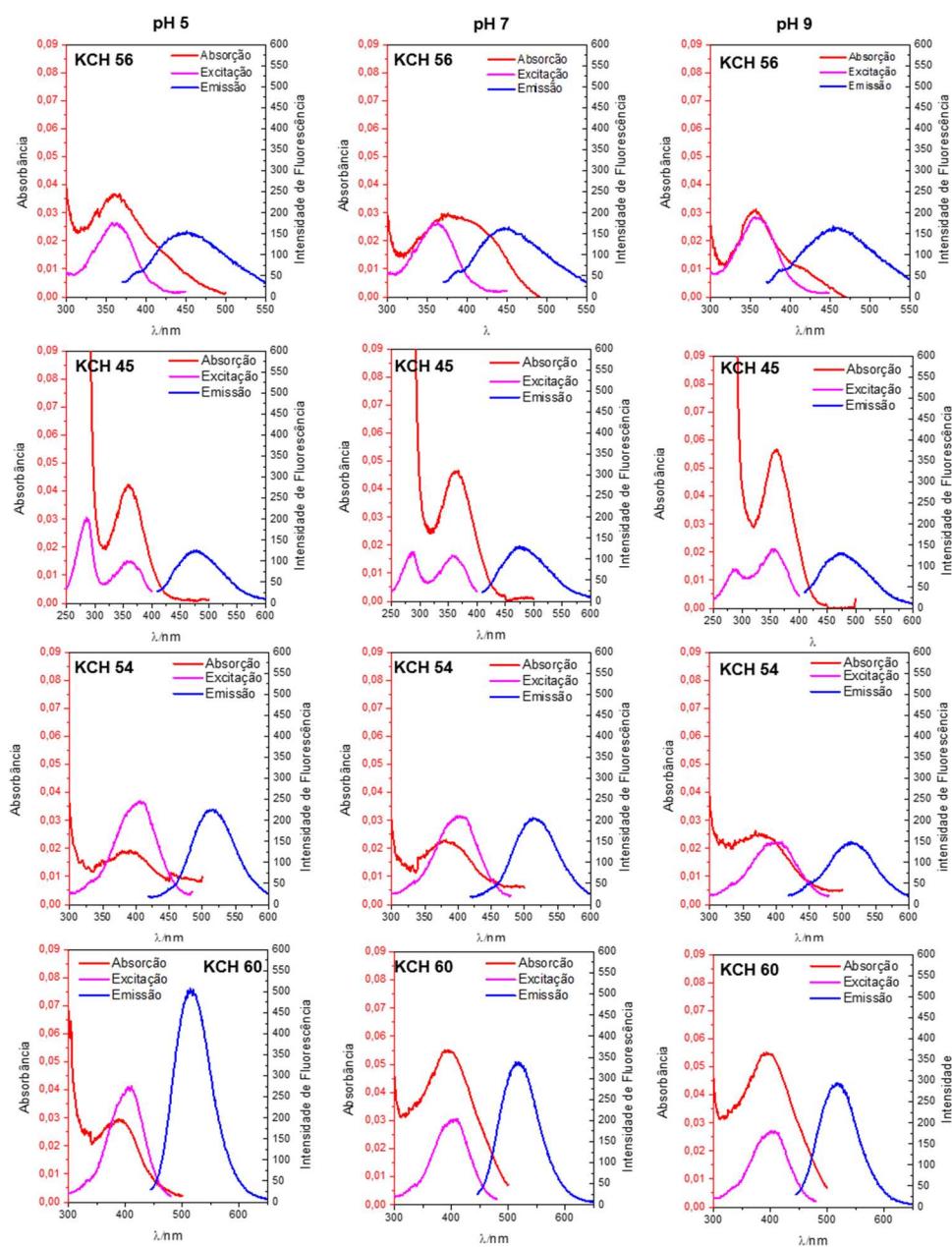
Figura 35. Intensidade de fluorescência de emissão para as sondas. Condições: pH = 7; [Sonda] = 2,5 μM ; [BSA] = 10,0 μM ; Tampão Britton-Robinson (10 mM).



Fonte: Autora, 2021.

Para escolher a melhor sonda a ser otimizada, o experimento foi repetido em pH 5, 7 e 9. Conforme pode ser observado nas Figura 36 (página 78) e Figura 37 (página 79), a sonda **KCH 60** apresentou maior intensidade de fluorescência, em especial em pH 5 (cerca de 70 vezes maior). Aliado a isso, a mesma apresentou λ_{em} de 515, 517 e 518 nm em pH 5, 7 e 9, respectivamente; sendo os mais próximos da região do infravermelho, além de bons deslocamentos de Stokes (Tabela 4, página 79).

Figura 36. Absorbância e intensidade de fluorescência de excitação e emissão das melhores sondas para BSA em diferentes pH. Condições: [Sonda] = 2,5 μ M, [BSA] = 10,0 μ M, tampão Britton-Robinson (10 mM).



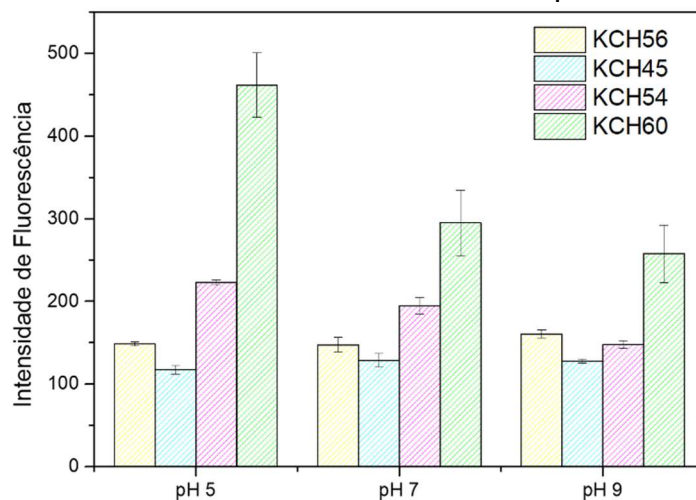
Fonte: Autora, 2021.

Tabela 4. Máximos de absorção, excitação, emissão e deslocamento de Stokes* das melhores sondas para BSA.

Cód.	pH 5				pH 7				pH 9			
	Absorção (nm)	Excitação (nm)	Emissão (nm)	Stokes (nm)*	Absorção (nm)	Excitação (nm)	Emissão (nm)	Stokes (nm)*	Absorção (nm)	Excitação (nm)	Emissão (nm)	Stokes (nm)*
KCH 56	418	361	455	94	409	361	457	96	409	357	460	103
KCH 45	386	361	478	117	380	357	477	120	381	357	479	122
KCH 54	389	408	516	108	384	404	516	112	378	403	516	113
KCH 60	405	406	515	109	397	405	517	112	398	403	518	115

Fonte: Autora, 2021.

Figura 37. Intensidade de fluorescência das sondas para BSA em função do pH

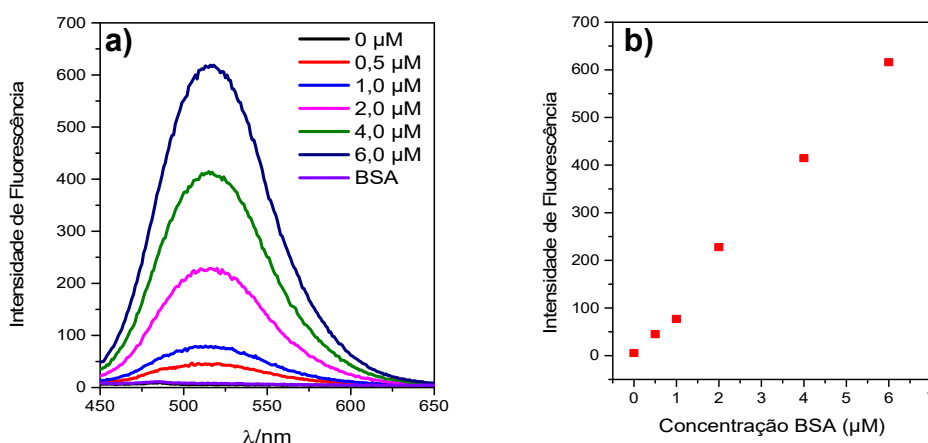


Fonte: Autora, 2021.

5.5.2 Avaliação da variação da concentração da proteína para a sonda KCH 60

Baseando-se nos resultados iniciais de máximos de absorção, excitação, emissão, deslocamento de Stokes e intensidade de fluorescência, a sonda **KCH 60** foi escolhida para a continuação dos experimentos. Neste sentido, a otimização dos parâmetros experimentais relacionados à sonda **KCH 60** foram realizados inicialmente sobre a concentração da proteína, a qual foi analisada entre 0,5-6,0 μM através da técnica de fluorescência molecular. Figura 38 (página 80) demonstra que houve um comportamento crescente entre o aumento da concentração da proteína e a intensidade de fluorescência. Esse comportamento possibilita a utilização do composto como sonda para BSA. Assim como para outras sondas com semelhança estrutural, o mecanismo de fluorescência parece ser *off-on*, provavelmente devido à perda da rotação da molécula quando ligada ao sítio de BSA (LI et al., 2018; SHEN et al., 2017; TABUCHI; TAKI, 2018).

Figura 38. a) Espectro de emissão indicando o aumento da intensidade de fluorescência em função da concentração de BSA; b) Valor de intensidade de fluorescência em função da concentração de BSA. Condições: [sonda]= 2,5 μM ; [BSA] = 0,5-6 μM ; tampão Britton-Robinson (10 mM); pH= 5; $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$ = 451/555 nm.



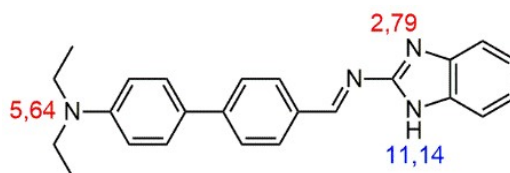
Fonte: Autora, 2021.

5.5.3 Avaliação da variação de pH para a sonda KCH 60

A formação do complexo e por consequência, a intensidade de fluorescência, podem sofrer alterações a partir de mudanças de pH. Estruturas contendo grupos ionizáveis podem se tornar protonadas ou desprotonadas em determinado pH e, portanto, representar mudanças espectrais ou de rendimento quântico (ELROBY; EL-SHISHTAWY; MAKKI, 2011; LEE et al., 2019). A sonda

KCH 60 apresenta grupos amino os quais podem apresentar carga positiva em $\text{pH} \cong 5,0$ e um nitrogênio que pode ser desprotonado a partir de pH superior a 11,5 (Figura 39, página 81). Adicionalmente, o pH também pode afetar características de proteínas como a BSA. O ponto isoelétrico (pH em que uma proteína/aminoácido apresenta carga elétrica líquida igual a zero) da BSA está em torno de 4,70 - 5,60. Dessa forma, no $\text{pH} 7,0$ ela apresenta carga negativa e no intervalo de 4 a 8 pode sofrer mudanças conformacionais (FERREIRA, 2009).

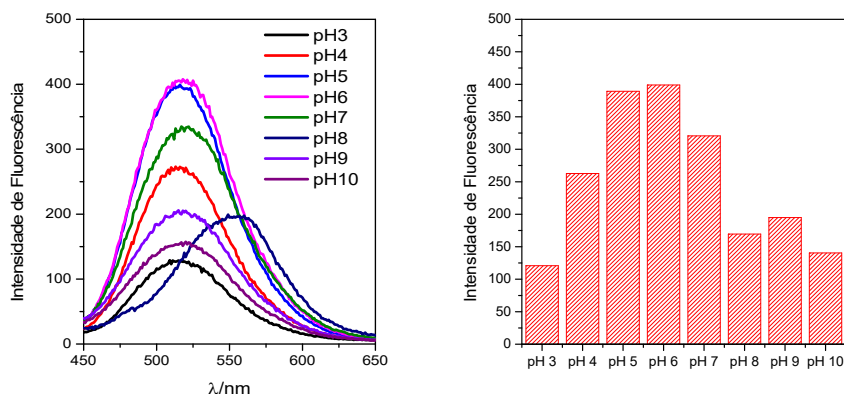
Figura 39. pK_a de grupos ionizáveis da sonda KCH 60



Fonte: Previsto no programa Marvin Sketch®, 2021.

Mantendo a concentração de $2,5 \mu\text{M}$ para a sonda e $4 \mu\text{M}$ para a BSA, foi avaliado o efeito do pH na intensidade de fluorescência (Figura 40, página 82). Observa-se que a melhor sensibilidade foi observada em $\text{pH} 5$ e 6 (Ver o apêndice V para comparação com a sonda livre). Nesse intervalo de pH , o grupo amino terminal encontra-se carregado positivamente, enquanto que a proteína está reduzindo a quantidade de cargas positivas, o que pode facilitar a interação entre estes. A redução significativa da intensidade de fluorescência em pH abaixo de $5,0$ deve ser associada a protonação dos grupos amino presentes na estrutura da sonda e na proteína, provocando uma repulsão entre estas, afetando o sinal do complexo. Em contrapartida, um pH superior a $6,0$ também levou a redução significativa da intensidade de fluorescência, o que pode ser associado a desprotonação do grupo NH de benzimidazol, ou alterações conformacionais que dificultem a ligação do complexo à proteína (FERREIRA, 2009). Dessa forma, considerando a melhor sensibilidade e proximidade ao pH fisiológico ($\text{pH} 7,2$), o $\text{pH} 6$ foi selecionado para os ensaios posteriores.

Figura 40. Avaliação do efeito da concentração hidrogeniônica na intensidade de fluorescência do complexo. Condições: [sonda]= 2,5 μM ; [BSA] = 4 μM ; tampão Britton-Robinson (10 mM); pH= 6,0; $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$ = 451/555 nm.

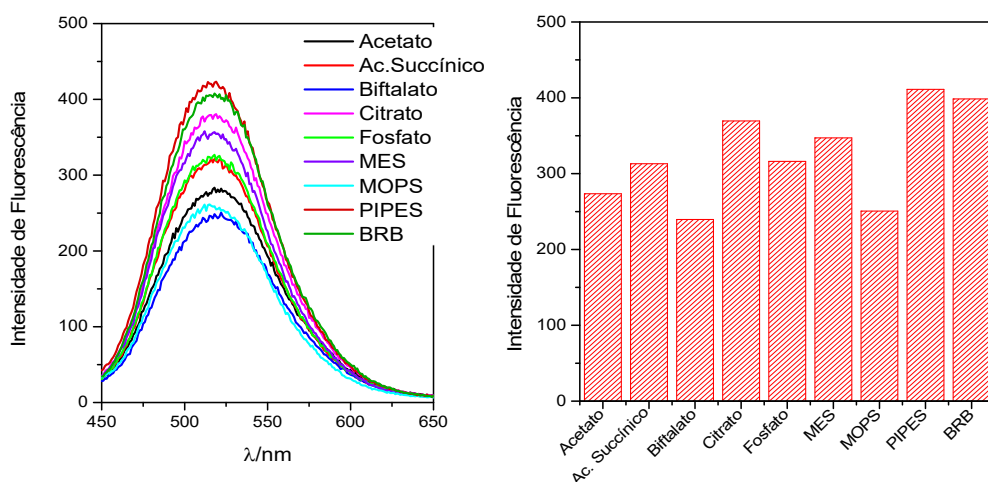


Fonte: Autora, 2021.

5.5.4 Avaliação do tipo e concentração da solução tampão para a sonda KCH 60

O efeito do tipo de tampão foi avaliado considerando que a capacidade máxima tamponante atendesse o valor de pH 6,0 ($\text{pH} = \text{pK}_a \pm 1$). Para tanto, foram selecionados os tampões acetato de sódio ($\text{pK}_a = 4,7$), ácido succínico ($\text{pK}_a = 5,4$), biftalato de potássio ($\text{pK}_{a1} = 5,1$), citrato de sódio ($\text{pK}_{a3} = 6,4$), fosfato de sódio ($\text{pK}_{a2} = 7,2$), MES ($\text{pK}_a = 6,1$), MOPS ($\text{pK}_a = 7,2$), PIPES ($\text{pK}_a = 6,8$) e Britton-Robinson (BRB). O resultado para esse estudo é mostrado na Figura 41 (página 82).

Figura 41. Avaliação do efeito do tipo de tampão na intensidade de fluorescência do complexo. Condições: [sonda]= 2,5 μM ; [BSA] = 4 μM ; [tampão] = 10 mM; pH= 6,0; $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$ = 415/555 nm.

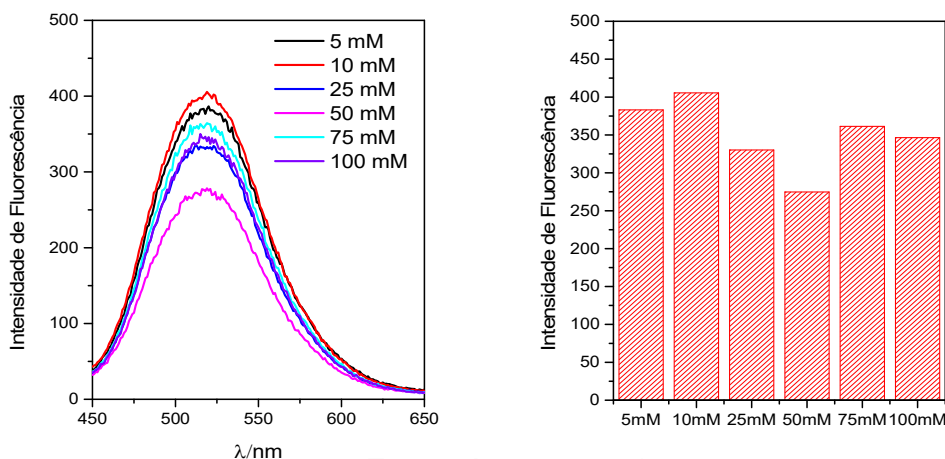


Fonte: Autora, 2021.

Observado que proteínas podem sofrer alterações significativas em resposta a alterações no pH, a manutenção adequada desse pH é de grande importância (PHAN et al., 2015). Esse controle é frequentemente alcançado através do uso de tampões adequados, seguindo o intervalo de pH desejado (FERREIRA et al., 2015; TAHA et al., 2011). Nesse estudo, observou-se que os tampões que apresentaram os melhores resultados de sensibilidade (citrato, MES, PIPES) foram os que apresentam pK_a mais próximo a 6,0 (Ver o apêndice W para comparação com a sonda livre). Esses tampões apresentam ionização próxima a 50% ($pK_a \cong pH$), o que promove a repulsão tampão-proteína, permitindo, portanto, a melhor interação com a sonda. Observa-se ainda uma tendência de diminuição da sensibilidade para tampões com ionização superior a 50%, o que pode ser associado a maiores interações com a sonda carregada positivamente, reduzindo a sua disponibilidade para a proteína. Entre os tipos de tampões analisados, PIPES e BRB apresentaram sensibilidade semelhante (diferença inferior a 10%). O tampão BRB é um sistema multi-tampão eficaz do pH 2,6 a 12 (EBIHARA et al., 2016). Nesse estudo, ele foi preparado a partir de acetato de sódio ($pK_a= 4,7$), fosfato de sódio ($pK_{a1}= 2,15$; $pK_{a2}= 7,2$; $pK_{a3}= 12,3$) e ácido bórico ($pK_a= 9,2$). Considerando o custo de produção reduzido quando comparado ao tampão PIPES, este foi escolhido para os ensaios posteriores.

Igualmente importante para a manutenção do pH, a concentração da solução tampão pode interferir na sensibilidade do método, de forma que alterações de até uma unidade no pH podem modificar a resposta de fluorescência para o complexo. Alterações na concentração e na temperatura podem promover variações no pK_a do tampão, modificando a capacidade tamponante, e portanto o pH do meio (REACH DEVICES, 2021). Dessa forma, foram escolhidas as concentrações de 5, 10, 25, 50, 75 e 100 mM do tampão BRB (Figura 42, página 84).

Figura 42. Avaliação do efeito da concentração do tampão na intensidade de fluorescência do complexo. Condições: [sonda]= 2,5 μ M; [BSA] = 4 μ M; [tampão BRB] = 5-100 mM; pH= 6,0; $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ = 415/555 nm.



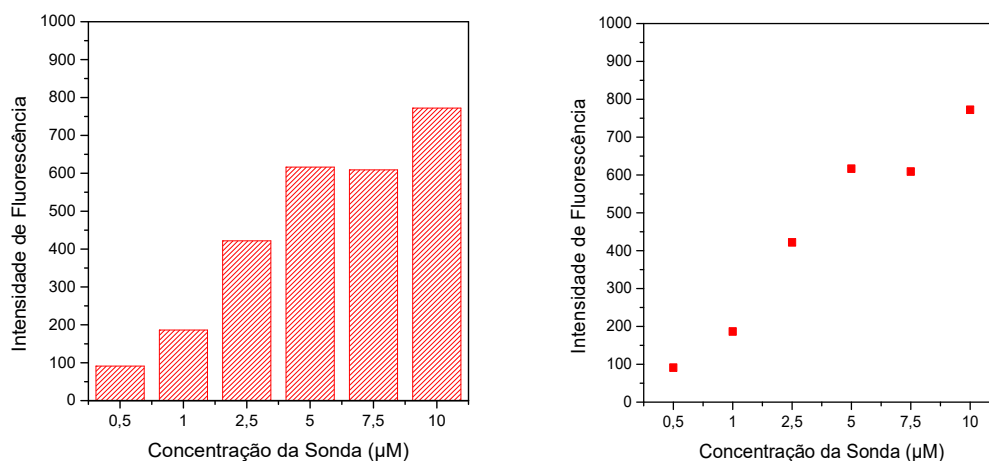
Fonte: Autora, 2021.

A partir dos dados apresentados, observa-se uma tendência de aumento da intensidade de fluorescência até a concentração de 10 mM, seguida de uma redução significativa até a concentração de 100 mM, sendo o menor resultado observado para 50 mM. O aumento da concentração do tampão significa o aumento da quantidade de cargas negativas no meio, o que pode interferir na interação sonda-proteína através do bloqueio da superfície da macromolécula. Nesse sentido, a concentração de 10 mM, a qual apresentou melhor sensibilidade, foi mantida para os estudos posteriores (Ver o apêndice X para comparação com a sonda livre).

5.5.5 Avaliação da concentração da sonda KCH 60

Considerando a resposta apresentada inicialmente a partir da concentração de 2,5 μ M para a sonda em contato com a BSA, outras concentrações foram avaliadas de forma a estabelecer a que apresentasse melhor sensibilidade e menor interferência do branco na intensidade de fluorescência. Considerando ainda o estabelecido por outros autores com sondas semelhantes à estudada (SHEN et al., 2017; TABUCHI; TAKI, 2018), o intervalo de concentração analisado foi estabelecido entre 2,5-10 μ M e os resultados são observados na Figura 43 (página 85).

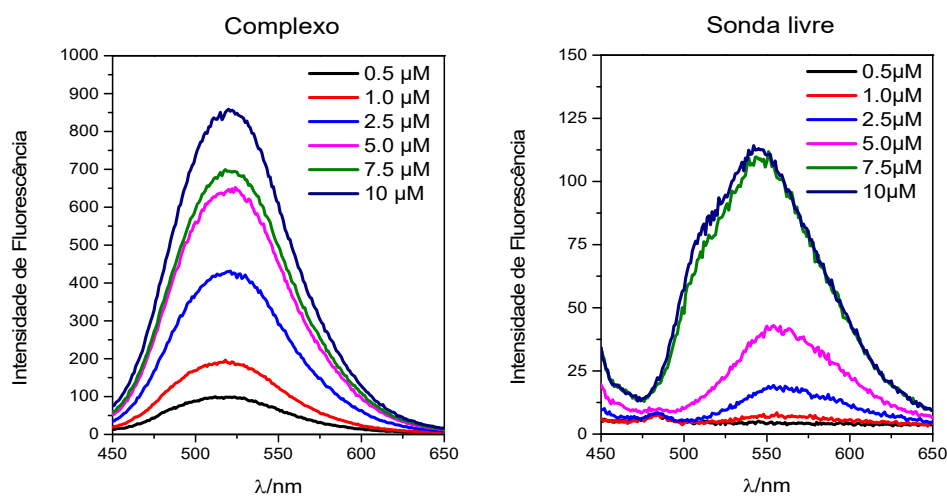
Figura 43. Avaliação do efeito da concentração da sonda na intensidade de fluorescência do complexo. Condições: [sonda]= 2,5-10 μM ; [BSA] = 4 μM ; [tampão BRB] = 10 mM; pH= 6,0; $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$ = 415/555 nm.



Fonte: Autora, 2021.

Entre os sistemas analisados, observa-se um aumento da intensidade de fluorescência dependente da concentração da sonda. No entanto, um aumento significativo da intensidade de fluorescência da sonda na sua forma livre também pode ser observado com o aumento da concentração (Verificar o apêndice Y para uma comparação direta com o branco). Dessa forma, a concentração de 5,0 μM foi escolhida para os estudos posteriores, pois apresentou melhor sensibilidade e menor interferência de fluorescência da sonda na sua forma livre (Figura 44, página 85).

Figura 44. Avaliação do efeito da concentração da sonda na intensidade de fluorescência do complexo e da sonda livre. Condições: [sonda]= 2,5-10 μM ; [BSA] = 4 μM ; [tampão BRB] = 10 mM; pH= 6,0; $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$ = 415/555 nm.

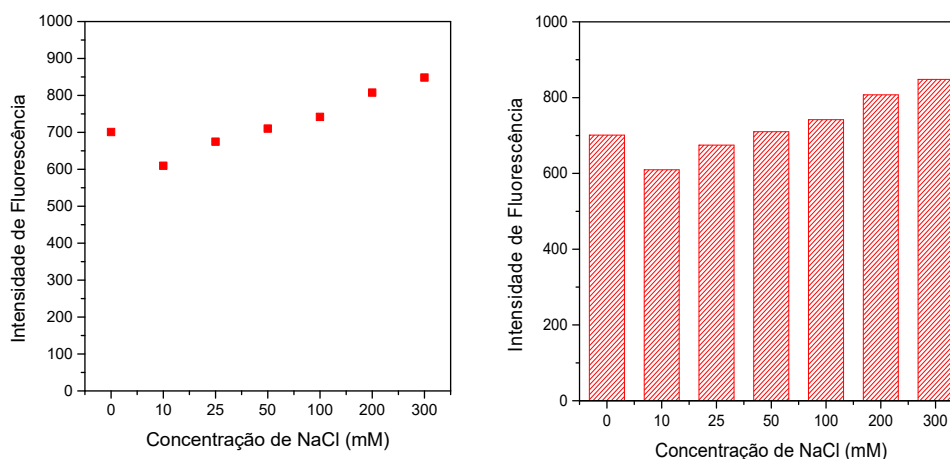


Fonte: Autora, 2021.

5.5.6 Avaliação da interferência da força iônica para a sonda KCH 60

Como já mencionado, a presença de íons na solução pode interferir diretamente na intensidade de fluorescência do complexo, logo que há a possibilidade de interações eletrostáticas com a sonda ou com a proteína, tornando-as menos disponíveis para interação (SANTOS, 2017). Nesse sentido, a avaliação da interferência da força iônica foi realizada através da adição de NaCl de forma a perfazer concentrações de 0-300 mM na solução final (Figura 45, página 86).

Figura 45. Avaliação do efeito da força iônica na intensidade de fluorescência do complexo. Condições: [sonda]= 5,0 μ M; [BSA] = 4 μ M; [tampão BRB] = 10 mM; pH= 6,0; $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ = 415/555 nm.



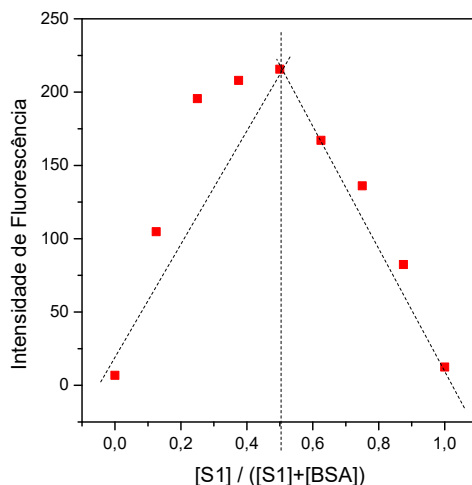
Fonte: Autora, 2021.

Através desse estudo, observa-se que a força iônica não interfere significativamente na intensidade de fluorescência do complexo (Verificar o apêndice Z para uma comparação direta com o branco), o que pode apontar a ausência de interações eletrostáticas entre sonda e proteína. Dessa forma, decidiu-se a manutenção do sistema sem o ajuste na força iônica do meio.

5.5.7 Determinação da estequiometria do complexo para a sonda KCH 60

A estequiometria do complexo foi determinada a partir do gráfico de Job, ou método das variações contínuas (KIM et al., 2020). O estudo foi realizado através de soluções com diferentes frações molares sonda-proteína, as quais foram analisadas quanto a intensidade de fluorescência (Figura 46, página 87). Dessa forma, a estequiometria foi determinada como 1:1, pois a intensidade máxima foi alcançada quando a fração molar sonda-BSA se aproximou de 0,5.

Figura 46. Gráfico de Job para determinação da estequiometria do complexo.

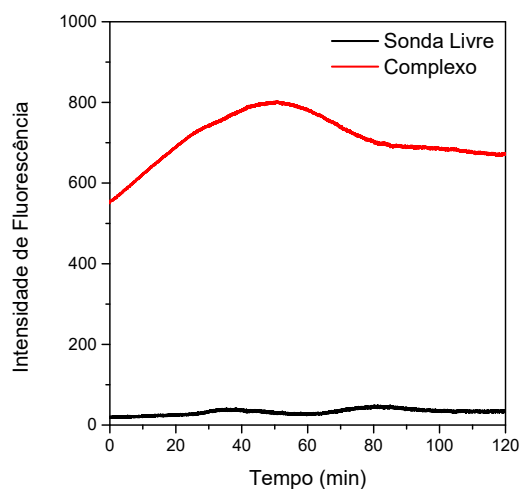


Fonte: Autora, 2021.

5.5.8 Avaliação da cinética e estabilidade do complexo para a sonda KCH 60

O estudo de cinética e estabilidade do complexo foi realizado através de medidas contínuas da intensidade de fluorescência em função do tempo a partir de um intervalo de medição pré-estabelecido. Os resultados apresentados por Tabuchi e Taki (2018) demonstraram perda de intensidade de fluorescência da sonda livre após uma hora de análise, sendo assim foi escolhido o tempo de análise de duas horas, sendo realizadas medições a cada 60 segundos como demonstrado na Figura 47 (página 87).

Figura 47. Avaliação da cinética e estabilidade do complexo. Condições: [sonda]= 5,0 μ M; [BSA] = 4 μ M; [tampão BRB] = 10 mM; pH= 6,0; $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ = 415/555 nm.



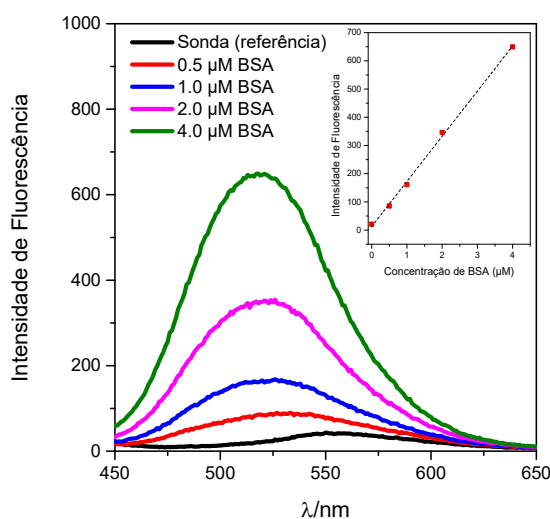
Fonte: Autora, 2021.

A partir desse estudo, observa-se um aumento significativo da intensidade de fluorescência do complexo até uma hora de reação, seguido de uma leve redução e estabilidade após cerca de 80 minutos. Esse perfil indica que a reação se processa lentamente e que o tempo de incubação deve ser superior a uma hora para obtenção da melhor sensibilidade da sonda.

5.5.9 Determinação das figuras de mérito e constante de ligação para a sonda KCH 60

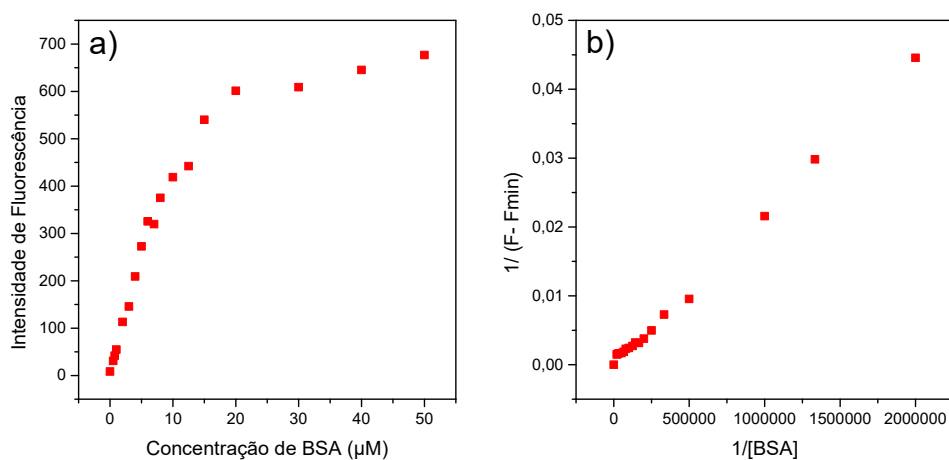
Após a otimização das condições analíticas, as figuras de mérito foram estudadas e a curva analítica foi estabelecida como $IF = 159(\pm 4,0) C_{BSA} + 13,30(\pm 6,24)$, com $r = 0,9988$ ($n = 5$). O aumento da intensidade de fluorescência foi linearmente relacionado à concentração de BSA no intervalo de 0,5-4,0 μM (Figura 48, página 88), um parâmetro importante a ser analisado, logo que o aumento da albumina sérica ou na urina é um importante indicador no diagnóstico clínico (BOLEL et al., 2012; LIU et al., 2018). O limite de detecção (LOD, $n = 10$) foi de 0,38 μM , semelhante ao relatado por outros trabalhos (LI et al., 2016; SHEN et al., 2017). Já o desvio padrão relativo (RSD) foi calculado a partir das concentrações de 0,5 e 4,0 μM , onde foram obtidos os valores de 5,0 e 6,0% respectivamente ($n = 10$). Tal resultado pode ser justificado pela variação de intensidade de fluorescência em função do tempo, observada no estudo cinético.

Figura 48. Curva analítica a partir de concentrações crescentes de BSA. Condições: [sonda]= 5,0 μM ; [BSA] = 0,5-4 μM ; [tampão BRB] = 10 mM; pH= 6,0; $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 415/555$ nm.



A constante de ligação foi determinada a partir da equação de Benesi-Hildebrand (GHOSH; GUCHHAIT, 2009; SINGH et al., 2009). A partir dessa equação e da linearização do gráfico $1/[BSA] \times 1/(F_{\max} - F_{\min})$ (Figura 49, página 89), obteve-se a constante de $4,56 (\pm 0,015) \times 10^7 \text{ M}^{-1}$. Este valor foi muito próximo ao obtido por outros autores com sondas estruturalmente semelhantes (CHEN et al., 2020; LIU et al., 2018; SHEN et al., 2017), indicando que a interação sonda-BSA é favorecida.

Figura 49. a) Curva de titulação fluorimétrica e b) Linearização da equação de Benesi-Hildebrand para determinação da constante de ligação. Condições: [sonda]= 5,0 μM ; [BSA] = 0-50 μM ; [tampão BRB] = 10 mM; pH= 6,0; $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$ = 415/555 nm.



Fonte: Autora, 2021.

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Baseando-se na sua reconhecida afinidade por biomoléculas e atividade fluorescente, duas séries de iminas foram planejadas e sintetizadas a partir dos núcleos 2-aminobenzimidazol e 5-aminoindol. Esses compostos foram obtidos inicialmente através de reações com aldeídos aromáticos *p*-funcionalizados com aminas alifáticas, aminas aromáticas e ácidos borônicos, os quais foram obtidos por reações de S_NAr e reações de acoplamento cruzado catalisadas por paládio (Reações de Buchwald-Hartwig e Suzuki-Miyaura). Os rendimentos obtidos foram de até 60% e os compostos foram utilizados como intermediários de reação. Posteriormente, os aldeídos funcionalizados sintetizados foram incorporados à fração indol e benzimidazol através da formação de uma ligação imina. Para os compostos finais, os rendimentos variaram entre 23-84%, e 10-37% para os indóis e benzimidazóis respectivamente. O grau de pureza foi superior a 98% e todos os intermediários e compostos finais foram caracterizados por RMN ¹H e ¹³C.

Em uma análise variando a concentração do DNA e o pH das soluções, foi observado que nenhuma das moléculas propostas apresentou perfil condizente a um comportamento de sonda de DNA. No entanto, através de uma análise preliminar, quatro das treze sondas sintetizadas apresentaram resposta de fluorescência significativa em contato com a proteína do soro bovino. Dessas, a sonda **KCH 60** ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 415/555 \text{ nm}$) se destacou e foi selecionada para ensaios de otimização dos parâmetros analíticos experimentais, em que a melhor resposta analítica ocorreu em meio contendo tampão Britton-Robinson (10mM) e pH 6. A estequiometria do complexo sonda-BSA foi definida como 1:1 pelo método de Job. O intervalo linear foi de 0,5- 4,0 μM com limite de detecção de 0,38 μM e RSD < 6,0%.

Como perspectivas, serão realizados os ensaios de determinação do sítio de ligação da sonda **KCH 60** ao BSA, através de ensaios de competição com marcadores específicos, além da realização dos mesmos ensaios com HSA. Em posse desses dados, serão realizados ensaios de docking e dinâmica molecular para um melhor entendimento das interações intermoleculares entre a sonda e a proteína, bem como estabilidade do complexo formado e possíveis alterações conformacionais na proteína-alvo. Finalmente, serão realizados ensaios com

amostras reais de urina e plasma para aplicações reais na quantificação de albuminas humanas.

7. REFERÊNCIAS

ABDEL-ATTY, M. M. et al. Design, synthesis, 3D pharmacophore, QSAR, and docking studies of carboxylic acid derivatives as Histone Deacetylase inhibitors and cytotoxic agents. **Bioorganic Chemistry**, v. 57, p. 65–82, 2014.

ABDEL-AZIZ, H. A. et al. Synthesis and anti-arrhythmic activity of some piperidine-based 1,3-thiazole, 1,3,4-thiadiazole, and 1,3-thiazolo[2,3-c]-1,2,4-triazole derivatives. **Monatshefte fur Chemie**, v. 140, n. 4, p. 431–437, 2009.

ABID, O. H.; RAMADAN, A. K. Preparation and Identification of Novel 1, 3-Oxazepine Derivatives by Cycloaddition Reactions [2+5] of Selected Carboxylic Acid Anhydrides with Imines Derived from 4-methyl aniline. **Al-Mustansiriyah Journal of Science**, v. 29, n. 2, p. 93, 2018.

ARMITAGE, B. A. Cyanine dye-DNA interactions: Intercalation, groove binding, and aggregation. **Topics in Current Chemistry**, v. 253, p. 55–76, 2005.

BARRA, C. V.; NETTO, A. V. G. Antitumour complexes and DNA interactions and their tools of analysis: An approach to metalointercalators. **Revista Virtual de Quimica**, v. 7, n. 6, p. 1998–2016, 2015.

BARWIOLEK, M. et al. The synthesis, characterization and fluorescence properties of new benzimidazole derivatives. **Journal of Luminescence**, v. 211, n. March, p. 88–95, 2019.

BATALHA, P. N.; SAGRILLO, F. S.; GAMA, I. L. C-C cross-coupling: New methodologies, applications and discoveries over the last few years. **Revista Virtual de Quimica**, v. 6, n. 2, p. 494–550, 2014.

BECKFORD, F. A. Reaction of the Anticancer Organometallic Ruthenium Compound, [(η^6 -p-Cymene)Ru(ATSC)Cl] PF₆ with Human Serum Albumin. **International Journal of Inorganic Chemistry**, v. 2010, p. 1–7, 2010.

BLACKBURN, G. M. et al. (EDS.). **Nucleic Acids in Chemistry and Biology**. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2007.

BOLEL, P. et al. Spectroscopic Investigation of the Effect of Salt on Binding of Tartrazine with Two Homologous Serum Albumins: Quantification by Use of the Debye–Hückel Limiting Law and Observation of Enthalpy–Entropy Compensation. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 116, n. 34, p. 10195–10204, 30 ago. 2012.

BOURASSA, P.; HASNI, I.; TAJMIR-RIahi, H. A. Folic acid complexes with human and bovine serum albumins. **Food Chemistry**, v. 129, n. 3, p. 1148–1155, dez. 2011.

BROWN, U. M.; CARTER, P. H.; TOMLINSON, M. 374. Formyl compounds. Part II. **Journal of the Chemical Society (Resumed)**, v. 1956, p. 1843, 1958.

BUCEVIČIUS, J.; LUKINAVIČIUS, G.; GERASIMAITE, R. The use of hoechst dyes for DNA staining and beyond. **Chemosensors**, v. 6, n. 2, 2018.

CEPANEC, I. The Suzuki-Miyaura reaction. In: **Synthesis of Biaryls**. 1. ed. [s.l.] Elsevier, 2004. p. 139–207.

CHEN, C. et al. Selective bioimaging of cancer cells and detection of HSA with indomethacin-based fluorescent probes. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 241, p. 118685, 2020.

CLAYDEN, J.; GREEVES, N.; WARREN, S. **Organic Chemistry**. 2. ed. New York: Oxford University Press, 2012.

CORDES, E. H.; JENCKS, W. P. On the Mechanism of Schiff Base Formation and Hydrolysis. **Journal of the American Chemical Society**, v. 84, n. 5, p. 832–837, mar. 1962.

CRISSMAN, H. A.; HIRONS, G. T. Staining of DNA in Live and Fixed Cells. **Methods in Cell Biology**, v. 41, n. C, p. 195–209, 1994.

CZARNY, A. et al. Analysis of van der Waals and Electrostatic Contributions in the Interactions of Minor Groove Binding Benzimidazoles with DNA. **Journal of the American Chemical Society**, v. 117, n. 16, p. 4716–4717, 1995.

DA SILVA, C. M. et al. Schiff bases: A short review of their antimicrobial activities. **Journal of Advanced Research**, v. 2, n. 1, p. 1–8, 2011.

DA SILVA, R. E. et al. Interação de complexo de rutênio com albumina de soro bovino para detecção amperométrica de ácido ascórbico. **Química Nova**, v. 37, n. 10, p. 1633–1638, 2014.

DASH, S. et al. Cyanine Dyes - Nucleic Acids Interactions. **Current Organic Chemistry**, v. 15, n. 15, p. 2673–2689, 2011.

EBIHARA, A. et al. Development of a modified Britton-Robinson buffer with improved linearity in the alkaline pH region. **Biojournal of Science and Technology**, v. 3, 2016.

ELROBY, S. A. K.; EL-SHISHTAWY, R. M.; MAKKI, M. S. I. Influence of the protonation, deprotonation and transition metal ions on the fluorescence of 8-hydroxyquinoline: A computational study. **Molecular Simulation**, v. 37, n. 11, p. 940–952, 2011.

FAN, J. et al. A fluorescent probe for site I binding and sensitive discrimination of HSA from BSA. **Chemical Communications**, v. 50, n. 67, p. 9573–9576, 2014.

FARAHAT, A. A. et al. Indole and Benzimidazole Bichalcophenes: Synthesis, DNA Binding and Antiparasitic Activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 143, p. 1590–1596, 2018.

FERREIRA, C. M. H. et al. (Un)suitability of the use of pH buffers in biological, biochemical and environmental studies and their interaction with metal ions – a review. **RSC Advances**, v. 5, n. 39, p. 30989–31003, 2015.

FERREIRA, E. S. **Interação da albumina do soro bovino (BSA) com substratos sintéticos**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2009.

GHOSH, S.; GUCHHAIT, N. Chemically Induced Unfolding of Bovine Serum Albumin by Urea and Sodium Dodecyl Sulfate: A Spectral Study with the Polarity-Sensitive Charge-Transfer Fluorescent Probe (E)-3-(4-Methylaminophenyl)acrylic Acid Methyl Ester. **ChemPhysChem**, v. 10, n. 9–10, p. 1664–1671, 13 jul. 2009.

GONÇALVES, M. S. T. Labeling of biomolecules with large organic fluorophores. **Chem. Rev.**, v. 109, n. 1, p. 190–212, 2009.

GONZLEZ-RUIZ, V. et al. An Overview of Analytical Techniques Employed to Evidence Drug-DNA Interactions. Applications to the Design of Genosensors. In: **Biomedical Engineering, Trends, Research and Technologies**. [s.l.] InTech, 2011.

HALAWA, A. H. et al. Synthesis, biological activity and molecular modeling study of new Schiff bases incorporated with indole moiety. **Zeitschrift fur Naturforschung -**

Section C Journal of Biosciences, v. 72, n. 11–12, p. 467–475, 2017.

HAN, F.; TAULIER, N.; CHALIKIAN, T. V. Association of the minor groove binding drug Hoechst 33258 with d(CGCGAATTCGCG)₂: Volumetric, calorimetric, and spectroscopic characterizations. **Biochemistry**, v. 44, n. 28, p. 9785–9794, 2005.

HARTWIG, J. Palladium-Catalyzed Amination of Aryl Halides and Sulfonates. **Modern Amination Methods**, v. 576, p. 195–262, 2007.

HARTWIG, J. F. et al. Palladium-Catalyzed Amination of Aryl Halides. In: **Organic Reactions**. [s.l.] Wiley, 2019. v. 100p. 853–958.

HE, X. M.; CARTER, D. C. Atomic structure and chemistry of human serum albumin. **Nature**, v. 358, n. 6383, p. 209–215, 16 jul. 1992.

HERAVI, M. M. et al. Buchwald-Hartwig reaction: An overview. **Journal of Organometallic Chemistry**, v. 861, p. 17–104, abr. 2018.

HU, Q. et al. Synthesis, biological evaluation, and molecular modeling studies of methylene imidazole substituted biaryls as inhibitors of human 17 α -hydroxylase-17,20-lyase (CYP17)-Part II: Core rigidification and influence of substituents at the methylene bridge. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 16, p. 7715–7727, 2008.

HUDSON, E. A. **Albumina do soro bovino como nanocarreador de curcumina**. [s.l.] Universidade Federal de Viçosa - Minas Gerais, 2017.

HUO, S. et al. Synthesis of a phosphaphenanthrene/benzimidazole-based curing agent and its application in flame-retardant epoxy resin. **Polymer Degradation and Stability**, v. 163, p. 100–109, 2019.

HURLEY, L. H. DNA and its associated processes as targets for cancer therapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, n. 3, p. 188–200, 2002.

JAUMOT, J.; GARGALLO, R. Experimental Methods for Studying the Interactions between G-Quadruplex Structures and Ligands. **Current Pharmaceutical Design**, v. 18, n. 14, p. 1900–1916, 1 mar. 2012.

JOHNSON, I; SPENCE, M. T. Z. **The Molecular Probes Handbook: a guide to fluorescent probes and labeling technologies**. 11. ed. [s.l.] Waltham: Life Technoogies, 2010.

KAJAL, A. et al. Schiff Bases: A Versatile Pharmacophore. **Journal of Catalysts**, v. 2013, n. Mic, p. 1–14, 2013.

KARLSSON, H. J. et al. Groove-binding unsymmetrical cyanine dyes for staining of DNA: Syntheses and characterization of the DNA-binding. **Nucleic Acids Research**, v. 31, n. 21, p. 6227–6234, 2003.

KARLSSON, H. J.; LINCOLN, P.; WESTMAN, G. Synthesis and DNA binding studies of a new asymmetric cyanine dye binding in the minor groove of [poly(dA-dT)]₂. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 6, p. 1035–1040, 2003.

KIM, Y. et al. A Near-infrared Turn-on Fluorescent Sensor for Sensitive and Specific Detection of Albumin from Urine Samples. **Sensors**, v. 20, n. 4, p. 1232, 24 fev. 2020.

KUBOTA, Y. et al. Synthesis and DNA binding properties of alkyl-linked bis(benzimidazole) compounds. **Nucleic acids research. Supplement (2001)**, v. 33258, n. 1, p. 101–102, 2001.

KUBOTA, Y.; IWAMOTO, T.; SEKI, T. The interaction of benzimidazole compounds

- with DNA: Intercalation and groove binding modes. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 42, n. 42, p. 53–54, 1999.
- LAFAYETTE, E. A. et al. Synthesis of novel indole derivatives as promising DNA-binding agents and evaluation of antitumor and antitopoisomerase I activities. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 136, p. 511–522, 2017.
- LAKOWICZ, J. R. **Principles of Fluorescence Spectroscopy**. 3. ed. Boston, MA: Springer US, 2006.
- LAURSEN, J. et al. Further Exploration of Antimicrobial Ketodihydronicotinic Acid Derivatives by Multiple Parallel Syntheses. **Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening**, v. 9, n. 9, p. 663–681, 2006.
- LAYER, R. W. The Chemistry of Imines. **Chemical Reviews**, v. 63, n. 5, p. 489–510, 1 out. 1963.
- LEE, S. et al. Development of human serum albumin selective fluorescent probe using thieno[3,2-b]pyridine-5(4h)one fluorophore derivatives. **Sensors (Switzerland)**, v. 19, n. 23, 2019.
- LI, H. et al. An NIR fluorescent probe of uric HSA for renal diseases warning. **Dyes and Pigments**, v. 133, p. 79–85, out. 2016.
- LI, P. et al. An ultrasensitive rapid-response fluorescent probe for highly selective detection of HSA. **Tetrahedron Letters**, v. 59, n. 14, p. 1390–1393, 2018.
- LIU, C. et al. Differential recognition and quantification of HSA and BSA based on two red-NIR fluorescent probes. **Journal of Luminescence**, v. 197, n. December 2017, p. 193–199, 2018.
- LIU, G. et al. Synthesis of enantiomerically pure N-tert-butanesulfinyl imines (tert-butanesulfinimines) by the direct condensation of tert-butanesulfinamide with aldehydes and ketones. **Journal of Organic Chemistry**, v. 64, n. 4, p. 1278–1284, 1999.
- LONG, W. et al. Boosting the turn-on fluorescent signaling ability of thiazole orange dyes: The effectiveness of structural modification site and its unusual interaction behavior with nucleic acids. **Dyes and Pigments**, v. 159, n. March, p. 449–456, 2018.
- LU, C. et al. Design, synthesis, and evaluation of multitarget-directed resveratrol derivatives for the treatment of Alzheimer's disease. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 56, n. 14, p. 5843–5859, 2013.
- MARTIN, R.; BUCHWALD, S. L. Palladium-Catalyzed Suzuki–Miyaura Cross-Coupling Reactions Employing Dialkylbiaryl Phosphine Ligands. **Accounts of Chemical Research**, v. 41, n. 11, p. 1461–1473, 18 nov. 2008.
- MCMURRAY, C. T.; SMALL, E. W.; VAN HOLDE, K. E. Binding of Ethidium to the Nucleosome Core Particle. 2. Internal and External Binding Modes. **Biochemistry**, v. 30, n. 23, p. 5631–5643, 1991.
- MISHRA, A. et al. Cyanines during the 1990s: a review. **Chemical Reviews**, v. 100, n. 6, p. 1973–2011, 2000.
- MORALES, S. et al. A general aminocatalytic method for the synthesis of aldimines. **Journal of the American Chemical Society**, v. 136, n. 3, p. 1082–1089, 2014.
- NAIK, P. N.; CHIMATADAR, S. A.; NANDIBEWOOR, S. T. Interaction between a potent corticosteroid drug – Dexamethasone with bovine serum albumin and human

serum albumin: A fluorescence quenching and fourier transformation infrared spectroscopy study. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 100, n. 3, p. 147–159, set. 2010.

NAM, H.; BOURY, B.; PARK, S. Y. Anisotropic polysilsesquioxanes with fluorescent organic bridges: Transcription of strong π - π interactions of organic bridges to the long-range ordering of silsesquioxanes. **Chemistry of Materials**, v. 18, n. 24, p. 5716–5721, 2006.

NAME-REACTION. **Suzuki cross-coupling**. Disponível em: <<https://www.name-reaction.com/suzuki-cross-coupling>>. Acesso em: 10 jul. 2020.

NARAYANASWAMY, N. et al. A thiazole coumarin (TC) turn-on fluorescence probe for AT-base pair detection and multipurpose applications in different biological systems. **Scientific Reports**, v. 4, p. 1–10, 2014.

NEIDLE, S. DNA minor-groove recognition by small molecules. **Natural Product Reports**, v. 18, n. 3, p. 291–309, 2001.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 7. ed. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2018.

OBERMOSER, V. et al. New telmisartan-derived PPAR γ agonists: Impact of the 3D-binding mode on the pharmacological profile. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 124, p. 138–152, 2016.

PAL, S. K.; ZHAO, L.; ZEWAİL, A. H. Water at DNA surfaces: Ultrafast dynamics in minor groove recognition. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 14, p. 8113–8118, 2003.

PALCHAUDHURI, R.; HERGENROTHER, P. J. DNA as a target for anticancer compounds: methods to determine the mode of binding and the mechanism of action. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 18, n. 6, p. 497–503, 2007.

PAN, C. et al. Palladium catalyzed ligand-free Suzuki cross-coupling reaction. **Catalysis Communications**, v. 9, n. 4, p. 508–510, 2008.

PHAN, H. T. M. et al. Investigation of Bovine Serum Albumin (BSA) Attachment onto Self-Assembled Monolayers (SAMs) Using Combinatorial Quartz Crystal Microbalance with Dissipation (QCM-D) and Spectroscopic Ellipsometry (SE). **PLOS ONE**, v. 10, n. 10, p. e0141282, 27 out. 2015.

PRAY, L. A. **Discovery of DNA Structure and Function: Watson and Crick**. Disponível em: <<https://www.nature.com/scitable/topicpage/discovery-of-dna-structure-and-function-watson-397/>>. Acesso em: 25 jun. 2020.

RAMEZANI, F.; RAFII-TABAR, H. An in-depth view of human serum albumin corona on gold nanoparticles. **Molecular BioSystems**, v. 11, n. 2, p. 454–462, 2015.

RASBURN, J. W.; STEWART, F. H. C. 431. The action of tin and hydrochloric acid on p-dialkylaminobenzaldehydes. Part II. The preparation of some new anthracenes. **Journal of the Chemical Society (Resumed)**, n. 1, p. 2237, 1957.

REACH DEVICES. **Biological Buffers**. Disponível em: <<https://www.reachdevices.com/Protein/BiologicalBuffers.html>>. Acesso em: 17 jan. 2021.

REEVES, J. T. et al. A General Method for Imine Formation Using B(OCH₂CF₃)₃. **Organic Letters**, v. 17, n. 10, p. 2442–2445, 2015.

REHMAN, S. U. et al. **Studying non-covalent drug-DNA interactions** *Archives of Biochemistry and Biophysics*, jun. 2015. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003986115001812>>

RODRIGUES, E. E. DA S. **PLANEJAMENTO E SÍNTESE DE ARIL-GUANILIDRAZONAS P-SUBSTITUÍDAS COMO POTENCIAIS PROTÓTIPOS ANTITUMORAIS**. [s.l.] UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS, 2019.

ROLINSKI, A. J. W. G. V. O. J. **Basic Photophysics**. Disponível em: <<http://photobiology.info/Visser-Rolinski.html>>. Acesso em: 30 jun. 2020.

SALAS REDONDO, C. et al. Interplay of Fluorescence and Phosphorescence in Organic Biluminescent Emitters. *Journal of Physical Chemistry C*, v. 121, n. 27, p. 14946–14953, 2017.

SANTOS, J. C. N. **ESTUDOS DE INTERAÇÃO DO TIMEROSAL COM ALBUMINA DO SORO BOVINO (BSA) SIMULANDO CONDIÇÕES FISIOLÓGICAS E EMPREGANDO TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS: MECANISMO E PERFIL DE FIBRILAÇÃO PROTEICA**. [s.l.] UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS, 2017.

SHEN, P. et al. Recognition and quantification of HSA: A fluorescence probe across A-helices of site I and site II. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, v. 247, p. 587–594, 2017.

SHIM, H. J. et al. Discovery of (E)-5-(benzylideneamino)-1 H -benzo[d]imidazol-2(3 H)-one derivatives as inhibitors for PTK6. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 24, n. 19, p. 4659–4663, out. 2014.

SHIMAZAKI, Y. et al. Metal complexes involving indole rings: Structures and effects of metal-indole interactions. *Coordination Chemistry Reviews*, v. 253, n. 3–4, p. 479–492, 2009.

SILVA, M. DE M. **Interação entre compostos bioativos e ctDNA (Calf Thymus): Uma abordagem espectroscópica**. [s.l.] Universidade Federal de Alagoas, 2016.

SINGH, R. B. et al. Interaction of human serum albumin with charge transfer probe ethyl ester of N,N-dimethylamino naphthyl acrylic acid: An extrinsic fluorescence probe for studying protein micro-environment. *Photochem. Photobiol. Sci.*, v. 8, n. 1, p. 101–110, 2009.

SISCHKA, A. et al. Molecular mechanisms and kinetics between DNA and DNA binding ligands. *Biophysical Journal*, v. 88, n. 1, p. 404–411, 2005.

SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B. **Química Orgânica**. 10. ed. [s.l.] Hoboken: John Wiley & Sons, 2014.

SORKIN, M. R. et al. Design of protein-based “turn on” molecular probes for intracellular bond cleavage. *Molecular Systems Design and Engineering*, v. 5, n. 1, p. 385–391, 2020.

SOUZA, P. J. F. DE. **ACOPLAMENTO DE AMINAS SECUNDÁRIAS AO SISTEMA 3,5-ISOXAZOL DISSUBSTITUÍDO, UTILIZANDO AS METODOLOGIAS DE ULLMANN E BUCHWALD**. [s.l.] UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL, 2012.

SUZUKI, A. Carbon-carbon bonding made easy. *Chemical Communications*, n. 38, p. 4759–4763, 2005.

TABUCHI, Y.; TAKI, M. Fluorescent “keep-on” type pharmacophore obtained from dynamic combinatorial library of Schiff bases. *Analytical and Bioanalytical*

Chemistry, v. 410, n. 26, p. 6713–6717, 2018.

TAHA, M. et al. Interactions of Biological Buffers with Macromolecules: The Ubiquitous “Smart” Polymer PNIPAM and the Biological Buffers MES, MOPS, and MOPSO.

Macromolecules, v. 44, n. 21, p. 8575–8589, 8 nov. 2011.

TERRIER, F. The SNAr Reactions: Mechanistic Aspects. In: **Modern Nucleophilic Aromatic Substitution**. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2013. p. 1–94.

TINTORI, C. et al. Development and in Vitro Evaluation of a Microbicide Gel Formulation for a Novel Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor Belonging to the N-Dihydroalkoxybenzyloxypyrimidines (N-DABOs) Family. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 59, n. 6, p. 2747–2759, 2016.

TREVISAN, M. G. **Monitoramento de reações químicas empregando espectroscopia no infravermelho**. [s.l.] Universidade Estadual de Campinas, 2009.

WANG, H.; QIAN, X.; LI, J. Synthesis and Fluorescence Properties of Some Aromatic Schiff Base Compounds. n. Gmee, p. 43–44, 2015.

WARING, M. J. DNA Modification and Cancer. **Annual Review of Biochemistry**, v. 50, n. 1, p. 159–192, 1981.

WATSON, J. D.; CRICK, F. H. C. Molecular structure of nucleic acids: A Structure for deoxyribose nucleic acid. **50 Years of DNA**, n. April, p. 83–84, 2016.

WU, Y. Y. et al. A selective and sensitive fluorescent albumin probe for the determination of urinary albumin. **Chemical Communications**, v. 50, n. 78, p. 11507–11510, 2014.

XU, Y. et al. A fluorescence probe acted on Site I binding for Human Serum Albumin. **Talanta**, v. 185, n. December 2017, p. 568–572, 2018.

YIN, J. et al. Preparation of a cyanine-based fluorescent probe for highly selective detection of glutathione and its use in living cells and tissues of mice. **Nature Protocols**, v. 10, n. 11, p. 1742–1754, 15 nov. 2015.

ZHANG, J. et al. Efficient Two-Photon Fluorescent Probe for Nitroreductase Detection and Hypoxia Imaging in Tumor Cells and Tissues. **Analytical Chemistry**, v. 87, n. 23, p. 11832–11839, 10 dez. 2015.

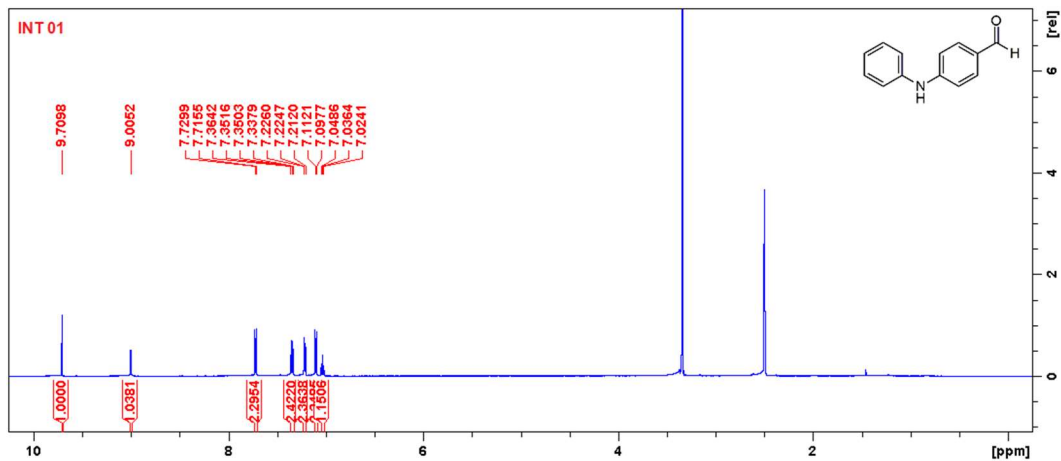
ZHU, J. et al. Spectroscopic and molecular modeling methods to investigate the interaction between 5-Hydroxymethyl-2-furfural and calf thymus DNA using ethidium bromide as a probe. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 124, p. 78–83, 2014.

APÊNDICES

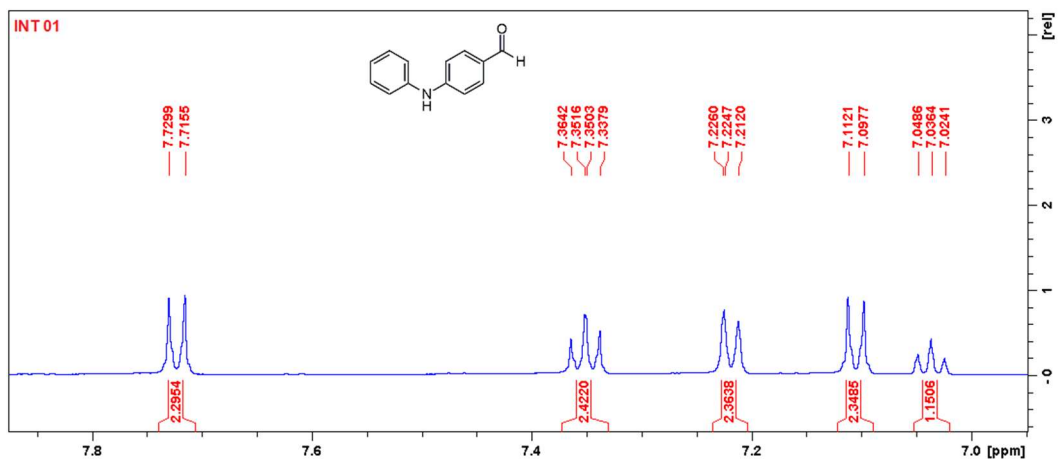
8. APÊNDICES

APÊNDICE A

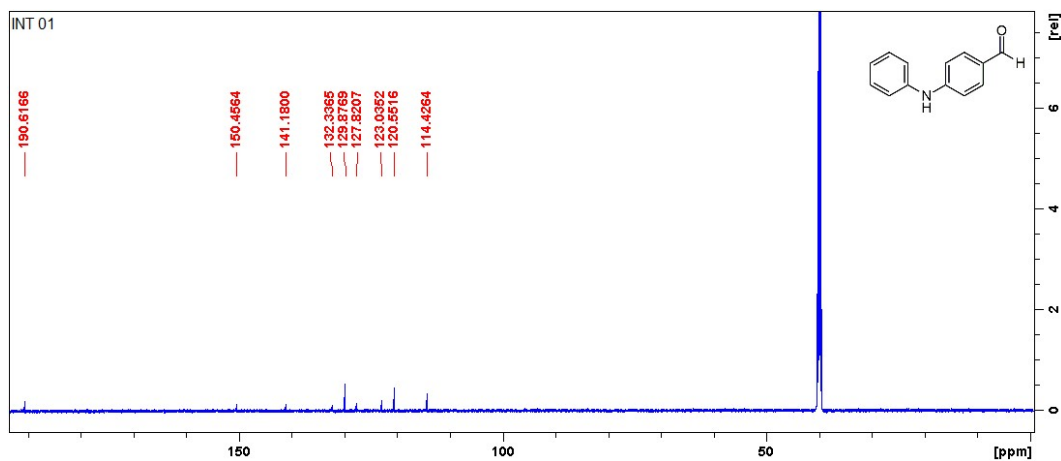
Espectro de RMN ^1H do composto **INT 01** (400 MHz, DMSO- d_6)



Ampliação de 7.00-7.80 ppm RMN ^1H do composto **INT 01** (400 MHz, DMSO- d_6)

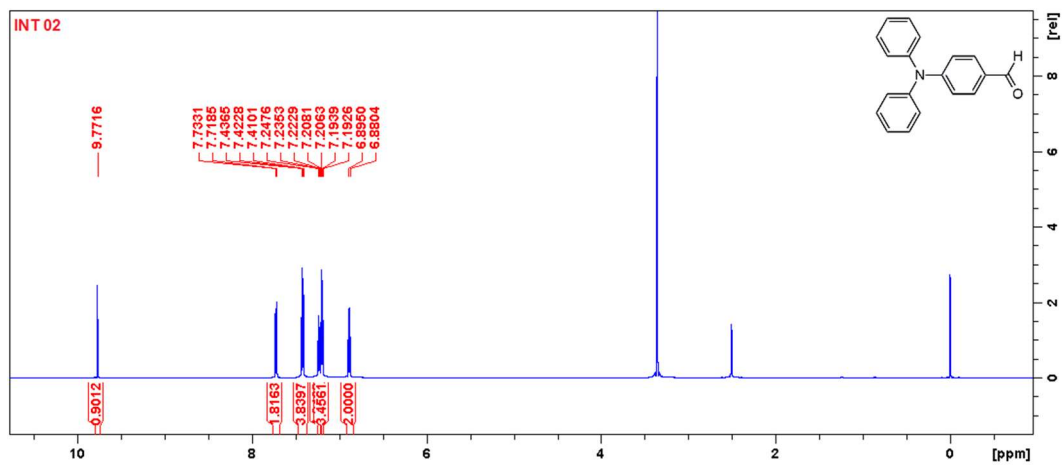


Espectro de RMN ^{13}C do composto **INT 01** (100 MHz, DMSO- d_6)

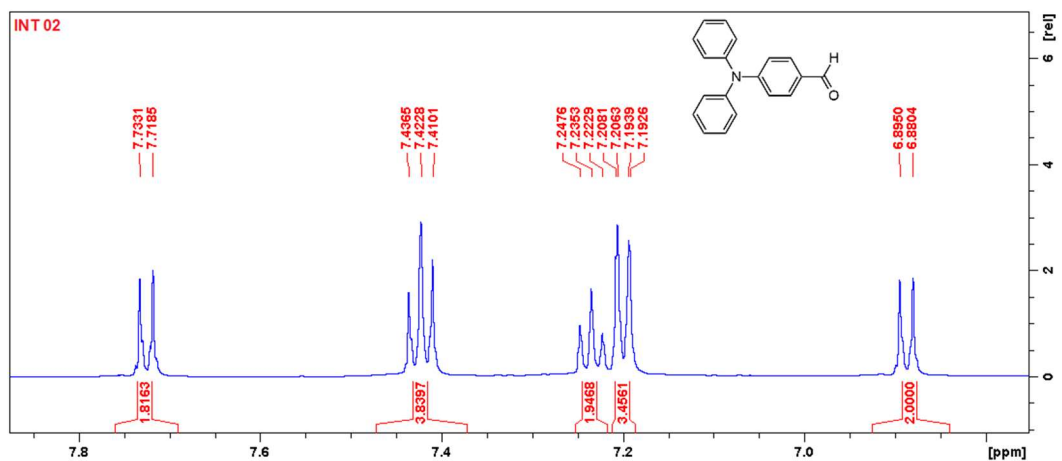


APÊNDICE B

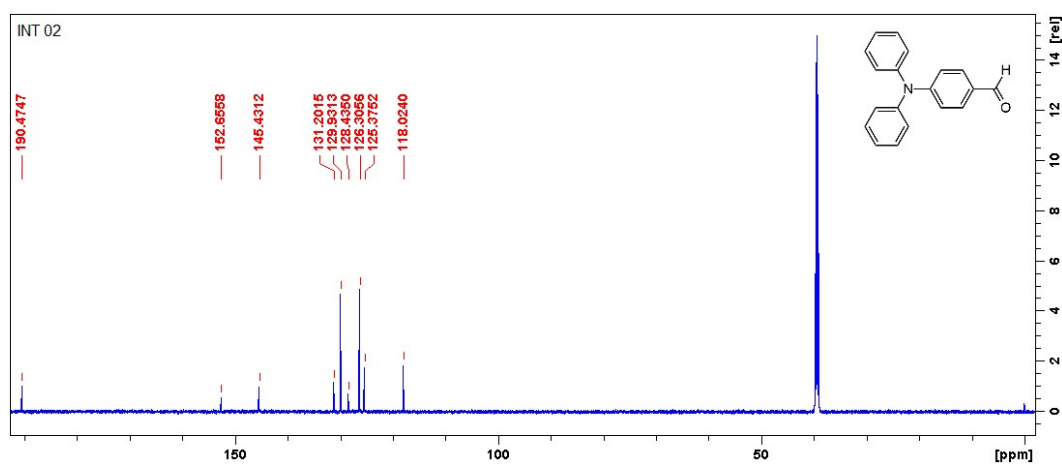
Espectro de RMN ^1H do composto **INT 02** (400 MHz, DMSO- d_6)



Ampliação de 6.82-7.80 ppm RMN ^1H do composto **INT 02** (400 MHz, DMSO- d_6)

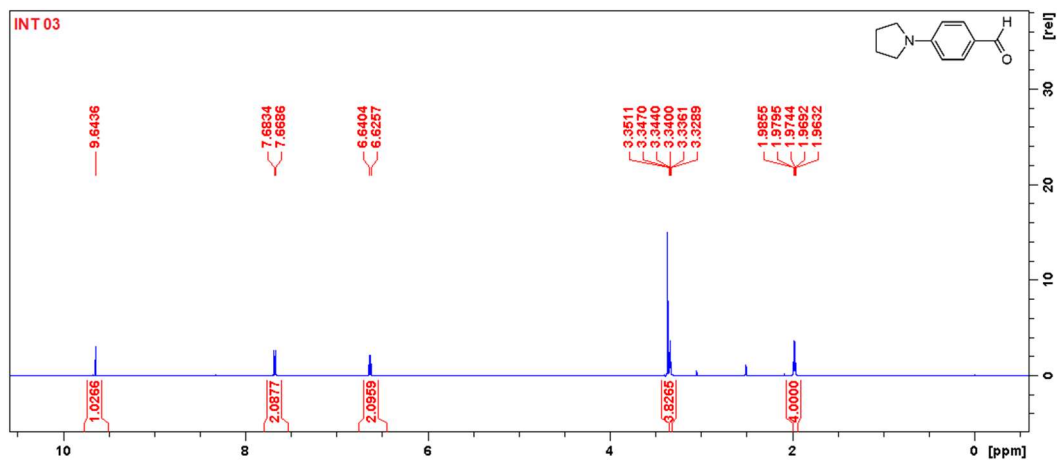


Espectro de RMN ^{13}C do composto **INT 02** (100 MHz, DMSO- d_6)

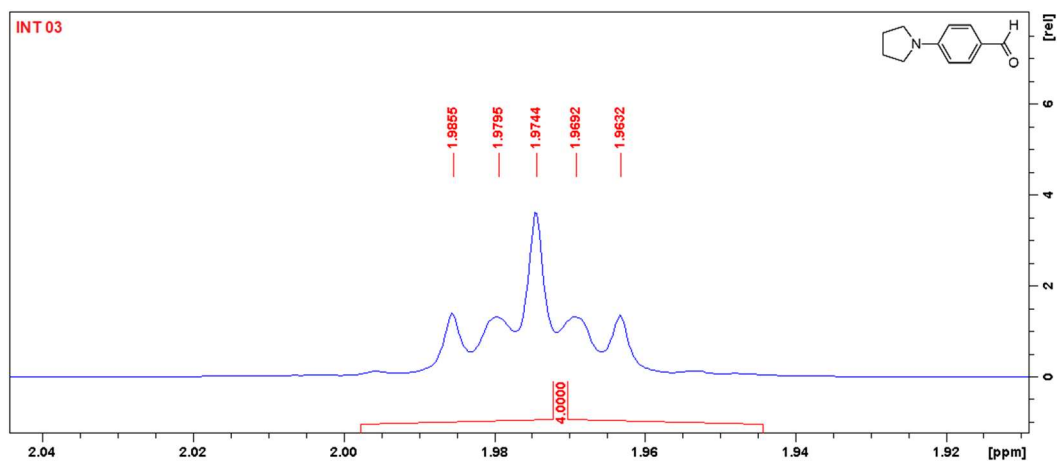


APÊNDICE C

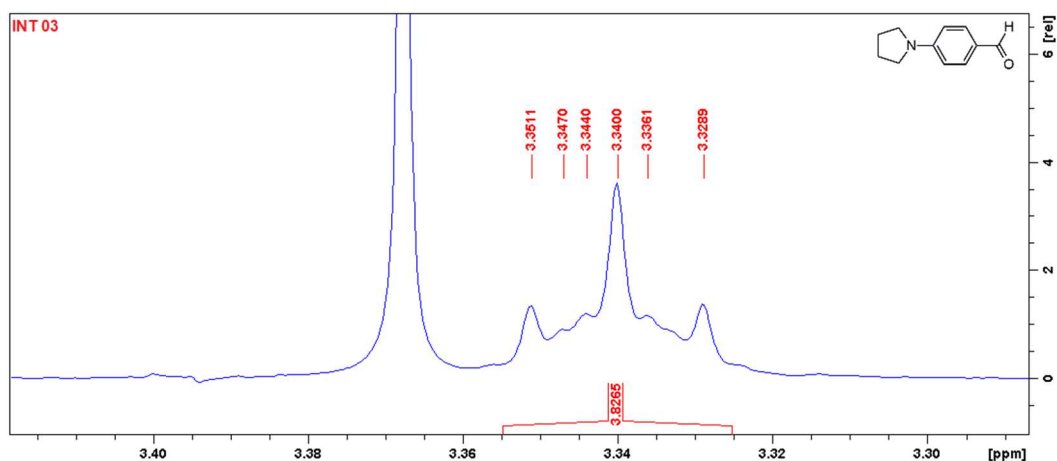
Espectro de RMN ^1H do composto **INT 03** (600 MHz, DMSO- d_6)



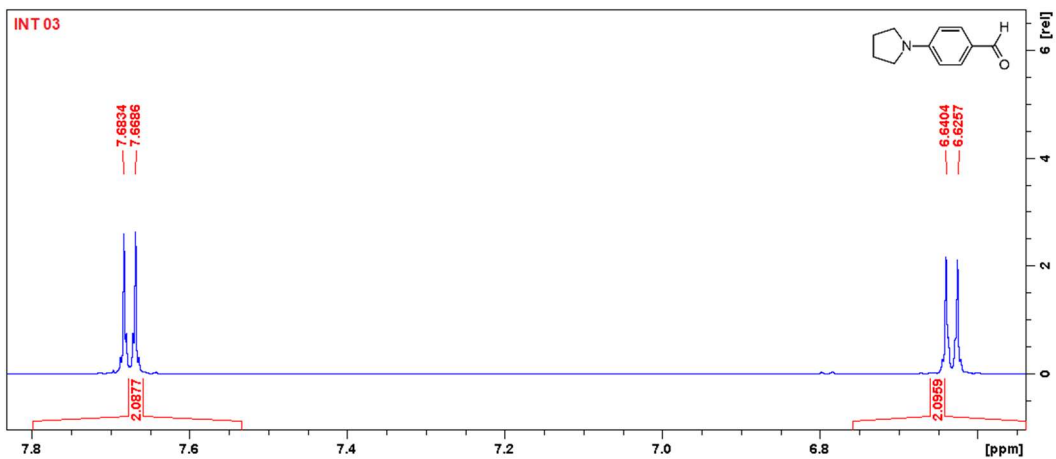
Ampliação de 1.90-2.00 ppm RMN ^1H do composto **INT 03** (600 MHz, DMSO- d_6)



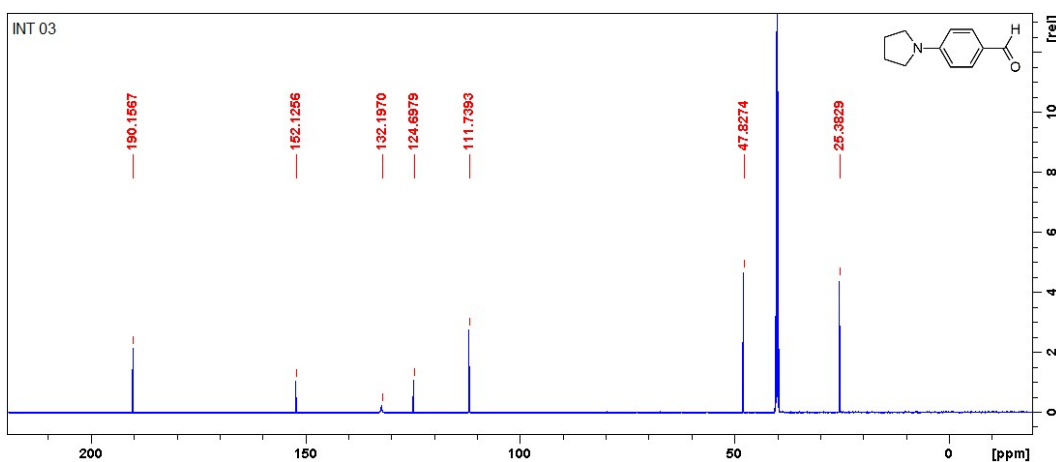
Ampliação de 3.29-3.41 ppm RMN ^1H do composto **INT 03** (600 MHz, DMSO- d_6)



Ampliação de 6.48-7.86 ppm RMN ^1H do composto **INT 03** (600 MHz, DMSO- d_6)

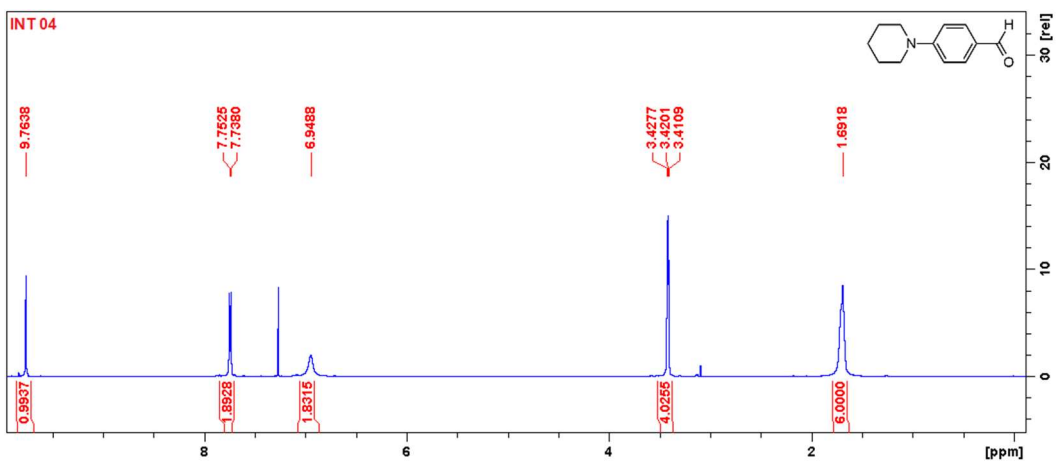


Espectro de RMN ^{13}C do composto **INT 03** (100 MHz, DMSO- d_6)

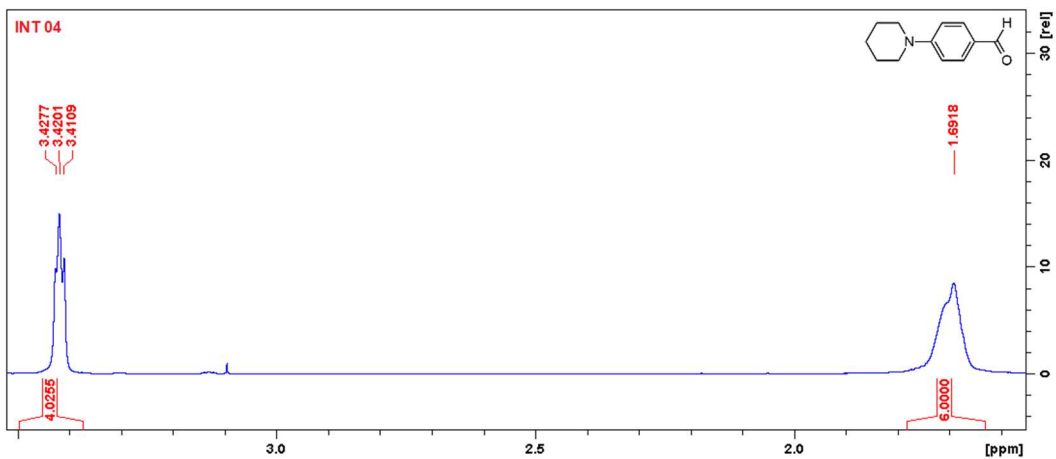


APÊNDICE D

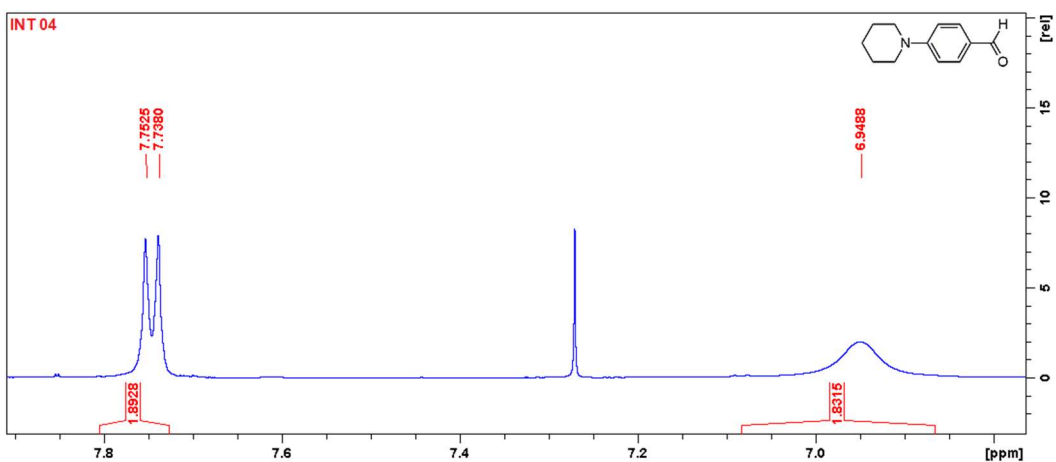
Espectro de RMN ^1H do composto **INT 04** (600 MHz, CDCl_3).



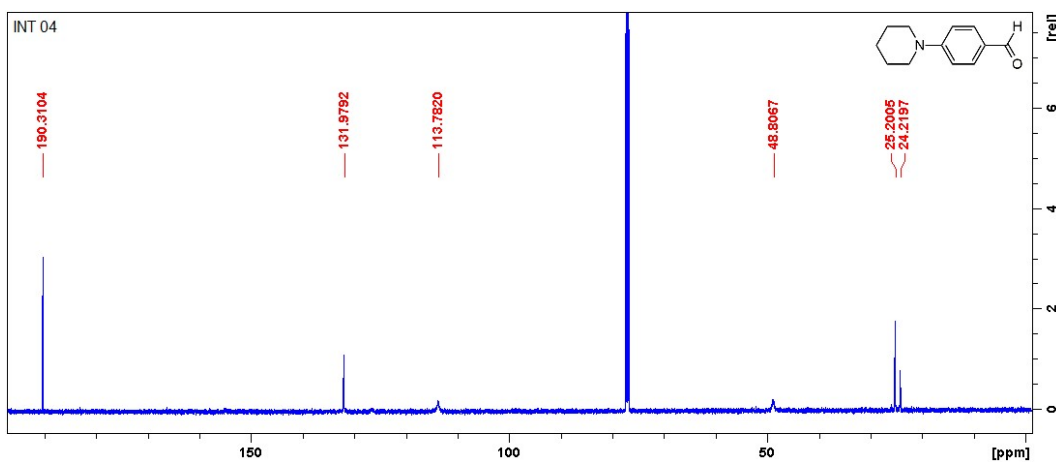
Ampliação de 1.44-3.65 ppm RMN ¹H do composto **INT 04** (600 MHz, CDCl₃).



Ampliação de 6.77-8.06 ppm RMN ¹H do composto **INT 04** (600 MHz, CDCl₃).

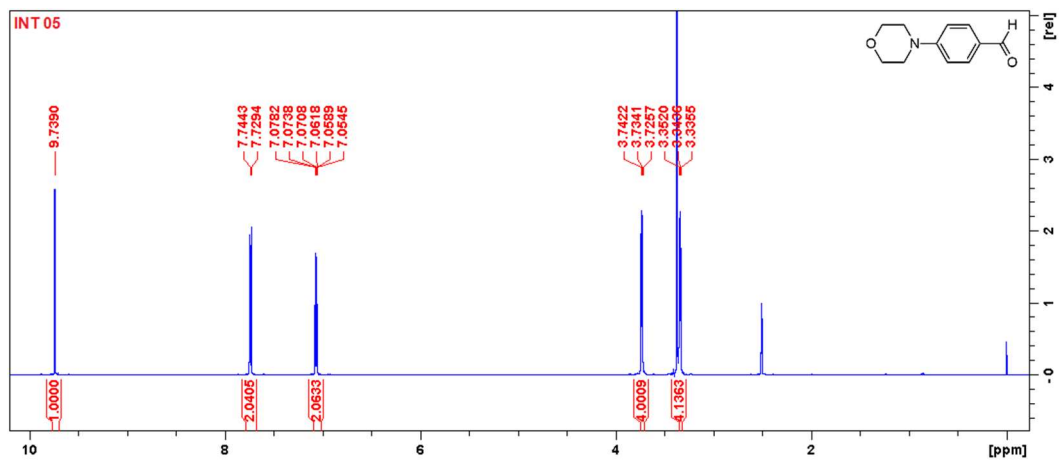


Espectro de RMN ¹³C do composto **INT 04** (100 MHz, CDCl₃)

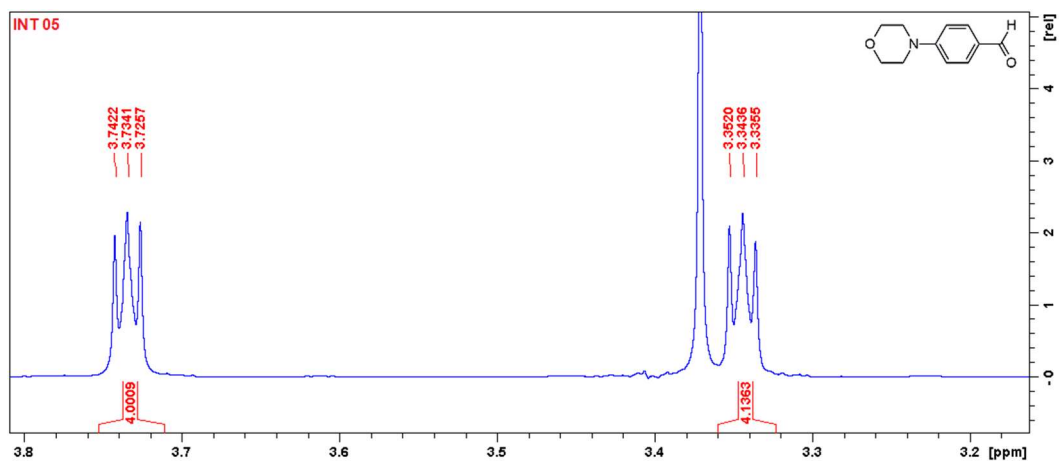


APÊNDICE E

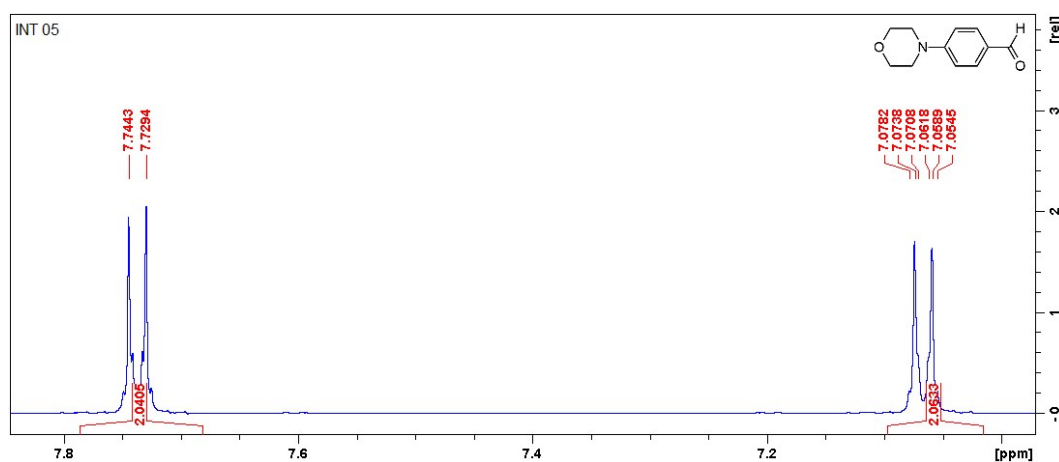
Espectro de RMN ^1H do composto **INT 05** (600 MHz, DMSO- d_6)



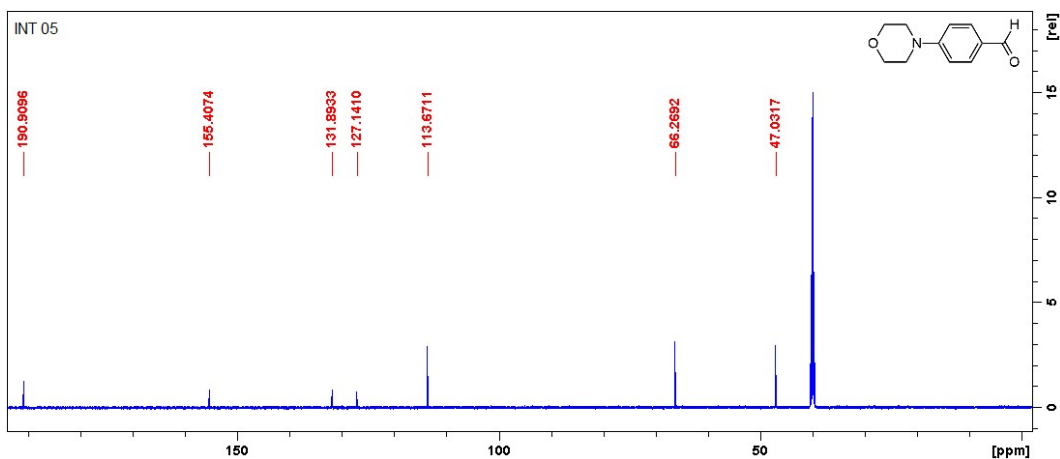
Ampliação de 3.26-3.82 ppm RMN ^1H do composto **INT 05** (600 MHz, DMSO- d_6)



Ampliação de 6.97-7.84 ppm RMN ^1H do composto **INT 05** (600 MHz, DMSO- d_6)

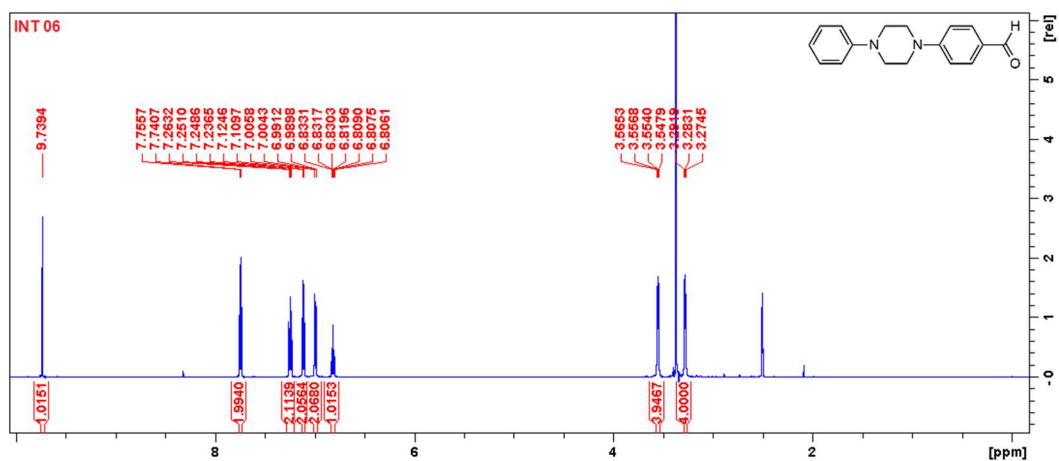


Espectro de RMN ^{13}C do composto **INT 05** (100 MHz, DMSO- d_6)

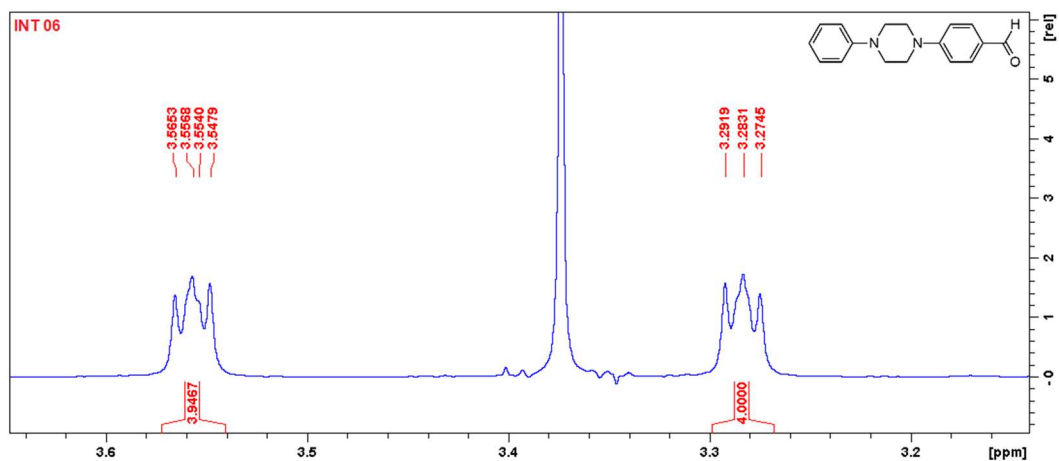


APÊNDICE F

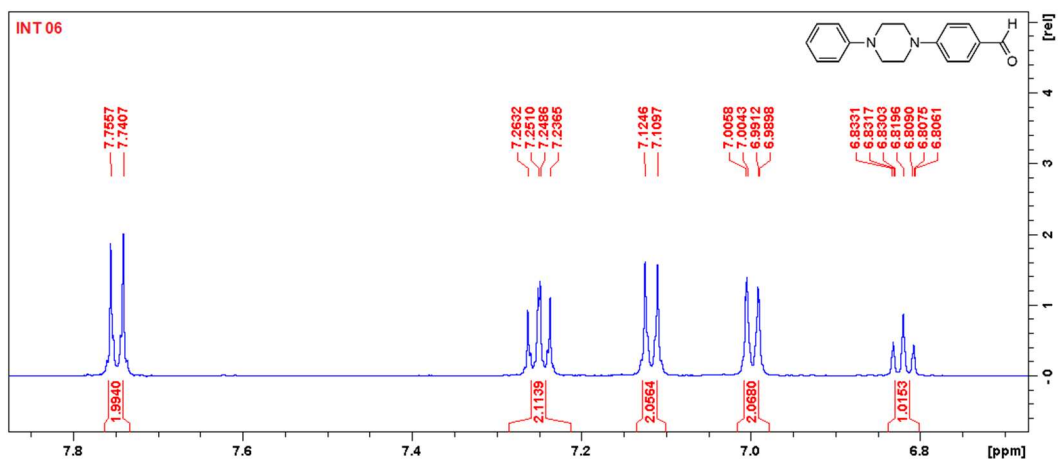
Espectro de RMN ^1H do composto **INT 06** (600 MHz, DMSO- d_6)



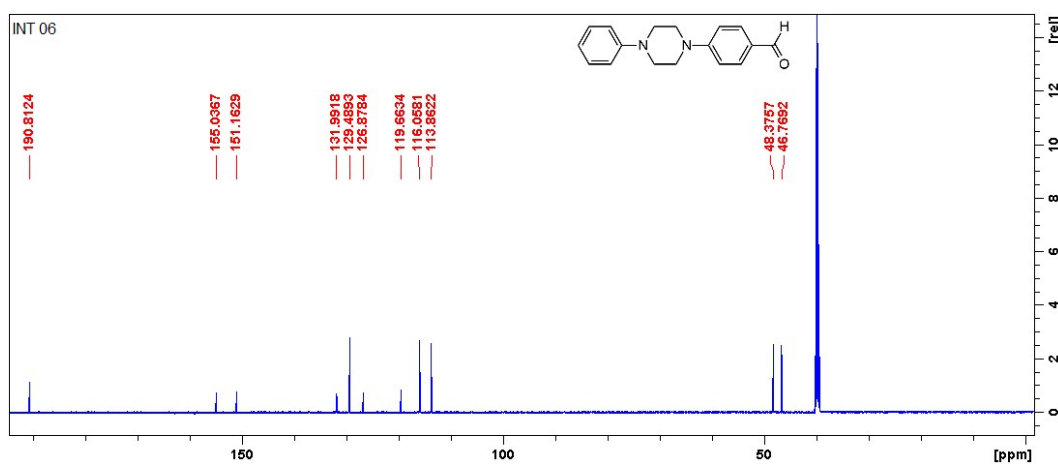
Ampliação de 3.20-3.60 ppm RMN ^1H do composto **INT 06** (600 MHz, DMSO- d_6)



Ampliação de 6.75-7.85 ppm RMN ¹H do composto **INT 06** (600 MHz, DMSO-d₆)

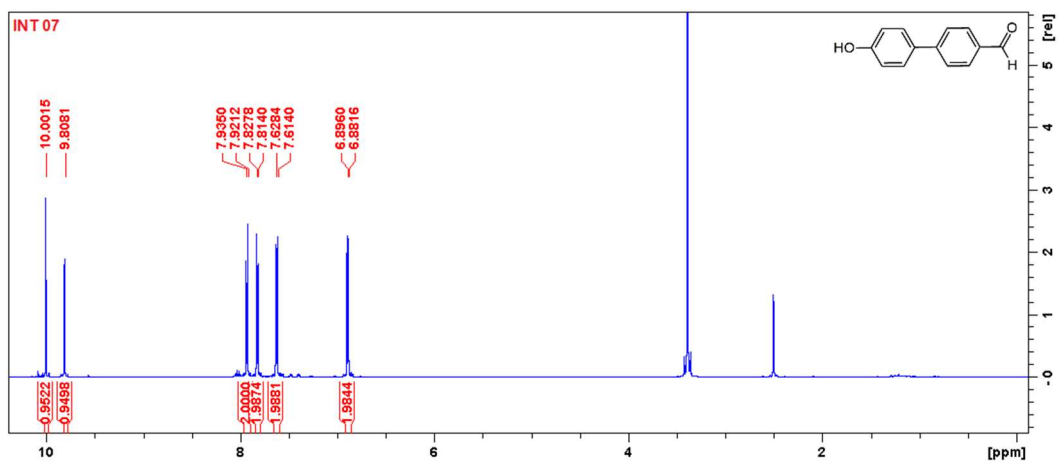


Espectro de RMN ¹³C do composto **INT 06** (100 MHz, DMSO-d₆)

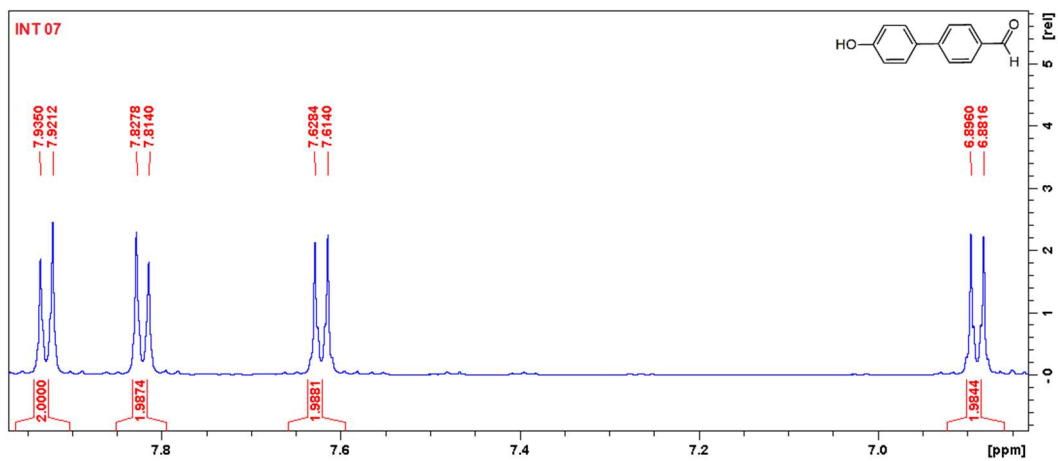


APÊNDICE G

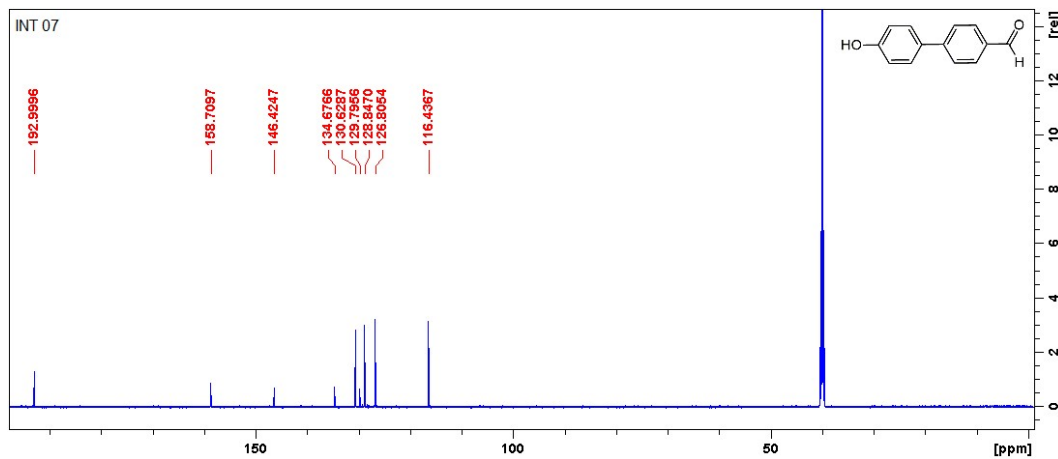
Espectro de RMN ¹H do composto **INT 07** (600 MHz, DMSO-d₆)



Ampliação de 6.70-7.99 ppm RMN ^1H do composto **INT 07** (600 MHz, DMSO- d_6)

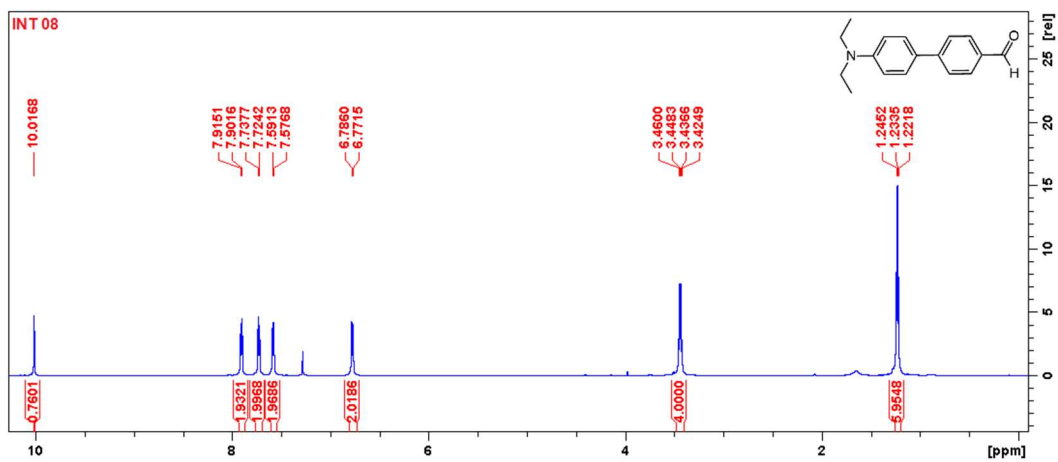


Espectro de RMN ^{13}C do composto **INT 07** (100 MHz, DMSO- d_6)

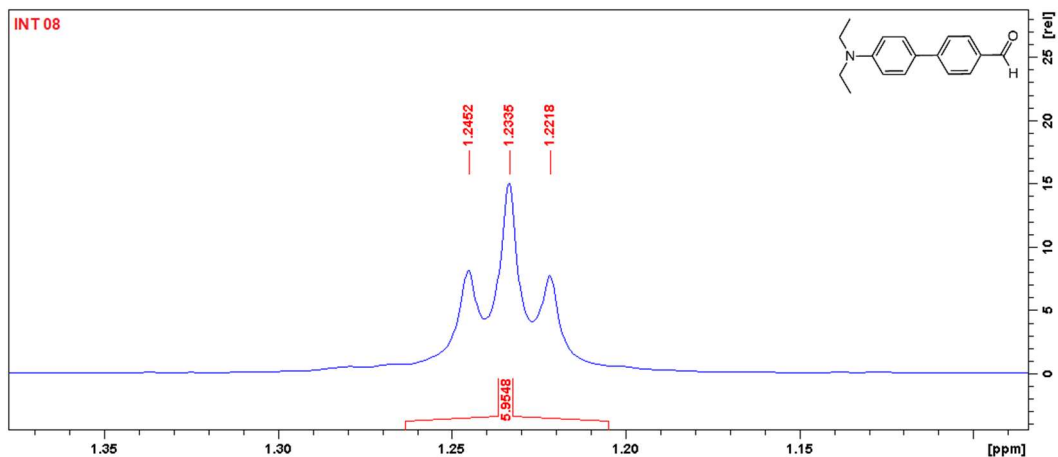


APÊNDICE H

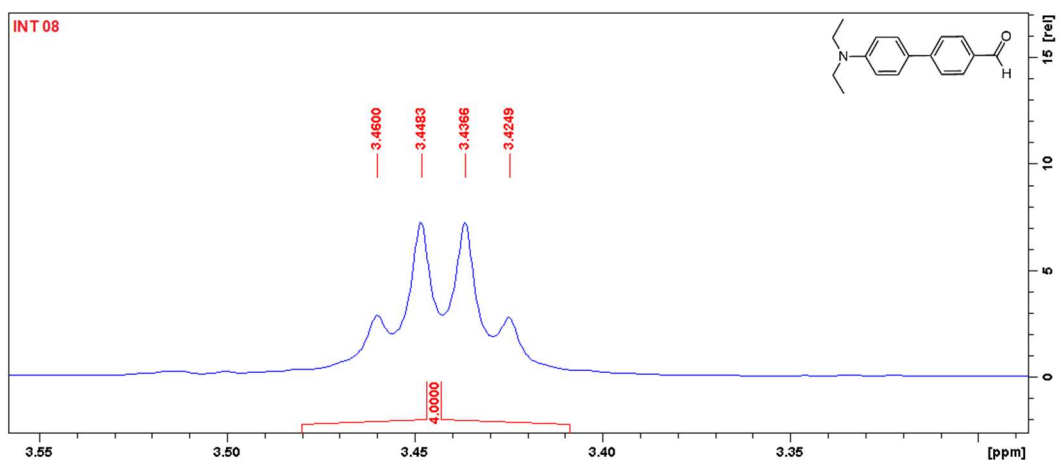
Espectro de RMN ^1H do composto **INT 08** (600 MHz, CDCl_3)



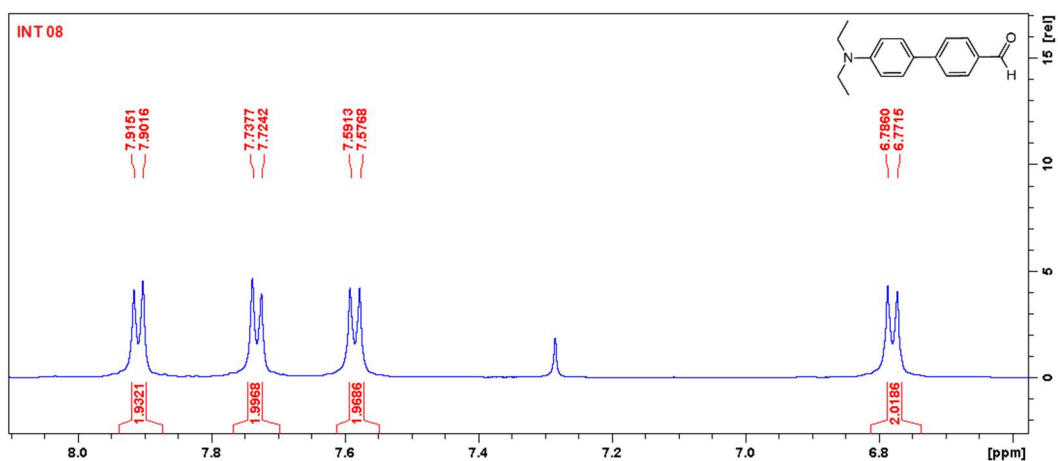
Ampliação de 1.14-1.35 ppm RMN ¹H do composto **INT 08** (600 MHz, CDCl₃)



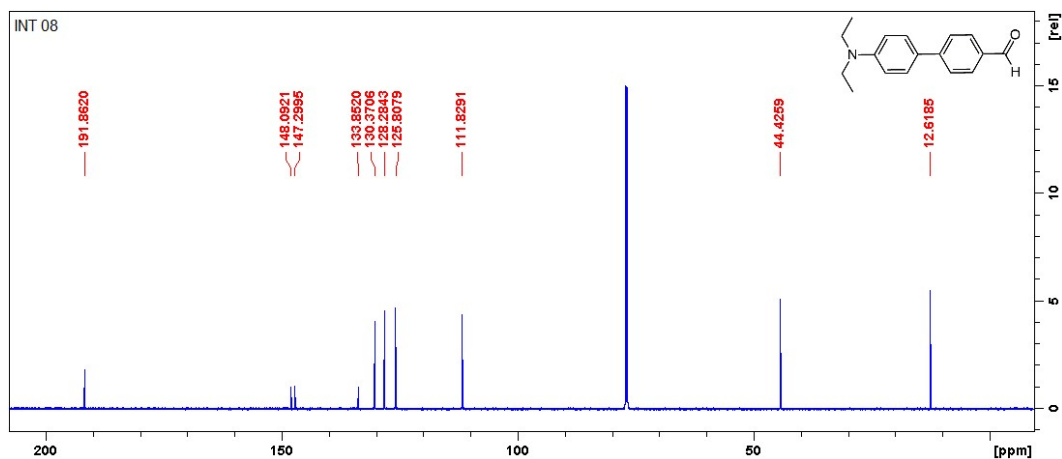
Ampliação de 3.50-3.55 ppm RMN ¹H do composto **INT 08** (600 MHz, CDCl₃)



Ampliação de 6.71-8.00 ppm RMN ¹H do composto **INT 08** (600 MHz, CDCl₃)

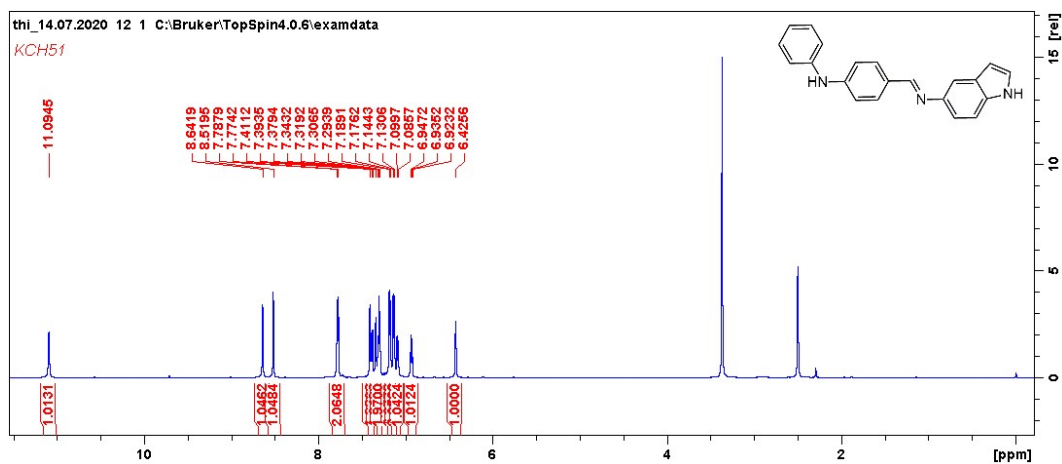


Espectro de RMN ^{13}C do composto **INT 08** (100 MHz, CDCl_3)

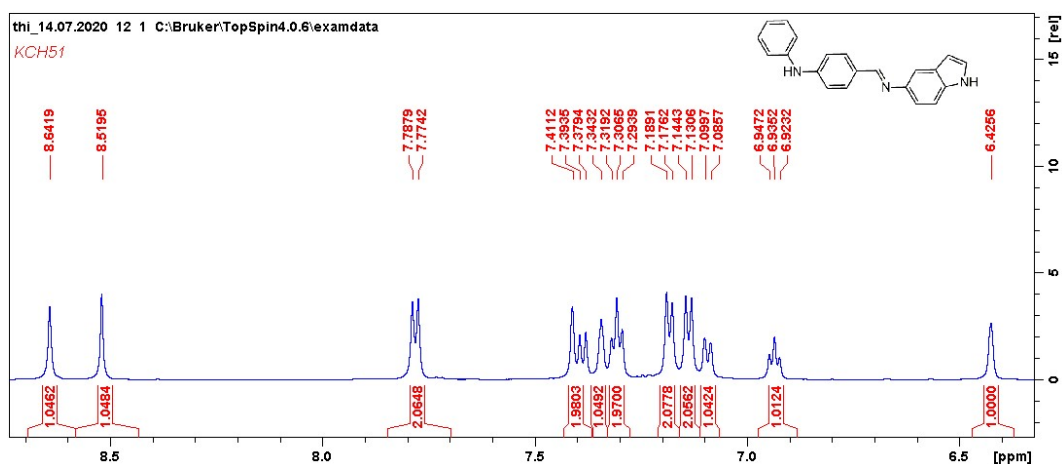


APÊNDICE I

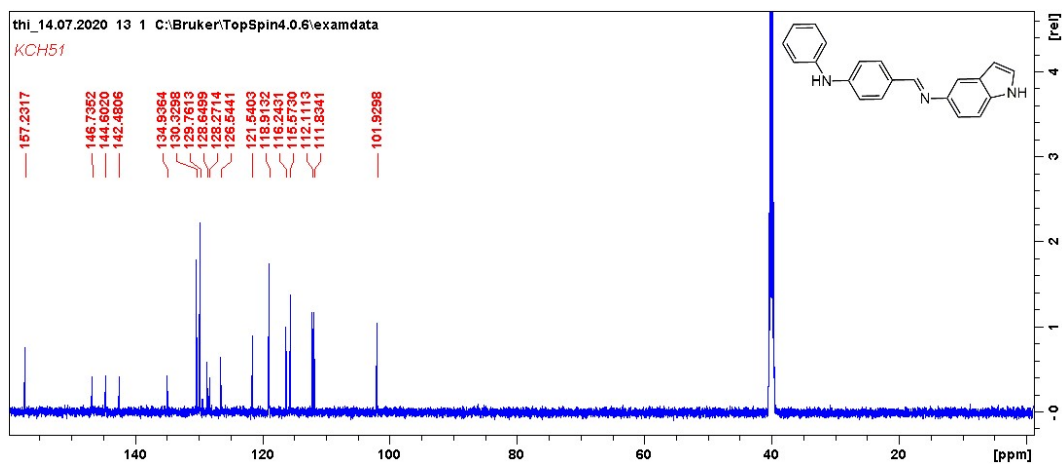
Espectro de RMN ^1H do composto **KCH 51** (600 MHz, DMSO-d_6)



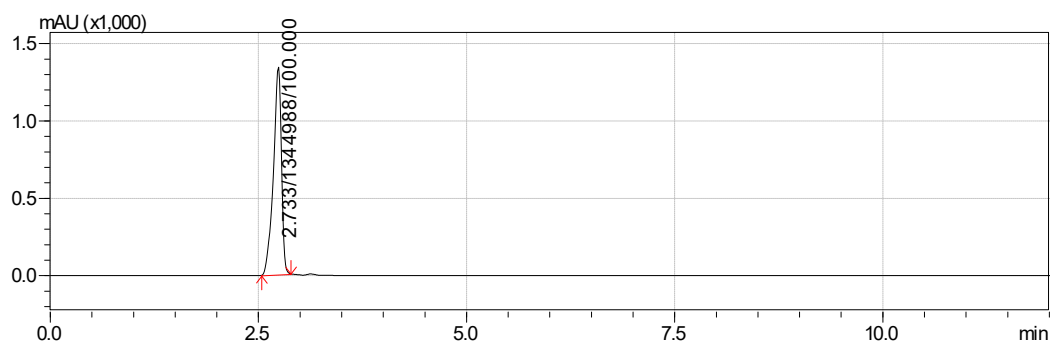
Ampliação de 6.33-8.72 ppm RMN ^1H do composto **KCH 51** (600 MHz, DMSO-d_6)



Espectro de RMN ¹³C do composto **KCH 51** (100 MHz, DMSO-d₆)

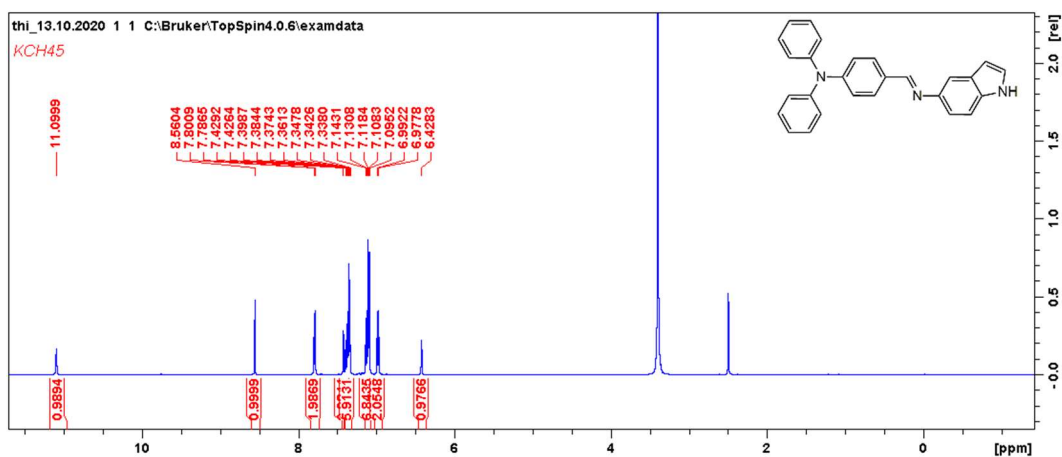


Cromatograma de HPLC-UV em MeOH 100% do composto **KCH 51**

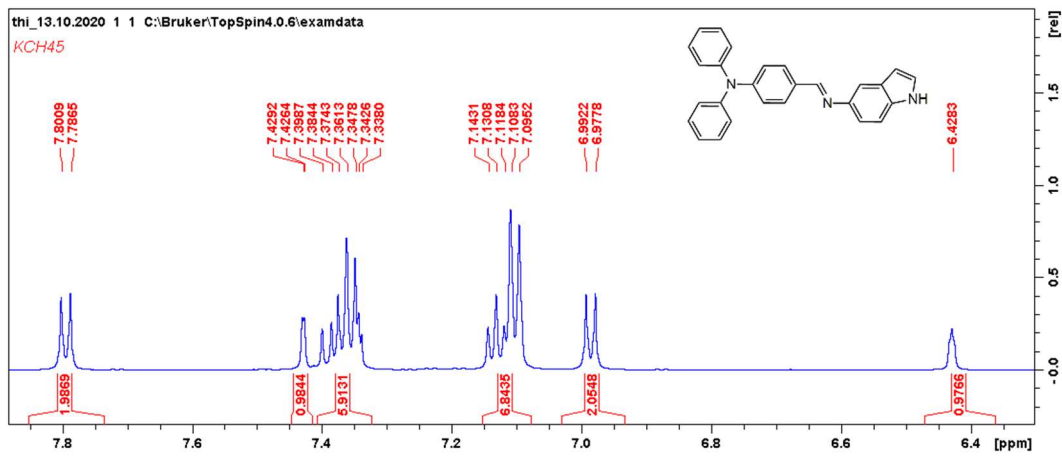


APÊNDICE J

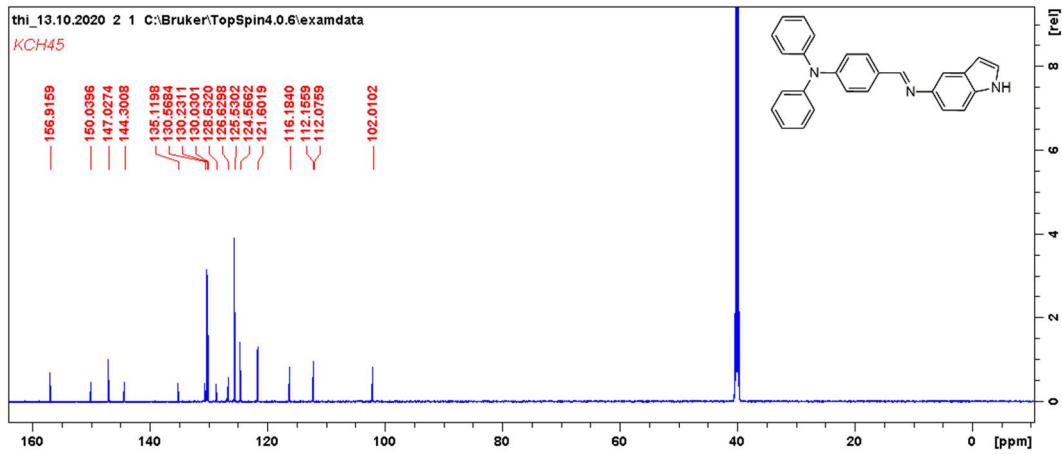
Espectro de RMN ¹H do composto **KCH 45** (600 MHz, DMSO-d₆)



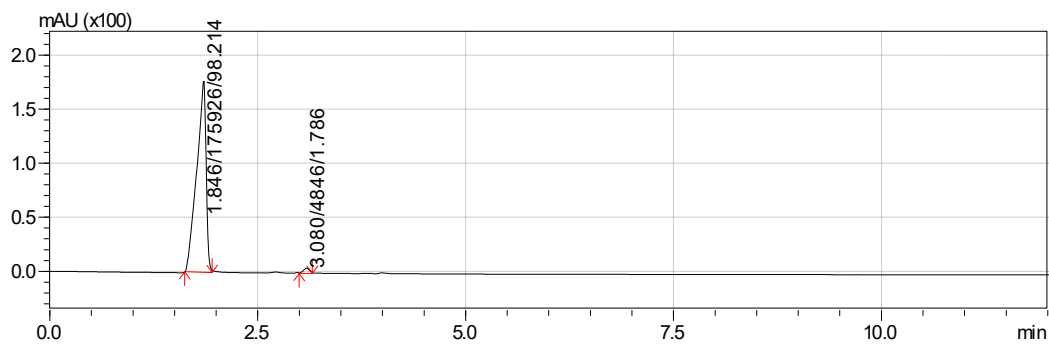
Ampliação de 6.36-7.86 ppm RMN ¹H do composto **KCH 45** (600 MHz, DMSO-d₆)



Espectro de RMN ¹³C do composto **KCH 45** (100 MHz, DMSO-d₆)

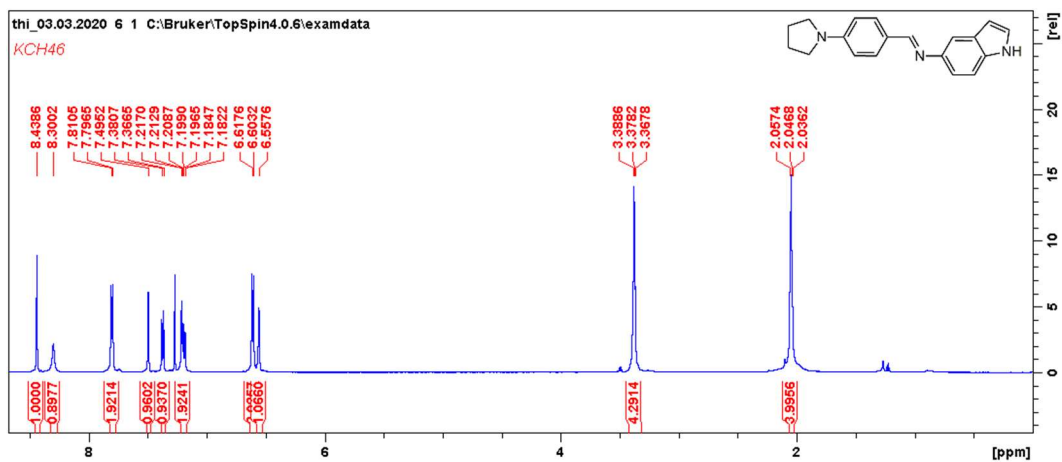


Cromatograma de HPLC-UV em MeOH 100% do composto **KCH 45**

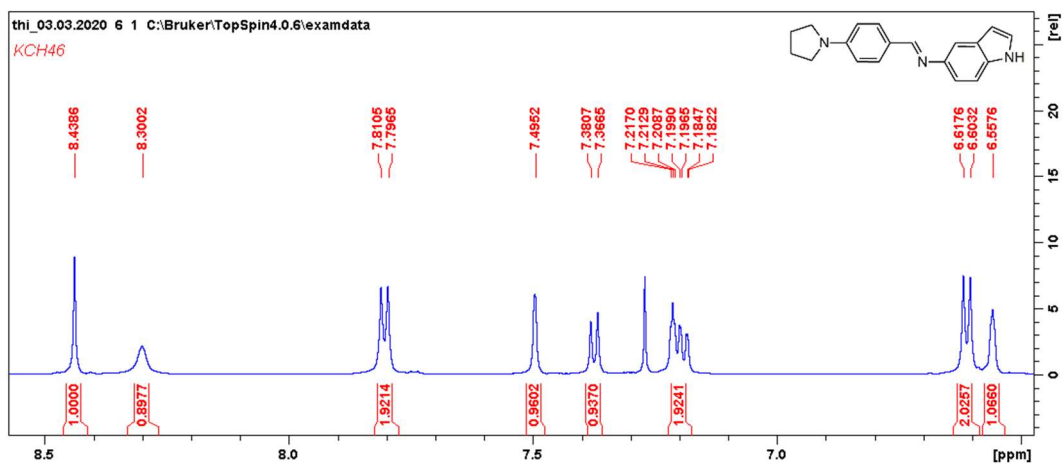


APÊNDICE K

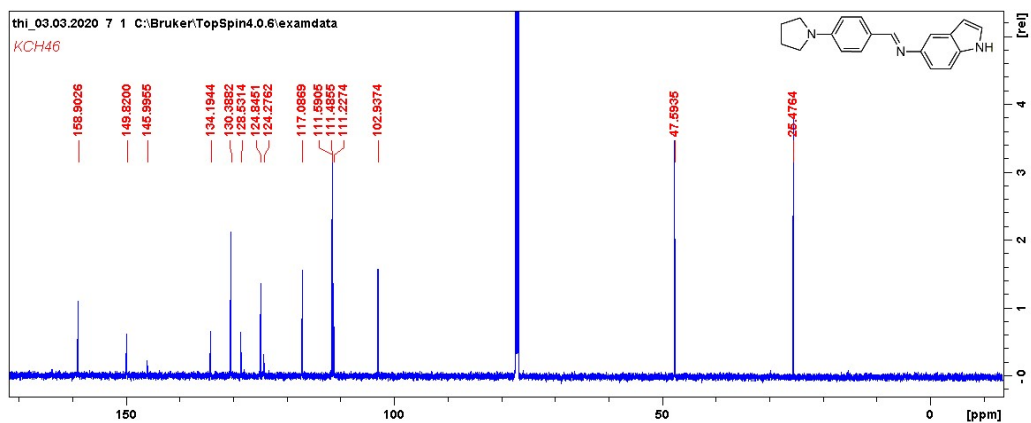
Espectro de RMN ^1H do composto **KCH 46** (600 MHz, CDCl_3)



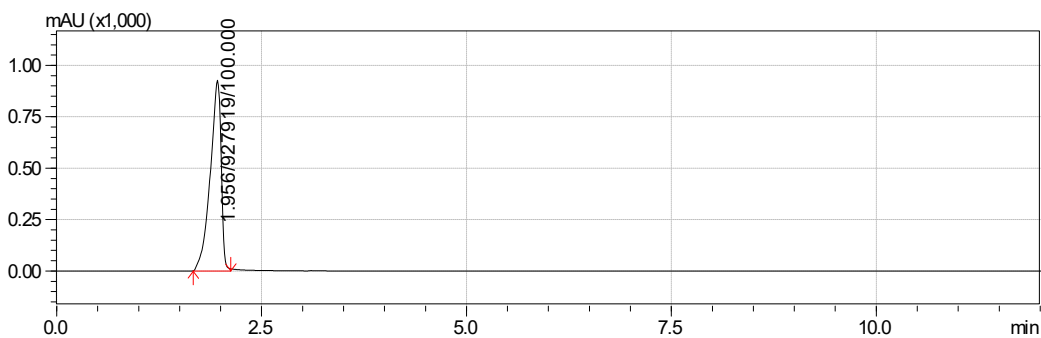
Ampliação de 6.47-8.52 ppm RMN ^1H do composto **KCH 46** (600 MHz, CDCl_3)



Espectro de RMN ^{13}C do composto **KCH 46** (100 MHz, DMSO-d_6)

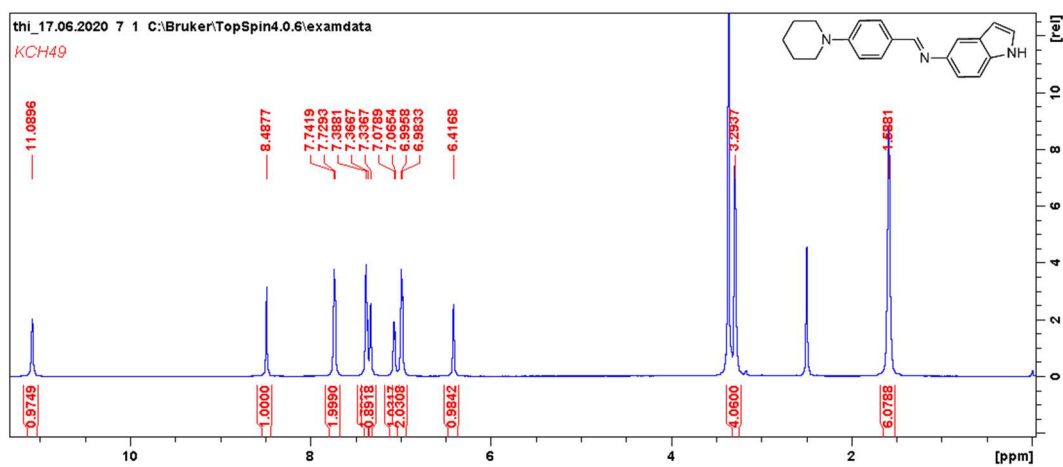


Cromatograma de HPLC-UV em MeOH 100% do composto **KCH 46**

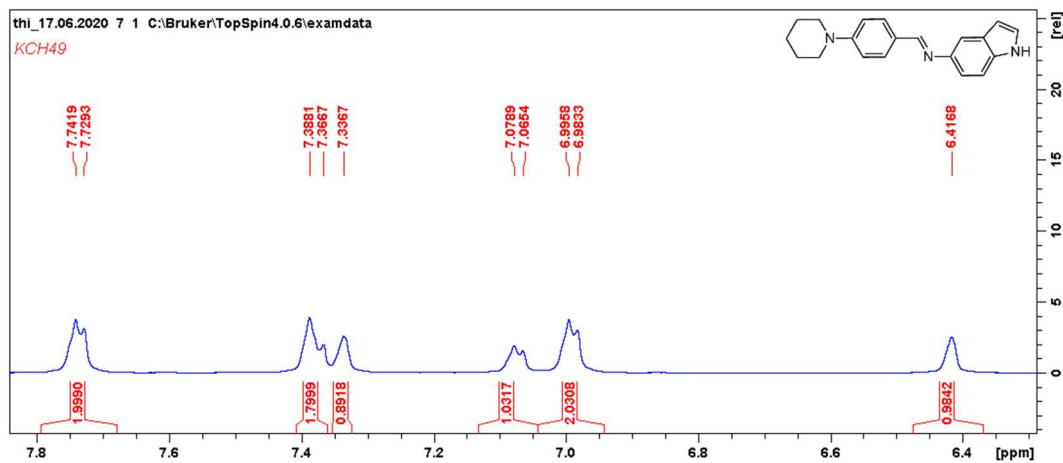


APÊNDICE L

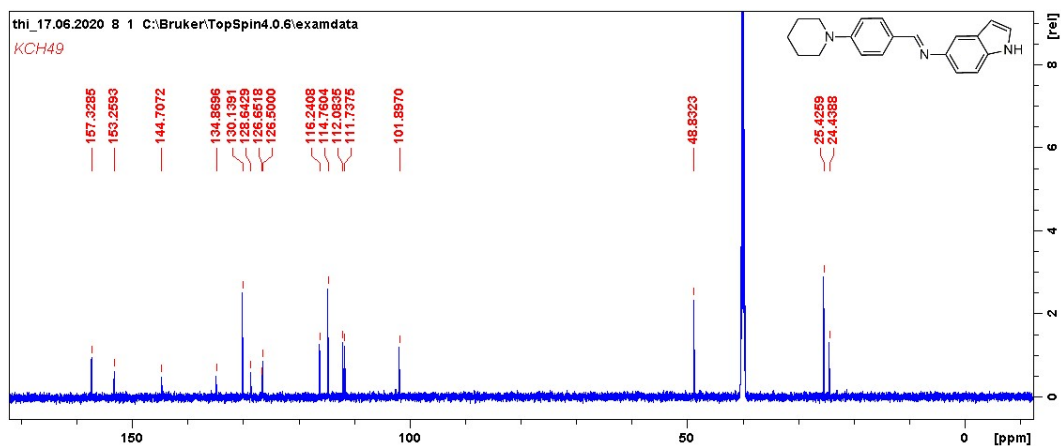
Espectro de RMN ^1H do composto **KCH 49** (600 MHz, DMSO- d_6)



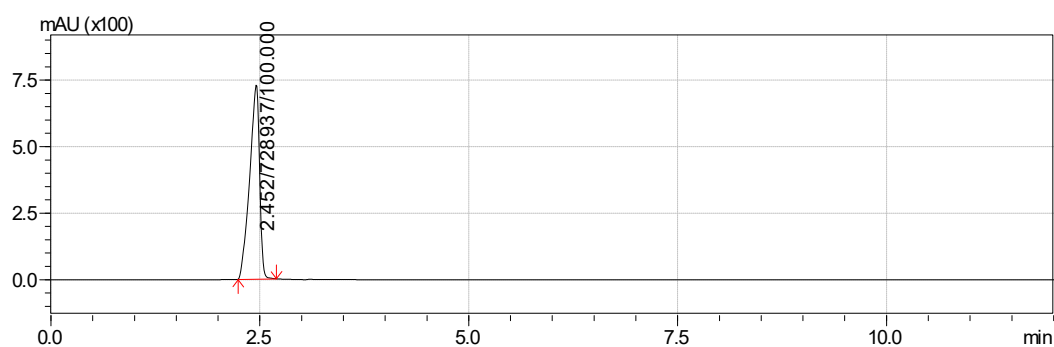
Ampliação de 6.27-7.80 ppm RMN ^1H do composto **KCH 49** (600 MHz, DMSO- d_6)



Espectro de RMN ¹³C do composto **KCH 49** (100 MHz, DMSO-d₆)

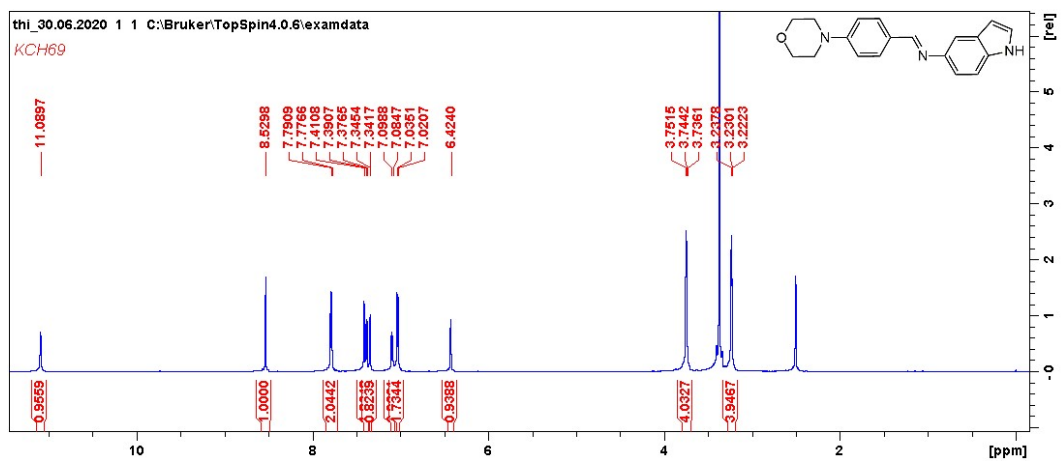


Cromatograma de HPLC-UV em MeOH 100% do composto **KCH 49**

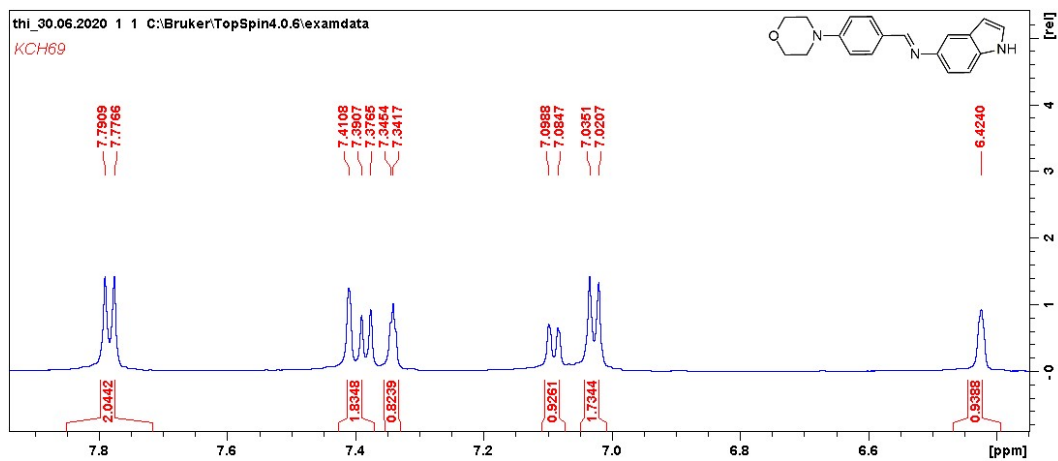


APÊNDICE M

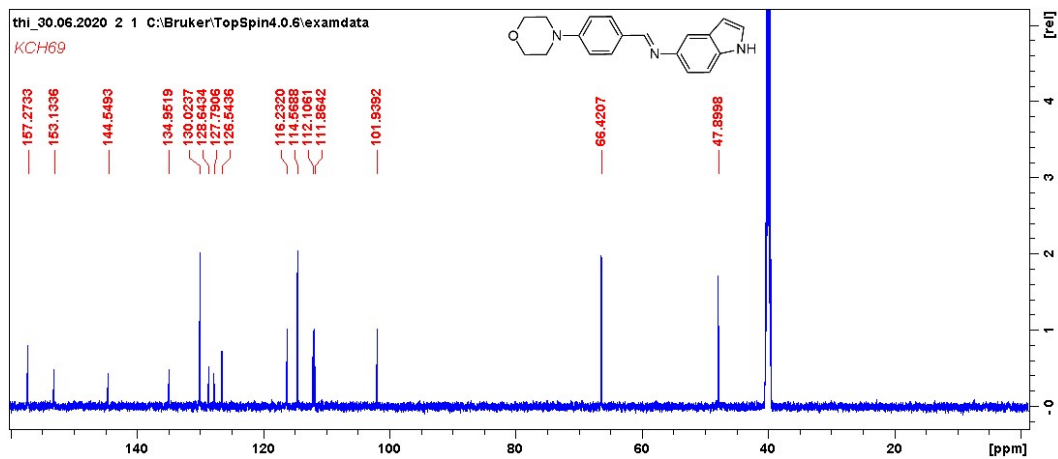
Espectro de RMN ¹H do composto **KCH 69** (600 MHz, DMSO-d₆)



Ampliação de 6.33-7.90 ppm RMN ¹H do composto **KCH 69** (600 MHz, DMSO-d₆)

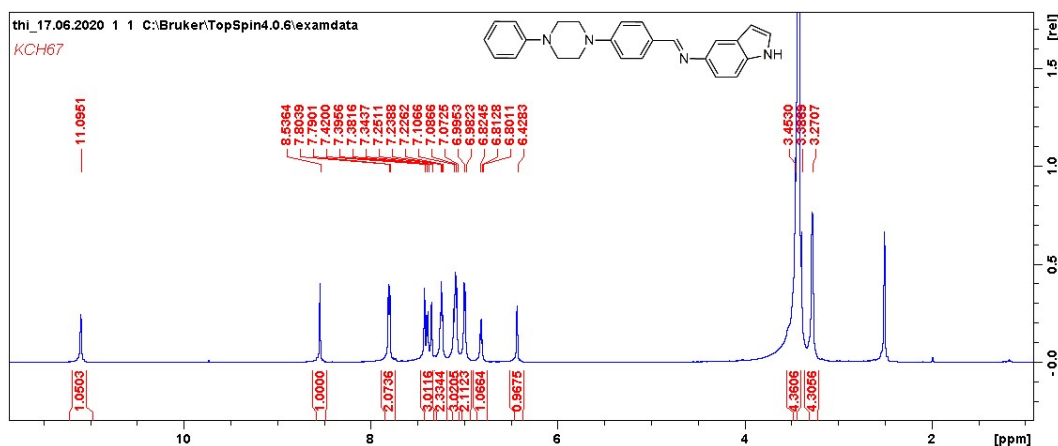


Espectro de RMN ¹³C do composto **KCH 69** (100 MHz, DMSO-d₆)

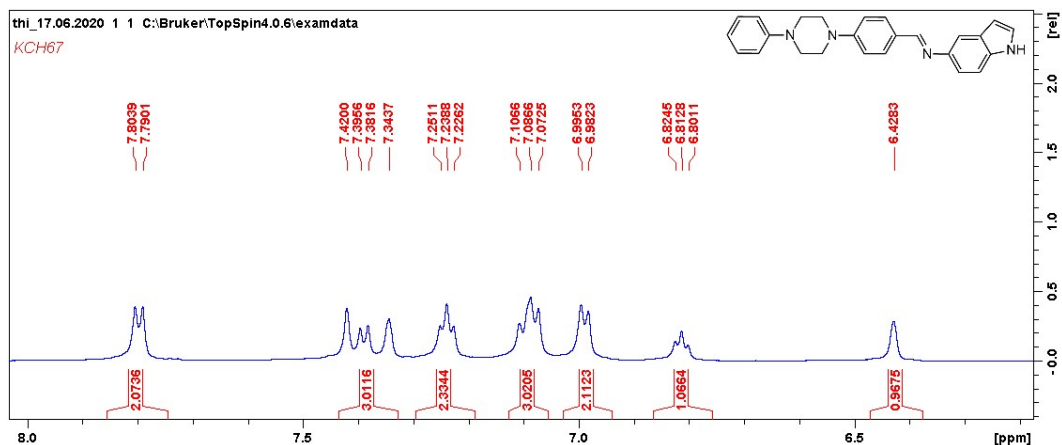


APÊNDICE N

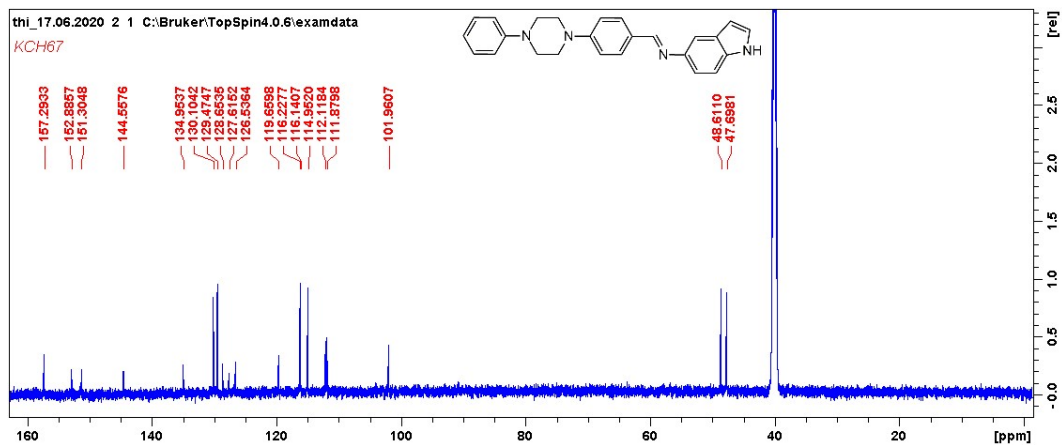
Espectro de RMN ¹H do composto **KCH 67** (600 MHz, DMSO-d₆)



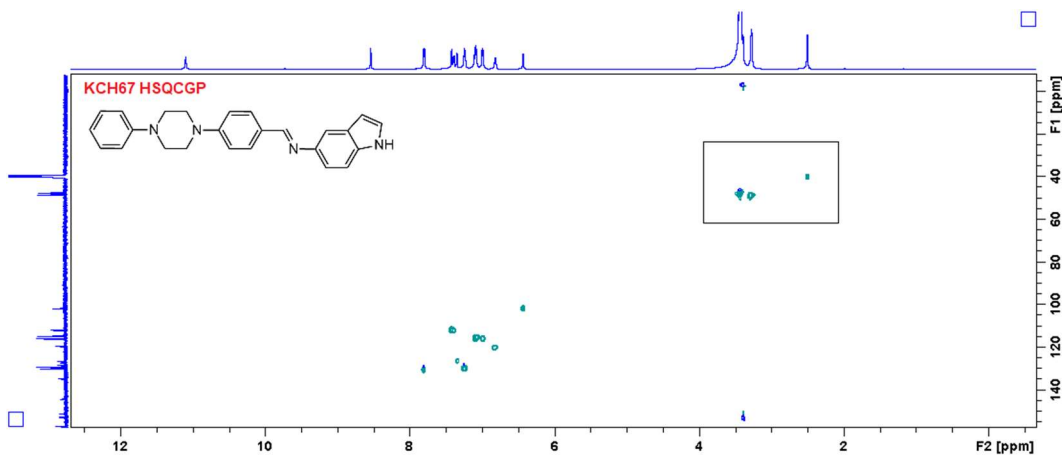
Ampliação de 6.19-8.00 ppm RMN ¹H do composto **KCH 67** (600 MHz, DMSO-d₆)



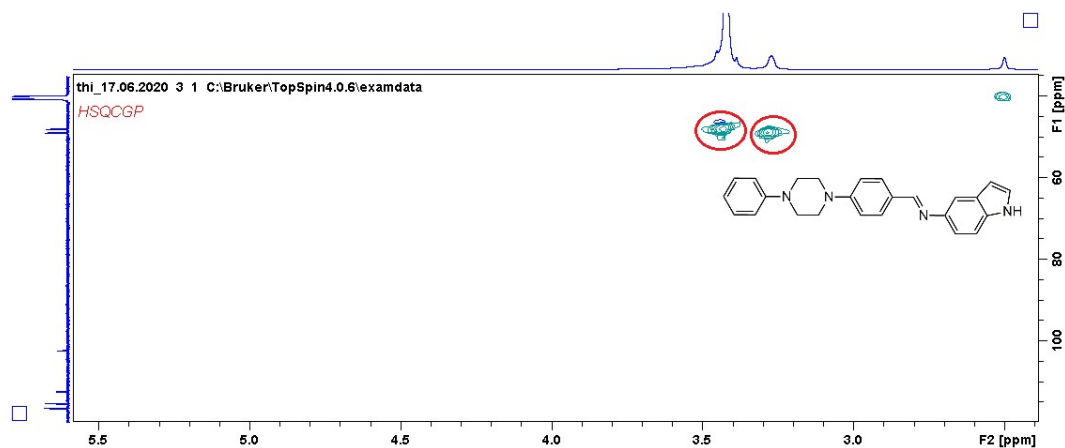
Espectro de RMN ¹³C do composto **KCH 67** (100 MHz, DMSO-d₆)



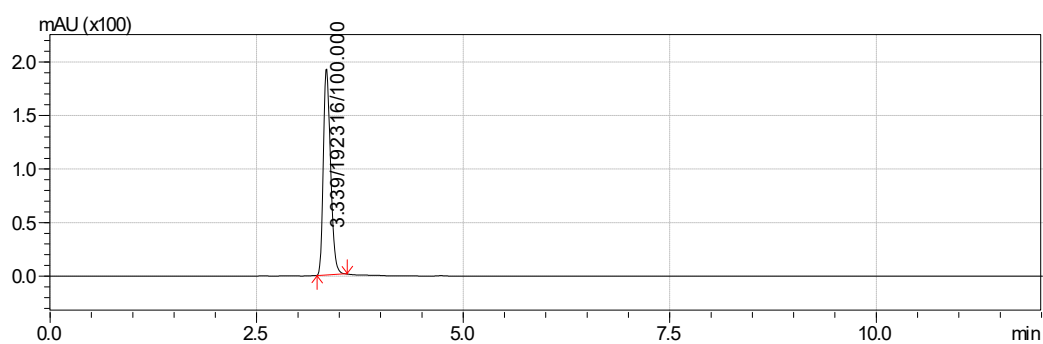
Espectro de HSQC do composto **KCH 67**



Ampliação espectro de HSQC do composto **KCH 67**

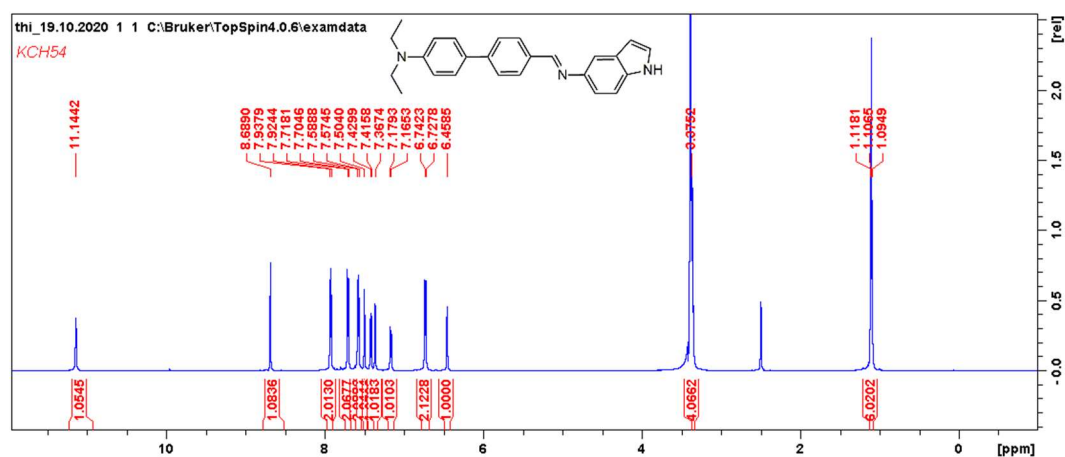


Cromatograma de HPLC-UV em MeOH 100% do composto **KCH 67**

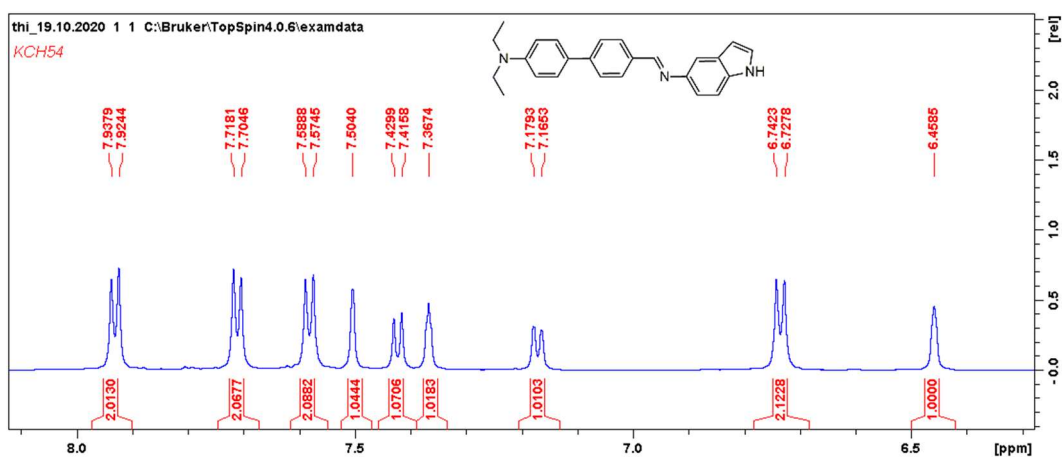


APÊNDICE O

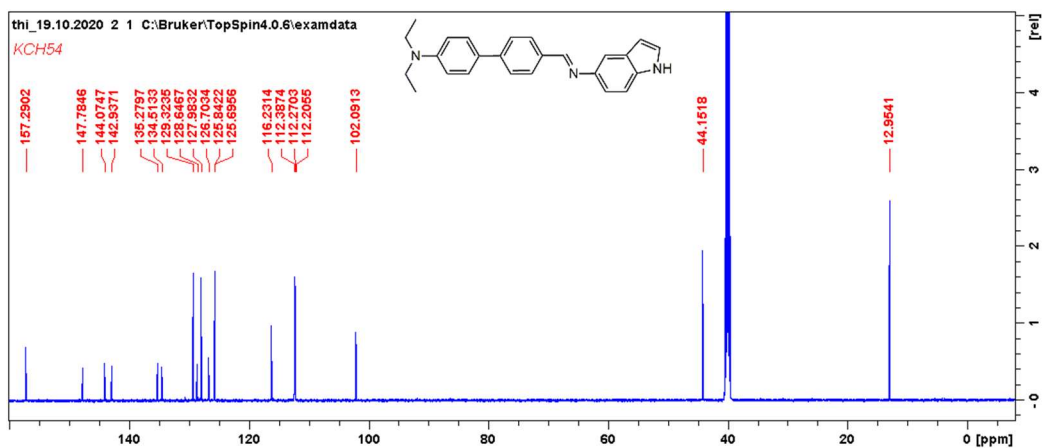
Espectro de RMN ^1H do composto **KCH 54** (600 MHz, DMSO- d_6)



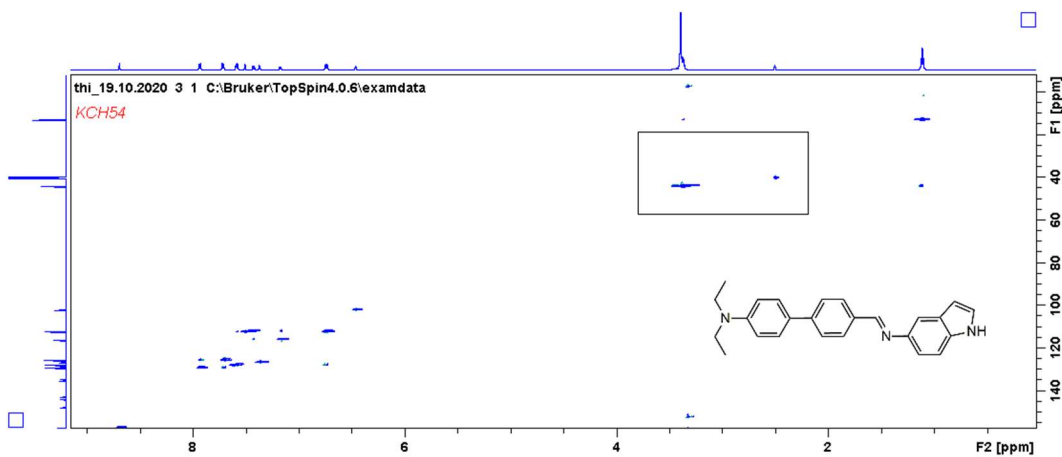
Ampliação de 6.12-8.20 ppm RMN ¹H do composto **KCH 54** (600 MHz, DMSO-d₆)



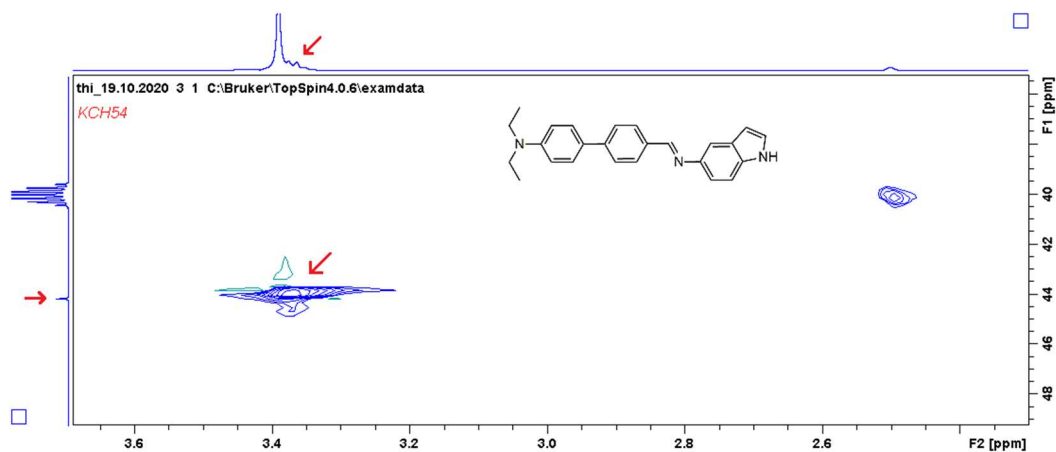
Espectro de RMN ¹³C do composto **KCH 54** (100 MHz, DMSO-d₆)



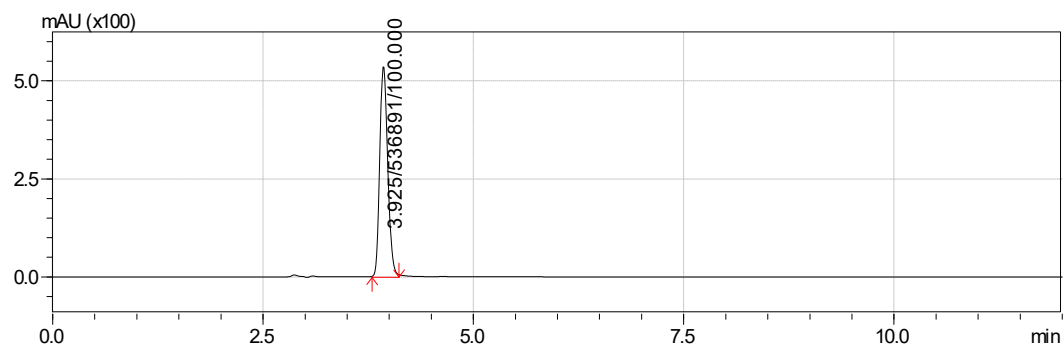
Espectro de HSQC do composto **KCH 54**



Ampliação do espectro de HSQC do composto **KCH 54**

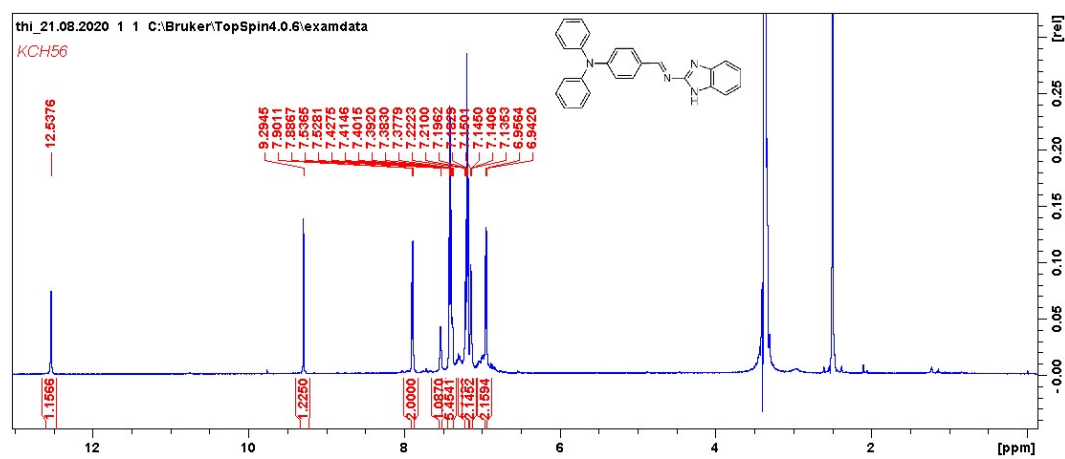


Cromatograma de HPLC-UV em MeOH 100% do composto **KCH 54**

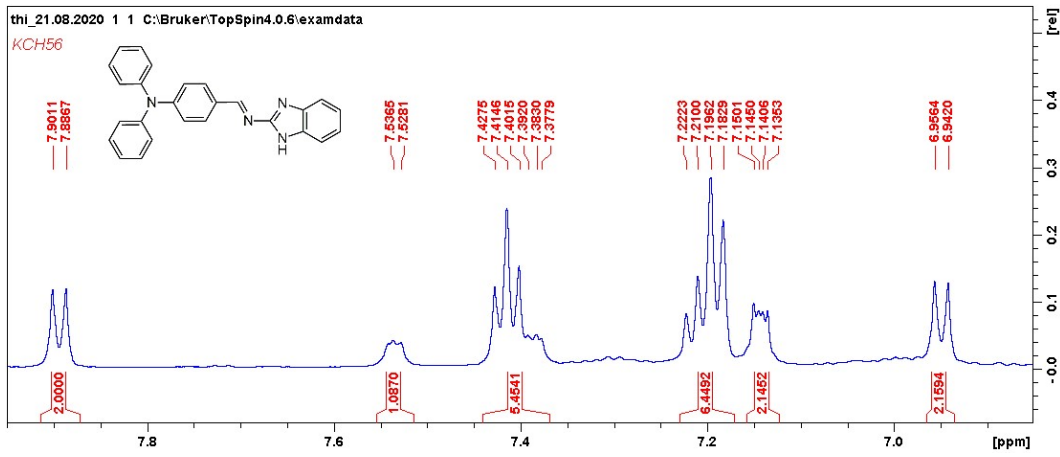


APÊNDICE P

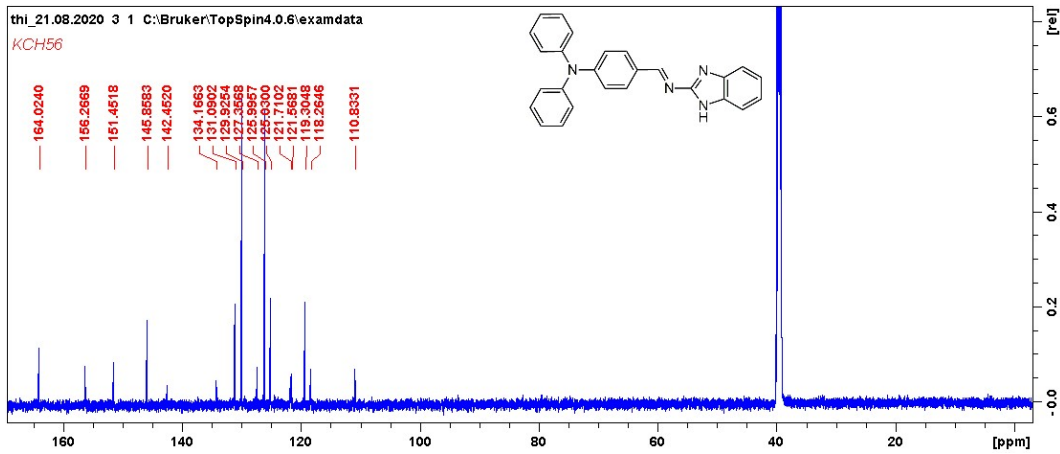
Espectro de RMN ^1H do composto **KCH 56** (600 MHz, DMSO- d_6)



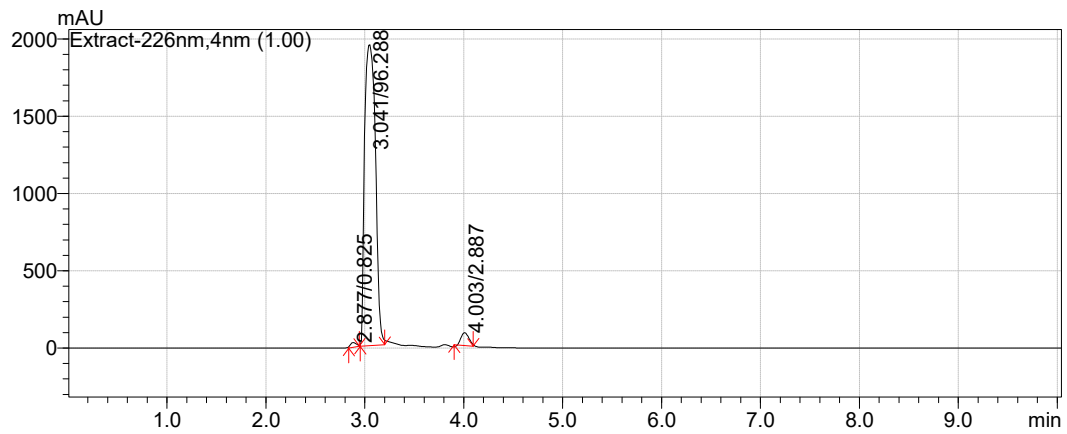
Ampliação de 6.49-7.90 ppm RMN ¹H do composto **KCH 56** (600 MHz, DMSO-d₆)



Espectro de RMN ¹³C do composto **KCH 56** (100 MHz, DMSO-d₆)

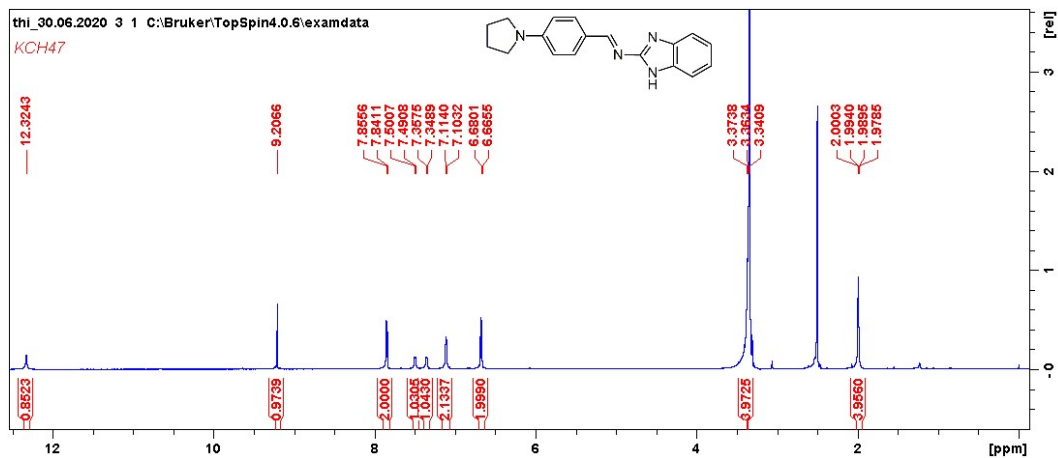


Cromatograma de HPLC-UV em MeOH 100% do composto **KCH 56**

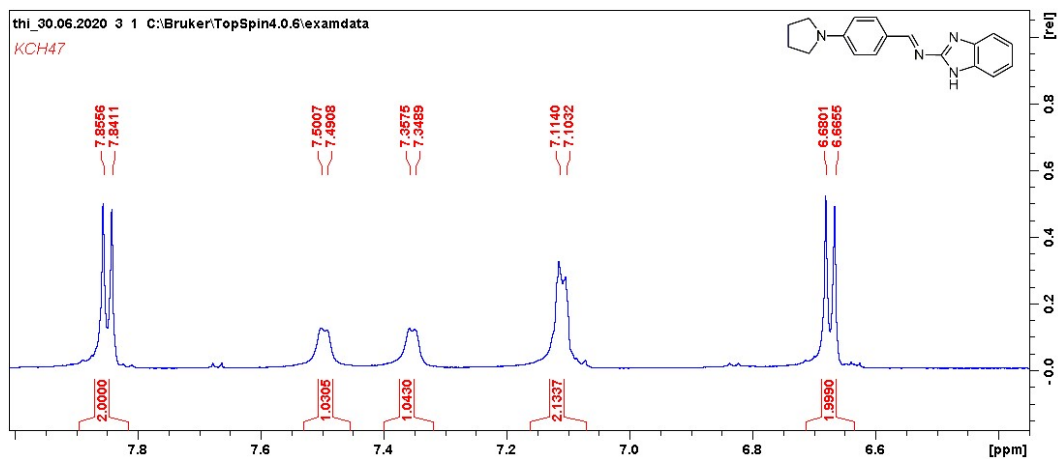


APÊNDICE Q

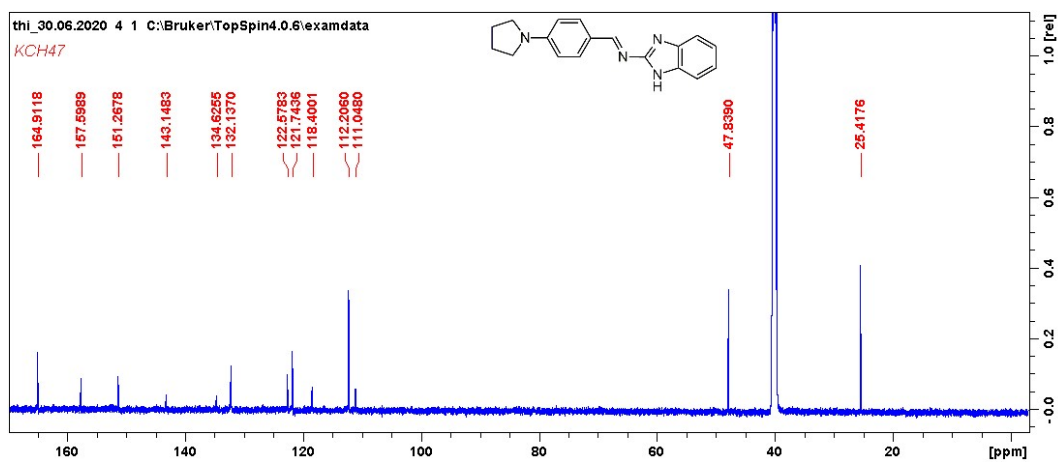
Espectro de RMN ^1H do composto **KCH 47** (600 MHz, DMSO- d_6)



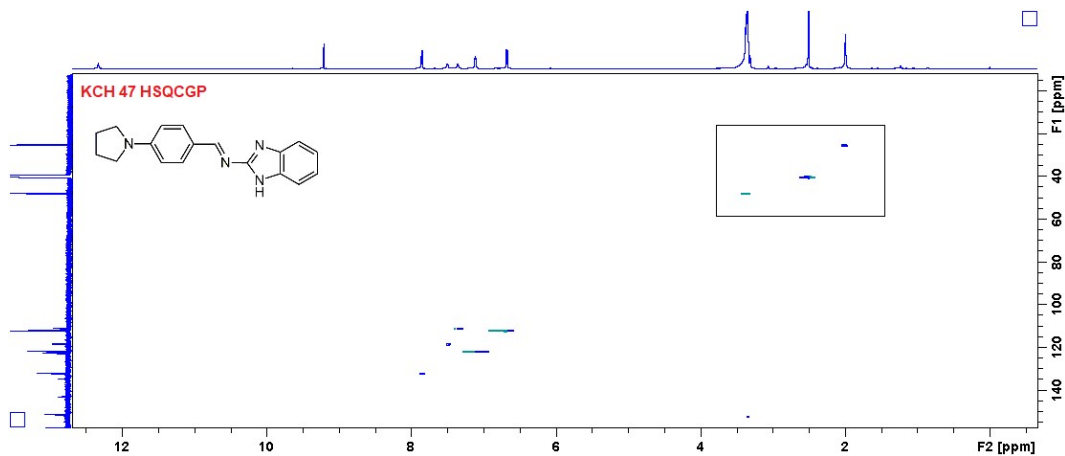
Ampliação de 6.39-7.95 ppm RMN ^1H do composto **KCH 47** (600 MHz, DMSO- d_6)



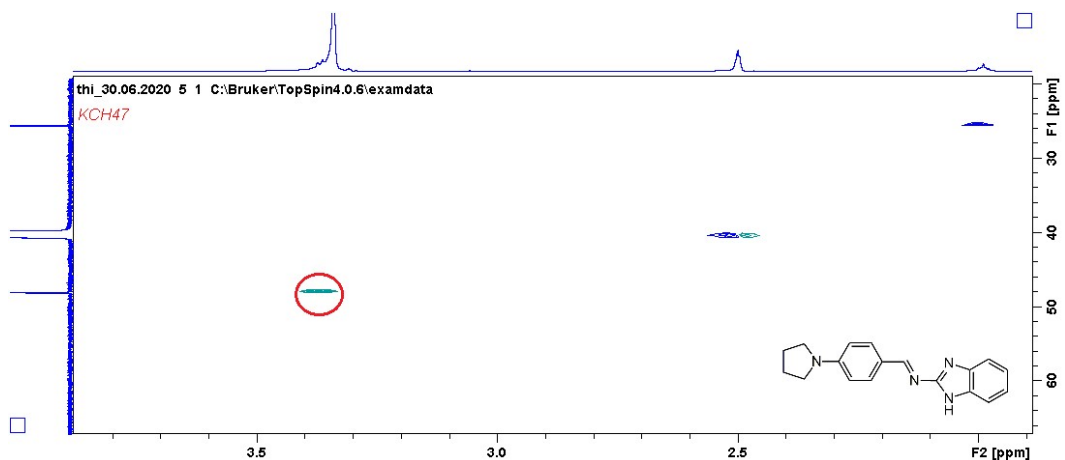
Espectro de RMN ^{13}C do composto **KCH 47** (100 MHz, DMSO- d_6)



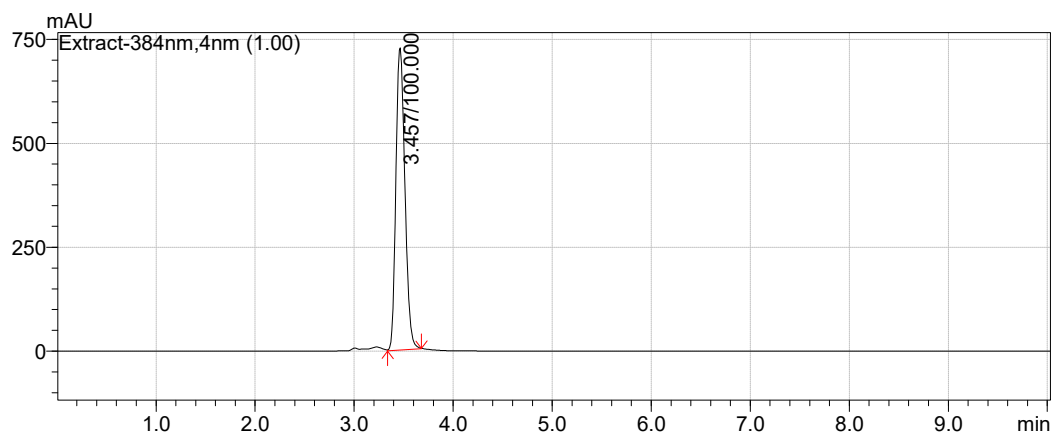
Espectro de HSQC do composto **KCH 47**



Ampliação espectro de HSQC do composto **KCH 47**

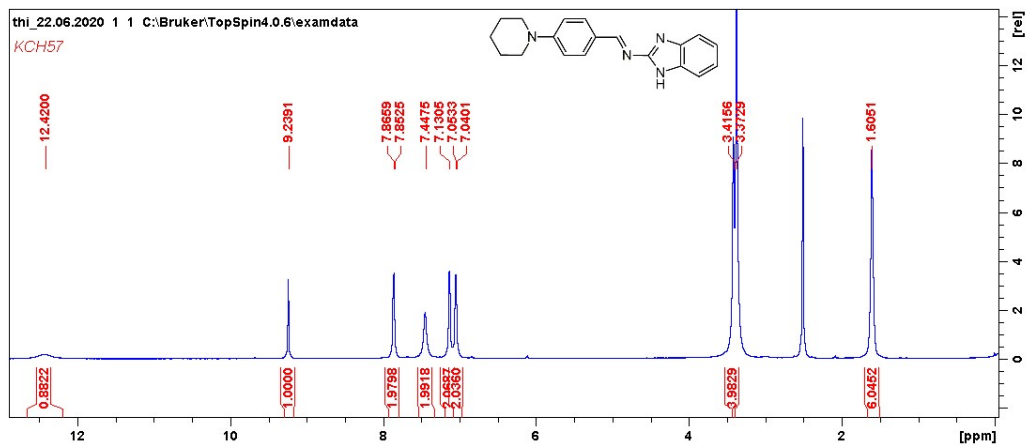


Cromatograma de HPLC-UV em MeOH 100% do composto **KCH 47**

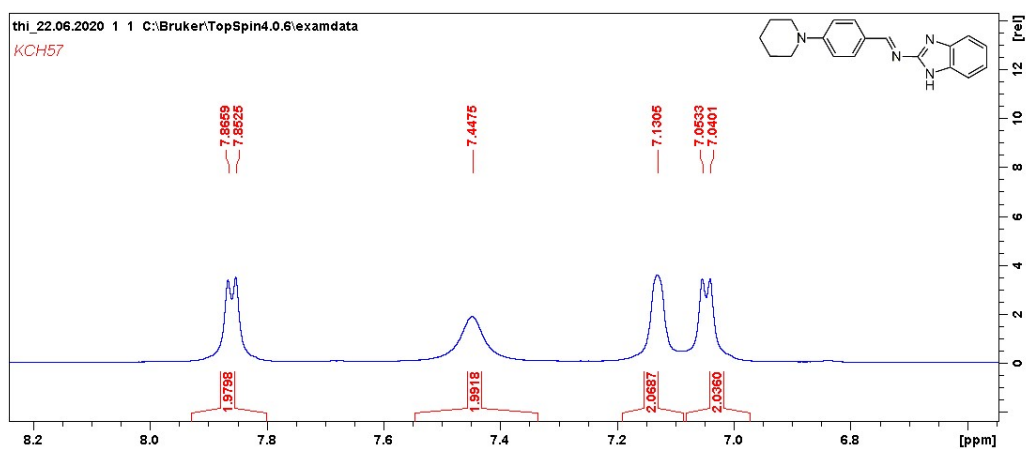


APÊNDICE R

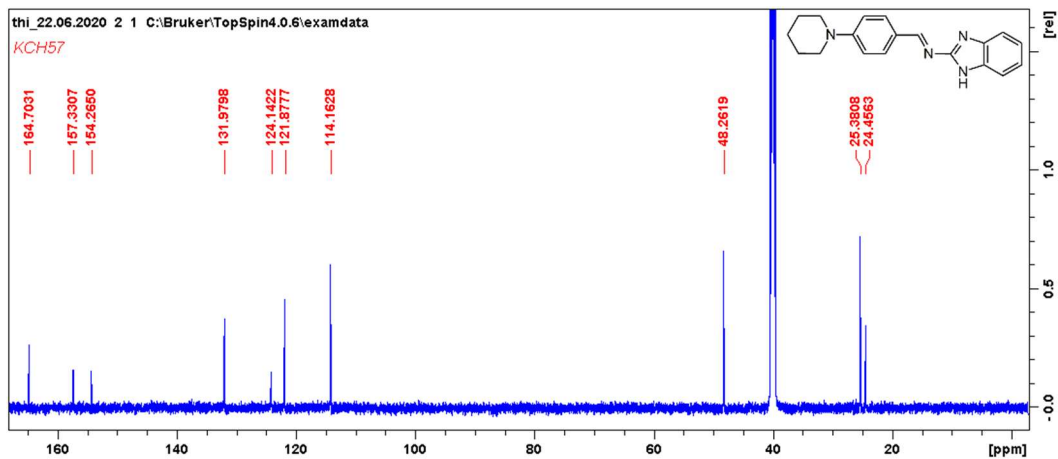
Espectro de RMN ^1H do composto **KCH 57** (600 MHz, DMSO- d_6)



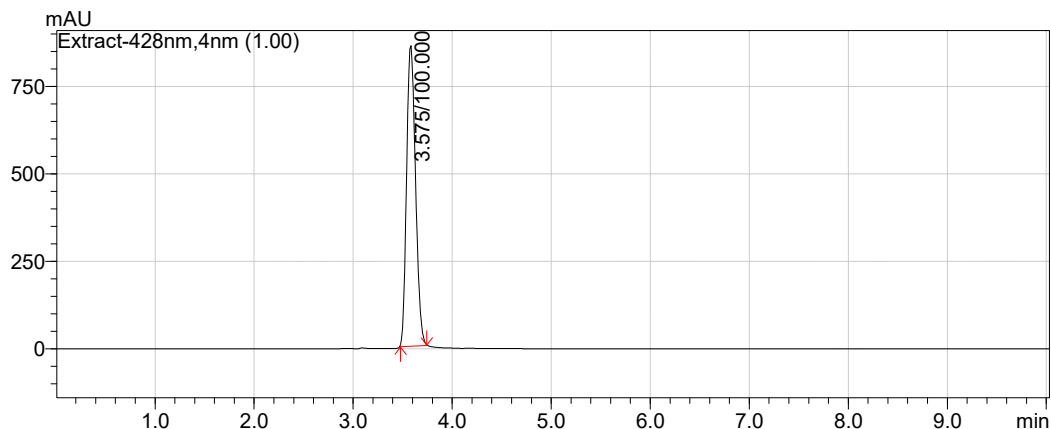
Ampliação de 6.60-8.20 ppm RMN ^1H do composto **KCH 57** (600 MHz, DMSO- d_6)



Espectro de RMN ^{13}C do composto **KCH 57** (100 MHz, DMSO- d_6)

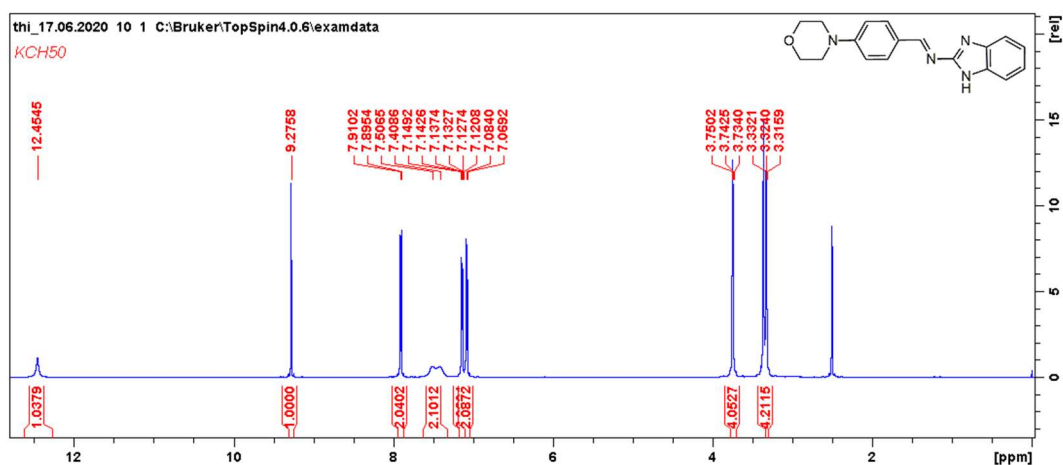


Cromatograma de HPLC-UV em MeOH 100% do composto **KCH 57**

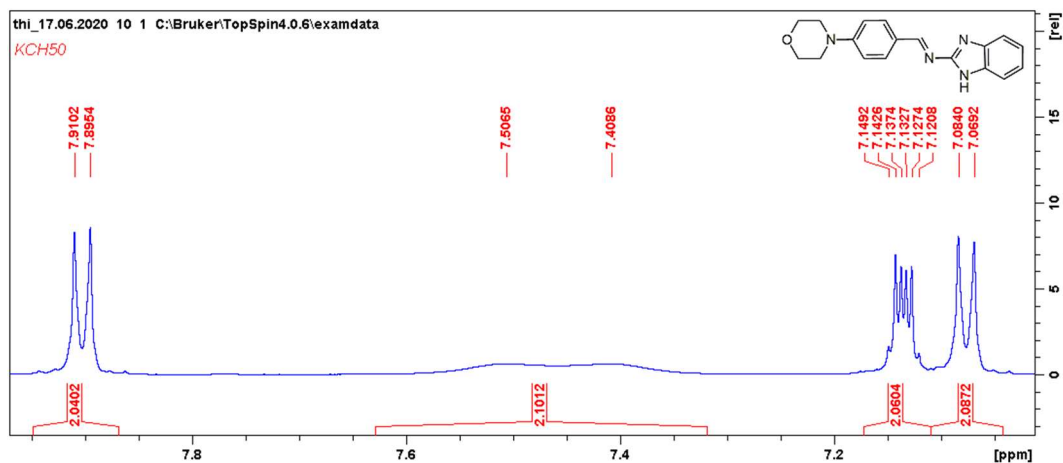


APÊNDICE S

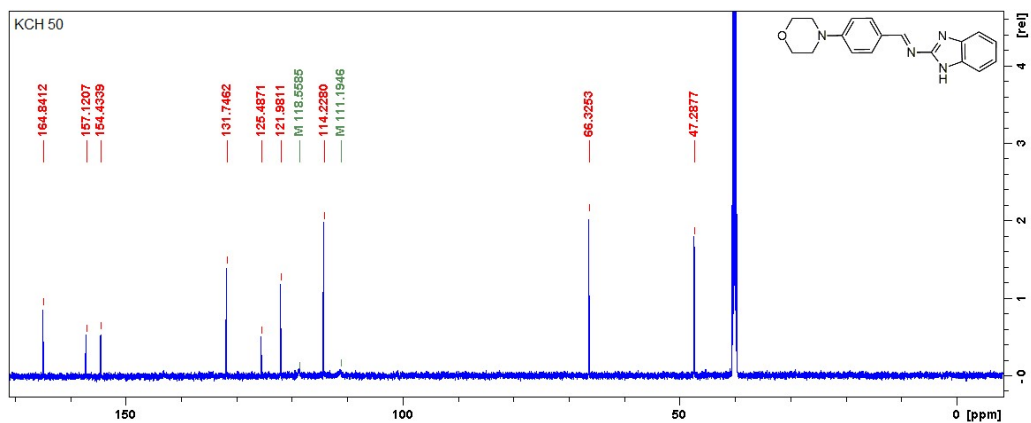
Espectro de RMN ^1H do composto **KCH 50** (600 MHz, DMSO- d_6)



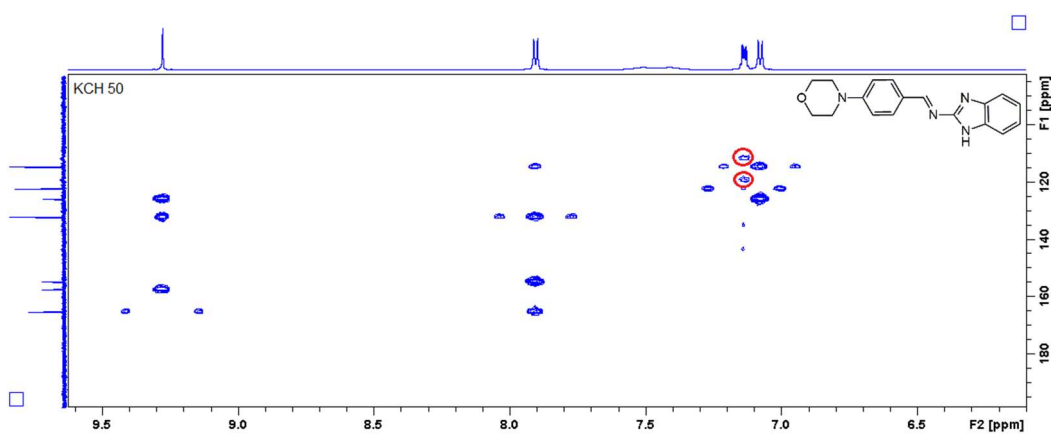
Ampliação de 7.00-7.96 ppm RMN ^1H do composto **KCH 50** (600 MHz, DMSO- d_6)



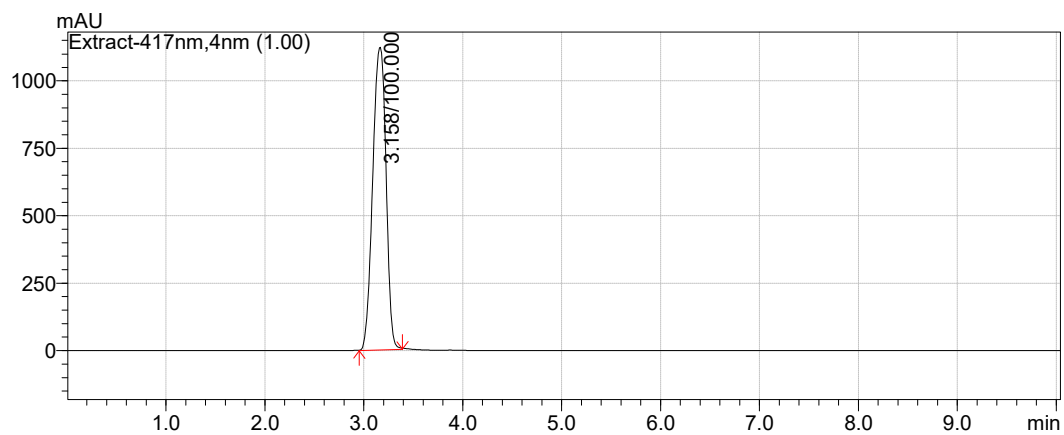
Espectro de RMN ¹³C do composto **KCH 50** (100 MHz, DMSO-d₆)



Espectro de HMBC de **KCH 50**

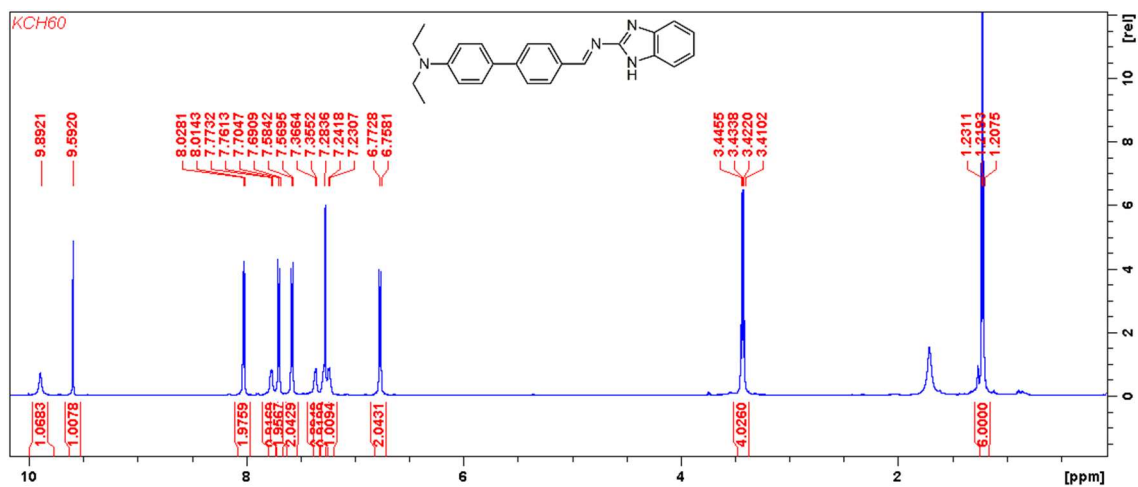


Cromatograma de HPLC-UV em MeOH 100% do composto **KCH 50**

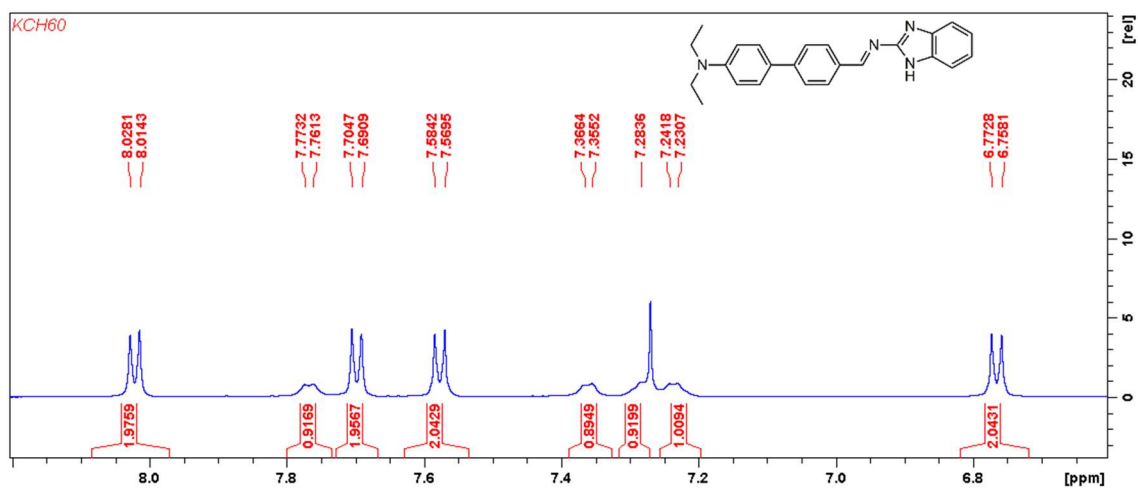


APÊNDICE T

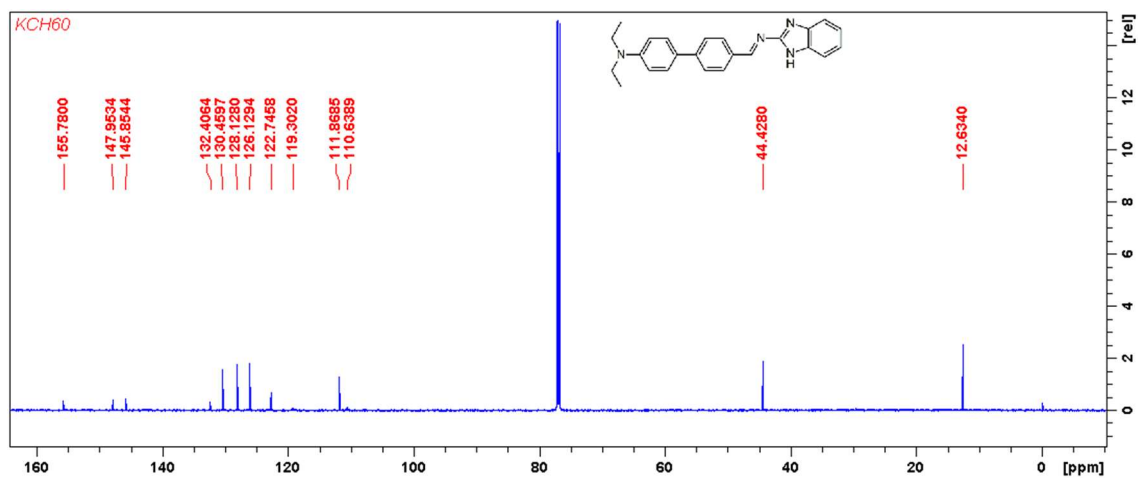
Espectro de RMN ^1H do composto **KCH 60** (600 MHz, CDCl_3)



Ampliação de 6.06-6.19 ppm RMN ^1H do composto **KCH 60** (600 MHz, CDCl_3)

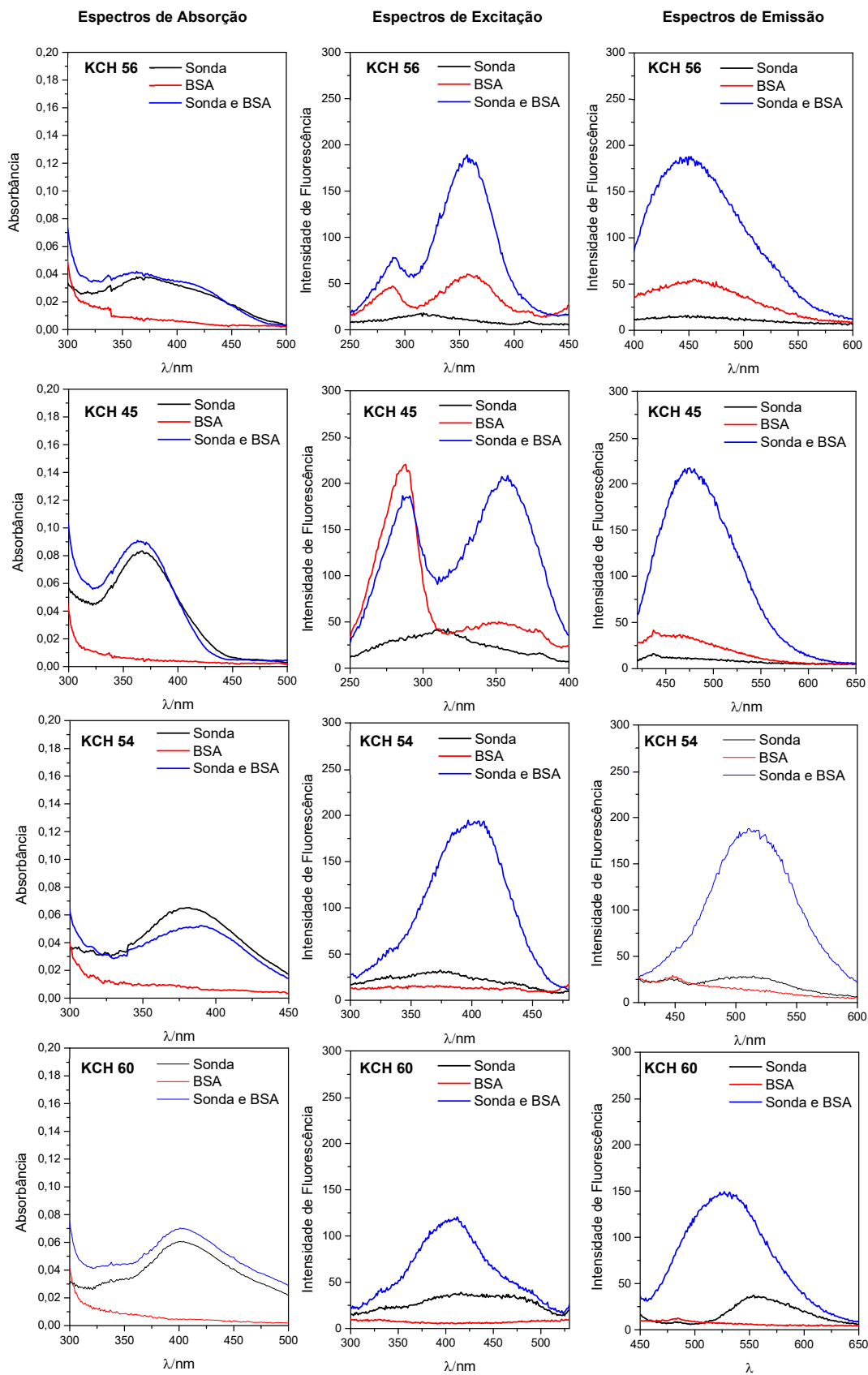


Espectro de RMN ^{13}C do composto **KCH 60** (100 MHz, CDCl_3)



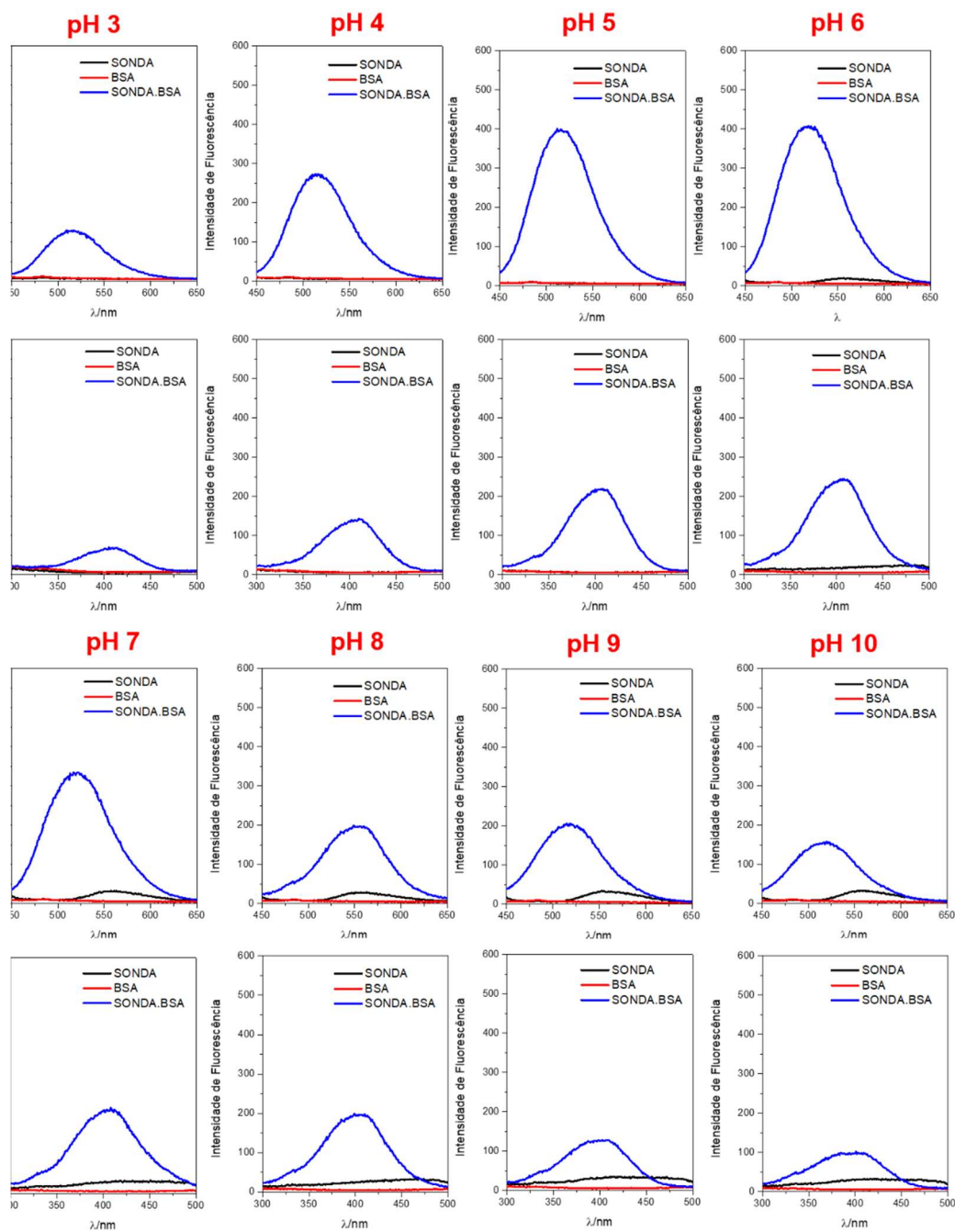
APÊNDICE U

Espectros de absorção, excitação e emissão das sondas KCH 56, KCH 45, KCH 54 e KCH 60 (2,5 μM) na presença de 10,0 μM de BSA.



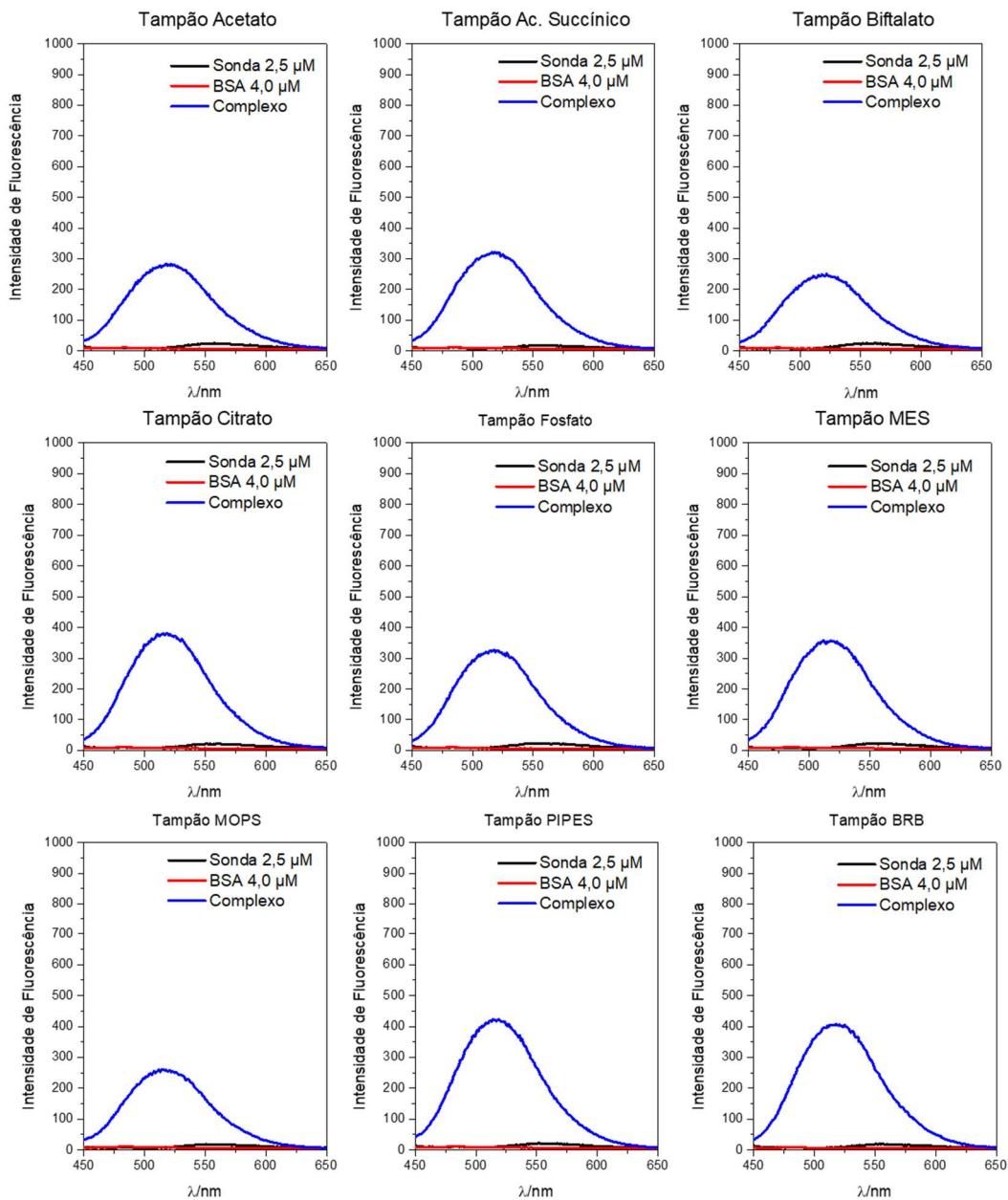
APÊNDICE V

Espectros de absorção, excitação e emissão de KCH 60 ($2,5 \mu\text{M}$) na presença de $4,0 \mu\text{M}$ de BSA em diferentes pH.



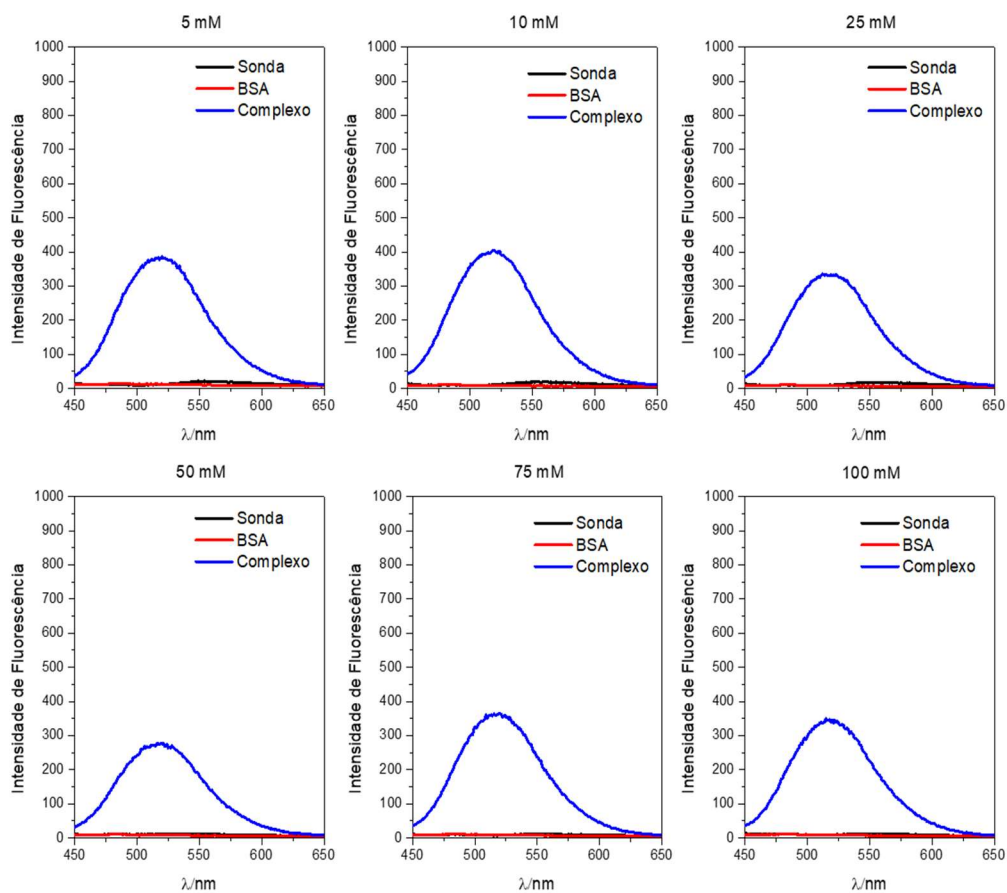
APÊNDICE W

Espectros de emissão de KCH 60 (2,5 μM) na presença de 4,0 μM de BSA em diferentes tipos de tampão.



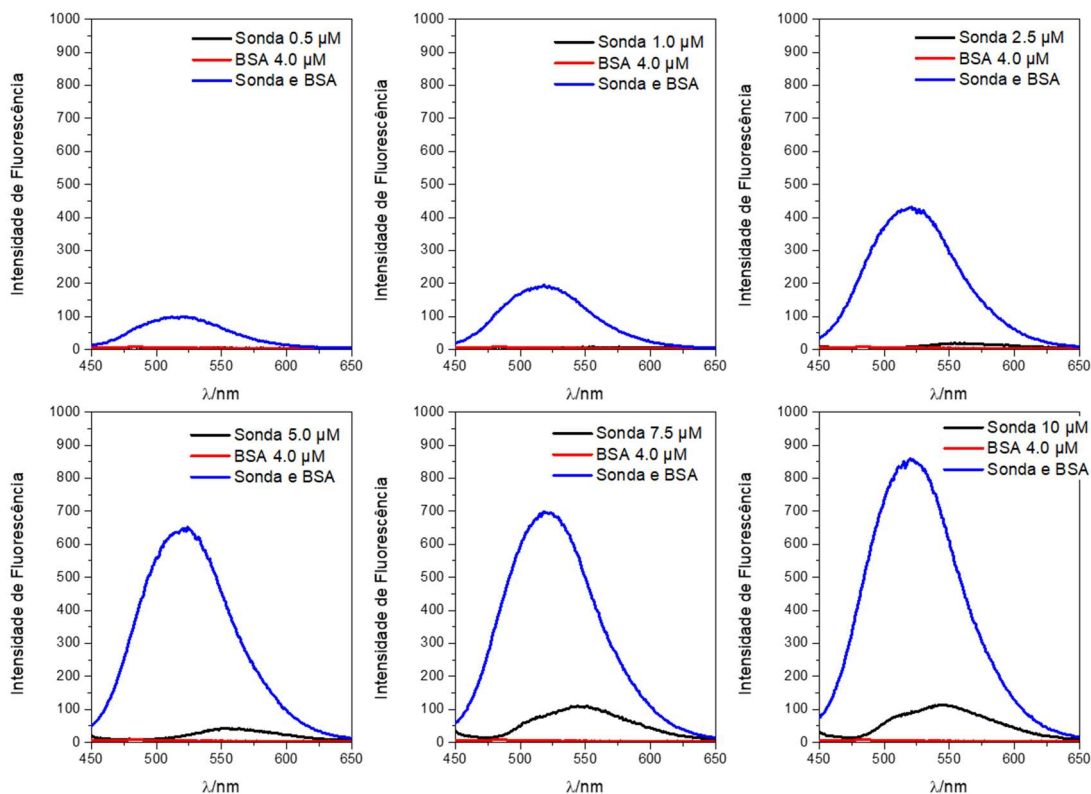
APÊNDICE X

Espectros de emissão de KCH 60 ($2,5 \mu\text{M}$) na presença de $4,0 \mu\text{M}$ de BSA em diferentes concentrações do tampão Britton-Robinson.



APÊNDICE Y

Espectros de emissão de KCH 60 (2,5-10 μM) na presença de 4,0 μM de BSA



APÊNDICE Z

Espectros de emissão de KCH 60 (5 μM) na presença de 4,0 μM de BSA em com ajuste da concentração de NaCl.

