

Ana Lúcia Caetano de Sousa Amorim

Design de novos fluoróforos utilizando metodologias mais limpas e eficientes



DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA UNIVERSIDADE DO PORTO
SETEMBRO/2012

Ana Lúcia Caetano de Sousa Amorim

Design de novos fluoróforos utilizando metodologias mais limpas e eficientes



Tese submetida à Faculdade de Ciências da Universidade do Porto para a obtenção do grau de Mestre em Química

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA UNIVERSIDADE DO PORTO
SETEMBRO/2012

Ana Lúcia Caetano de Sousa Amorim

Design de novos fluoróforos utilizando metodologias mais limpas e eficientes

Composição do Júri:

Maria Clara Ramalho Monteiro Pires Basto, Professora Auxiliar do Departamento de Química e Bioquímica da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto (Representante da Comissão Científica do 2º Ciclo de Estudos em Química) – Presidente;

Baltazar Manuel Romão de Castro, Professor Catedrático do Departamento de Química e Bioquímica da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto;

Ana Cristina Freire, Professora Associada do Departamento de Química e Bioquímica da Universidade do Porto;

Susana Luísa Henriques Rebelo, Investigadora Auxiliar do Laboratório Associado para a Química Verde – REQUIMTE – Pólo do Porto, Universidade do Porto

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA UNIVERSIDADE DO PORTO
SETEMBRO/2012

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer, em primeiro lugar, ao *Professor Doutor Baltazar de Castro* por me ter concedido a oportunidade de realizar este trabalho bem como todas as condições necessárias para a sua realização.

À *Doutora Ana Margarida Silva*, pela orientação científica desta dissertação, constante apoio, optimismo e amizade com que sempre me presenteou.

À *Professora Doutora Maria Conceição Rangel*, pelo apoio e disponibilidade demonstrados, contribuindo assim para o enriquecimento deste trabalho.

À *Doutora Andreia Leite*, pela ajuda fundamental prestada na realização dos estudos fotofísicos, sempre disponível, sempre paciente.

À *Doutora Salete Balula* e à *Doutora Susana Rebelo*, agradeço pela disponibilidade prestada na colaboração neste trabalho nomeadamente na síntese em fase sólida e catálise.

À *Doutora Vera* pela simpatia e pela cedência do reator de aquecimento óhmico.

Ao CeNTI, em especial à *Dra. Andrea Carneiro* pela cedência do reator monomodo de micro-ondas.

À *Mariana Andrade* pela simpatia e pela colaboração prestada na aquisição dos espectros de RMN.

À *Inês Cardoso*, por me ter dado a conhecer esta oportunidade; pela simpatia e amizade, e pela disponibilidade com que me ajudou a dar os primeiros passos neste trabalho. Ao *André Barbosa*, pela ajuda, paciência e disponibilidade sempre presentes ao longo destes meses de trabalho, sempre com a sua boa disposição. À *Carla Queirós*, por tem dispensado do seu tempo e paciência para gentilmente ajudar na fase final deste trabalho.

Aos *colegas do piso 2*, agradeço os momentos de descontração e boa disposição contribuindo assim para um bom ambiente de trabalho.

Às minhas *amigas*, pela preciosa amizade, luz e alegria com que brindam os meus dias.

À minha *família*, pela união e companheirismo, e por estarem presentes nos momentos mais importantes da minha vida.

Ao meu *Pai*, pela inesgotável paciência e amor de todos os dias; mais do que um pai, um companheiro único e incomparável.

Ao *Leo*, por segurar a minha mão, mesmo quando à distância, reconfortando-me e dando força em todos os momentos; pelo carinho e amor que me fizeram renascer.

*Dedicado à minha Mãe,
com amor.*

RESUMO

Os fluoróforos do tipo rodamina representam um grupo de compostos de elevado valor devido às suas excelentes propriedades fotofísicas. Deste modo, estes compostos têm sido amplamente utilizados na preparação de sensores fluorescentes. Por outro lado, o design de novos derivados de rodamina, designados por rosaminas, apresenta-se como uma boa alternativa uma vez que introduz vantagens do ponto de vista do processo de síntese. Estas vantagens traduzem-se na possibilidade de se isolar apenas um regioisómero com elevado rendimento e grau de pureza.

O trabalho desenvolvido no âmbito desta dissertação tem como objetivo a síntese e caracterização de novos fluoróforos utilizando metodologias mais sustentáveis. Sintetizaram-se novos derivados de rosamina contendo grupos fenilo, naftilo ou unidades quelantes do tipo catecol ligados ao anel xanteno. Para isso, recorreu-se à reação de condensação de 3-dietilaminofenol e correspondente benzaldeído sob irradiação micro-ondas, seguida por uma etapa de oxidação. A etapa de oxidação é tipicamente levada a cabo utilizando-se cloranil como agente oxidante.

Com o intuito de tornar a etapa de oxidação mais limpa e eficiente, estudaram-se outras metodologias alternativas ao uso de cloranil, nomeadamente, oxidação catalítica com peróxido de hidrogénio, oxidação com óxido de grafeno e também a oxidação com dióxido de manganês.

Além dos métodos de aquecimento já descritos, estudou-se um método novo de aquecimento direto para síntese orgânica em meio aquoso baseado num reator de aquecimento óhmico. Este método permitiu obter a rosamina contendo o anel fenilo em condições mais sustentáveis.

Ainda com o intuito de estabelecer protocolos mais limpos e eficientes, estudaram-se reações de síntese em fase sólida. Para tal testaram-se os suportes sólidos do tipo MCM-41 e nanopartículas de sílica, tendo-se observado que os suportes do tipo MCM-41 são mais resistentes às condições reacionais e por isso mais promissoras para virem a ser utilizadas na síntese de compostos orgânicos.

As rosaminas sintetizadas foram caracterizadas por análise elementar, espetrometria de massa e espectroscopia de ressonância magnética nuclear. Estabeleceu-se ainda as propriedades fotofísicas de uma das rosaminas sintetizadas, observando-se a sua potencial aplicação como sensor de pH.

ABSTRACT

Rhodamine-based fluorophores represent a high-value group of compounds due to their excellent photophysical properties. Because of this, these compounds have been widely used in the preparation of fluorescent sensors. On the other hand, the design of new rhodamine derivatives, called rosamines, appears as a good alternative because it introduces advantages in the synthesis process. These advantages make possible to isolate only one regioisomer with high yield and purity.

In this work new rosamine derivatives were synthesized, containing phenyl groups, naphthyl or catechol-based chelating units linked to xanthene ring. To achieve this, a condensation reaction of 3-diethylaminophenol and benzaldehyde was performed under micro-wave irradiation; and then an oxidation step was carried out. This latter step is typically carried out using chloranil as oxidative agent.

Aiming to make the oxidation step more clean and efficient, a study of alternative methodologies to chloranil was carried out. Namely, catalytic oxidation with hydrogen peroxide, oxidation with graphene oxide and also oxidation with manganese dioxide.

Beyond the heating methods already described, a new and direct way of heating for organic synthesis was studied. It is based in a reactor of ohmic heating. This method has allowed to get rosamine containing phenyl ring in a more sustainable conditions.

Furthermore, aiming to establish environment-friendly protocols, a study of synthesis reactions in solid phase was carried out as well. For this purpose we tested the MCM-41 as solid support and also silicon dioxide nanoparticles. An observation was made that the former one are more resistant to reaction conditions and hence more promising to be used in solid phase organic synthesis.

The rosamines synthesized were characterized by elemental analysis, mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy. Photophysical properties of one of the synthesized rosamines were also established, by observing its potential application as pH sensor.

RESUMÉ

Les fluorophores du type rhodamine représentent un groupe de composés d'une grande valeur en raison de leurs excellentes propriétés photophysiques. Ainsi, ces composés ont été largement utilisés dans la préparation de senseurs fluorescents. D'autre part, le design de nouveaux dérivés de rhodamine, désignés rhosamines, se présente comme une bonne alternative une fois que cela introduit des avantages du point de vue du processus de synthèse. Ces avantages se traduisent par la possibilité d'isoler uniquement un régioisomère avec un rendement et un degré de pureté élevé.

Au cours de ce travail de nouveaux dérivés de rhosamine ont été synthétisés contenant des groupes phényle, naphthyl ou des unités chélatantes du type catéchol lié à l'anneau xanthène. Pour cela, il fallu avoir recourt à la réaction de condensation de 3-diéthylaminophénol et du benzaldéhyde correspondant sous irradiation micro-ondes, suivie par une étape d'oxydation. L'étape d'oxydation est typiquement effectuée en utilisant du chloranyle en tant qu'agent oxydant.

Dans l'objectif de rendre l'étape d'oxydation plus propre et efficace, d'autres méthodes alternatives à l'utilisation du chloranyle ont été étudiées, notamment, l'oxydation catalytique avec du peroxyde d'hydrogène, l'oxydation avec de l'oxyde de graphène et encore l'oxydation avec du dioxyde de manganèse.

En plus des méthodes de chauffage déjà décrite, une nouvelle méthode de chauffage direct pour la synthèse organique en milieu aqueux basée sur un réacteur de chauffage ohmique a été étudiée. Cette méthode a permis d'obtenir la rhosamine contenant l'anneau phényle dans des conditions plus viables.

Toujours en vue d'établir des protocoles plus respectueux de l'environnement, des réactions en phase solide ont été étudiées. Pour cela les supports solides de type MCM-41 et des nanoparticules de silice ont été testés, ayant été observé que les premiers sont plus résistants aux conditions réactionnelles et donc plus prometteurs pour à l'avenir être utilisé en synthèse organique.

Les rhosamines synthétisées ont été caractérisées par analyse élémentaire, spectrométrie de masse et spectroscopie de résonance magnétique nucléaire. Les propriétés photophysiques de l'une des rhosamines synthétisées ont aussi été établies, en observant son application potentielle en tant que senseur de pH.

Índice

RESUMO.....	vii
ABSTRACT	viii
RESUMÉ	ix
Índice de figuras	xiii
Índice de tabelas	xv
Abreviaturas.....	1
Abreviaturas para Ressonância Magnética Nuclear	2
Capítulo 1	3
1. Introdução.....	4
1.1 Fluoróforos	4
1.1.1 Anel Xanteno.....	5
1.1.2 Conceção clássica de sondas fluorescentes	5
1.2 Metodologias de síntese no âmbito da ‘Química Verde’	6
1.2.1 Princípios de ‘Química Verde’	6
1.2.2 Síntese assistida por micro-ondas.....	8
1.2.3 Aquecimento Óhmico	11
1.2.4 Síntese em fase sólida	14
1.3 Fluoróforos com aplicações clínicas: tratamento e diagnóstico	15
1.3.1 Sondas de pH.....	17
1.3.2 Sensores de iões de metal.....	18
1.4 Fluoróforos com aplicações ambientais	20
Capítulo 2	22
2. Parte experimental.....	23
2.1 Reagentes, solventes e equipamentos.....	23
2.2 Síntese de precursores	24
2.2.1 Síntese de 2,3–dibenziloxibenzaldeído (2,3-OBn).....	24
2.2.2 Síntese de 3,4-dibenziloxibenzaldeído (3,4-OBn).....	25
2.3 Síntese de rosaminas utilizando diferentes métodos de aquecimento	25
2.3.1 Procedimento geral- Aquecimento convencional (banho de óleo).....	25
2.3.2 Procedimento geral- Aquecimento por micro-ondas.....	26
2.3.3 Rosamina 2 (R=1’-naftilo)	26

2.3.4 Rosamina 3 (R=2'-naftilo) e análogo hidroxilado 3a	27
2.3.5 Rosamina 4a (R=2',3'-OBn)	28
2.3.6 Rosamina 5a (R=3',4'-OBn)	28
2.3.7 Rosamina 4b (R=2',3'-OH)	29
2.3.8 Rosamina 4c (R=2',3'-OH e H-9)	29
2.3.9 Rosamina 5b (R=3',4'-OH)	30
2.3.10 Estudo das propriedades fotofísicas da rosamina 5b	31
2.3.10.1 Estudo da variação do espectro de UV-Vis com o pH	31
2.3.10.2 Estudo da variação do espectro de fluorescência com o pH	31
2.4 Síntese de rosamina em meio aquoso recorrendo ao aquecimento Óhmico	31
2.4.1 Rosamina 1 (R=H)	32
2.5 Síntese de rosaminas utilizando diferentes metodologias de oxidação	32
2.5.1 Oxidação com cloranil em aquecimento por micro-ondas	32
2.5.2 Oxidação com DDQ em aquecimento por micro-ondas	33
2.5.3 Oxidação com dióxido de manganês em aquecimento por micro-ondas	33
2.5.4 Oxidação catalítica com peróxido de hidrogénio	33
2.5.5 Oxidação com óxido de grafeno	33
2.6 Síntese orgânica em fase sólida	34
2.6.1 Material MCM-41	34
2.6.2 Reação de MCM-41 com o ligando vanilina	34
Capítulo 3	35
3. Resultados e discussão	36
3.1 Síntese de precursores	36
3.1.1 Síntese de 2,3-dibenziloxibenzaldeído (2,3-OBn) e 3,4-dibenziloxibenzaldeído (3,4-OBn)	36
3.1.2 Caracterização estrutural	37
3.2 Síntese de rosaminas utilizando diferentes métodos de aquecimento	38
3.2.1 Síntese das rosaminas 2 , 3 , 4a e 5a (R= 1'-naftilo, 2'-naftilo, 2,3-OBn, 3,4-OBn)	38
3.2.2 Remoção dos grupos protetores das rosaminas 4a e 5a (R=2,3-OBn e R=3,4-OBn)	45
3.2.3 Caracterização estrutural	47
3.2.3.1 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear	47
3.2.3.2 Espectrometria de massa	52
3.2.3.3. Estudo das propriedades fotofísicas da rosamina 5b	53
3.3. Estudo de novas metodologias mais limpas e mais eficientes	58

3.3.1 Síntese de rosamina em meio aquoso recorrendo ao aquecimento Óhmico.....	58
3.3.2 Síntese de rosaminas utilizando diferentes metodologias de oxidação	58
3.3.2.1 Oxidação com cloranil em aquecimento por micro-ondas	59
3.3.2.2 Oxidação com DDQ em aquecimento por micro-ondas.....	59
3.3.2.3 Oxidação com dióxido de manganês em aquecimento por micro-ondas	60
3.3.2.4 Oxidação catalítica com peróxido de hidrogénio	60
3.3.2.5 Oxidação com óxido de grafeno.....	62
3.3.3 Estudo preliminar de síntese em Fase Sólida	63
3.3.3.1 Funcionalização dos suportes	65
3.3.3.2 Imobilização de Vanilina em nanopartículas de sílica	67
3.3.3.3 Imobilização de Vanilina em MCM-41.....	69
3.3.3.4 Análise Elementar	71
Capítulo 4	72
4. Considerações finais.....	73
Referências bibliográficas	74

Anexo

Índice de figuras

Figura 1.1 Estrutura molecular da quinina.	4
Figura 1.2 Requisitos de uma síntese ideal. ⁷	7
Figura 1.1.3. (i): Imagem de um magnetrão gerador de micro-ondas para rádios e radares. (ii): Primeiro forno micro-ondas de uso doméstico em 1947. ¹¹	8
Figura 1.4 Diferentes perfis de temperatura após 1 min de irradiação por micro-ondas (esquerda) e após aquecimento em banho de óleo (direita). A radiação micro-ondas aumenta a temperatura de todo o volume em simultâneo enquanto que no aquecimento convencional a mistura reacional em contacto com as paredes do vaso aquece primeiro. ¹⁵	10
Figura 1.5 Dispositivo de aquecimento ôhmico. ¹⁶	12
Figura 1.6 Representação esquemática de um sistema de aquecimento ôhmico usado em química alimentar onde a) tampa isoladora; b) tubo isolador; c) e d) elétrodos; e) comida; f) gerador; g) corrente.	13
Figura 1.7 Representação de alguns compostos fluorescentes com atividade antibacteriana.	16
Figura 1.8 Modo de atuação de moléculas fluorescentes por marcação de estruturas biológicas.	17
Figura 1.9 Derivados de catecol utilizados como sondas de pH.	18
Figura 1.10 Derivado do tipo rosamina utilizado como sonda de pH.	18
Figura 1.11 Duas sondas fluorescentes para Zn^{2+} do tipo ‘turn-on’.	19
Figura 1.12 Duas sondas fluorescentes para Fe^{3+} do tipo ‘turn-on’ e ‘turn-off’, respetivamente.	19
Figura 1.13 Duas sondas fluorescentes de Hg^{2+}	20
Figura 1.14 Derivados de rosamina preparados no âmbito deste trabalho.	21
Figura 3.1 Síntese do precursor 2,3-OBn.	36
Figura 3.2 Síntese do precursor do 3,4-OBn.	36
Figura 3.3 Estruturas de ressonância em derivados do benzaldeído.	37
Figura 3.4 Constantes de acoplamento de longa distância de arranjo geométrico em zig-zag.	38
Figura 3.5 Estruturas dos compostos rodamina B e rosamina, respetivamente.	39
Figura 3.6 Reator micro-ondas CEM Discover.	41
Figura 3.7 Coluna de cromatografia rápida.	43
Figura 3.8 Espetros de RMN de 1H : (A) rosamina 4a em $CDCl_3$, (B) rosamina 4b em CD_3OD e (C) rosamina 4c com hidrogénio em CD_3OD	47
Figura 3.9 Atribuição dos prótons presentes nos anéis fenilo das rosaminas 4b e 5b.	49
Figura 3.10 Espetro de RMN de 1H da rosamina 5b.	51
Figura 3.11 Espectro de COSY da rosamina 5b.	51
Figura 3.12 Espetro de RMN de ^{13}C da rosamina 5b.	52
Figura 3.13 Espetros de HSQC e HMBC da rosamina 5b.	52
Figura 3.14 Comparação de espectros de UV-Vis da rodamina B e rosaminas 2 e 3.	53
Figura 3.15 Espetro de absorvância obtido para a rosamina 5b, na gama de pH de 2 a 7, em água.	55
Figura 3.16 Espetro de absorvância obtido para a rosamina 5b, na gama de pH de 7 a 12, em água.	55
Figura 3.17 Espetro de fluorescência obtido para a rosamina 5b, na gama de pH de 2 a 6, em água.	56

Figura 3.18 Espectro de fluorescência obtido para a rosamina 5b, na gama de pH de 6 a 12, em água.	56
Figura 3.19 Influência do pH na intensidade de fluorescência rosamina 5b, em água.	57
Figura 3.20 Esquema de dissociação da rosamina 5b.	57
Figura 3.21 Reactor de aquecimento óhmico. ²⁰	58
Figura 3.22 Cloranil.	59
Figura 3.23 DDQ.	60
Figura 3.24 Metaloporfirinas utilizadas como catalisadores.	61
Figura 3.25 Modelo proposto por Lerf–Klinowski, com omissão dos grupos minoritários (carboxilo, carbonilo, éster, etc), da periferia do plano de carbono das folhas gráficas do óxido de grafeno.	62
Figura 3.26 Representação esquemática do material MCM-41.	64
Figura 3.27 Superfície dos materiais utilizados após funcionalização com 3-(cloropropil)-trimetilsilano.	66
Figura 3.28 Espectros de IV relativos à funcionalização de MCM-41 e nanopartículas de sílica.	67
Figura 3.29 Imagem de SEM de nanopartículas de sílica após funcionalização	68
Figura 3.30 Espectros de IV do material após funcionalização (Sílica -Cl) e após imobilização (Sílica Van).	68
Figura 3.31 Espectros de IV do material após funcionalização (MCM-41-Cl) e após imobilização (MCM-41 Van).	69
Figura 3.32 Imagem de SEM de MCM-41 após funcionalização.	70
Figura 3.33 Imagem de SEM de MCM-41 após imobilização da vanilina.	70

Índice de tabelas

Tabela 1.1 Aquecimento convencional versus aquecimento com radiação micro-ondas.	9
Tabela 3.1. Comparação dos valores dos desvios químicos (ppm) dos espectros de RMN de ^1H dos precursores 2,3-OBn e 3,4-OBn em CDCl_3	37
Tabela 3.2 Resultados obtidos na síntese das rosaminas 2 (R= 1'-naftilo) e 3 (R= 2'-naftilo) e respectivas condições experimentais.....	42
Tabela 3.3 Resultados obtidos na síntese das rosaminas 4a e 5a e respectivas condições experimentais. ...	44
Tabela 3.4 Comparação dos valores dos desvios químicos (ppm) dos espectros de RMN de ^1H das rosaminas 1, 2 e 3 em CDCl_3 e das rosaminas 4b e 5b em CD_3OD	48
Tabela 3.5 Desvios químicos δ (ppm) dos sinais obtidos nos espectros de RMN de ^{13}C das rosaminas 1, 2 e 3 em CDCl_3 e das rosaminas 4b e 5b em CD_3OD	50
Tabela 3.6 Comprimento máximo de absorção ($\lambda_{\text{máx}}(\text{abs})$) e absortividade molar (ϵ) das rosaminas 2 e 3.	54
Tabela 3.7 Comprimento máximo de absorção ($\lambda_{\text{máx}}(\text{abs})$) e absortividade molar (ϵ) da rosamina 5b.....	54

Índice de esquemas

Esquema 1.1 Diferentes formas da Rodamina B em solução.	5
Esquema 1.2 Rota de síntese recorrendo a SPOS para preparar arilpropanolaminas.	15
Esquema 3.1 Pigmentos sintetizados através de reações de substituição eletrofílica aromática.	39
Esquema 3.2 Síntese da rosamina 2 (R= 1'-naftilo).	41
Esquema 3.3 Síntese da rosamina 3, R= 2'-naftilo.	42
Esquema 3.4 Análogo hidroxilado (3a) isolado durante a síntese da rosamina 3 e a sua respetiva forma protonada.	43
Esquema 3.5 Síntese da rosamina 4a (R=2',3'-OBn).	44
Esquema 3.6 Síntese da rosamina 5a (R=3',4'-OBn).	44
Esquema 3.7 Reação de hidrogenólise da rosamina 4a (R=2,3-OBn).	45
Esquema 3.8 Reação com BCl ₃ com formação da rosamina 4b.	46
Esquema 3.9 Reação com BCl ₃ com formação da rosamina 5b.	46
Esquema 3.10 Reação de clivagem dos grupos protetores com BCl ₃	46
Esquema 3.11 Reação de síntese proposta para a imobilização do ligando vanilina em suporte sólido.	65

Abreviaturas

AE - análise elementar

CeNTI – Centro de Nanotecnologia e Materiais Técnicos, Funcionais e Inteligentes

DDQ – 5,6-diano-2,3-dicloro-1,4-benzoquinona

DCM - diclorometano

DMF – *N,N*-dimetilformamida

DMSO – dimetilsulfóxido

EDTA – do Inglês “Ethylene diamine tetraacetic acid”

EM – espectroscopia de massa

ESI – ionização em electrospray

FAB – do Inglês “fast atomic bombardement”

GO – óxido de grafeno

HRESI – alta resolução em ESI

IV – infravermelho

IUPAC – do Inglês “International Union of Pure and Applied Chemistry”

$M^{+•}$ – ião molecular

$[M+H]^+$ – ião molecular protonado

MCM – do Inglês “mobil chrystalline materials”

MO – micro-ondas

R_f – factor de retenção

SEM – do Inglês “scanning electron microscopy”

SPOS – do Inglês “solid phase organic synthesis”

TLC – do Inglês “thin layer chromatography”

p-TsOH – ácido *p*-toluenossulfônico

TFA – ácido trifluoroacético

UV-Vis – ultravioleta/visível

QC – Química combinatória

$\lambda_{m\acute{a}x}$ – comprimento de onda para máximo de absorvância

λ_{exc} – comprimento de onda de excitação

Abreviaturas para Ressonância Magnética Nuclear

COSY – correlation spectroscopy

d – duplete

dd – duplo duplete

HMBC – heteronuclear multiple-bond correlation spectroscopy

HSQC – heteronuclear single-quantum correlation spectroscopy

J – constantes de acoplamento

m – multiplete

ppm – partes por milhão

q – quarteto

RMN - ressonância magnética nuclear

RMN de ^{13}C - ressonância magnética nuclear de carbono 13

RMN de ^1H - ressonância magnética nuclear de próton

s – singuleto

t – tripleto

TMS – tetrametilsilano

δ – desvio químico

Capítulo 1

Introdução

1. Introdução

1.1 Fluoróforos

O trabalho desenvolvido no âmbito desta dissertação tem como objetivo a síntese e caracterização de novos fluoróforos utilizando metodologias mais sustentáveis.

O termo fluoróforo, segundo Lavis e Raines,¹ define-se como uma *unidade fluorescente que pode ser composta por moléculas pequenas ou proteínas* e que confere à molécula, na qual está inserida, propriedades fluorescentes.

Em 1845 Herschel reportou a emissão visível de uma solução aquosa de quinina (Figura 1.1).¹ Assim, esta molécula estabeleceu-se historicamente como o primeiro fluoróforo estudado e classifica-se como fluoróforo endógeno. A sua importância em termos de química orgânica medicinal motivou o desenvolvimento do primeiro corante sintético têxtil, “mauvine”, em 1865, e o aparecimento dos primeiros espectralfluorímetros.¹ Muitos compostos naturais exibem, tal como a quinina, uma fluorescência mensurável, nomeadamente os aminoácidos aromáticos como o triptofano.

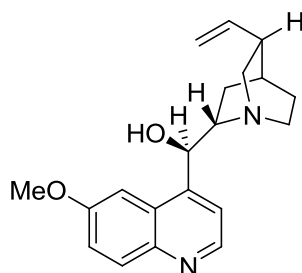


Figura 1.1 Estrutura molecular da quinina.

Existem várias classes de fluoróforos, como são exemplo os compostos aromáticos policíclicos, as cumarinas, as quinolinas e os imidazois.²

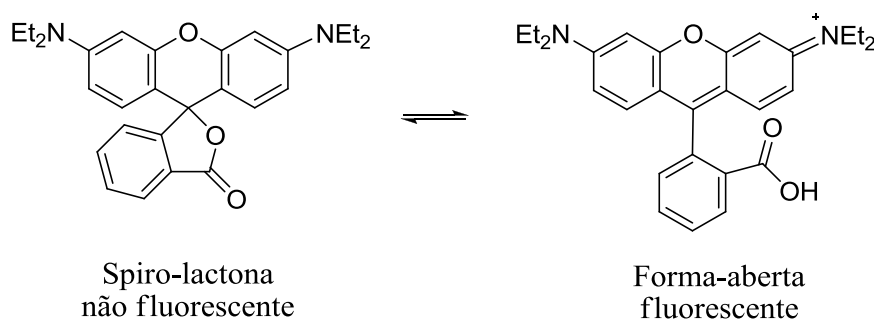
Atualmente, os fluoróforos podem ser classificados tendo em conta as suas propriedades fotofísicas (absorção e emissão) quando conjugados ou complexados com determinado analito. Deste modo os fluoróforos podem ser divididos em duas classes principais: fluoróforos com emissão até 500 nm e fluoróforos com emissão acima de 500 nm. Nestes últimos incluem-se os fluoróforos do tipo rodamina e fluoresceína pertencentes à família dos xantenos.³

1.1.1 Anel Xanteno

Os xantenos constituem a classe de compostos fluorescentes mais investigada devido sobretudo às suas propriedades fotofísicas: espectro de absorção e emissão, rendimentos quânticos e tempo de vida de fluorescência.⁴ O primeiro corante fluorescente derivado do anel xanteno – fluoresceína - foi sintetizado por Bayer, em 1871.¹

No âmbito do presente trabalho existe particular interesse em explorar os derivados de rodamina, família de compostos que contem igualmente o anel xanteno no seu esqueleto. A rodamina B (Esquema 1.1) é uma das rodaminas mais utilizadas, foi sintetizada pela primeira vez em 1905 por Noelting e Dziewonsky,¹ tendo sido posteriormente utilizada na determinação colorimétrica de vários metais de relevância biológica.⁵

A rodamina B, dependendo do valor de pH do meio pode adquirir diferentes formas, designadamente a forma de spirolactona, que não é fluorescente e é incolor, e a forma aberta resultante da protonação do grupo carboxilato, que por sua vez apresenta uma forte fluorescência e adquire a cor rosa (Esquema 1.1). O valor de pK_a da rodamina B é de 3,7.⁶



Esquema 1.1 Diferentes formas da Rodamina B em solução.

1.1.2 Conceção clássica de sondas fluorescentes

Tradicionalmente as sondas fluorescentes são concebidas de forma a incluírem na sua estrutura um recetor ou ligando responsável pela deteção do analito e um fluoróforo responsável pela sua sinalização. A conceção destas sondas pode seguir as três abordagens seguintes:

-sondas fluorescentes intrínsecas: onde o mecanismo de transdução do sinal envolve a interação do analito com um ligando que faz parte do sistema π do fluoróforo;

-sondas fluorescentes extrínsecas: onde o ligando está covalentemente ligado ao fluoróforo, no entanto estes são eletronicamente independentes. Uma vez que a ligação covalente se faz através de um espaçador, ambas as unidades estão relativamente próximas; a interação do analito com o ligando induz alterações na sua fluorescência.

-sondas conjugadas “ensemble”: o conjugado unidade quelante-fluoróforo é seletivamente dissociado por adição de um analito, resultando numa resposta detetável pelo fluoróforo.

Com o intuito de se procurar protocolos mais limpos e eficientes, estudaram-se diferentes metodologias de síntese no âmbito da ‘Química Verde’, para preparar novas sondas fluorescentes derivadas do fluoróforo rodamina.

1.2 Metodologias de síntese no âmbito da ‘Química Verde’

1.2.1 Princípios de ‘Química Verde’

Em 1994, um estudo levado a cabo pelo Conselho Europeu da Indústria Química revelou que 60% da opinião pública tinha uma visão negativa acerca desta indústria. Nos EUA, um ano antes, um estudo semelhante revelava que apenas 26% da opinião pública via com bons olhos a Indústria Química. As principais razões que conduzem à formação de opiniões mais desfavoráveis relacionam-se com as adversidades associadas ao impacto ambiental, segurança e resíduos resultantes. Os processos industriais conduzem à formação de toneladas de resíduos, pelo que a redução e eliminação destes resíduos é cada vez mais tema preocupante não só na indústria como para as autoridades responsáveis e opinião pública em geral. No entanto, a Indústria Química é das mais bem-sucedidas e diversificadas indústrias de produção no mundo inteiro.⁷

O aparecimento da ‘Química Verde’ está associado à procura de metodologias mais sustentáveis, sendo um conceito complexo e difícil de definir, mas que se relaciona com a extensão em que as características da Química praticada assentam no Desenvolvimento Sustentável. É por isso importante avaliar a sustentabilidade das práticas em Química, desde as reações de síntese aos processos de fabrico industrial, bem como os próprios produtos e respetiva utilização. No entanto, esta avaliação é bastante complexa pois a Química tem um alcance vasto e diversificado – aplica-se aos compostos, à sua utilização, aos processos para o seu fabrico industrial, etc.; envolve diferentes parâmetros de benignidade ambiental desde os processos de fabrico aos

compostos e é determinada por um conjunto de várias características que permitam a Sustentabilidade (Figura 1.2).⁸ Ou seja, que o composto/ processo seja:

- por si só benigno – não apresente efeitos nocivos para o Homem e Ambiente;
- utilize de forma eficiente os átomos dos reagentes e não origine muitos resíduos, particularmente se apresentam toxicidade;
- possa ser preparado por reações em condições suaves e que não consumam muita energia;
- utilize reagentes resultantes de matérias primas renováveis.⁸



Figura 1.2 Requisitos de uma síntese ideal.⁷

É de assinalar que a transposição da Química Laboratorial para a Industrial é complexa, pois nesta estão envolvidos um grande número de produtos químicos diversificados e variados processos de fabrico.⁸

É cada vez mais urgente a procura de vias de síntese “mais verdes” que as tradicionais e de as classificar consoante o desenvolvimento “verde” do processo de modo a conseguir-se alcançar processos industriais mais eficientes e benignos para o meio ambiente, do que os atualmente utilizados. É necessário, por isso, avaliar quantitativamente a “verdura” das reações, vias de síntese, processos químico-industriais, etc., de modo a catalogar as alternativas disponíveis em cada caso e facilitar assim a escolha das mais apropriadas para se atingir a Sustentabilidade.^{9,10}

1.2.2 Síntese assistida por micro-ondas

Foi em 1946, que Spencer se deparou com a irradiação por micro-ondas como método de aquecimento aquando da realização de experiências no seu laboratório. Numa dessas experiências, em que procurava obter um novo tubo de vácuo (magnetron – Figura 1.3 i), Spencer descobriu que a barra de chocolate que tinha no seu bolso derreteria devido à exposição a esta radiação. Foi na sequência deste acontecimento que já em 1947, Spencer desenvolveu o primeiro forno de micro-ondas de uso doméstico (Figura 1.3 ii).¹¹

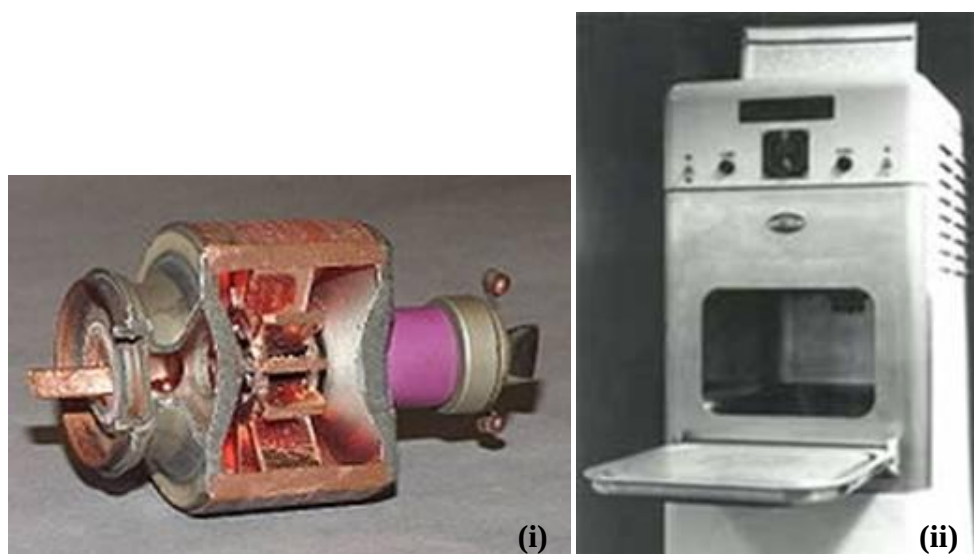


Figura 1.3. (i): Imagem de um magnetron gerador de micro-ondas para rádios e radares. (ii): Primeiro forno micro-ondas de uso doméstico em 1947.¹¹

Na década de 90, surgiram os primeiros fornos micro-ondas para uso laboratorial. E em 1986, os grupos de investigação de Gedye e Giguere descreveram as primeiras reações em síntese orgânica, em vasos abertos, recorrendo a radiação micro-ondas por meio de fornos micro-ondas domésticos.^{12,13} Nesta altura, as experiências eram realizadas sem qualquer controlo da temperatura ou pressão causando acidentes. No entanto, verificou-se, em alguns casos, que este tipo de aquecimento reduzia significativamente os tempos de reação comparativamente com as experiências desenvolvidas sob condições de aquecimento convencional. Desde então esta técnica tem sido das mais desenvolvidas no âmbito da química orgânica, fato que se observa pelo crescente número de publicações sobre este tema.

Tradicionalmente, as reações químicas são aquecidas recorrendo-se a uma fonte de calor externa, banho de óleo ou manta de aquecimento. Esta forma de aquecimento é um método bastante lento e ineficiente de transferência de energia para uma mistura

reacional, pois apresenta uma elevada inércia térmica, uma vez que depende de processos de convecção e condução do calor e da condutividade térmica dos diferentes materiais através dos quais o calor tem de penetrar, resultando muitas vezes numa temperatura do vaso de reação superior à da mistura reacional. Por sua vez, o aquecimento por micro-ondas proporciona um aquecimento mais eficiente, já que este é gerado internamente por absorção direta da radiação micro-ondas por moléculas polares presentes na mistura reacional, por exemplo, solventes, reagentes, catalisadores. Na Tabela 1.1 apresentam-se as principais características de ambos os tipos de aquecimento.¹⁴

Tabela 1.1 Aquecimento convencional versus aquecimento com radiação micro-ondas.

Aquecimento convencional	Aquecimento por micro-ondas
	
A energia é transferida através das paredes do vaso reacional, e em seguida, dissipada para a mistura reacional.	A radiação micro-ondas é absorvida diretamente pelas moléculas presentes na mistura reacional, sendo as paredes do vaso reacional transparentes à radiação

A radiação micro-ondas (onde 2,45 GHz é a frequência utilizada nos fornos domésticos e de síntese química) é convertida em aquecimento segundo dois mecanismos principais: polarização dipolar e condução iónica. Os iões ou dipolos presentes numa dada reação, quando sujeitos à radiação micro-ondas, vão alinhar-se segundo o campo elétrico aplicado. Como o campo aplicado oscila, os iões ou dipolos vão realinhar-se com a corrente elétrica alternada e, durante esse processo, a energia é perdida na forma de calor através de fricção molecular e perdas dielétricas. A quantidade de calor gerado por este processo está diretamente relacionada com a capacidade dos materiais para se alinharem à frequência do campo aplicado. Se o ião ou dipolo não tem tempo para realinhar ou reorienta muito rapidamente com o campo

aplicado, então não há aquecimento. Deste modo, quando se planifica uma experiência com radiação micro-ondas deve ter-se em conta essencialmente as propriedades dielétricas do material a aquecer.¹⁵

A capacidade de uma dada substância converter energia eletromagnética em calor é determinada por $\tan \delta$, grandeza que está relacionada com a constante dielétrica (ϵ) do material. Uma substância com elevada constante dielétrica irá absorver radiação com elevada eficiência e consequentemente aquecer mais rapidamente. Geralmente, os solventes mais polares como álcoois, ácidos e DMSO, têm valores elevados de constante dielétrica pelo que são considerados bons solventes para usar com radiação micro-ondas, enquanto os solventes apolares, como hexano e tolueno, possuem constantes dielétricas muito baixas e, por isso, são considerados transparentes à radiação.¹⁵ A Figura 1.4 evidencia de que modo os gradientes de temperatura se apresentam nos dois tipos de aquecimento.

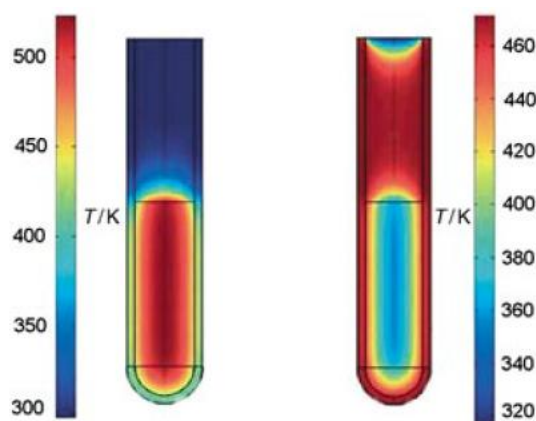


Figura 1.4 Diferentes perfis de temperatura após 1 min de irradiação por micro-ondas (esquerda) e após aquecimento em banho de óleo (direita). A radiação micro-ondas aumenta a temperatura de todo o volume em simultâneo enquanto que no aquecimento convencional a mistura reacional em contacto com as paredes do vaso aquece primeiro.¹⁵

As vantagens desta tecnologia têm sido demonstradas em várias áreas da Química, desde o desenvolvimento de metodologias sintéticas até à aplicação em processos industriais.¹⁴

As principais vantagens associadas ao aquecimento com radiação micro-ondas são:

- Obtenção de temperaturas de reação elevadas através da combinação da radiação micro-ondas com a utilização de vasos fechados.
- Redução dos tempos de reação, rendimentos elevados e reações mais “limpas” facilitando os processos de purificação.

- Utilização de solventes de baixo ponto de ebulição em vasos fechados sob pressão e a temperaturas elevadas (acima do ponto de ebulição do solvente).
- Combinação da radiação micro-ondas com catalisadores que absorvem fortemente a radiação.

Porém, existem algumas desvantagens e limitações associadas a esta tecnologia que são:¹⁴

- A baixa eficiência do magnetrão dado que apenas 50% da energia elétrica usada é transformada em energia micro-ondas.
- Nem toda a radiação gerada é absorvida pela mistura reacional.
- O aquecimento com radiação micro-ondas pode não ser exequível, por exemplo se a reação requer um solvente apolar cuja absorção da radiação é limitada.
- A tecnologia envolvida na conceção dos aparelhos de micro-ondas faz com que o elevado custo de investimento seja mais uma desvantagem.

O aquecimento por micro-ondas é uma técnica ainda muito recente, com uma margem de aperfeiçoamento maior do que outras técnicas. Apesar da intensa investigação desenvolvida ao longo destes anos, existem ainda muitas limitações que não foram ultrapassadas, das quais se destaca o alto custo da energia de micro-ondas por quilowatt instalado e a relativa ineficiência do magnetrão na conversão de energia elétrica em energia micro-ondas. Atualmente, os fabricantes de aparelhos de micro-ondas continuam a desenvolver esforços com vista à construção de magnetrons mais eficientes e aperfeiçoamento dos desenhos dos reatores já existentes, principalmente no que diz respeito a questões de segurança. Deste modo, espera-se o aparecimento de novos reatores de micro-ondas, energeticamente mais eficientes, capazes de trabalhar em condições de elevada pressão e temperatura e em larga escala.¹⁴

1.2.3 Aquecimento Óhmico

A técnica de aquecimento óhmico (Figura 1.5) não é uma descoberta recente; tem sido utilizada há mais de 100 anos. Processos de aquecimento como a esterilização e a pasteurização, com vista a proteger os alimentos de contaminação microbológica, assentam no princípio de aquecimento a altas temperaturas e durante curtos períodos de tempo. Estas condições são proporcionadas pelo aquecimento óhmico, um método moderno de o alcançar, em alternativa ao método clássico de esterilização UHT.

Já durante o séc. XX que o aquecimento ôhmico era prática comum, no entanto, esta técnica foi abandonada devido a problemas faradaicos e de corrosão, sendo mais tarde, no final deste século, redescoberta.¹⁶

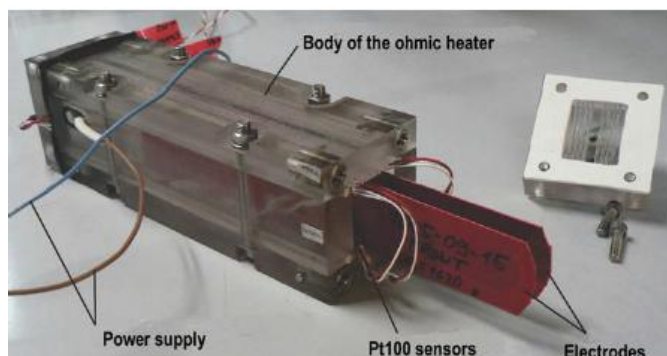


Figura 1.5 Dispositivo de aquecimento ôhmico.¹⁶

O aquecimento ôhmico tornou-se, por essa altura, num tema alvo de vários estudos envolvendo uma grande variedade de aplicações na Indústria Alimentar; nomeadamente, no processamento térmico de alimentos sólidos, alimentos líquidos, mistura alimentares sólido-líquido, carnes e vegetais. Uma vez que é possível que um alimento com 2 fases (sólida e líquida) sofra em ambas a mesma taxa de geração de calor evitando-se o sobreaquecimento de uma delas.^{16, 17}

O aquecimento ôhmico apresenta-se como um método de aquecimento no qual a mistura de reação (material a aquecer), que funciona como uma resistência elétrica, é aquecida pela passagem, no seu interior, de corrente elétrica. A energia elétrica é dissipada diretamente no reator, por efeito ôhmico, sendo a potência gerada, função da tensão alterna aplicada, da impedância do sistema e da corrente gerada (Figura 1.6).

Em particular, as soluções aquosas têm condutividade suficiente para permitir que o calor se dissipe, devido aos iões provenientes dos sais nelas presentes. O aquecimento ôhmico é extremamente eficiente na conversão de energia, apresentando valores de eficiência superiores a 95%.¹⁸ Este método de aquecimento para síntese apresenta diversas vantagens relativamente aos métodos convencionais, tais como:

- aquecimento rápido e uniforme;
- ausência de superfícies para transferência de calor;
- observação da reação em tempo real, o que não acontece no aquecimento usando radiação micro-ondas;

- processo de controlo bastante simples e com custos de manutenção reduzidos, mesmo à escala industrial;
- eficiência energética superior à dos processos tradicionais, traduzindo-se em poupanças significativas de energia;
- baixo impacto ambiental.¹⁹

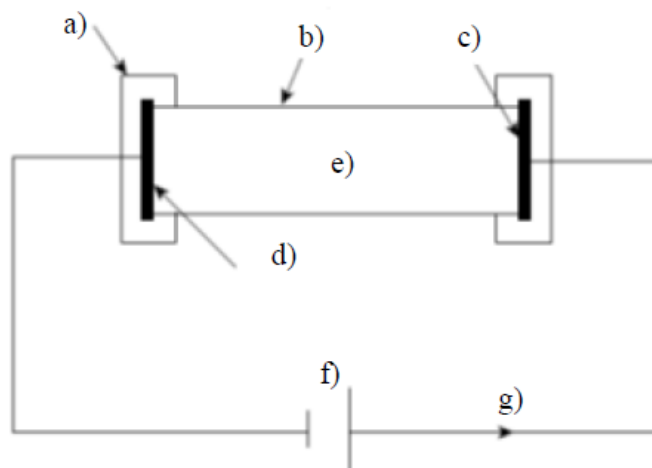


Figura 1.6 Representação esquemática de um sistema de aquecimento ôhmico usado em química alimentar onde a) tampa isoladora; b) tubo isolador; c) e d) elétrodos; e) comida; f) gerador; g) corrente.

Investigadores de um conjunto de Universidades Públicas portuguesas desenvolveram um reator com aquecimento ôhmico para síntese química, em particular em meio aquoso (N/Ref.: PAT 43149-11).²⁰ Este reator e respetivo método de aquecimento têm aplicação desde a síntese orgânica à inorgânica, preparação de materiais organometálicos, síntese de nanopartículas e de polímeros, sendo aplicável na Indústria Química e Farmacêutica. A simplicidade de conceção e custo do reator, a sua baixa capacidade calorífica e inércia térmica, o aquecimento rápido e uniforme, a elevada eficiência energética, fácil manutenção e manuseamento, assim como a possibilidade de monitorização e acompanhamento visual da evolução da reação e de adição de reagentes durante o decurso da reação, tornam a utilização deste reator uma opção vantajosa e versátil.²⁰

Com o objetivo de avaliar e comparar as vantagens deste método de aquecimento com o aquecimento por irradiação de micro-ondas, no presente trabalho realizou-se a síntese de um derivado do tipo rosamina recorrendo a este método de aquecimento.

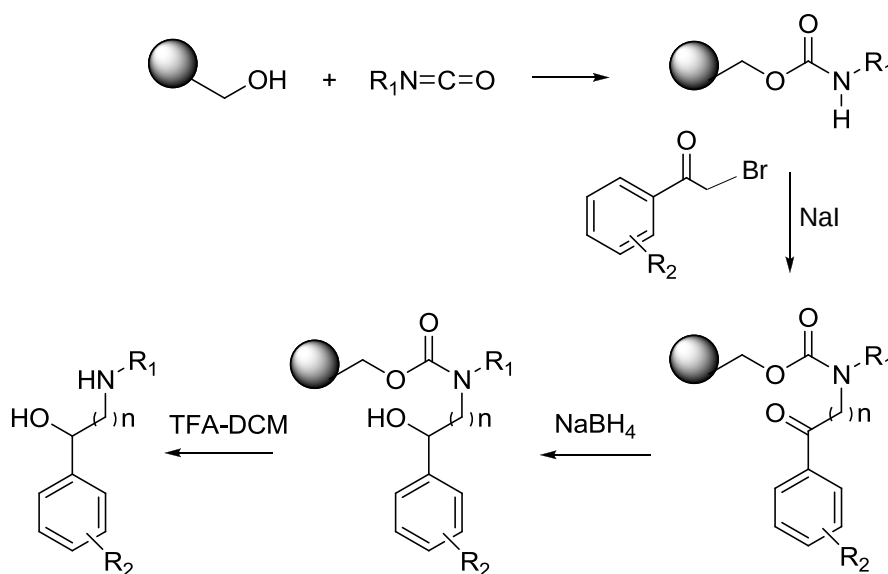
1.2.4 Síntese em fase sólida

A Química Combinatorial (QC) surgiu no início da década de 90 e consiste em sintetizar e testar uma biblioteca de compostos bioativos com o objetivo de descobrir novos fármacos de forma mais rápida e economicamente mais acessível. A QC mudou os paradigmas na descoberta de novos fármacos uma vez que automatizou e reduziu a escala das sínteses, encurtando o tempo de investigação conduzindo de forma rápida a uma biblioteca de substâncias análogas com diferentes grupos funcionais ou diferentes conformações.²¹ Ou seja, o princípio básico da QC consiste em preparar um largo número de compostos diferentes ao mesmo tempo – ao contrário das sínteses convencionais que são realizadas uma de cada vez – e depois identificar qual o composto mais promissor para estudos posteriores. Os vários compostos são preparados em simultâneo recorrendo a condições reacionais semelhantes de modo sistemático, sendo desta forma os produtos obtidos numa única vez.²²

Na sequência do desenvolvimento da QC surgiu a Síntese Orgânica em Fase Sólida (SPOS – *Solid Phase Organic Synthesis*). Esta técnica apresentou-se como uma importante ferramenta na síntese de compostos orgânicos.²³ Neste tipo de síntese um dos reagentes é imobilizado num suporte sólido, que após reação com os restantes reagentes conduz à obtenção do produto de reação que se encontra também imobilizado neste suporte. Em SPOS, os reagentes são adicionados em excesso relativamente ao reagente imobilizado no suporte sólido, que podem ser constituídos por polímeros insolúveis, de modo a levar a conversão total dos reagentes. O primeiro relato sobre a utilização da SPOS data de 1963, quando Bruce Merrifield desenvolveu a metodologia para a síntese de peptídeos, utilizando polímeros insolúveis e inertes, que serviram de suportes para a síntese.²⁴ Esta técnica apresentou vantagens na quimioseletividade das reações e, consequentemente, diminuição de reações paralelas. Entretanto, a maior vantagem da SPOS é a simplificação da etapa de purificação dos produtos sintetizados, que consiste no simples processo de lavagem e filtração em cada etapa da rota sintética. Dessa maneira, eliminam-se excesso de solventes, reagentes e possíveis produtos indesejados não covalentemente ligados ao suporte sólido. A última etapa da rota sintética consiste na clivagem da molécula do suporte sólido para obtenção do produto final com elevado grau de pureza.

Na década de 80, o desenvolvimento desta metodologia conduziu ao aparecimento de novos suportes sólidos com diferentes espaçadores e estruturas de resinas Merrifield. Atualmente, a SPOS é frequentemente utilizada na Indústria

Farmacêutica. No âmbito da procura de novos fármacos, as reações de cicloadição são privilegiadas para gerar bibliotecas de compostos. Para evidenciar a importância do uso de suportes sólidos na pesquisa de novos fármacos, no Esquema 1.2 apresenta-se como exemplo um método versátil para a síntese de aminas diversamente substituídas recorrendo a carbamatos imobilizados em polímeros insolúveis. A metodologia foi estabelecida com sucesso na síntese de ariletanolaminas e arilpropanolaminas com altos rendimentos e pureza dos produtos.²⁵



Esquema 1.2 Rota de síntese recorrendo a SPOS para preparar arilpropanolaminas.

1.3 Fluoróforos com aplicações clínicas: tratamento e diagnóstico

Alguns corantes têm sido utilizados em Medicina há mais de um século apesar do crescente aparecimento de fármacos sintéticos e semisintéticos. A maioria das classes de corantes – acrinidina, fenotiazinas, triarilmetano e xantenos – têm sido descritas pela sua ação terapêutica. É de salientar que a descoberta destas propriedades surge em resultado da procura de alternativas aos fármacos convencionais.²⁶

Ehrlich testou as propriedades de corantes derivados da anilina e descobriu a potencialidade de alguns para corar células animais.²⁶ Estes estudos surtiram em avanços médicos consideráveis uma vez que permitiram demonstrar a origem microbiana de doenças como a tuberculose e a malária. O uso de corantes em sistemas biológicos é ainda hoje a base da técnica patológica para conhecer a atividade de doenças. Além disso, a natureza seletiva do corante anilina levou Ehrlich a desenvolver

o princípio da toxicidade seletiva e usar estes compostos no tratamento de doenças de origem microbiana.²⁶

A primeira cura utilizando corantes data de 1891 por Guttman e Ehrlich, quando dois pacientes com malária foram tratados com azul de metileno (Figura 1.7). Ehrlich foi também responsável pela demonstração das propriedades antibacterianas de aminoacridinas (Figura 1.7). Alguns destes compostos foram utilizados como desinfetantes de feridas durante a 1ª Guerra Mundial. Consequentemente, em 1940, as aminoacridinas antibacterianas foram bastante usadas pelas populações civis bem como por militares. Um outro derivado da acridina, designado por quinacrina, teve um papel importante no tratamento da malária aquando da escassez da quinina. Outros corantes antibacterianos foram usados durante esta época tais como: azul de metileno, mercurocromo e também prontasil que levou posteriormente à síntese de diversas sulfonamidas antibacterianas (Figura 1.7).

Apesar da atividade dos corantes antibacterianos, estes compostos foram caindo em desuso tendo sido substituídos por outros fármacos como a penicilina, e subsequentemente por agentes sintéticos como as fluoroquinolonas.

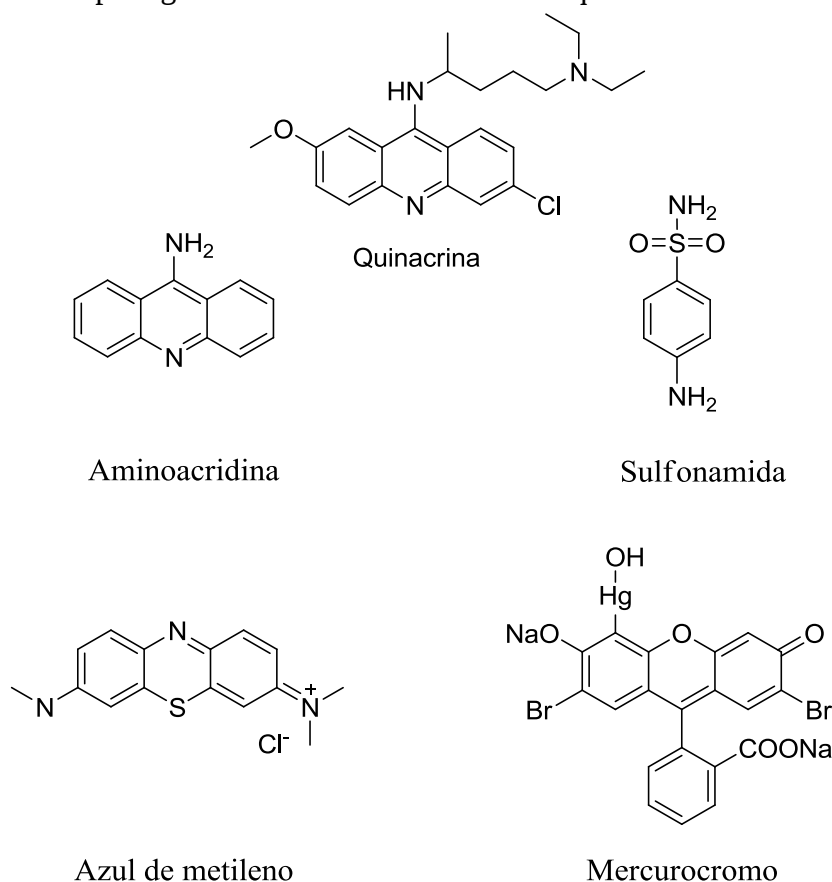


Figura 1.7 Representação de alguns compostos fluorescentes com atividade antibacteriana.

A Histoquímica dedica-se ao estudo da constituição química e metabolismos das células e tecidos. As moléculas fluorescentes desempenham nesta ciência um papel importante na medida em que permitem a obtenção de imagens microscópicas de contraste através da marcação de estruturas biológicas. Os corantes neste âmbito funcionam como marcadores de moléculas como anticorpos e na deteção de enzimas,²⁷ permitindo o diagnóstico de determinadas doenças.

Na Figura 1.8 exemplifica-se o modo de atuação de marcação de estruturas biológicas através do uso de várias classes de moléculas fluorescentes.

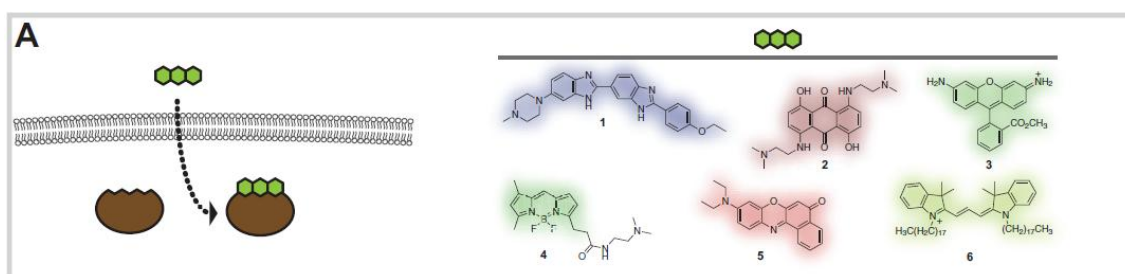


Figura 1.8 Modo de atuação de moléculas fluorescentes por marcação de estruturas biológicas.

1.3.1 Sondas de pH

A determinação do valor de pH é um parâmetro importante em diversas áreas que vão desde o ambiente, às ciências da vida, passado pelos processos industriais. Tipicamente recorre-se aos sensores potenciométricos para medição do valor de pH, no entanto os sensores de pH óticos surgem como uma alternativa vantajosa na medida em que tornam o processo de medição menos invasivo, ou seja, permitem medições sem necessitar aceder à amostra. Por outro lado, os sensores óticos são sistemas miniaturizados e têm ainda a particularidade de permitirem efetuar medições de pH em zonas com elevados campos magnéticos.

A maioria dos sensores óticos de pH descritos é constituída por moléculas fluorescentes que se encontram integradas em dispositivos que recebem o sinal ótico.²⁸ Atualmente, existem vários compostos fluorescentes que podem funcionar como sondas de pH. A Figura 1.9 apresenta dois derivados de catecol constituídos por uma unidade de catecol ligada covalentemente a anéis aromáticos do tipo fenilo ou piridilo, através de um sistema de ligações π .²⁸

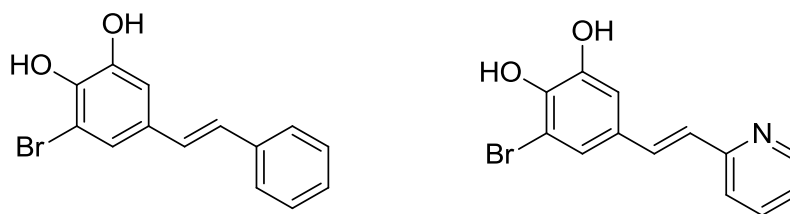


Figura 1.9 Derivados de catecol utilizados como sondas de pH.

A Figura 1.10 ilustra um composto fluorescente do tipo rosamina aplicado como sensor de pH que possui duas especialidades de relevo: (i) grupos do tipo piperazina sensíveis ao pH e (ii) ligação covalente a um suporte sólido com o intuito de facilitar a aplicação dos compostos.²⁹

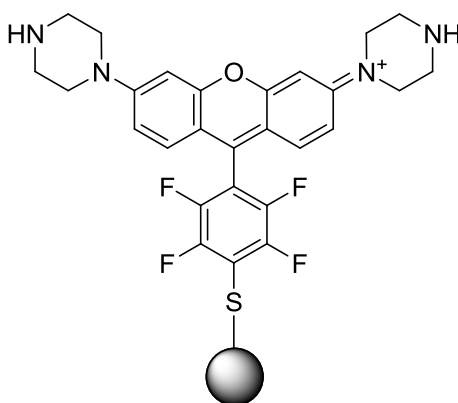


Figura 1.10 Derivado do tipo rosamina utilizado como sonda de pH.

1.3.2 Sensores de iões de metal

Os iões de metal são essenciais a todas as formas de vida, no entanto alterações no regulamento homeostático destes estão fortemente relacionados com várias patologias humanas, incluindo cancro, diabetes e doenças neurodegenerativas. Sensores de iões de metal em células que respondam de forma seletiva e sensível permitem determinar as consequências destes desequilíbrios nas células. O uso crescente da microscopia confocal motivou o desenvolvimento de moléculas fluorescentes, oferecendo um vasto conjunto de sondas capazes de responder a acontecimentos intracelulares tais como: a localização de proteínas, marcação de moléculas, determinação da distribuição de organelos e viabilidade celular.

Fluoróforos que permitam localizar a presença de certos iões de metal quer nas regiões intra ou extracelular continuam a dar um forte contributo no estudo e compreensão dos equilíbrios homeostáticos associados a diversas doenças. Existe por

isso uma necessidade premente no desenvolvimento de sensores de íons de metal de importância biológica como por exemplo: o Zn(II), o Cu(II) e o Fe(III).

O zinco é o segundo íon de metal mais abundante presente no corpo humano e existe exclusivamente na sua forma divalente no meio biológico. A quantidade de tipos de células que acumulam e mobilizam zinco promoveu interesse no desenvolvimento de sensores para Zn^{2+} . Este íon de metal pode ter a função de ácido de Lewis, cofactor de enzimas e outras proteínas. Além disso, relaciona-se com atividades neuronais uma vez que é libertado aquando os fenómenos de sinapse. Na Figura 1.11 são apresentados alguns sensores para Zn^{2+} do tipo 'turn-on'.³⁰

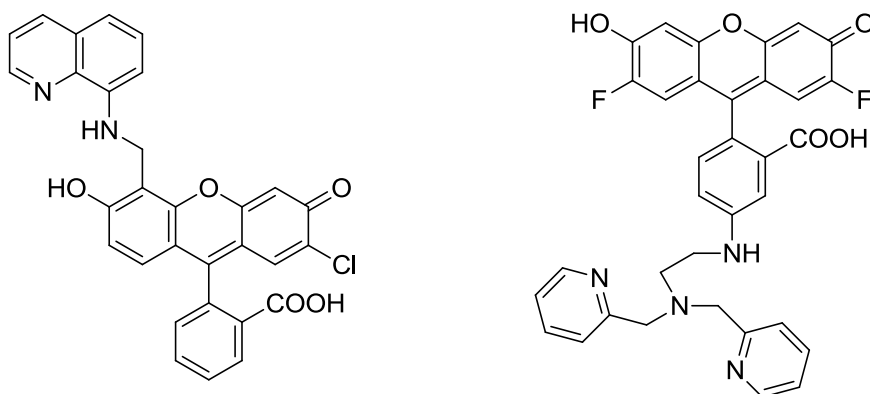


Figura 1.11 Duas sondas fluorescentes para Zn^{2+} do tipo 'turn-on'.³⁰

Em meio biológico é possível encontrar predominantemente estados de oxidação Fe^{2+} e Fe^{3+} , ligados a enzimas e proteínas de armazenamento. A detecção de ferro no meio celular por agentes fluorogénicos pode ser realizada por fenómenos de surgimento ou extinção de fluorescência. A Figura 1.12 ilustra estruturas de duas sondas fluorescentes para Fe(III) .^{31, 32}

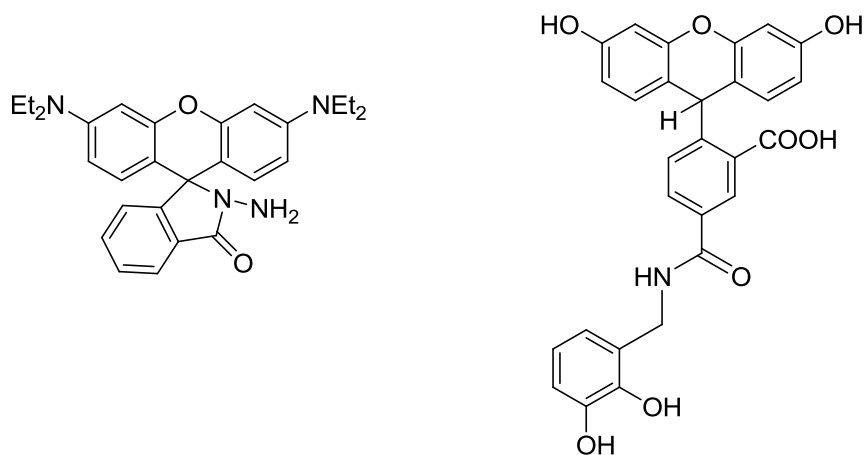


Figura 1.12 Duas sondas fluorescentes para Fe^{3+} do tipo 'turn-on' e 'turn-off', respetivamente.

1.4 Fluoróforos com aplicações ambientais

A contaminação ambiental por metais pesados tem contribuído para o desenvolvimento de novas técnicas de identificação e seletividade de modo a estudar a ação destes agentes tóxicos. Este problema reflete-se particularmente no meio aquático através da bioacumulação destes metais e respetiva persistência no meio ambiente. Metais pesados como o mercúrio, chumbo e cádmio são considerados neurotoxinas e têm efeitos nefastos a nível da saúde pré-natal e nos primeiros estágios de desenvolvimento infantil.

Os alvos mais prováveis de acumulação de chumbo e cádmio incluem proteínas dependentes de cálcio e zinco, e potenciais ligandos presentes nas células para espécies orgânicas de mercúrio incluindo a glutatona e outros antioxidantes. Porém, o mecanismo relacionado com a atividade tóxica destes metais permanece ainda pouco conhecido. Estas dificuldades motivam o desenvolvimento de moléculas fluorescentes que atuem como sensores na deteção de metais pesados em amostras biológicas.

Na Figura 1.13 apresenta-se o primeiro sensor de mercúrio desenvolvido por Lippard e Nolan. Além de detetar Hg^{2+} , apresenta também seletividade para outros iões de metal como é o caso do Pb^{2+} e Cd^{2+} . A Figura 1.13 apresenta ainda um outro sensor semelhante ao anterior, capaz de detetar os níveis de mercúrio presentes em amostras de águas.³⁰

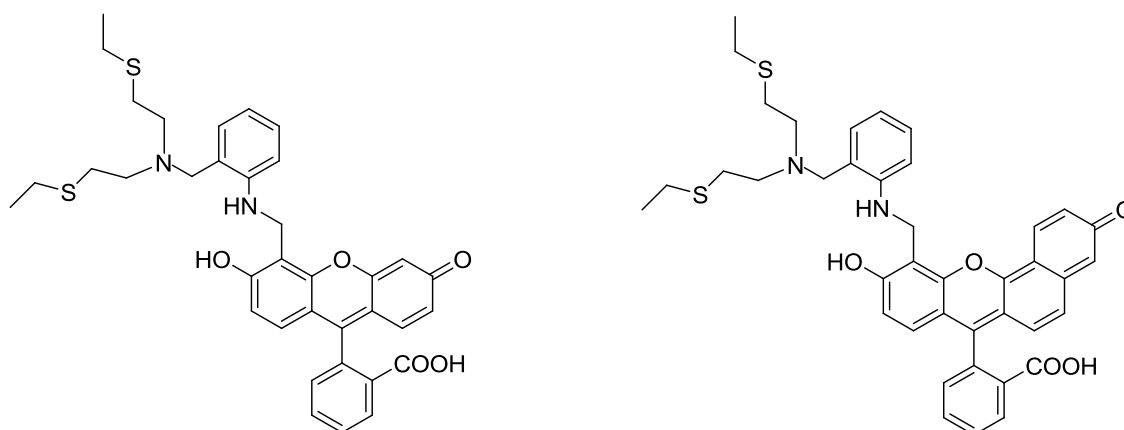


Figura 1.13 Duas sondas fluorescentes de Hg^{2+} .

Neste trabalho sintetizaram-se derivados de rosamina (Figura 1.14) com diferentes grupos substituintes ligados ao anel xanteno recorrendo a diferentes tipo de aquecimento, nomeadamente aquecimento convencional e micro-ondas. Em anexo encontra-se a lista relativa aos compostos sintetizados no âmbito deste trabalho. Com o intuito de explorar metodologias mais limpas e eficientes realizaram-se os seguintes estudos:

- Síntese de rosamina em meio aquoso recorrendo ao aquecimento Óhmico;
- Síntese de rosamina utilizando diferentes metodologias de oxidação;
- Estudo preliminar de síntese em fase sólida por imobilização de precursor em fase sólida, para posterior aplicação na síntese de rosamina.

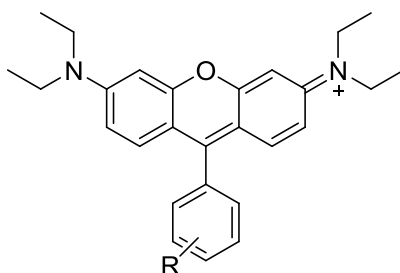


Figura 1.14 Derivados de rosamina preparados no âmbito deste trabalho.

Capítulo 2

Parte experimental

2. Parte experimental

2.1 Reagentes, solventes e equipamentos

Os reagentes comerciais utilizados na síntese dos compostos foram obtidos através da Sigma-Aldrich e não sofreram qualquer purificação prévia.

As balanças utilizadas nas pesagens foram: balança Analítica Metler AT 201 (2×10^{-5} g) e balança semi-analítica Metler (2×10^{-4} g).

As sínteses dos compostos foram realizadas recorrendo-se a diferentes tipos de aquecimento: aquecimento convencional, aquecimento por radiação micro-ondas e aquecimento em reator óhmico. No aquecimento convencional utilizaram-se placas de aquecimento Corning com sensor de temperatura, modelo (Cat. 6795PR). No aquecimento recorrendo à irradiação por micro-ondas utilizou-se um forno micro-ondas com sistema de cavidade monomodo da CEM Discover. O equipamento de aquecimento óhmico utilizado está a ser desenvolvido no Departamento de Química da Universidade de Aveiro ao abrigo do projeto FCT PTDC/QUI-QUI/102454/2008 e da patente Portuguesa “Reator com aquecimento óhmico para síntese química, respetivo método e suas aplicações” (PAT No 20111000073974).

As reações foram seguidas através de cromatografia em camada fina utilizando-se folhas de sílica gel 60 F₂₅₄. A separação dos compostos resultantes das várias misturas reacionais foi realizada utilizando a técnica de cromatografia rápida (“flash”) com sílica gel 60 (0,040-0,063 mm) da Merck. Para alguns compostos, para melhor separação, foi necessário recorrer à cromatografia em camada fina preparativa em placas de vidro (20x20 cm) revestidas por uma camada de sílica gel 60 F₂₅₄ (Merck) com cerca de 0,5 mm de espessura e secas em estufa a 100°C durante 10 horas.

Os espetros de RMN de ^1H e ^{13}C foram adquiridos no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear da Universidade do Porto (LRMN-CEMUP) e registados num aparelho Bruker Avance III 400. O espectrofotómetro opera à frequência de 400,15 MHz para ^1H e 100,62 MHz para ^{13}C . Nos espetros de RMN de ^1H e de ^{13}C foi usado como padrão interno o TMS ($\delta = 0$ ppm). Os desvios químicos são expressos em δ (ppm) e as constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz). Os espetros bidimensionais (2D) incluindo espetros de correlação $^1\text{H}/^1\text{H}$ (COSY), espetros de correlação $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ HSQC e HMBC foram adquiridos usando programas padrão disponíveis no espectrofotómetro.

Os espectros de massa e as análises elementares foram obtidos em Santiago de Compostela nas Unidades de Espetrometria de Massa e Análises Elementares, respetivamente.

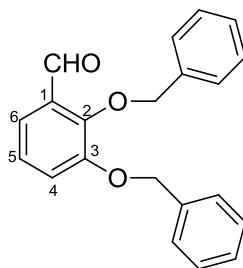
Os espectros eletrónicos de absorção foram obtidos através do espectrofotómetro Shimadzu UV3600 UVEVisNIR equipado com Varian Cary Single Cell Peltier Accessory para controlo da temperatura.

Os espectros de emissão de fluorescência foram obtidos através de um fluorímetro Varian Cary Eclipse TM equipado com Signal Cell Peltier Accessory para controlo da temperatura.

A caracterização dos compostos resultantes dos estudos de síntese em Fase Sólida foi realizada por espectroscopia vibracional de infra-vermelhos (IV) através do espectrómetro de FT-IV Jasco 460 Plus (alcance $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$), por difração de raios-X de pó e por microscopia de varrimento eletrónico (SEM) - microscópio eletrónico de varrimento de alta resolução FEI Quanta 400 FEG ESEM - e espectroscopia de energia dispersiva (EDS), equipado com um espectrofotómetro de microanálise de Raios-X EDAX Genesis X4M. As amostras foram analisadas em pó, revestidas por uma camada fina de ouro.

2.2 Síntese de precursores

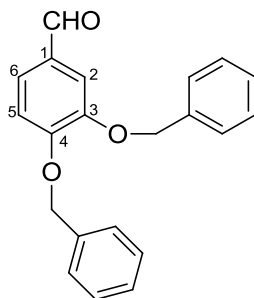
2.2.1 Síntese de 2,3-dibenziloxibenzaldeído (2,3-OBn)



Uma solução de 2,3-dihidroxibenzaldeído (1,00 g; 7,24 mmol) e carbonato de potássio (2,20 g; 15,9 mmol) em DMF (20 mL) a $0\text{ }^{\circ}\text{C}$, foi adicionado gota a gota, brometo de benzilo (1,89 mL; 15,9 mmol) sob atmosfera de árgon. Após agitação magnética durante 15 min a 0°C , a mistura reacional foi mantida em agitação à temperatura ambiente durante 6 h. De seguida, a mistura foi precipitada num banho de água e gelo e neutralizada com ácido cítrico. O sólido obtido foi filtrado e lavado com água. Por fim, o sólido foi dissolvido em clorofórmio e cristalizado em *n*-hexano.

Obteve-se 1,72 g de composto (rendimento 75%). RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ : 5,19 (2 H, s, 3- $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$); 5,20 (2 H, s; 2- $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$); 7,11 (1 H; dt; $J= 8,0$ e $J= 0,8$ Hz; H-5); 7,24 (1 H; dd; $J= 8,0$ e $J= 1,6$ Hz; H-4 ou H-6); 7,32-7,43 (9 H; m; H-Ar); 7,46-7,49 (2 H; m; H-Ar); 10,26 (1 H, d; $J= 0,8$, CHO) ppm.³³

2.2.2 Síntese de 3,4-dibenziloxibenzaldeído (3,4-OBn)



Uma solução de 3,4-dihidroxibenzaldeído (1,00 g; 7,24 mmol) e carbonato de potássio (2,20 g; 15,9 mmol) em DMF (20 mL) a 0°C , foi adicionado gota a gota, brometo de benzilo (1,89 mL; 15,9 mmol) sob atmosfera de argon. Após agitação magnética durante 15 min a 0°C , a mistura reacional foi mantida em agitação à temperatura ambiente durante 6 h. De seguida, a mistura foi precipitada num banho de gelo e água e neutralizada com ácido cítrico. O sólido obtido foi filtrado e lavado com água. Por fim, o sólido foi dissolvido em clorofórmio e cristalizado em *n*-hexano. Obteve-se 1,93 g de composto (rendimento de 84 %). RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ : 5,22 (2 H; s; 3- $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$); 5,26 (2 H; s; 4- $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$); 7,02 (1 H; d; $J= 8,0$ Hz; H-5); 7,32-7,49 (12 H; m; H-Ar); 9,81 (1 H; s; CHO) ppm.

2.3 Síntese de rosaminas utilizando diferentes métodos de aquecimento

2.3.1 Procedimento geral- Aquecimento convencional (banho de óleo)

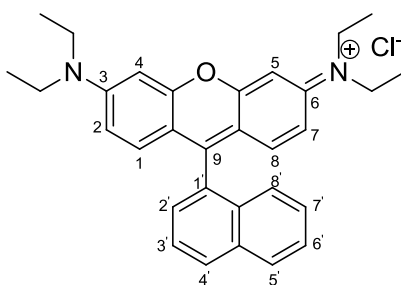
Uma solução de 3-dietilaminofenol (1,72 mmol), um aldeído aromático (0,86 mmol) e ácido *p*-TsOH (0,10 mmol) em ácido propiônico (10 mL) foi agitada a 65°C durante 16 h. Após arrefecimento à temperatura ambiente, a mistura reacional foi adicionada a uma solução aquosa de acetato de sódio 3 M (100 mL). A suspensão resultante foi extraída 3 vezes com clorofórmio. A fase orgânica foi seca com Na_2SO_4 anidro e evaporada à securo com a ajuda do evaporador rotativo. O sólido obtido foi dissolvido em 40 mL de uma mistura de clorofórmio/metanol (1:1) ao qual se adicionou cloranil (0,11 g; 0,43 mmol). A mistura foi vigorosamente agitada durante 2 h e concentrada em vácuo. O resíduo obtido foi purificado por “cromatografia rápida” utilizando uma mistura de clorofórmio/metanol (9:1) como eluente. Por fim, realizou-se

a mudança de contra-íção, utilizando uma solução aquosa saturada de NaCl e a suspensão resultante foi extraída 3 vezes com clorofórmio e seca com Na₂SO₄ anidro. O solvente foi evaporado e os compostos foram cristalizados em clorofórmio/metanol.

2.3.2 Procedimento geral- Aquecimento por micro-ondas

Uma solução de 3-dietilaminofenol (0,86 mmol), um aldeído aromático (0,43 mmol) e ácido *p*-TsOH (0,05 mmol) em ácido propiônico (5 mL) foi colocada num vaso reacional de 10 mL, que foi seguidamente fechado e colocado na cavidade do reator de micro-ondas CEM. A reação foi aquecida a 80°C (com 1 min de rampa a 80°C e 10 min de reação a 80°C, utilizando 100 W de potência máxima). Após arrefecimento até à temperatura ambiente, a mistura reacional foi adicionada a uma solução aquosa de acetato de sódio 3 M (50 mL). A suspensão resultante foi extraída 3 vezes com clorofórmio. A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ anidro e evaporada à secra com a ajuda do evaporador rotativo. O sólido obtido foi dissolvido em 40 mL de uma mistura de clorofórmio/metanol (1:1) ao qual se adicionou cloranil (0,11 g, 0,43 mmol). A mistura foi vigorosamente agitada durante 2 h e concentrada em vácuo. O resíduo obtido foi purificado por “cromatografia rápida” utilizando uma mistura de clorofórmio/metanol (9:1) como eluente. Por fim, realizou-se a mudança de contra-íção, utilizando uma solução saturada de NaCl e a suspensão resultante foi extraída 3 vezes com clorofórmio e seca com Na₂SO₄ anidro. O solvente foi evaporado e os compostos foram cristalizados em clorofórmio/metanol.

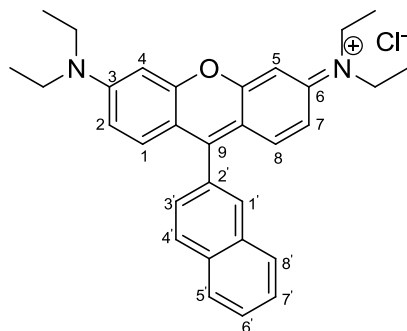
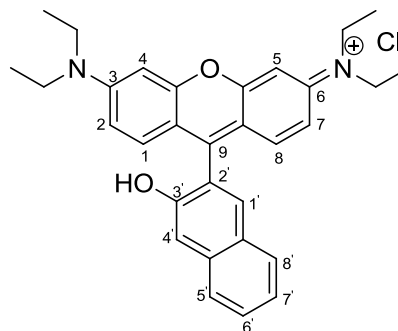
2.3.3 Rosamina 2 (*R*=1'-naftilo)



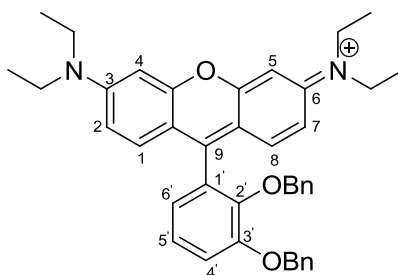
Obteve-se 60,7 mg (rendimento de 15%) de rosamina em aquecimento convencional e 71,5 mg (rendimento de 18%) em aquecimento por irradiação de micro-ondas. RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ: 1,33 (12 H, t, *J*= 7,2 Hz, 4x CH₃), 3,65 (8 H, q, *J*= 7,2 Hz, 4x CH₂), 6,77 (2 H, dd, *J*= 9,6 e *J*= 2,4 Hz, H-2 e H-7), 6,94 (2 H, d, *J*= 2,4 Hz, H-4 e H-5), 7,05 (2 H, d, *J*= 9,6 Hz, H-1 e H-8), 7,31-7,45 (3 H, m, H-2', H-6' e H-8') 7,57 e 7,69 (2 H, 2 t, *J*= 8,0 Hz, H-3' e H-7'), 8,01 e 8,10 (2 H, 2 d, *J*= 8.4 Hz, H-

4' e H-5') ppm. RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ : 12,8 (CH_3); 46,4 (CH_2); 96,9 (C-4 e C-5); 114,3 (C-2 e C-7); 114,4; 125,2; 125,3; 127,1 e 127,8 (C-2', C-3', C-6', C-7' e C-8'); 128,9 (C-4' ou C-5'); 129,6; 130,6 (C-4' ou C-5'); 131,6; 132,1 (C-1 e C-8); 133,5; 155,8 (C-3 e C-6); 156,7 (C-9); 158,1 (C-4a e C-5a) ppm. EM (FAB^+) m/z : 449 (M^+). $\text{C}_{31}\text{H}_{33}\text{ClN}_2\text{O}$. $1/2\text{H}_2\text{O}$. $1/2\text{CHCl}_3$. Calculado C, 68,32; H, 6,28; N, 5,06. Encontrado C, 68,48; H, 6,16; N, 4,44.

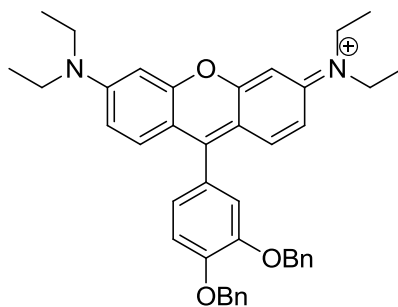
2.3.4 Rosamina 3 ($R=2'$ -naftilo) e análogo hidroxilado 3a

**3****3a**

Obteve-se 114 mg (rendimento de 30 %) de rosamina **3** em aquecimento convencional e 115 mg (rendimento 30%) em aquecimento por irradiação de micro-ondas. O análogo hidroxilado **3a** foi obtido em pequena quantidade, independentemente do tipo de aquecimento utilizado. RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) δ : 1,36 (12 H; t; $J=7,2$ Hz; 4x CH_3); 3,68 (8 H; q; $J=7,2$ Hz; 4x CH_2); 6,91 (2 H; d; $J=2,4$ Hz; H-4 e H-5); 6,98 (2 H; dd; $J=9,4$ e $J=2,4$ Hz; H-2 e H-7); 7,47 (2 H; d; $J=9,4$ Hz; H-1 e H-8); 7,52 (2 H; dd; $J=8,4$ e $J=1,6$ Hz; H-3'); 7,66-7,73 e 7,95-8,06 (5 H; 2 m; H-1'; H-5'; H-6'; H-7' e H-8'); 8,14 (1 H; d; $J=8,4$ Hz; H-4') ppm. RMN de ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) δ : 12,8 (CH_3); 46,5 (CH_2); 96,9 (C-4 e C-5); 114,1 (C-1a e C-8a); 114,7 (C-2 e C-7); 126,7 (C-3'); 128,1; 128,50; 128,54; 128,8; 129,4 (C-4'); 129,7; 130,0; 132,9 (C-1 e C-8); 133,2; 134,4; 156,2 (C-3 e C-6); 158,5 (C-9); 158,7 (C-4a e C-5a) ppm. EM (FAB^+) m/z : 449 (M^+). $\text{C}_{31}\text{H}_{33}\text{ClN}_2\text{O}$. $3/2\text{H}_2\text{O}$. $1/2\text{CHCl}_3$ Calculado C; 66,17; H; 6,43; N; 4,90. Encontrado C; 66,59; H; 6,38; N; 4,51.

2.3.5 Rosamina **4a** ($R=2',3'$ -OBn)

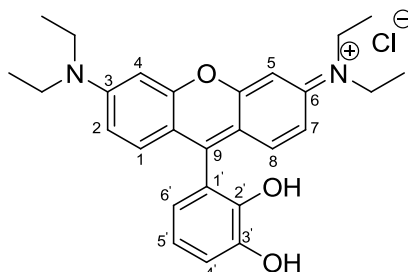
Obteve-se 191 mg (rendimento de 36%) de rosamina **4a** em aquecimento convencional e 203 mg (rendimento 38%) em aquecimento por irradiação de micro-ondas. RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ : 1,33 (12 H, t, $J=7,2$ Hz, 4x CH_3), 3,64 (8 H, q, $J=7,2$ Hz, 4x CH_2), 4,88 (2 H, s, $2'\text{-CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$), 5,27 (2 H, s, $3'\text{-CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$), 6,74-6,76 (3 H, m, H-Ar); 6,77 (2 H, d, $J=2,4$ Hz, H-4 e H-5), 6,82 (2 H, dd, $J=9,4$ e $J=2,4$ Hz, H-2 e H-7); 6,93-7,03 (3 H, m, H-Ar); 7,19 (2 H, d, $J=9,4$ Hz, H-1 e H-8); 7,23-7,27 e 7,36-7,52 (7 H, 2 m, H-Ar) ppm. RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ : 12,7 (CH_3); 46,2 (CH_2); 71,2 ($3'\text{-CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$); 75,2 ($2'\text{-CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$); 96,2 (C-4 e C-5); 113,7; 114,0; 116,0 (C-2 e C-7); 122,4; 124,8; 126,7; 127,6; 127,8; 128,0; 128,4; 128,7; 132,2 (C-1 e C-8); 136,2; 136,6; 145,5 (C-2'); 152,3 (C-3'); 155,1 (C-9); 155,4 (C-3 e C-6); 157,7 (C-4a e C-5a) ppm.

2.3.6 Rosamina **5a** ($R=3',4'$ -OBn)

Obteve-se 66,6 mg (rendimento de 12%) de rosamina **5a** em aquecimento convencional e 339 mg (rendimento de 61%) em aquecimento por irradiação de micro-ondas. RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ : 1,32 (12 H, t, $J=7,2$ Hz, 4x CH_3), 3,63 (8 H, q, $J=7,2$ Hz, 4x CH_2), 5,24 (2 H, s, $3'\text{-CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$), 5,31 (2 H, s, $4'\text{-CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$), 6,77 (2 H, d, $J=2,4$ Hz, H-4 e H-5), 6,80 (2 H, dd, $J=9,6$ e $J=2,4$ Hz, H-2 e H-7), 6,89 (1 H, d, $J=2,0$ Hz, H-2'), 6,92 (1 H, dd, $J=8,0$ e $J=2,0$ Hz, H-6'), 7,17 (1 H, d, $J=8,0$ Hz, H-5'), 7,27 (2 H, d, $J=9,6$ Hz, H-1 e H-8), 7,31-7,45 (8 H, m, H-Ar), 7,53 (2 H, d, $J=7,2$ Hz, H-Ar) ppm. RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ : 12,8 (CH_3); 46,2 (CH_2); 71,2 e 71,3 ($\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$); 96,5 (C-4 e C-5); 113,2 (C-1a e C-8a); 114,1 (C-2 e C-7); 114,4 (C-5');

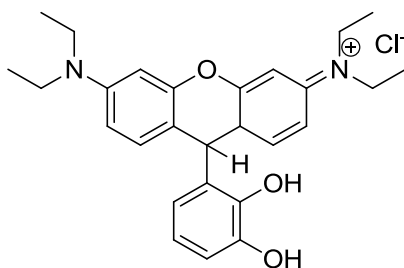
116,9 (C-2'); 123,8 (C-6'); 124,2 (C-1'); 127,37; 127,41; 128,0; 128,2; 128,76; 128,79; 132,2 (C-1 e C-8); 136,6; 136,7; 148,4 (C-3'); 151,1 (C-4'); 155,4 (C-3 e C-6); 157,1 (C-9); 158,0 (C-4a e C-5a) ppm.

2.3.7 Rosamina **4b** (R=2',3'-OH)



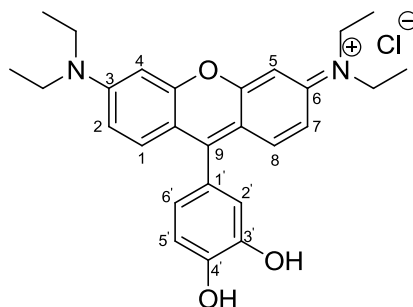
Dissolveu-se a rosamina **4a** (R=2',3'-OBn) em diclorometano anidro (10 mL). A solução obtida foi colocada em banho de gelo e sal, sob atmosfera de argon, e de seguida, adicionou-se gota a gota uma solução 1 M de BCl₃ em diclorometano (1 mL). A mistura foi mantida em agitação magnética, à temperatura ambiente, e sob atmosfera de argon durante 15 h. Adicionou-se metanol (5 mL) e a reação continuou por mais 1 h à temperatura ambiente. Por fim, concentrou-se a mistura com a ajuda do evaporador rotativo, tendo-se obtido 146 mg (rendimento de 27%). RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 1,21 (12 H, t, J= 7,2 Hz, 4x CH₃), 3,65 (8 H, q, J= 6,8 Hz, 4x CH₂), 6,66 (1 H, d, J= 7,6 Hz, H-6'), 6,89 (1 H, dd, J= 8,0 e J= 7,6 Hz, H-5'), 6,96 (2 H, d, J= 2,2 Hz, H-4 e H-5), 7,07 (1 H, d, J= 8,0 Hz, H-4'), 7,14 (2 H, dd, J= 9,4 e J= 2,2 Hz, H-2 e H-7), 7,26 (2 H, d, J= 9,4 Hz, H-1 e H-8), 9,00 (1 H, s, OH), 9,96 (1 H, s, OH) ppm. RMN de ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ: 12,5 (CH₃); 45,3 (CH₂); 95,8 (C-4 e C-5); 113,0 (C-1a e C-8a); 114,3 (C-2 e C-7); 117,2 (C-4'); 119,3 (C-1'); 119,5 (C-5'); 120,4 (C-6'); 131,9 (C-1 e C-8); 143,0 (C-2'); 145,8 (C-3'); 155,1 (C-3 e C-6); 155,6 (C-9); 157,4 (C-4a e C-5a) ppm. EM (ESI) m/z: 431,2 (M)⁺. C₂₇H₃₁ClN₂O₃. 3/2CH₂Cl₂ Calculado C; 57,59; H; 5,77; N; 4,71. Encontrado C; 58,07; H; 5,46; N; 4,75.

2.3.8 Rosamina **4c** (R=2',3'-OH e H-9)



Dissolveu-se a rosamina **4a** (R=2,3-OBn) em etanol absoluto (5 mL) ao qual se adicionou 4 gotas (quantidade catalítica) de ácido clorídrico. De seguida, sob atmosfera de árgon, adicionou-se uma quantidade catalítica de Pd/C 10%. O vaso reacional foi colocado no hidrogenador à pressão de 5 bar. Após 15 h de reação filtrou-se o catalizador e lavou-se com uma mistura de diclorometano/ metanol (8:2). A mistura foi concentrada com a ajuda do evaporador rotativo (obteve-se o composto em pequena quantidade). RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) δ : 1,18 (12 H, t, $J = 7,2$ Hz, 4x CH_3), 3,68-3,70 (8 H, m, 4x CH_2), 5,82 (1 H, s, H-9), 6,45 (1 H, dd, $J = 7,6$ e $J = 1,6$ Hz, H-6'), 6,60 (1 H, dd, $J = 8,0$ e $J = 7,6$ Hz, H-5'), 6,70 (1 H, dd; $J = 8,0$ e $J = 1,6$ Hz, H-4'), 7,23 (2 H, dd, $J = 8,4$ e $J = 2,4$ Hz, H-2, 7), 7,42 (2 H, d, $J = 8,4$ Hz, H-1, 8), 7,47 (2 H, d, $J = 2,4$ Hz, H-4, 5).

2.3.9 Rosamina **5b** (R=3',4'-OH)



Dissolveu-se a rosamina **5a** (R=3',4'-OBn) em diclorometano anidro (10 mL). A solução obtida foi colocada em banho de gelo e sal, sob atmosfera de árgon, e de seguida, adicionou-se gota a gota uma solução 1 M de BCl_3 em diclorometano (1 mL). A mistura foi mantida em agitação magnética, à temperatura ambiente, e sob atmosfera de argon durante 15 h. Adicionou-se metanol (5 mL) e a reação continuou por mais 1 h à temperatura ambiente. Por fim, concentrou-se a mistura com a ajuda do evaporador rotativo, tendo-se obtido 241 mg (rendimento de 43%). RMN de ^1H (400 MHz, DMSO-d_6) δ : 1,23 (12 H, t, $J = 7,2$ Hz, 4x CH_3), 3,65 (8 H, q, $J = 6,8$ Hz, 4x CH_2), 6,79 (1 H, dd, $J = 8,0$ and $J = 2,1$ Hz, H-6'), 6,94 (3 H, d, $J = 2,1$ Hz, H-4, H-5 e H-2'), 7,05 (1 H, d, $J = 8,0$ Hz, H-5'), 7,16 (2 H, dd, $J = 9,8$ e $J = 2,1$ Hz, H-2 e H-7), 7,47 (2 H, d, $J = 9,8$ Hz, H-1 e H-8), 9,77 (2 H, s largo, 2x OH) ppm. RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO-d_6) δ : 12,5 (CH_3); 45,3 (CH_2); 95,9 (C-4 e C-5); 112,5 (C-1a e C-8a); 114,2 (C-2 e C-7); 116,0 (C-5'); 117,3 (C-2'); 121,7 (C-6'); 122,3 (C-1'); 132,1 (C-1 e C-8); 145,6 (C-3'); 147,8 (C-4'); 154,9 (C-3 e C-6); 157,3 (C-9); 157,4 (C-4a e C-5a) ppm. EM (ESI) m/z : 431,2

(M)⁺: C₂₇H₃₁ClN₂O₃ 1/2CH₂Cl₂ Calculado C; 64,83; H; 6,33; N; 5,50. Encontrado C; 64,41; H; 6,28; N; 5,42.

2.3.10 Estudo das propriedades fotofísicas da rosamina **5b**

2.3.10.1 Estudo da variação do espectro de UV-Vis com o pH

Foi preparada uma solução stock de rosamina **5b** (R=3,4-OH) em água com a concentração de $1,93 \times 10^{-4}$ M. A partir desta solução preparou-se outra mais diluída ($1,6 \times 10^{-5}$ M) para se realizar este estudo. Ajustou-se a força iônica desta solução com 0,1 M NaCl. Para cada valor de ajuste de pH – obtido a partir da adição de pequenas alíquotas de HCl e NaOH – a solução foi transferida para uma cuvete e adquirido o respetivo espectro de absorvância. Os espectros foram obtidos entre 200 e 1100 nm, a 25°C. Cada ensaio incluiu várias amostras a partir da solução preparada a diferentes pH abrangendo a gama de pH 1,5 a 12.

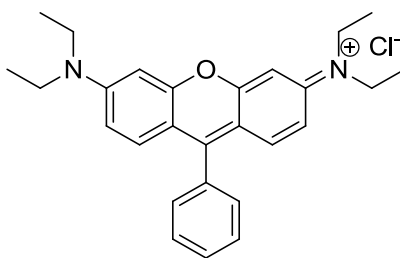
2.3.10.2 Estudo da variação do espectro de fluorescência com o pH

Os espectros de emissão de fluorescência para a rosamina **5b** (R=3,4-OH) foram obtidos a partir de uma solução do mesmo ($1,16 \times 10^{-6}$ M) em água, a 25 °C, com fenda 5, λ_{exc} = 554 nm, na gama de aquisição de 555 a 700 nm. Nos ensaios realizados para este estudo, foram utilizadas amostras da solução previamente preparada às quais foram adicionadas alíquotas de ácido e base (HCl e NaOH, respetivamente) na gama de pH de 1,5 a 12 obtendo-se os respetivos espectros.

2.4 Síntese de rosamina em meio aquoso recorrendo ao aquecimento Óhmico

Uma solução de 3-dietilaminofenol (1,57 mmol), benzaldeído (0,984 mmol) e ácido *p*-TsOH (0,121 mmol) em água (15 mL) foi colocada num vaso reacional de 50 mL. A mistura resultante foi aquecida até entrar em refluxo (2 min de rampa de aquecimento até 100°C) e mantida em refluxo durante 10 min. Depois deixou-se arrefecer à temperatura ambiente e desprezou-se a fase aquosa com a ajuda de uma pipeta de Pasteur. O sólido obtido foi dissolvido em 40 mL de uma mistura clorofórmio/metanol (1:1) ao qual foi adicionado cloranil (0,103 g; 0,422 mmol). A mistura foi agitada durante 15 min e de seguida concentrada em vácuo. O produto obtido foi purificado por cromatografia rápida utilizando-se como eluente a mistura clorofórmio/metanol (9:1).

2.4.1 Rosamina 1 (R=H)



Obteve-se 96 mg (rendimento de 45%) de rosamina 1 utilizando o aquecimento com irradiação micro-ondas e 131 mg (rendimento de 31%) no aquecimento Óhmico. RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ : 1,34 (12 H, t, $J=7,2$ Hz, 4x CH_3), 3,67 (8 H, q, $J=7,2$ Hz, 4x CH_2), 6,86 (2 H, d, $J=2,4$ Hz, H-4 e H-5), 6,95 (2 H, dd, $J=9,6$ e $J=2,4$ Hz, H-2 e H-7), 7,36 (2 H, d, $J=9,6$ Hz, H-1 e H-8), 7,37-7,39 (2 H, m, H-2' e H-6'), 7,61-7,64 (3 H, m, H-3', H-4' e H-5') ppm. RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ : 12,8 (CH_3); 46,4 (CH_2); 96,7 (C-4 e C-5); 113,5 (C-1a e C-8a); 114,4 (C-2 e C-7); 129,1 (C-3' e C-5'); 129,5 (C-2' e C-6'); 130,5 (C-4'); 131,9 (C-1'); 132,3 (C-1 e C-8); 155,7 (C-3 e C-6); 157,5 (C-9); 158,2 (C-4a e C-5a) ppm. EM (FAB $^+$) m/z : 399 (M^+). $\text{C}_{27}\text{H}_{31}\text{N}_2\text{OCl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. CHCl_3 Calculado C, 56,96; H, 6,15; N, 4,74. Encontrado C, 57,08; H, 6,20; N, 4,77.

2.5 Síntese de rosaminas utilizando diferentes metodologias de oxidação

Os ensaios relativos à etapa de oxidação, recorrendo ao uso de diferentes metodologias, foram realizados na sequência da reação de condensação de 3-dietilaminofenol com benzaldeído de acordo com o procedimento geral descrito anteriormente, usando o aquecimento por micro-ondas. Deste modo, os estudos realizados descrevem tentativas de oxidação da rosamina 1.

2.5.1 Oxidação com cloranil em aquecimento por micro-ondas

Para se proceder à etapa de oxidação concentrou-se a mistura reacional com a ajuda do evaporador e dissolveu-se em 4 mL de uma mistura de diclorometano/ metanol (1:1). De seguida adicionou-se cloranil (61,0 mg). A mistura foi colocada num vaso reacional de 10 mL, que foi seguidamente fechado e colocado na cavidade do reator de micro-ondas CEM. A reação foi aquecida a 60°C (com 1 min de rampa a 60°C e 10 min de reação a 60°C, utilizando 50 W de potência máxima). O resíduo obtido foi purificado por "cromatografia rápida" utilizando uma mistura de clorofórmio/ metanol (9:1) como eluente. A rosamina 1 (95,5 mg) foi obtida com rendimento de 44%.

2.5.2 Oxidação com DDQ em aquecimento por micro-ondas

Para se proceder à etapa de oxidação concentrou-se a mistura reacional com a ajuda do evaporador e dissolveu-se em 4 mL de uma mistura de diclorometano/metanol (1:1). De seguida adicionou-se DDQ (56,0 mg). A mistura foi colocada num vaso reacional de 10 mL, que foi seguidamente fechado e colocado na cavidade do reator de micro-ondas CEM. A reação foi aquecida a 60°C (com 1 min de rampa a 60°C e 10 min de reação a 60°C, utilizando 50 W de potência máxima). O resíduo obtido foi purificado por “cromatografia rápida” utilizando uma mistura de clorofórmio/metanol (9:1) como eluente. A rosamina **1** (36,0) foi obtida com rendimento de 30%.

2.5.3 Oxidação com dióxido de manganês em aquecimento por micro-ondas

Para se proceder à etapa de oxidação concentrou-se a mistura reacional com a ajuda do evaporador e dissolveu-se em 4 mL de diclorometano. Adicionou-se de seguida 5 equivalentes molar (0,213 g, 2,46 mmol) de dióxido de manganês. A mistura foi colocada num vaso reacional de 10 mL, que foi seguidamente fechado e colocado na cavidade do reator de micro-ondas CEM. A reação foi aquecida a 100°C (com 1 min de rampa a 100°C e 1 min de reação a 100°C, utilizando 50 W de potência máxima). O resíduo obtido foi purificado por “cromatografia rápida” utilizando uma mistura de clorofórmio/ metanol (9:1) como eluente. A rosamina **1** foi obtida em pequena quantidade.

2.5.4 Oxidação catalítica com peróxido de hidrogénio

Para se proceder à etapa de oxidação concentrou-se a mistura reacional com a ajuda do evaporador e dissolveu-se em 5 mL de etanol. De seguida adicionou-se o complexo de Fe(III) da porfirina (**iii**) (6,0 mg) e o aducto H₂O₂-ureia (232,9 mg). A mistura foi colocada num vaso reacional de 10 mL, que foi seguidamente fechado e colocado na cavidade do reator de micro-ondas. A reação foi aquecida a 60°C (com 1 min de rampa a 60°C e 40 min de reação a 60°C, utilizando 60 W de potência máxima). A evolução da reação foi controlada por TLC, no entanto a baixa quantidade de rosamina **1** obtida não justificou a purificação da mistura reacional.

2.5.5 Oxidação com óxido de grafeno

Para se proceder à etapa de oxidação concentrou-se a mistura reacional com a ajuda do evaporador e dissolveu-se em 5 mL de etanol. De seguida adicionou-se óxido de grafeno (50,0 mg) e aducto H₂O₂-ureia (230 mg). A mistura foi colocada num vaso

reacional de 10 mL, que foi seguidamente fechado e colocado na cavidade do reator de micro-ondas CEM. A reação foi aquecida a 60°C (com 1 min de rampa a 60°C e 40 min de reação a 60°C, utilizando 60 W de potência máxima). A evolução da reação foi controlada por TLC, no entanto a baixa quantidade de rosamina **1** obtida não justificou a purificação da mistura reacional.

2.6 Síntese orgânica em fase sólida

2.6.1 Material MCM-41

A funcionalização do material MCM-41 (500 mg) foi efectuada com 3-(cloropropil)-trimetiloossilano (25 µL) dissolvido em tolueno anidro (20 mL). A mistura foi mantida em aquecimento a 70 °C e atmosfera de árgon durante 24 h. Por fim, a mistura foi filtrada, obtendo-se um sólido branco.

2.6.2 Reação de MCM-41 com o ligando vanilina

Dissolveu-se vanilina (92,0 mg; 0,605 mmol) em DMF seca (5 mL). De seguida, adicionou-se Cs₂CO₃ (0,197 g; 0,606 mmol) e, cerca de 20 min depois, adicionou-se o material MCM-41 (180 mg). A mistura foi mantida em aquecimento a 50°C, e atmosfera de árgon durante 24 h. Por fim, o composto foi filtrado e lavado com DMF, diclorometano, metanol e éter dietílico (5x15 mL cada) e deixou-se a evaporar.

Capítulo 3

Resultados e discussão

3. Resultados e discussão

3.1 Síntese de precursores

3.1.1 Síntese de 2,3-dibenziloxibenzaldeído (2,3-OBn) e 3,4-dibenziloxibenzaldeído (3,4-OBn)

Para se proceder à obtenção das rosaminas **4b** (R=2',3'-OH) e **5b** (R=3',4'-OH) foi necessário sintetizar, previamente, os respectivos precursores, 2,3-dibenziloxibenzaldeído (**2,3-OBn**) e 3,4-dibenziloxibenzaldeído (**3,4-OBn**). As rosaminas referidas contêm na sua estrutura uma unidade catecol. No entanto, para facilitar a sua preparação os grupos hidroxilo desta unidade foram previamente submetidos a uma reação com brometo de benzilo de modo a serem protegidos. A reação de proteção é descrita no Esquema 3.1 e Esquema 3.2, e envolve a benzilação dos grupos hidroxilo dos catecóis.

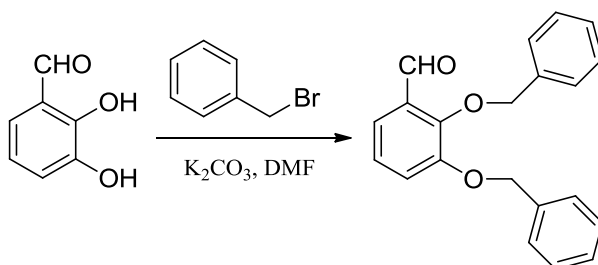


Figura 3.1 Síntese do precursor 2,3-OBn.

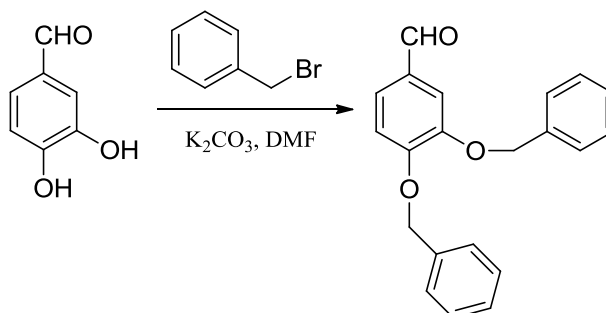


Figura 3.2 Síntese do precursor do 3,4-OBn.

Ambos os precursores, **2,3-OBn** e **3,4-OBn**, foram obtidos com bons rendimentos, 75% e 84%, respetivamente. O precursor substituído na posição *orto* (2,3-OBn) apresenta um valor de rendimento relativamente mais baixo que pode ser explicado pelo facto de nesta posição existir maior impedimento estérico em relação ao grupo aldeído do anel aromático.

3.1.2 Caracterização estrutural

Relativamente à caracterização por espectroscopia de ressonância magnética nuclear, verifica-se que as interações eletrônicas de grupos substituintes com o sistema de eletrões π estão bem presentes nos derivados do benzeno. Os grupos substituintes podem aumentar ou diminuir a densidade eletrônica do anel, em particular em determinadas posições desse mesmo anel, por efeitos indutivos ou por efeitos de ressonância. Substituintes dadores de eletrões aumentam a densidade eletrônica do anel benzénico, principalmente das posições *orto* e *para* (ex. grupos OR, OH, NH₂, etc) e consequentemente provocam uma maior blindagem desses prótons, surgindo a ressonância destes a menores valores de desvio químico do que os do benzeno não substituído. Pelo contrário, os substituintes atraidores de eletrões, como é exemplo o grupo CHO, diminuem a densidade eletrônica dos anéis benzénicos, fazendo-se sentir este efeito mais significativamente nas posições *orto* e *para* provocando desproteção dos seus prótons, tal como se verifica no Esquema 3.3. Os sinais correspondentes à ressonância destes prótons surgem assim a maiores valores de desvio químico do que os do benzeno não substituído.

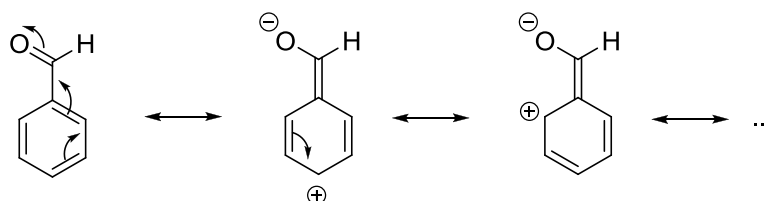


Figura 3.3 Estruturas de ressonância em derivados do benzaldeído.

A Tabela 3.1 mostra os desvios químicos (em ppm) dos sinais atribuídos à ressonância dos prótons de ambos os precursores **2,3-OBn** e **3,4-OBn** sintetizados.

Tabela 3.1. Comparação dos valores dos desvios químicos (ppm) dos espectros de RMN de ¹H dos precursores 2,3-OBn e 3,4-OBn em CDCl₃.

Precursor	CHO	H-Ar	OCH ₂ C ₆ H ₅
2,3-OBn	10,26	7,46-7,49	5,20 (2-CH ₂ -)
		7,32-7,43	5,19 (3-CH ₂ -)
		7,24 (H-4 ou H-6)	
		7,11 (H-5)	
3,4-OBn	9,81	7,32-7,49	5,26 (4-CH ₂ -)
		7,02 (H-5)	5,22 (3-CH ₂ -)

Observando a Tabela 3.1, verifica-se então que os sinais correspondentes à ressonância dos prótons 2-CH₂ e 4-CH₂, isto é posições *orto* e *para*, surgem relativamente mais desprotegidos, com valores de desvios químicos de 5,20 e 5,26 ppm, do que os sinais atribuídos à ressonância dos prótons 3-CH₂, posição *meta*, que surgem a 5,19 e 5,22 ppm, respetivamente nos derivados **2,3-OBn** e **3,4-OBn**.

A ressonância do próton do grupo aldeído surge a valores de desvio químico particularmente elevados ($\delta_H \sim 10$ ppm) que se deve em larga medida à presença do átomo de oxigénio, muito eletronegativo, e ao efeito da anisotropia magnética da ligação C=O. Particularmente, no precursor **2,3-OBn** a ressonância do próton surge a 10,26 ppm, enquanto que no precursor **3,4-OBn** a ressonância do próton surge a 9,81 ppm. Tipicamente a ressonância do próton do grupo aldeído aparece a 9,87 ppm no caso do benzaldeído³⁴ o que sugere que no precursor **2,3-OBn** exista uma desproteção devido à presença do grupo substituinte OCH₂C₆H₅ na posição *orto*.

Existem exemplos em que o arranjo geométrico em zig-zag proporciona constantes de acoplamento de longa distância especialmente significativas. Tal verificou-se para o precursor **2,3-OBn** pelo aparecimento do sinal atribuído ao próton do grupo formilo com constante de acoplamento $^5J_{HH} = 0,8$ Hz à semelhança do exemplo do 2-clorobenzaldeído com $^5J_{HH} = 0,7$ Hz, tal como mostra a Figura 3.4.³³

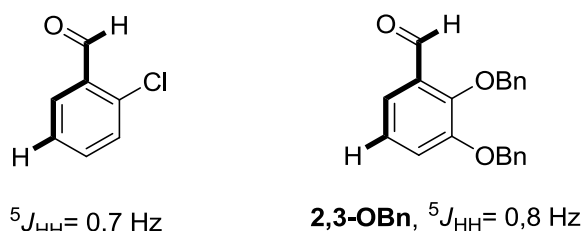
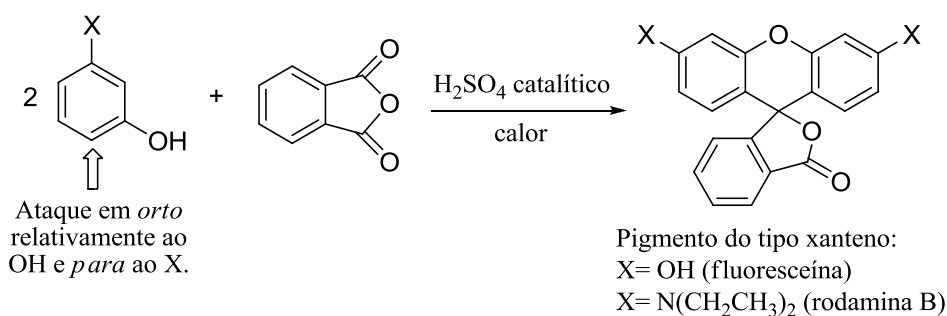


Figura 3.4 Constantes de acoplamento de longa distância de arranjo geométrico em zig-zag.

3.2 Síntese de rosaminas utilizando diferentes métodos de aquecimento

3.2.1 Síntese das rosaminas **2**, **3**, **4a** e **5a** ($R = 1'$ -naftilo, $2'$ -naftilo, **2,3-OBn**, **3,4-OBn**)

As rosaminas preparadas, no âmbito deste trabalho, contêm no seu esqueleto um anel xanteno, podendo ser comparadas a outros pigmentos deste tipo, como por exemplo, a fluoresceína e a rodamina B. Esta família de pigmentos segue uma rota de síntese do tipo substituição eletrofílica aromática (Esquema 3.1).



Esquema 3.1 Pigmentos sintetizados através de reações de substituição eletrofílica aromática.

Os derivados de rodamina funcionalizados são geralmente preparados através de reações de condensação e sob condições fortemente ácidas, apresentando dificuldades na purificação, uma vez que se obtêm misturas de 4'- e 5'-regioisómeros, que são difíceis de separar. Assim as rosaminas, por não possuírem o grupo ácido carboxílico na posição 2', são consideradas uma boa alternativa às rodaminas clássicas, uma vez que a síntese destes compostos conduz à formação de um único regioisómero (Figura 3.5).³⁵

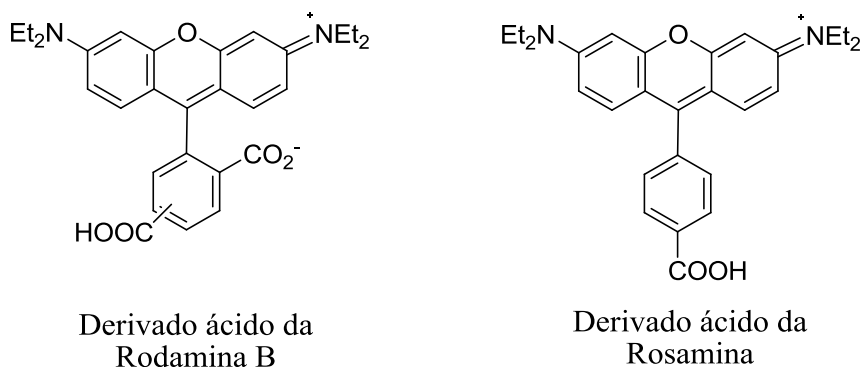


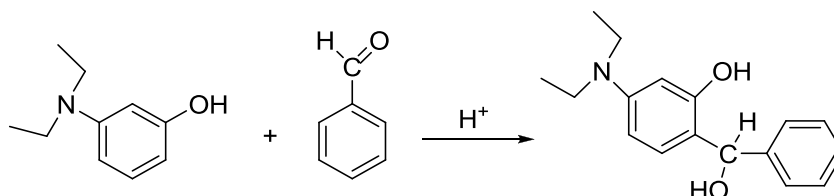
Figura 3.5 Estruturas dos compostos rodamina B e rosamina, respetivamente.

Neste trabalho, procedeu-se à síntese de rosaminas recorrendo a uma rota de síntese semelhante, envolvendo a reação de 3-dietilaminofenol com um benzaldeído em meio ácido, seguindo-se uma etapa de oxidação com cloranil. As reações de síntese foram realizadas por diferentes tipos de aquecimento: aquecimento clássico (banho de óleo) e aquecimento por radiação micro-ondas.

Relativamente à síntese de rosaminas considera-se que a sua rota de síntese é semelhante à dos derivados da fluoresceína. A rosamina deverá formar-se ao longo de 3 etapas. Sendo que a primeira envolve a formação de um carbocátion por protonação do

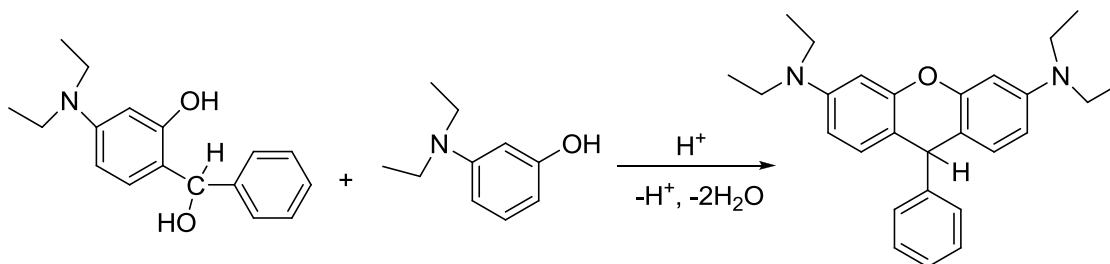
átomo de oxigênio do grupo carbonilo do benzaldeído, carbocatião esse que irá reagir com o fenol substituído segundo uma reação de substituição eletrofílica aromática.

1ª Etapa



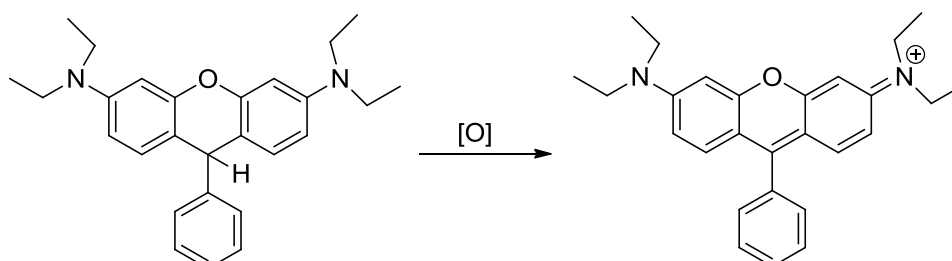
Na 2ª etapa o intermediário formado é protonado e gera um novo carbocatião que vai sofrer nova reação de substituição eletrofílica aromática. O átomo de oxigênio do anel aromático adjacente sofre um ataque nucleofílico ao catião formado gerando uma nova ligação éter entre os dois anéis aromáticos. A subsequente desidratação restaura o carácter aromático do anel conduzindo à formação do anel xanteno.

2ª Etapa



Por último, a oxidação do anel formado conduz à síntese do esqueleto da rosamina.

3ª Etapa



Inicialmente, foram sintetizadas duas rosaminas com os grupos 1-naftilo e 2-naftilo ligados ao anel xanteno formando as respectivas rosaminas **2** (R= 1'-naftilo) e **3**

(R= 2'-naftilo), recorrendo ao aquecimento convencional através de banho de óleo e aquecimento por micro-ondas utilizando um dispositivo CEM Discover que se trata de um reator com cavidade monomodo (Figura 3.6).

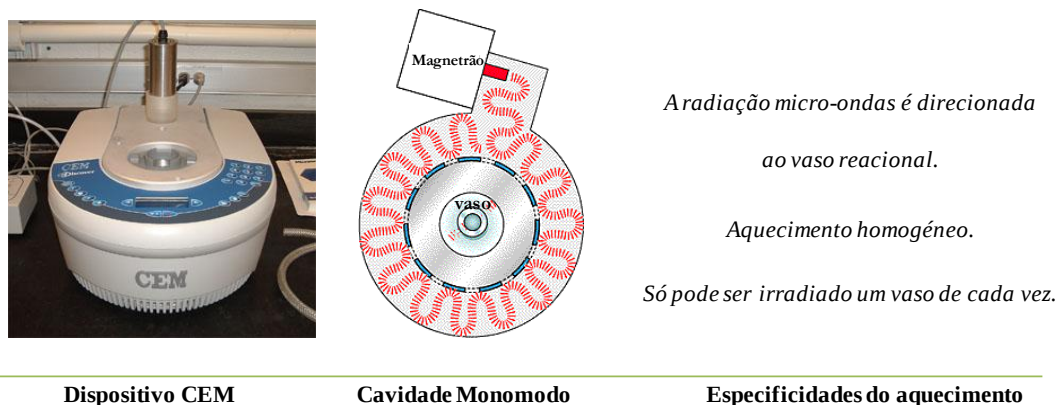
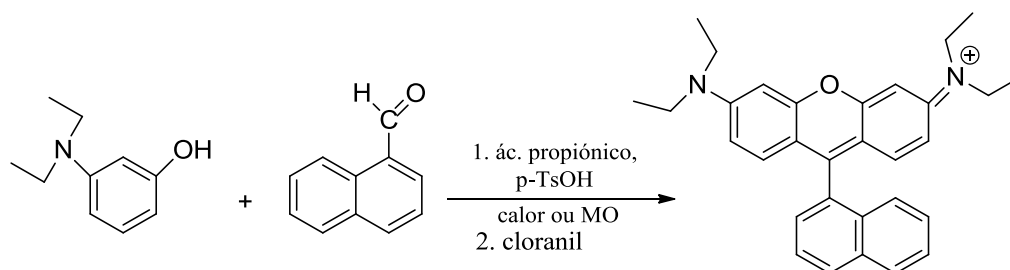


Figura 3.6 Reator micro-ondas CEM Discover.

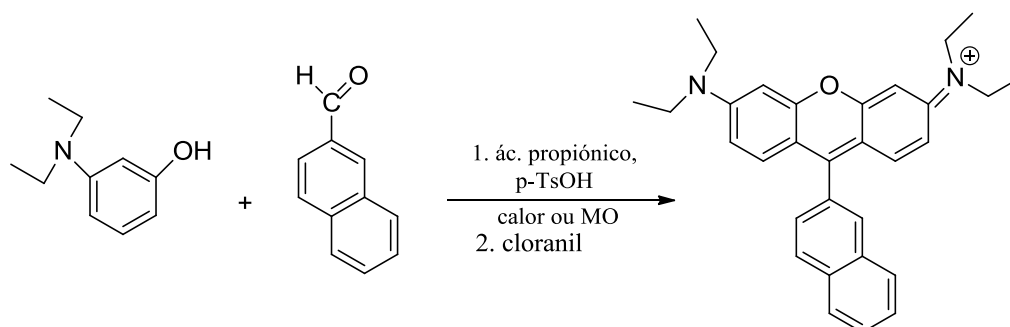
Na síntese da rosamina 2 (R= 1'-naftilo) foi usada a reação entre 1-naftaldeído e 3-dietilaminofenol, em meio ácido (ácido propiônico), na presença de *p*-TsOH, seguida por oxidação com cloranil (Esquema 3.2). Para esta rosamina obteve-se os seguintes rendimentos, 15% e 18%, para o aquecimento convencional e aquecimento por micro-ondas, respetivamente. A reação ocorrida em micro-ondas apresenta vantagens comparativamente à reação em aquecimento convencional, nomeadamente, o tempo de reação que para o primeiro tipo de aquecimento é de apenas 10 min enquanto que, no aquecimento convencional, o tempo de reação foi de 16 h (Tabela 3.2).



Esquema 3.2 Síntese da rosamina 2 (R= 1'-naftilo).

Relativamente à síntese que conduziu à formação da rosamina 3 (R= 2'-naftilo) os protocolos utilizados foram semelhantes aos da síntese da rosamina 2 (R= 1'-naftilo), modificando-se apenas o aldeído usado, que neste caso foi o 2-naftaldeído (Esquema 3.3). A rosamina 3 (R= 2'-naftilo) apresenta menor impedimento estérico, tendo sido

sintetizada com maior rendimento (30%) não se verificando, no entanto, diferenças em termos de rendimento, entre os dois tipos de aquecimento usados (Tabela 3.2).



Esquema 3.3 Síntese da rosamina 3, R= 2'-naftilo.

Tabela 3.2 Resultados obtidos na síntese das rosaminas 2 (R= 1'-naftilo) e 3 (R= 2'-naftilo) e respectivas condições experimentais.

Rosamina	Tipo de aquecimento	Temp (°C)	Tempo	Rendimento (%)
2, R= 1'-naftilo	Banho de óleo	65	16 h	15
2, R= 1'-naftilo	Micro-ondas	80	10 min	18
3, R= 2'-naftilo	Banho de óleo	65	16 h	30
3, R= 2'-naftilo	Micro-ondas	80	10 min	30

A evolução das reações de síntese foi monitorizada por TLC indicando a formação de compostos secundários para além da rosamina. Sobretudo, durante a síntese da rosamina 3 (R= 2'-naftilo), foi possível observar a formação de compostos com *R_f* semelhante ao apresentado pela rosamina como é possível ver na Figura 3.7. A Fração 1 corresponde a um composto roxo menos polar do que a rosamina 3, de cor rosa, que corresponde à Fração 2.

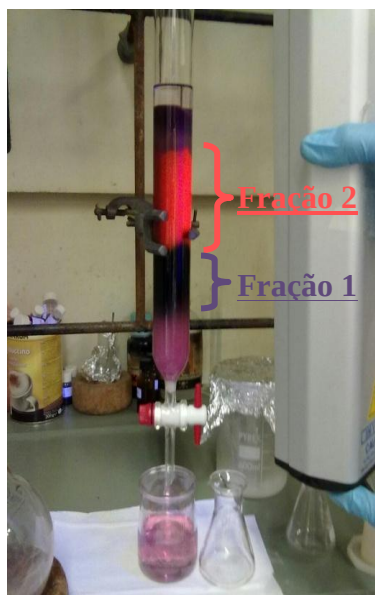
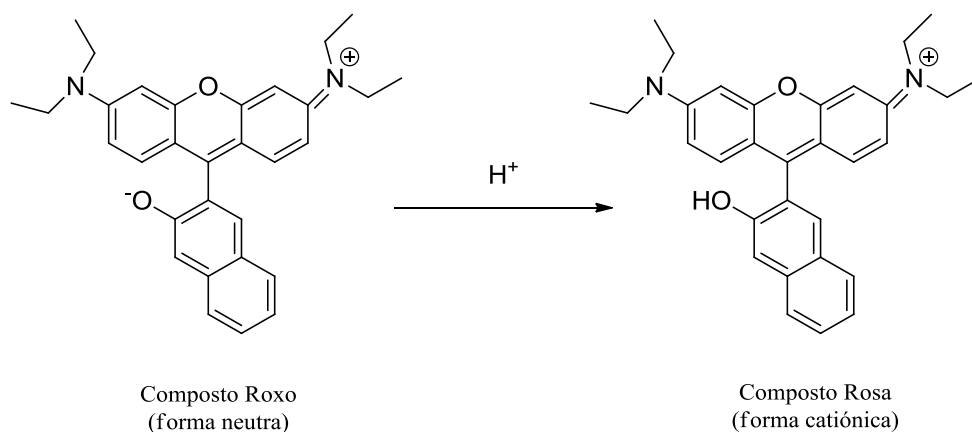


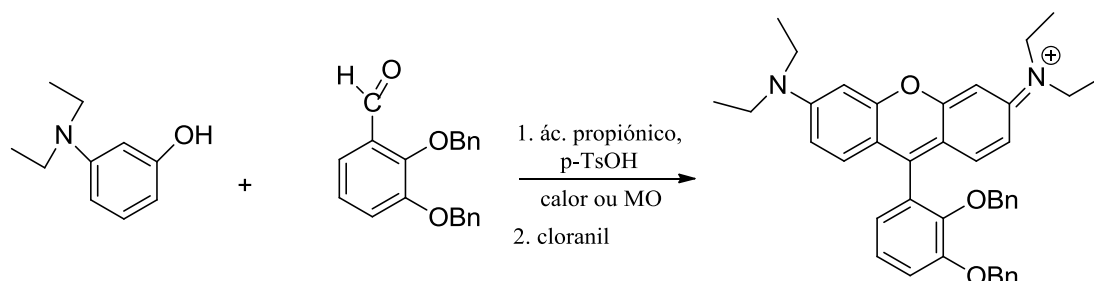
Figura 3.7 Coluna de cromatografia rápida.

Este composto roxo surge como um produto secundário tendo sido isolado e caracterizado por RMN como sendo correspondente ao análogo hidroxilado (**3a**) apresentado no Esquema 3.4. Prevê-se que este composto terá sido formado na sequência da etapa de oxidação. Verificou-se experimentalmente que este composto quando sujeito a condições ácidas apresentava uma variação de cor de roxo para rosa, esta alteração deve-se à protonação do oxigénio, tal como evidencia o Esquema 3.4. Este comportamento confere ao composto **3a** uma potencial aplicação como sensor de pH.

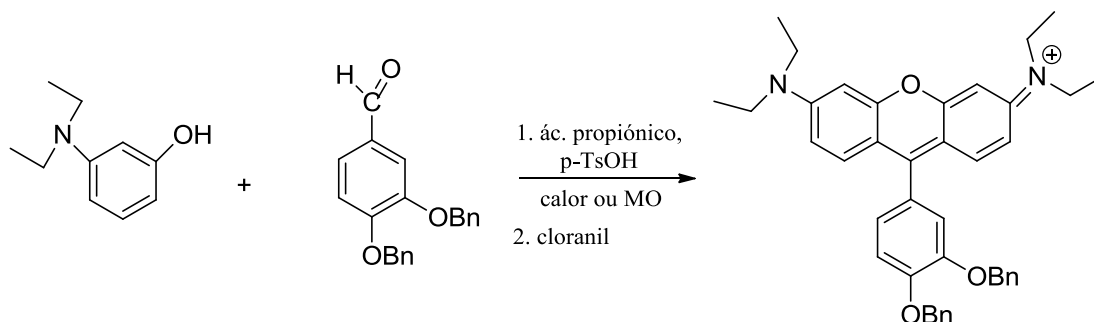


Esquema 3.4 Análogo hidroxilado (**3a**) isolado durante a síntese da rosamina **3** e a sua respetiva forma protonada.

Posteriormente sintetizaram-se as rosaminas **4a** (R=2',3'-OBn, Esquema 3.5) e **5a** (R=3',4'-OBn, Esquema 3.6). As rosaminas preparadas possuem no seu esqueleto uma unidade catecol sensível ao pH do meio e que poderá quelatar iões de metal, assunto que será explorado na secção 3.2.3.3 (Estudo das propriedades fotofísicas da rosamina **5b**).



Esquema 3.5 Síntese da rosamina **4a** (R=2',3'-OBn).



Esquema 3.6 Síntese da rosamina **5a** (R=3',4'-OBn).

A metodologia aqui utilizada para a obtenção destas rosaminas envolveu a reação de 3-dietilaminofenol e um benzaldeído substituído, em meio ácido, usando ambos os aquecimentos (convencional e micro-ondas) seguindo-se oxidação com cloranil e por último, a etapa de desprotecção, conduzindo a formação dos compostos **4b** (R=2',3'-OH) e **5b** (R=3',4'-OH).

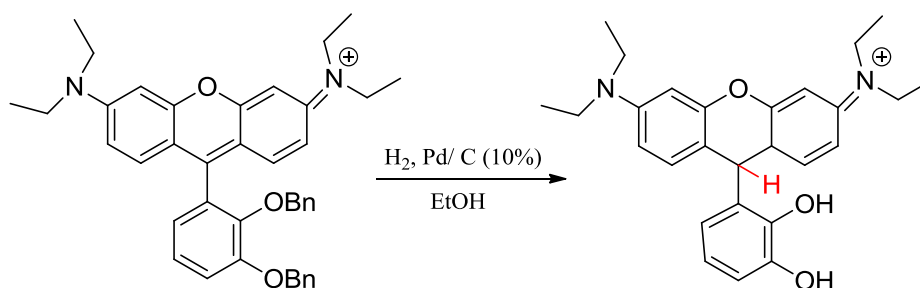
Tabela 3.3 Resultados obtidos na síntese das rosaminas **4a** e **5a** e respetivas condições experimentais.

Rosamina	Tipo de aquecimento	Temp (°C)	Tempo	Rendimento (%)
4a, R=2',3'-OBn	Banho de óleo	65	16 h	36
4a, R=2',3'-OBn	Micro-ondas	80	10 min	38
5a, R=3',4'-OBn	Banho de óleo	65	16 h	12
5a, R=3',4'-OBn	Micro-ondas	80	10 min	61

3.2.2 Remoção dos grupos protetores das rosaminas **4a** e **5a** ($R=2,3\text{-OBn}$ e $R=3,4\text{-OBn}$)

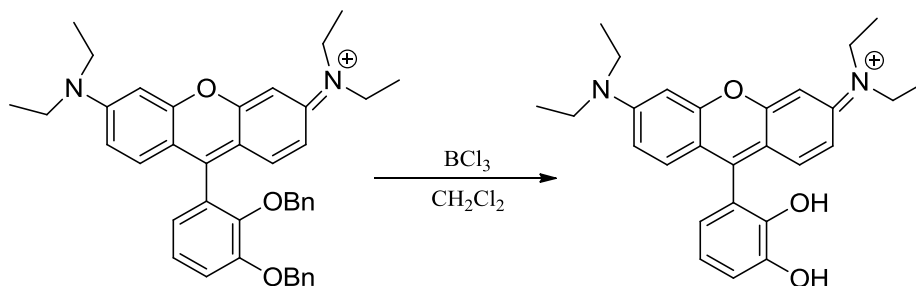
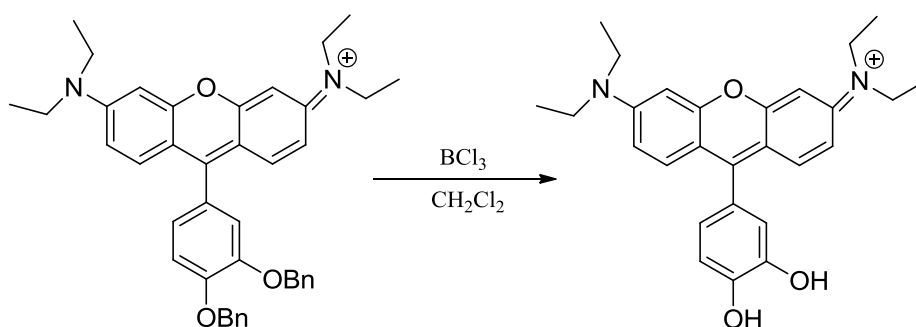
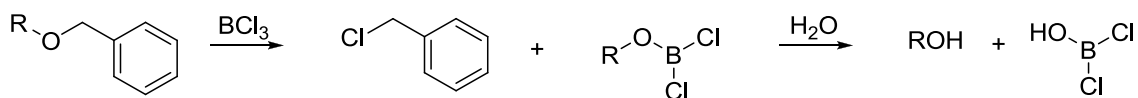
O último passo da reação de síntese das rosaminas **4a** e **5a** ($R=2,3\text{-OBn}$ e $R=3,4\text{-OBn}$) envolveu a remoção dos grupos protetores benzilo das respectivas unidades catecol. Nesta etapa dois tipos de metodologias foram utilizados: a hidrogenólise e a reação com tetracloreto de boro.

O método de hidrogenólise envolveu o uso de hidrogénio e Pd/C (10%) como catalisador, em etanol. Verificou-se que através desta reação foi possível remover os grupos protetores pretendidos. No entanto, pela análise dos espectros de RMN de ^1H obtidos para a rosamina **4a** verificou-se a introdução de um átomo de hidrogénio na posição 9 do anel xanteno (Esquema 3.7).



Esquema 3.7 Reação de hidrogenólise da rosamina **4a** ($R=2,3\text{-OBn}$).

Outro método testado utilizou o tetracloreto de boro em diclorometano. Quando se procedeu à remoção dos grupos protetores com tetracloreto de boro verificou-se, com sucesso, apenas a clivagem dos grupos benzilos mantendo a restante estrutura das rosaminas intacta (Esquema 3.8 e Esquema 3.9). Tal como, o BBr_3 , o tetracloreto de boro é um ácido de Lewis. Estes ácidos coordenam com o átomo de oxigénio de ligações éter de forma a promover a clivagem da ligação C-O para formar brometo de alquilo e alcoxiborano que é posteriormente hidrolizado a álcool durante o tratamento da reação, tal como se encontra representado no Esquema 3.10. Tanto o BBr_3 como o BCl_3 são comumente usados na clivagem de éteres uma vez que estas reações ocorrem de forma completa em condições suaves.

Esquema 3.8 Reação com BCl_3 com formação da rosamina **4b**.Esquema 3.9 Reação com BCl_3 com formação da rosamina **5b**.Esquema 3.10 Reação de clivagem dos grupos protetores com BCl_3 .

Na Figura 3.8 apresentam-se, de cima para baixo, os espectros de RMN de ^1H para os compostos **4a**, **4b** e **4c** com hidrogénio na posição 9. No espectro B é possível ver o composto resultante da etapa de desproteção levada a cabo com BCl_3 , verificando-se que em relação ao primeiro espectro desaparecem os sinais relativos aos grupos benzilos, mantendo a restante estrutura da molécula. O espectro C, relativo ao método de hidrogenólise, indica mais uma vez a remoção dos grupos benzilo, através do desaparecimento dos respetivos sinais característicos desses grupos, no entanto, observa-se o aparecimento de um novo sinal na forma de singuleto a 5,82 ppm, atribuído ao próton presente na posição 9 do anel xanteno.

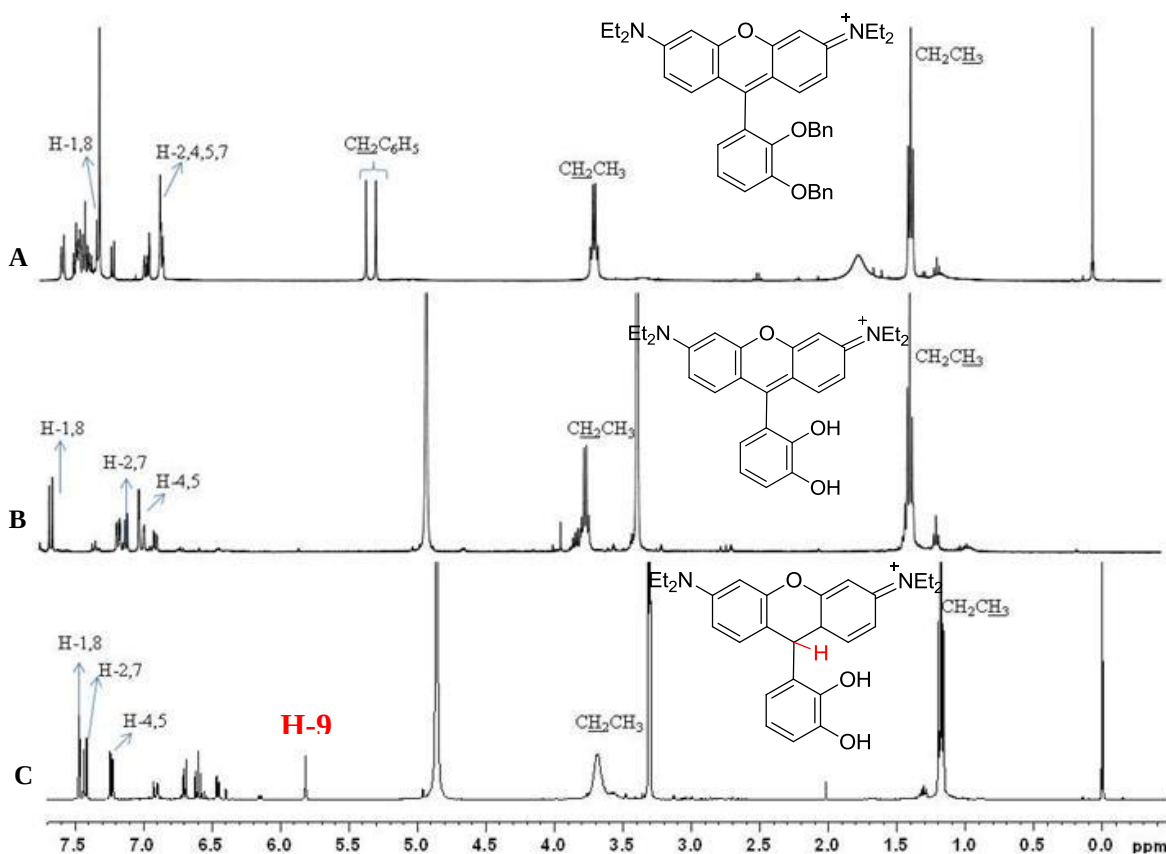


Figura 3.8 Espectros de RMN de ^1H : (A) rosamina **4a** em CDCl_3 , (B) rosamina **4b** em CD_3OD e (C) rosamina **4c** com hidrogênio em CD_3OD .

3.2.3 Caracterização estrutural

3.2.3.1 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

As estruturas das rosaminas foram deduzidas pela análise dos espectros de ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C e usando dados de técnicas bidimensionais de correlação espectroscópicas homo- e heteronuclear (COSY, HSQC e HMBC).

A Tabela 3.4 compila os valores dos desvios químicos (ppm) dos espectros de RMN de ^1H para as diferentes rosaminas.

Tabela 3.4 Comparação dos valores dos desvios químicos (ppm) dos espectros de RMN de ^1H das rosaminas **1**, **2** e **3** em CDCl_3 e das rosaminas **4b** e **5b** em CD_3OD .

Rosamina	H-1, 8	H-2, 7	H-4, 5	H-arilo ou H-naftilo	CH_2	CH_3
1, R= H	7,36	6,95	6,86	7,37-7,39 (H-2', 6') 7,61-7,64 (H-3', 4', 5')	3,67	1,34
2, R= 1'-naftilo	7,05	6,77	6,94	7,31-7,45 (H-2', 6', 8') 7,57 e 7,69 (H-3', 7') 8,01 e 8,10 (H-4', 5')	3,65	1,33
3, R= 2'-naftilo	7,47	6,98	6,91	7,52 (H-3') 7,66-7,73 e 7,95-8,06 (H-1', 5', 6', 7', 8') 8,14 (H-4')	3,68	1,36
4b, R= 2',3'-OH	7,26	7,14	6,96	6,66 (H-6'), 6,89 (H-5'), 7,07 (H-4'), 9,00 (OH), 9,96 (OH)	3,65	1,21
5b, R= 3',4'-OH	7,47	7,16	6,94	6,79 (H-6') 6,94 (H-2'), 7,05 (H-5'), 9,77 (OH)	3,65	1,23

O espectro de RMN de ^1H da rosamina **1** (R=H), tida como referência da família de compostos sintetizados neste trabalho, evidencia os sinais típicos do esqueleto xanteno, que são: um tripleto a 1,34 ppm e um quarteto a 3,67 ppm correspondentes à ressonância dos grupos etilo; um duplete a 6,86 ppm correspondente à ressonância dos prótons H-4 e H-5; um duplo duplete a 6,95 atribuído à ressonância dos prótons H-2 e H-7 e um duplete a 7,36 ppm devido à ressonância dos prótons H-1 e H-8. Existem ainda os sinais relativos à ressonância dos prótons do anel fenilo ligado ao anel xanteno na posição 9, que surgem como dois multipletos a 7,37-7,39 ppm atribuído aos prótons H-2' e 6' e a 7,61-7,64 ppm correspondente aos prótons H-3', 4' e 5'.

Para a série substituída na posição 9 do anel xanteno com anéis naftilo (rosamina **2** (R= 1'-naftilo) e **3** (R= 2'-naftilo)), os espectros de RMN de ^1H mostram igualmente os sinais característicos do anel xanteno e, em particular para a rosamina **2**, os sinais correspondentes às ressonâncias dos prótons H-2, 7 e H-1, 8 aparecem relativamente desviados para campos mais altos, 6,77 e 7,05 ppm, respetivamente. Esta alteração dos desvios químicos é causada pelo facto do anel naftilo estar ligado pela posição 1' ao anel xanteno, resultando num maior impedimento estérico. Para a rosamina **3** a ligação do anel naftilo dá-se pela posição 2' e por isso tem menos influência na ressonância dos prótons H-2, 7 e H-1, 8 que surgem a 6,98 e 7,47 ppm, respetivamente.

Para a série substituída na posição 9 do anel xanteno com unidades catecol (rosamina **4b** (R= 2',3'-OH) e **5b** (R= 3',4'-OH)), os espectros de RMN de ^1H mostram tal como esperado os sinais característicos do anel xanteno sem alterações assinaláveis

em relação à ressonância dos respectivos prótons da rosamina **1** de referência. O que melhor diferencia estas duas rosaminas são os sinais correspondentes à ressonância dos prótons presentes nos respectivos anéis fenilo, como se evidencia na Figura 3.9. Dado o esquema de substituição nas posições 2' e 3', para a rosamina **4b** surgem três sinais com constantes de acoplamento vicinal (3J) da ordem dos 7,6-8,0 Hz correspondentes aos prótons das posições 4', 5' e 6'. Relativamente à rosamina **5b** em que a substituição é feita nas posições 3' e 4', aparece um sinal com acoplamento a longa distância (4J) de 2,1 Hz correspondente a H-2', um sinal com $^3J = 8,0$ Hz correspondente a H-5' e um sinal com $^3J = 8,0$ e $^4J = 2,1$ Hz correspondente a H-6'.

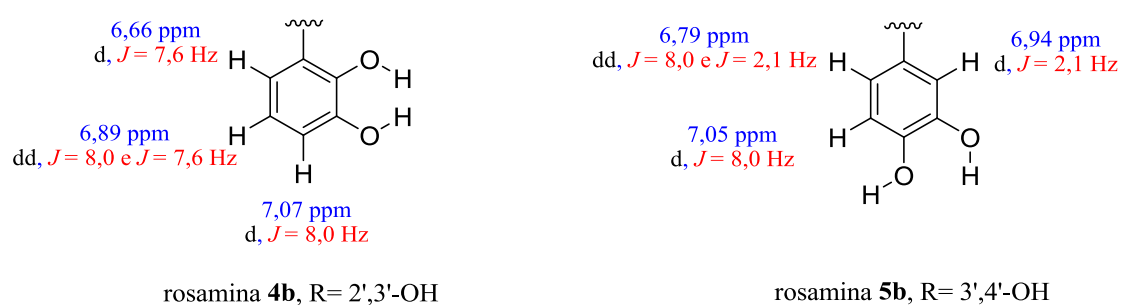


Figura 3.9 Atribuição dos prótons presentes nos anéis fenilo das rosaminas **4b** e **5b**.

Os espectros de RMN de ^{13}C para as diferentes rosaminas **1**, **2**, **3**, **4b** e **5b** apresentam nove sinais característicos correspondentes aos átomos de carbono do anel xanteno comum a estes compostos, não sofrendo alterações significativas nos valores de desvio químico, como se pode verificar na Tabela 3.5. Além disso surgem sinais correspondentes à substituição que ocorre na posição 9 do anel xanteno, quando esta é feita por um grupo naftilo nas posições 1' ou 2' (rosaminas **2** e **3**) e também quando a substituição é feita pelas respetivas unidades catecol (rosaminas **4b** e **5b**).

As ressonâncias dos carbonos 4a e 5a surgem a maiores valores de frequência (158,7-157,4 ppm) uma vez que estes átomos de carbono aromáticos estão sob o efeito indutivo desprotetor do átomo de oxigénio que lhes é vizinho. Além disso, a ressonância do carbono 9 surge tipicamente a (158,5-155,6 ppm) dado que corresponde à posição onde o anel xanteno é substituído por outro anel aromático contribuindo assim para elevados valores de frequência.

Tabela 3.5 Desvios químicos δ (ppm) dos sinais obtidos nos espectros de RMN de ^{13}C das rosaminas **1**, **2** e **3** em CDCl_3 e das rosaminas **4b** e **5b** em CD_3OD .

	1 (R=H)	2 (R=1'-naftilo)	3 (R=2'-naftilo)	4b (R=2',3'-OH)	5b (R=3',4'-OH)
C-1e C-8	132,3	132,1	132,9	131,9	132,1
C-2 e C-7	114,4	114,3	114,7	114,3	114,2
C-3e C-6	155,7	155,8	156,2	155,1	154,9
C-4 e C-5	96,7	96,9	96,9	95,8	95,9
C-4a e C-5a	158,2	158,1	158,7	157,4	157,4
C-1a e C-8a	113,5	*	114,1	113,0	112,5
C-9	157,5	156,7	158,5	155,6	157,3
C-fenilo ou naftilo	131,9 (C-1') 129,5 (C-2' e C-6') 129,1 (C-3' e C-5') 130,5 (C-4')	114,4; 125,2; 125,3; 127,1 e 127,8 (C-2', C-3', C-6', C-7' e C-8'); 128,9 (C-4' ou C-5'); 129,6; 130,6 (C-4' ou C-5');	126,7 (C-3'); 128,1; 128,50; 128,54; 128,8; 129,4 (C-4'); 129,7; 130,0; 133,2; 134,4	117,2 (C-4'); 119,3 (C-1'); 119,5 (C-5'); 120,4 (C-6'); 143,0 (C-2'); 145,8 (C-3');	116,0 (C-5'); 117,3 (C-2'); 121,7 (C-6'); 122,3 (C-1'); 145,6 (C-3'); 147,8 (C-4');
<u>N</u>CH₂CH₃	46,4	46,4	46,5	45,3	45,3
NCH₂<u>C</u>H₃	12,8	12,8	12,8	12,5	12,5

* não se conseguiu fazer a atribuição

A título de exemplo apresentam-se os espectros de RMN mono- e bidimensionais realizados para a rosamina **5b** onde R=3,4-OH, e que permitiram a atribuição dos sinais correspondentes aos prótons e carbonos. O espectro que se segue corresponde ao espectro de RMN de ^1H representado na Figura 3.10.

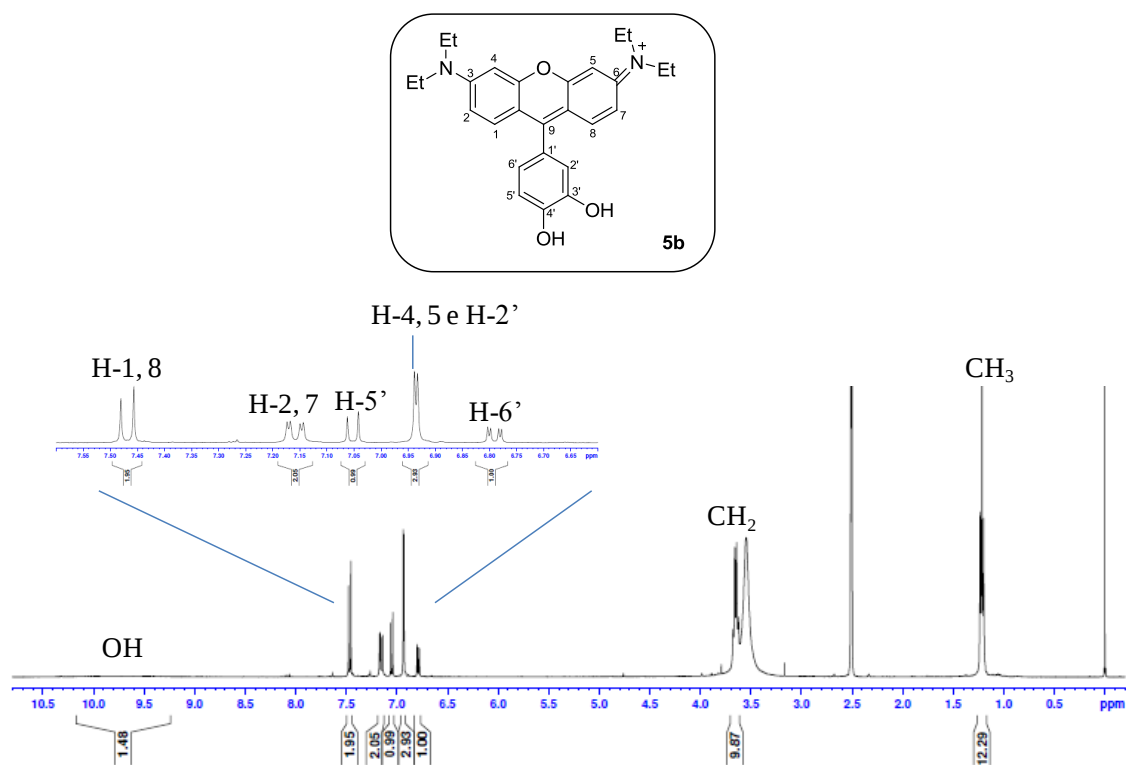


Figura 3.10 Espectro de RMN de ^1H da rosamina **5b**.

O espectro de COSY (Figura 3.11) permitiu identificar os prótons acima assinalados no espectro de RMN de ^1H .

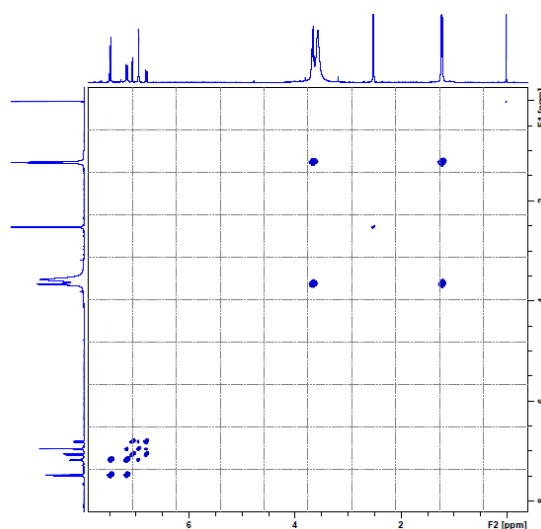


Figura 3.11 Espectro de COSY da rosamina **5b**.

Na Figura 3.12 está representado o espectro de RMN de ^{13}C referente à rosamina **5b** bem como a sua expansão da zona aromática para melhor atribuição dos carbonos. A

atribuição dos carbonos foi feita com a ajuda dos espectros de HSQC e HMBC (Figura 3.13).

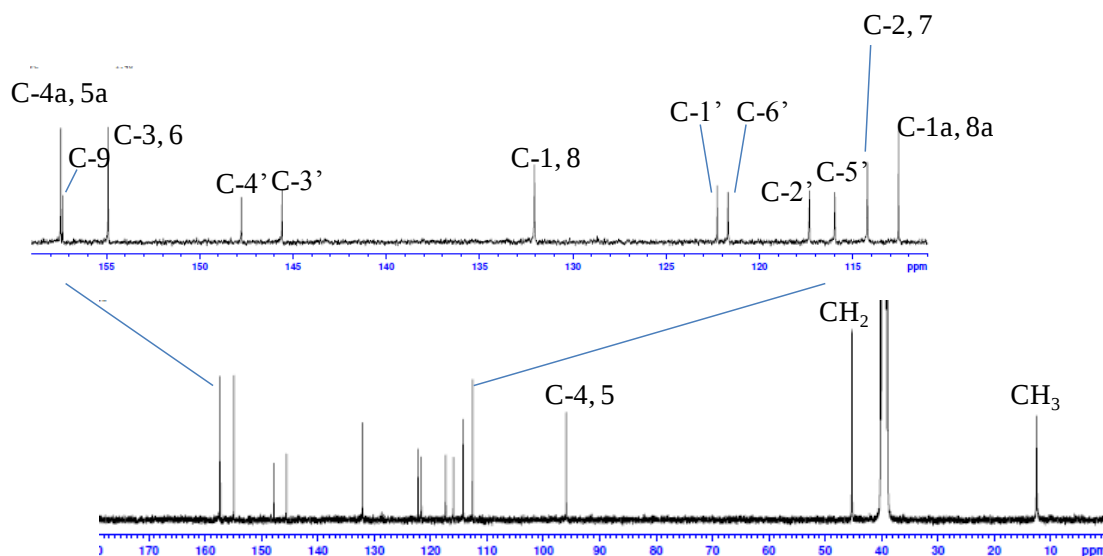


Figura 3.12 Espectro de RMN de ^{13}C da rosamina **5b**.

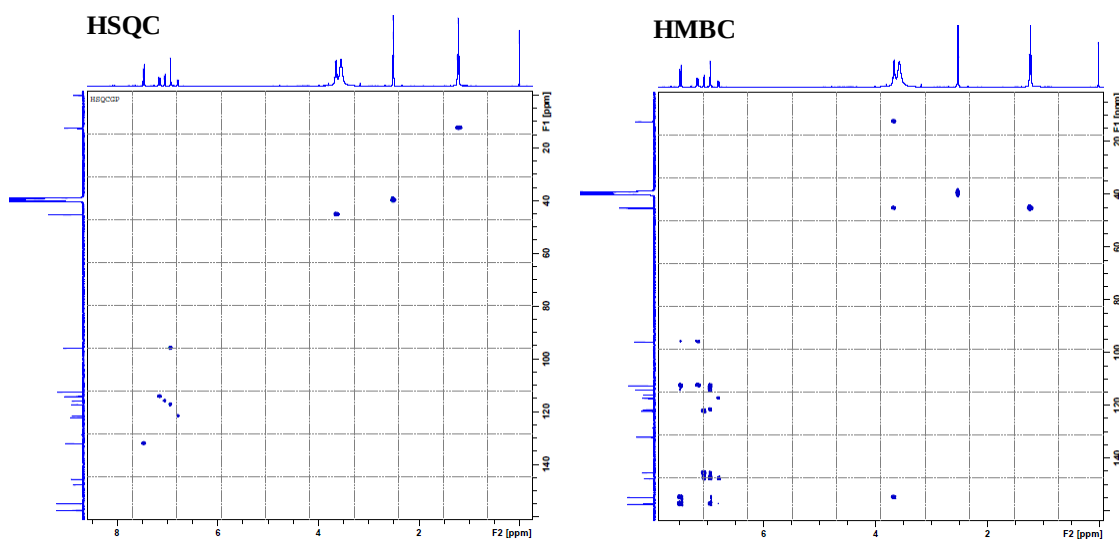


Figura 3.13 Espectros de HSQC e HMBC da rosamina **5b**.

3.2.3.2 Espectrometria de massa

A caracterização por EM foi realizada utilizando como métodos de ionização FAB^+ e ESI para as rosaminas preparadas. A título de exemplo, para a rosamina **5b** onde $\text{R}=3,4\text{-OH}$, o espectro de massa em ESI revelou a presença do pico do ião molecular, M^+ , a m/z 431, confirmando deste modo que estamos na presença da rosamina sintetizada.

3.2.3.3. Estudo das propriedades fotofísicas da rosamina 5b

Com o objetivo de estabelecer as propriedades fotofísicas das rosaminas sintetizadas, realizaram-se estudos espectroscópicos de absorção e emissão e determinou-se a absorptividade molar ϵ para os compostos de acordo com a lei de Lambert-Beer (Equação 3.1).

$$A(\lambda) = \epsilon(\lambda) \cdot c \cdot l$$

Equação 3.1 Equação utilizada para a determinação da absorptividade molar (ϵ), onde A é a absorvância máxima, c a concentração molar do composto e l é a largura da célula (1 cm).

De modo a determinar as possíveis alterações no perfil do espectro de UV-Vis da série de rosaminas substituídas na posição 9 do anel xanteno com anéis naftilo (rosamina 2 (R= 1'-naftilo) e 3 (R= 2'-naftilo)) relativamente ao perfil do espectro da rodamina B, obtiveram-se os respetivos espectros em etanol (Figura 3.14).

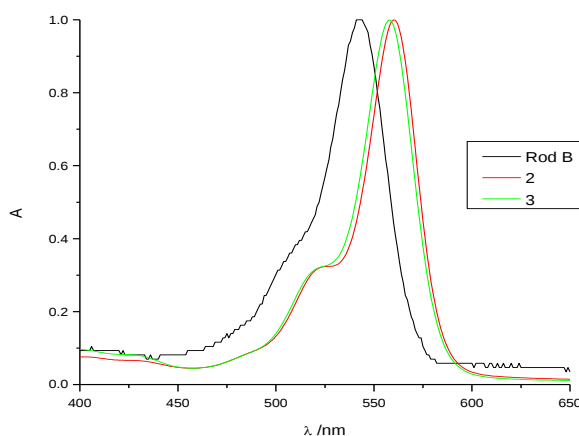


Figura 3.14 Comparação de espectros de UV-Vis da rodamina B e rosaminas 2 e 3.

Os espectros obtidos mostram que a introdução dos anéis naftilo na posição 9 do anel xanteno não introduz alterações no perfil espectroscópico de UV-Vis das rosaminas 2 e 3 relativamente à rodamina B.

Obtiveram-se também os respetivos espectros de UV-Vis em diclorometano.

Analisando os resultados obtidos nos dois solventes utilizados (Tabela 3.6) verificou-se que, no solvente prótico (etanol) o $\lambda_{m\acute{a}x}(abs)$ das rosaminas sintetizadas é desviado para λ superiores (menor energia) relativamente à rodamina B, não se

verificando uma alteração significativa nos valores de ε . Quanto aos resultados obtidos no solvente aprótico (diclorometano) verifica-se que o $\lambda_{\text{máx}}(\text{abs})$ das rosaminas sintetizadas não significativamente alterado enquanto que, o valor de ε é inferior nas rosaminas sintetizadas, apresentando a rosamina **3** o valor mais baixo devido à livre rotação do anel naftilo, substituído na posição 2', o que não acontece na rosamina **2** devido ao impedimento estérico. A rodamina B apresenta um valor de ε superior ao encontrado para as rosaminas sintetizadas devido à existência do grupo substituinte ácido carboxílico na posição 2' do anel fenilo, impedindo a rotação do anel.

Tabela 3.6 Comprimento máximo de absorção ($\lambda_{\text{máx}}(\text{abs})$) e absorptividade molar (ε) das rosaminas **2** e **3**.

Rosamina	Solvente	$\lambda_{\text{máx}}(\text{abs})$ (nm)	ε (cm ⁻¹ mol dm ⁻³)×10 ⁴
2	EtOH	560	5.48
	CH ₂ Cl ₂	561	6.85
3	EtOH	558	5.10
	CH ₂ Cl ₂	560	2.58
Rodamina B	EtOH	543	3.25
	CH ₂ Cl ₂	555	11.2

Relativamente às rosaminas substituídas na posição 9 do anel xanteno com unidades catecol, apenas se estudou o comportamento da rosamina **5b** (R= 3',4'-OH) em água, visto este composto apresentar dois grupos hidroxilo passíveis de ser desprotonados a diferentes valores de pH. Os parâmetros espectroscópicos do espectro de UV-Vis da rosamina **5b** a pH 6,52 (valor de pH da solução inicial obtida por dissolução da rosamina **5b** em água) encontram-se na Tabela 3.7.

Tabela 3.7 Comprimento máximo de absorção ($\lambda_{\text{máx}}(\text{abs})$) e absorptividade molar (ε) da rosamina **5b**.

Rosamina	Solvente	$\lambda_{\text{máx}}(\text{abs})$ (nm)	ε (cm ⁻¹ mol dm ⁻³)×10 ⁴
5b	Água (pH 6,52)	554	5,12

As Figuras (Figura 3.15 e Figura 3.16) apresentam os espectros de absorção para a gama de pH de 2 a 12.

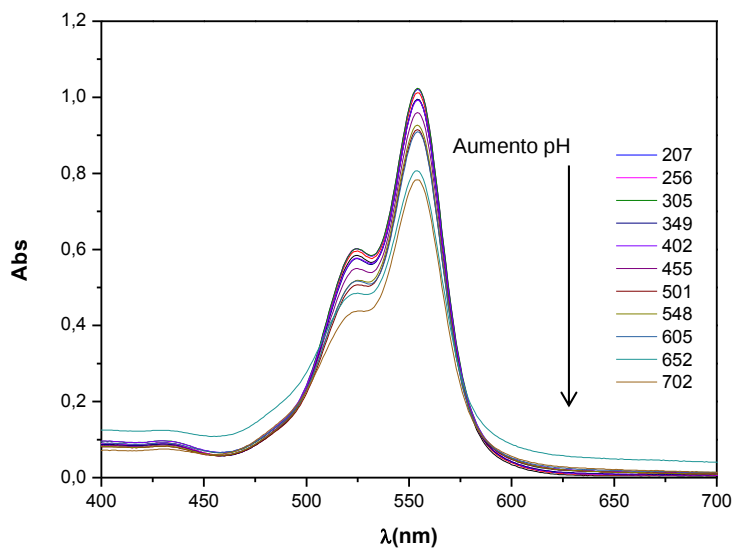


Figura 3.15 Espectro de absorvância obtido para a rosamina **5b**, na gama de pH de 2 a 7, em água.

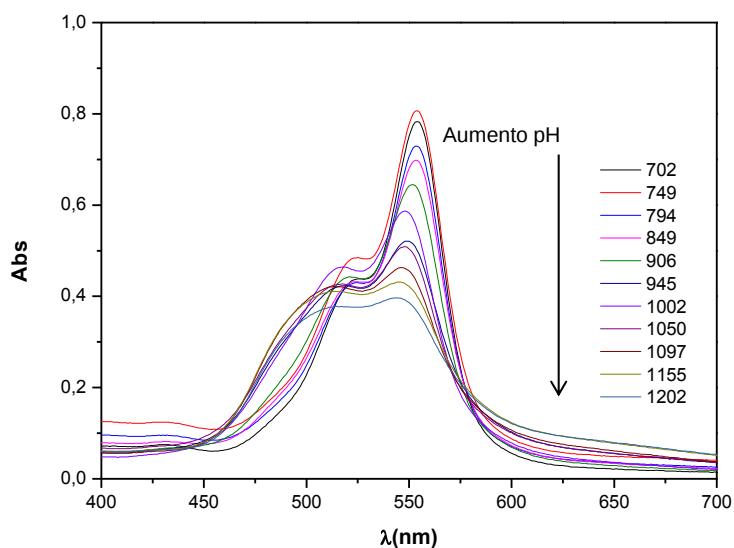


Figura 3.16 Espectro de absorvância obtido para a rosamina **5b**, na gama de pH de 7 a 12, em água.

Os espectros de UV-Vis obtidos para a rosamina **5b** mostram que à medida que o valor de pH da solução vai aumentando a absorvância do composto diminui. Observam-se também alterações no perfil da banda, observando-se uma diminuição do máximo da banda a $\lambda=554$ nm e um alargamento da banda com o aumento de pH.

Realizaram-se também estudos da variação de fluorescência em função do pH na gama 2 a 12 (Figura 3.17 e Figura 3.18).

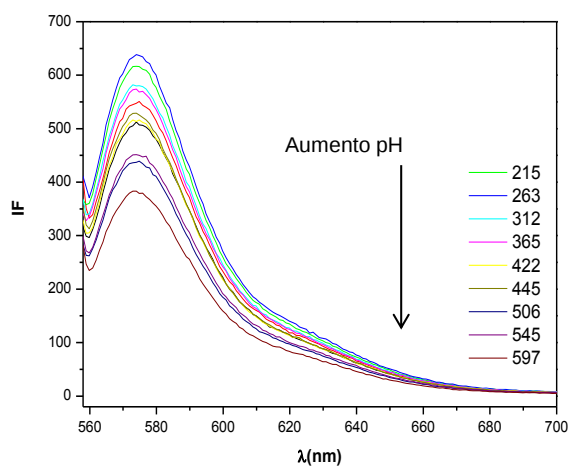


Figura 3.17 Espectro de fluorescência obtido para a rosamina **5b**, na gama de pH de 2 a 6, em água.

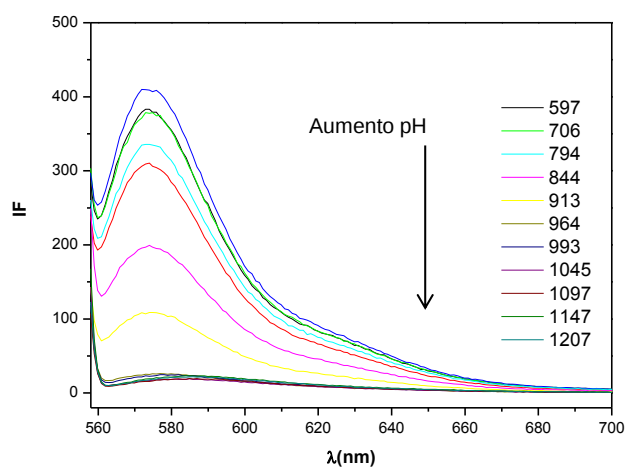


Figura 3.18 Espectro de fluorescência obtido para a rosamina **5b**, na gama de pH de 6 a 12, em água.

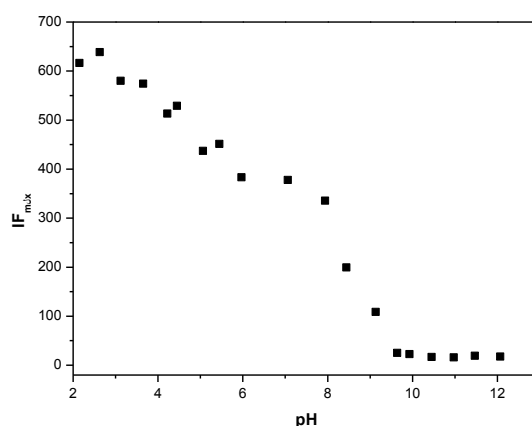


Figura 3.19 Influência do pH na intensidade de fluorescência rosamina **5b**, em água.

Verificou-se que a fluorescência do composto diminui gradualmente à medida que o valor de pH do meio aumenta, levando à extinção total de fluorescência a partir de pH= 9,64 (Figura 3.19).

O estudo do comportamento da rosamina **5b** em função do pH sugere que o composto assume três formas (catiônica, neutra e aniônica) quando ocorre dissociação dos prótons dos grupos hidroxilo da unidade catecol (Figura 3.20).

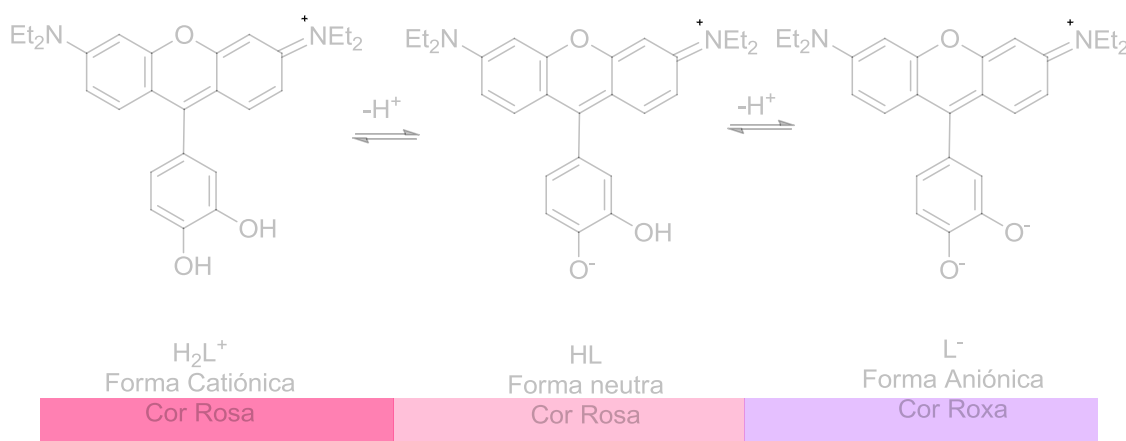


Figura 3.20 Esquema de dissociação da rosamina **5b**.

Segundo o esquema de dissociação proposto e tendo em conta os resultados obtidos nos estudos espectroscópicos efetuados sugere-se que a desprotonação dos grupos hidroxilo levam a uma diminuição de absorvância assim como de intensidade de fluorescência, verificando-se uma extinção total da fluorescência para valores de pH superiores a 9,64.

3.3. Estudo de novas metodologias mais limpas e mais eficientes

3.3.1 Síntese de rosamina em meio aquoso recorrendo ao aquecimento Óhmico

A síntese da rosamina **1** recorrendo ao aquecimento óhmico apresentou resultados notáveis no âmbito do objetivo de implementar protocolos mais sustentáveis (Figura 3.21). Em primeiro lugar, nesta experiência utilizou-se como solvente a água em detrimento das condições ácidas (envolvendo o uso de ácido propiónico como solventes) tipicamente descritas para a preparação deste tipo de compostos. Além disso, o procedimento desenvolvido permitiu simplificar o tratamento da reação, após a primeira fase de condensação, já que eliminou os passos de lavagem e extração com solventes orgânicos, passando-se a fazer uma simples decantação.

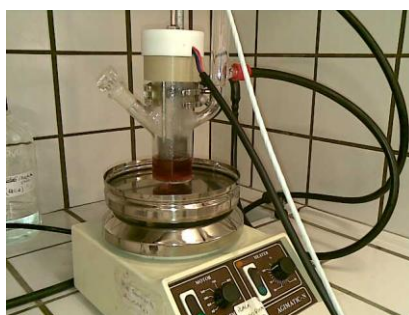


Figura 3.21 Reactor de aquecimento óhmico.²⁰

Tendo em conta, que apenas se realizou um único ensaio, tendo-se isolado a rosamina **1** pura com rendimento de 31%, é de prever que este método de aquecimento aplicado na preparação destes compostos possa apresentar vantagens relativamente a outros tipos de aquecimento, tais como a rapidez e homogeneidade do aquecimento e maior eficiência energética.

3.3.2 Síntese de rosaminas utilizando diferentes metodologias de oxidação

Este trabalho pretendeu dar um contributo significativo na procura de novos protocolos que visassem a melhoria da etapa de oxidação. Tendo em conta que foi possível reduzir significativamente o tempo de reação da etapa de condensação (16 h vs. 10 min) o passo seguinte seria reduzir o tempo da etapa de oxidação, fixado em 2 h

através do método já descrito com cloranil, e/ou recorrer a agentes oxidantes alternativos reduzindo assim a toxicidade associada ao uso de cloranil.

Para este estudo foram realizados vários ensaios onde se testaram vários parâmetros desde os solventes às temperaturas de reação. Nesta secção apresentam-se os resultados preliminares apontando-se as metodologias mais promissoras para o estabelecimento de novos protocolos de oxidação de rosaminas. É de notar que para este estudo utilizou-se a rosamina **1** R= H por forma a simplificar o sistema, tendo assim esta rosamina como referência na otimização de novos métodos.

3.3.2.1 Oxidação com cloranil em aquecimento por micro-ondas

Em primeiro lugar, recorrendo ainda ao uso de cloranil (Figura 3.21) uma vez que este agente oxidante funciona com sucesso na oxidação de rosaminas, realizaram-se ensaios com cloranil recorrendo, no entanto, ao aquecimento por micro-ondas. O método clássico de oxidação envolve o uso deste agente oxidante numa mistura de clorofórmio/metanol (1:1) em agitação durante 2 h à temperatura ambiente. Neste ensaio utilizou-se 4 mL de solvente (mistura de diclorometano/ metanol (1:1)) e aqueceu-se a mistura a 60°C durante 10 min. Obteve-se 95,5 mg de rosamina (rendimento de 44%).

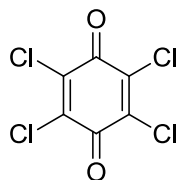


Figura 3.22 Cloranil.

3.3.2.2 Oxidação com DDQ em aquecimento por micro-ondas

Testou-se outra quinona a 2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona (DDQ, Figura 3.22), de estrutura semelhante à do cloranil, também recorrendo ao aquecimento por micro-ondas. Neste ensaio utilizou-se as mesmas condições experimentais descritas para o método anterior. Os TLC's realizados indicaram uma boa conversão de rosamina oxidada, porém, a formação de mais produtos secundários quando comparado com o uso do cloranil. Obteve-se 36,0 mg de rosamina (rendimento de 30%).

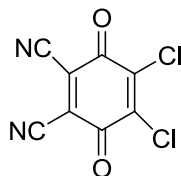


Figura 3.23 DDQ.

3.3.2.3 Oxidação com dióxido de manganês em aquecimento por micro-ondas

Como abordagem alternativa às tradicionais quinonas recorreu-se ao dióxido de manganês. Este composto tem sido usado com sucesso na oxidação de vários compostos orgânicos, incluindo a desidrogenação e a aromatização oxidativa de reações, recorrendo ao uso de aquecimento clássico ou micro-ondas. O MnO_2 é um agente oxidante heterogêneo de baixo custo e apresenta boa biocompatibilidade.³⁶

Neste ensaio a mistura reacional foi dissolvida em 4 mL de diclorometano e adicionado o MnO_2 ; a reação, aquecida por micro-ondas, durou cerca de 1 min, a 100°C. Realizaram-se TLC's antes e depois da oxidação e verificou-se que tinha ocorrido oxidação mas em pequena escala, uma vez, que se formaram outros compostos secundários. Procedeu-se à purificação da mistura reacional no entanto a quantidade obtida de rosamina foi mínima não tendo sido possível calcular o rendimento obtido.

3.3.2.4 Oxidação catalítica com peróxido de hidrogénio

No âmbito da procura de novas metodologias de oxidação em estudos de química verde, o peróxido de hidrogénio apresenta-se como o segundo melhor agente oxidante, a seguir ao oxigénio. Nesta parte do trabalho descrevem-se, por isso, alguns ensaios recorrendo a este agente oxidante. Utilizou-se para isso o aduto H_2O_2 -ureia de modo a obter-se maior segurança na libertação controlada deste composto durante as reacções.

Além disso, as metodologias testadas envolveram a presença de metaloporfirinas como catalisadores. O uso de metaloporfirinas como catalisadores em reações de oxidação de compostos orgânicos, vem sendo proposto por vários grupos de investigação, destacando-se os trabalhos desenvolvidos no âmbito da oxidação de compostos aromáticos com peróxido de hidrogénio catalisados na presença de complexos de Mn(III) de porfirinas.³⁷ Foi estudado um conjunto de metaloporfirinas (Figura 3.23) de acordo com ensaios já descritos para as mesmas noutro tipo de substratos orgânicos. Escolheram-se metaloporfirinas com dois tipos diferentes de metais de coordenação (Mn(III) e Fe(III)) devido ao facto de atuarem segundo diferentes mecanismos de oxidação.³⁸ Segundo os mesmos estudos sabe-se que as

metaloportirinas de Mn(III) catalisam, a reação de oxidação com H_2O_2 , na presença de um co-catalisador, por exemplo, o NH_4AcO , e em solventes apróticos. Por outro lado, quando o centro metálico da porfirina é o Fe(III), a ativação do H_2O_2 é mais eficiente em solvente prótico e ausência de co-catalisador.

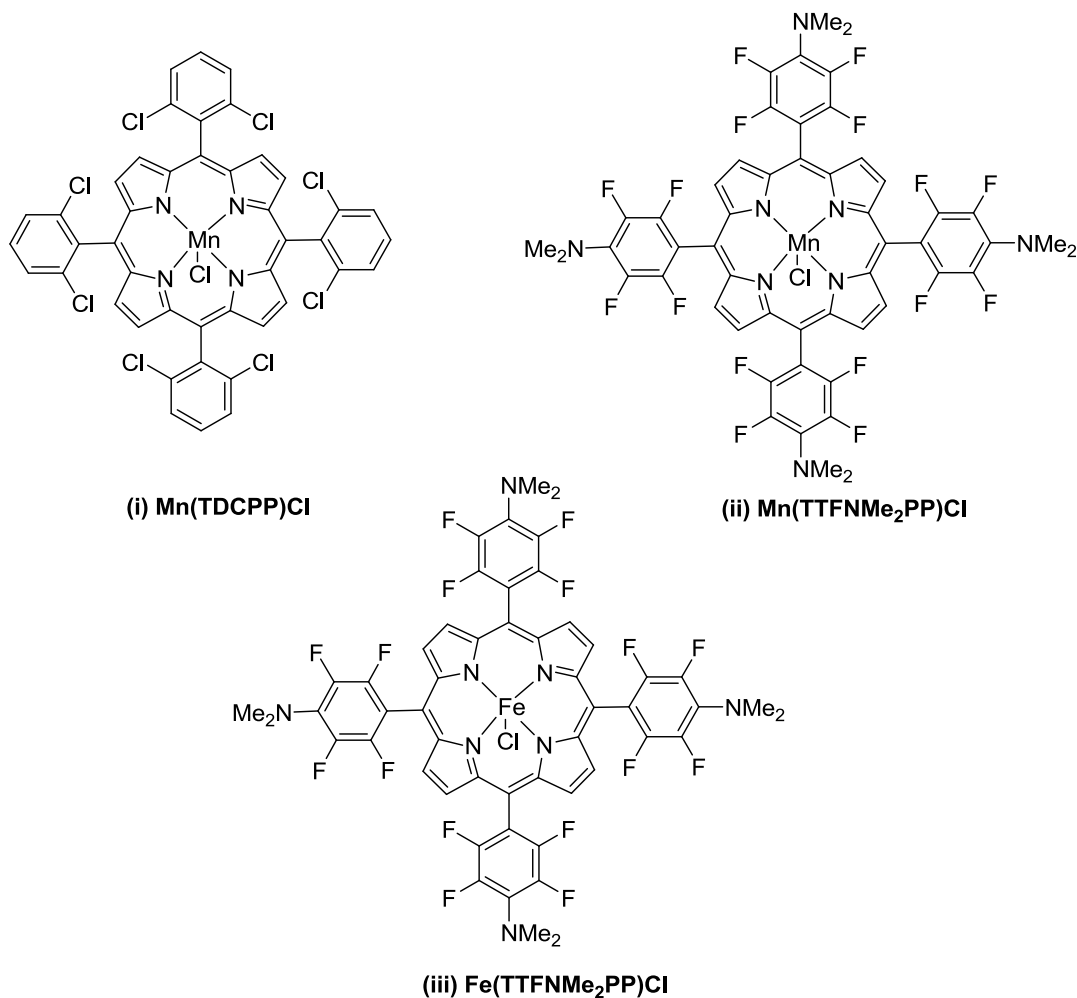


Figura 3.24 Metaloporfirinas utilizadas como catalisadores.

Relativamente aos ensaios realizados com as metaloporfirinas de Mn(III) - catalisadores (i) e (ii)- utilizou-se o acetonitrilo como solvente aprótico, mas também testou-se o etanol como solvente prótico.

Inicialmente, a oxidação da rosamina **1** foi levada a cabo com a metaloporfirina (i), aduto H_2O_2 -ureia e NH_4AcO como co-catalisador, em acetonitrilo. O primeiro ensaio foi realizado à temperatura ambiente e a mistura foi colocada sob agitação. A reação foi acompanhada por TLC e durou cerca de 16 h. Verificou-se uma ligeira oxidação da rosamina, no entanto, o TLC revelou a formação de vários produtos secundários e não houve evolução significativa ao longo da reação. Realizou-se o

mesmo procedimento com a metaloporfirina (ii), porém não houve melhorias na oxidação da rosamina. Os ensaios realizados usando etanol como solvente mostraram ser infrutíferos. Do conjunto de metaloporfirinas apresentado, aquela que apresentou resultados mais promissores foi o complexo de Fe(III) da porfirina (iii). Nestes ensaios, a reação ocorreu apenas com o H_2O_2 e etanol como solvente, durante 30 min, com aquecimento por micro-ondas. Os TLC's realizados mostraram uma redução significativa na formação de produtos secundários bem como um aumento de obtenção da rosamina 1. Apesar de não se ter realizado a etapa de purificação da rosamina, uma vez que pelos TLC's a quantidade de rosamina oxidada não o justificaria, é de salientar que a metodologia seguida com recurso ao complexo de Fe(III) da porfirina (iii), foi a que conduziu a melhores resultados na oxidação de rosaminas, e por isso deve ser alvo de otimização experimental no futuro.

3.3.2.5 Oxidação com óxido de grafeno

O óxido de grafeno (GO) é obtido por tratamento da grafite com oxidantes fortes e consiste em folhas de grafeno individuais ou sobrepostas com um certo espaçamento entre cada uma, com espessura nanométrica, contendo uma série de grupos funcionais formados por átomos de oxigénio (Figura 3.24).³⁹

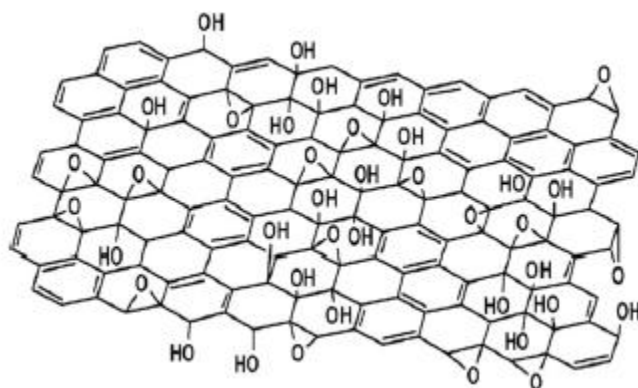


Figura 3.25 Modelo proposto por Lerf–Klinowski, com omissão dos grupos minoritários (carboxilo, carbonilo, éster, etc), da periferia do plano de carbono das folhas gráficas do óxido de grafeno.^{40,41}

Verificou-se que o óxido de grafeno é um oxidante eficaz num vasto número de reações, nomeadamente, na oxidação de olefinas às respectivas dionas, nos metilbenzenos aos respetivos aldeídos, nos diarilmetanos às respetivas cetonas, e em várias desidrogenações. As temperaturas usadas nestas reações são normalmente suaves

e variam entre os 100 e os 120°C. Além disso, o fato de se tratar de um oxidante heterógeno facilita o isolamento e respetiva purificação dos produtos desejados.⁴²

Inicialmente, realizou-se um ensaio com óxido de grafeno como agente oxidante. A reação de oxidação foi assistida por micro-ondas, durante cerca de 30 min, a 60°C, usando-se o etanol como solvente. Pelos TLC's realizados, antes e após a reação, verificou-se uma redução significativa na formação de produtos secundários quando comparado com as metodologias anteriormente descritas. Porém, observou-se que a quantidade de rosamina oxidada não foi significativa.

Na sequência deste ensaio e com o intuito de melhorar o poder oxidante do meio, combinou-se o óxido de grafeno com o aducto H₂O₂-ureia, em etanol. A reação foi desenvolvida em condições experimentais semelhantes à anterior e seguida, igualmente, por TLC. Observou-se uma melhoria relativamente à quantidade de rosamina oxidada e à semelhança do ensaio anterior, poucos produtos secundários se formaram. Este ensaio mostra portanto um resultado preliminar promissor e deve ser alvo de estudo de modo a ser otimizado; nomeadamente, o uso de outro solvente que permita realizar as reações a temperaturas mais elevadas.

Os estudos desenvolvidos nesta seção do trabalho contaram com a estreita colaboração da investigadora Doutora Susana Rebelo, que não só disponibilizou os materiais: porfirinas, aduto H₂O₂-ureia e óxido de grafeno, bem como colaborou no desenvolvimento das experiências realizadas.

3.3.3 Estudo preliminar de síntese em Fase Sólida

Desde da década de 60, que a síntese orgânica em fase sólida tem sido uma ferramenta importante na preparação de péptidos. Mais recentemente, foram desenvolvidos estudos no âmbito da escolha do material de suporte utilizado, mas também na possibilidade de combinar SPPS com aquecimento por micro-ondas, resultando em tempos de síntese mais reduzidos, bem como na maior pureza dos produtos obtidos.⁴³

A síntese em fase sólida pressupõe a ligação covalente entre o material de suporte e o substrato, que apenas será quebrada no final da rota sintética, onde o produto é facilmente removido por filtração.⁴⁴ Deste modo, a síntese em fase sólida apresenta-se como uma metodologia de síntese em que a principal vantagem reside na simplicidade do tratamento das reações. No entanto apresenta também algumas dificuldades como o

elevado impedimento estéreo do suporte sólido que por vezes não permite que a reação de síntese seja completa.

Neste trabalho procurou-se estudar novos suportes sólidos, mais resistentes às condições reacionais. Deste modo, testaram-se como suportes sólidos as sílicas do tipo MCM-41 e nanopartículas de sílica.

O sistema poroso hexagonal MCM-41 (Figura 3.26) pertence aos materiais da família M41S sendo o material mais estudado, devido às suas propriedades texturais únicas, nomeadamente à grande área superficial ($1000 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$), ao elevado número de poros ($1 \text{ cm}^3\text{g}^{-1}$) e à distribuição regular do tamanho dos poros.⁴⁵ O diâmetro destes poros varia entre 15 a 100 Å e pode ser controlado por alteração do comprimento da cadeia carbonada do surfactante utilizado na síntese. As suas paredes de sílica são estruturalmente semelhantes às da sílica amorfa e a sua espessura é de aproximadamente 1 nm. As superfícies interiores dos canais contêm grupos Si-OH nucleófilos, que permitem a imobilização de complexos inorgânicos e organometálicos.⁴⁶

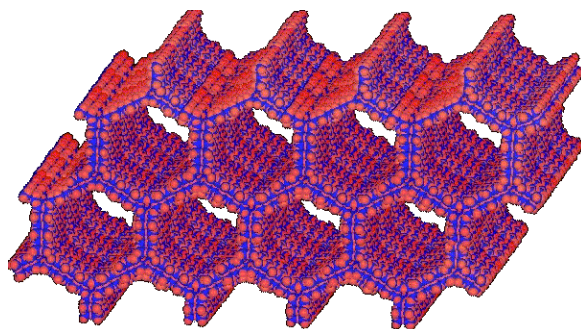


Figura 3.26 Representação esquemática do material MCM-41.⁴⁷

Existem vários métodos de introduzir grupos funcionais nos materiais mesoporosos.⁴⁸ Tradicionalmente, os dois métodos mais usados são: o “grafting”, em que os grupos funcionais são inseridos numa fase pós-síntese, e co-condensação, na qual os grupos funcionais são inseridos juntamente com a fonte de sílica (síntese direta). Ambos se baseiam na ligação covalente entre os grupos funcionais e a estrutura siliciosa.

O método “grafting”, pode ser realizado através de um (ou mais) dos seguintes procedimentos:

- introdução dos grupos orgânicos funcionais por reação direta de organossilanos com os grupos silanol da superfície (procedimento seguido na funcionalização do MCM-41 neste trabalho);

- ancoragem de grupos funcionais através de ligações covalentes e/ou reconhecimento molecular com os grupos previamente fixados;
- conversão, por reação química, dos grupos funcionais introduzidos noutros.

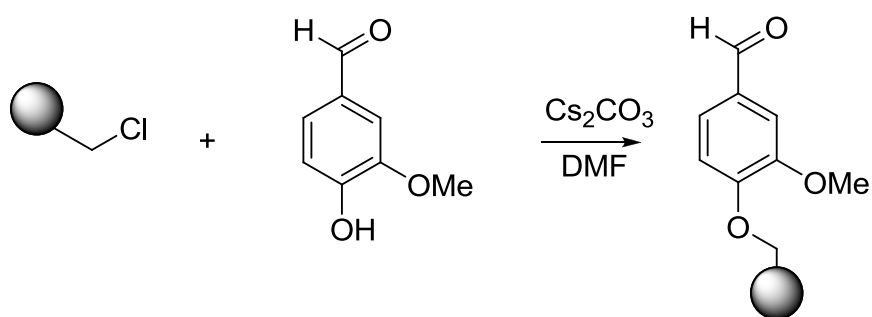
Este método apresenta as seguintes vantagens:

- a estrutura dos materiais resultantes é altamente ordenada, uma vez que a estrutura original é preservada após a reação de funcionalização;
- os grupos funcionais podem ser escolhidos de acordo com os objetivos pré-determinados;
- os materiais apresentam estabilidade hidrotérmica relativamente elevada.

No entanto, a dificuldade em controlar a distribuição dos grupos funcionais através deste método constitui a principal desvantagem deste método.

Neste trabalho pretendeu-se estudar métodos de síntese em fase sólida, escolhendo-se para isso a vanilina, e procurando perceber quais as condições ideais para a sua imobilização num material suporte. A vanilina, sendo um derivado do 3,4-dihidroxibenzaldeído e por isso um precursor semelhante ao utilizado na preparação das rosaminas deste trabalho, foi selecionada para a realização dos testes de otimização da síntese em fase sólida. Além disso este composto dispensou a sua preparação, uma vez que se encontra disponível comercialmente.

O esquema de reação proposto é apresentado no Esquema 3.11. A síntese foi desenvolvida em meio básico, Cs_2CO_3 , de modo a gerar-se o alcóxido da vanilina e assim imobilizar este ligando no material de suporte.



Esquema 3.11 Reação de síntese proposta para a imobilização do ligando vanilina em suporte sólido.

3.3.3.1 Funcionalização dos suportes

Os materiais suportes usados são comerciais (nanopartículas de sílica e MCM-41). Estes materiais foram previamente funcionalizados com 3-(cloropropil)-

trimetilsilano de forma a introduzir-se o grupo funcional –Cl na sua superfície. A reação de funcionalização ocorre através da interação dos grupos hidroxilo na superfície dos materiais com os grupos metóxilo do organossilano (Figura 3.27). O procedimento seguido foi baseado no descrito na literatura.⁴⁹

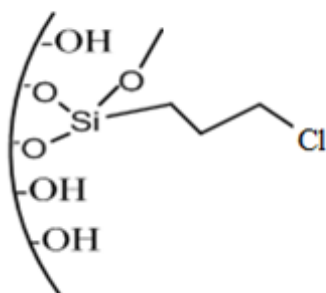
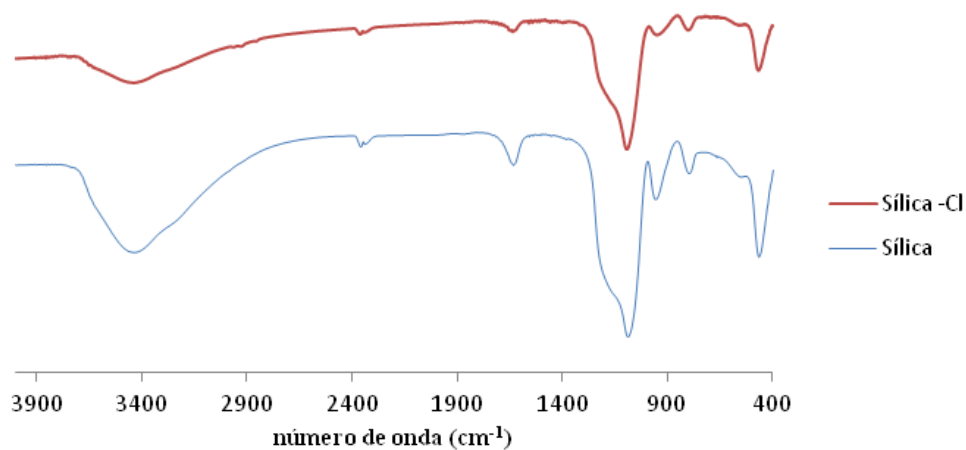


Figura 3.27 Superfície dos materiais utilizados após funcionalização com 3-(cloropropil)-trimetilsilano.

Na Figura 3.28 apresentam-se os espectros de IV relativos à funcionalização dos materiais de suporte: MCM-41 e nanopartículas de sílica.



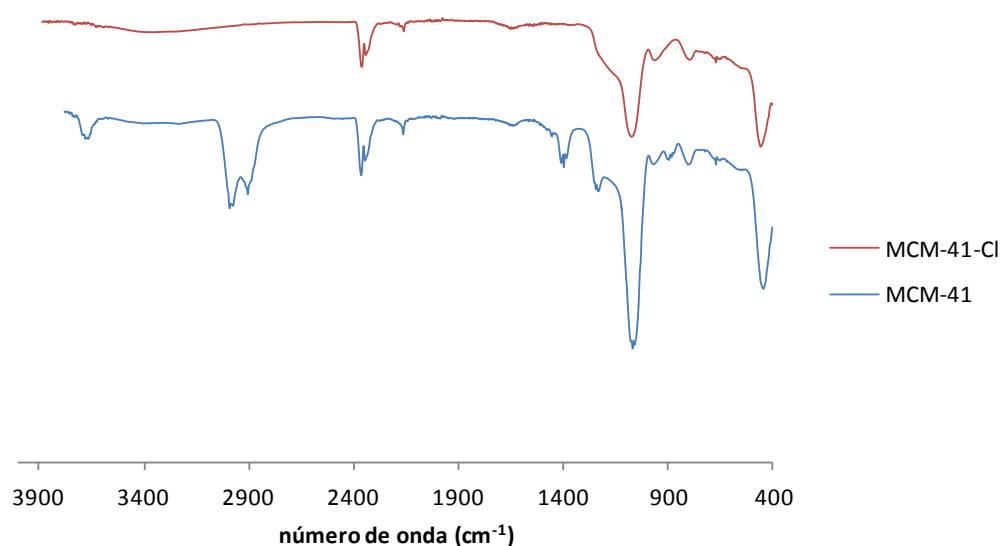


Figura 3.28 Espectros de IV relativos à funcionalização de MCM-41 e nanopartículas de sílica.

3.3.3.2 Imobilização de Vanilina em nanopartículas de sílica

A primeira experiência realizada consistiu na imobilização da vanilina em nanopartículas de sílica. A caracterização do material foi realizada pelas técnicas de espectroscopia de IV e por SEM.

A imagem de SEM (Figura 3.29) demonstra que as nanopartículas de sílica com morfologia esférica bem definida, foram destruídas no meio reacional aquando da imobilização da vanilina, provavelmente devido ao carácter básico da solução. A figura 3.26 mostra a ausência de unidades esféricas, observando-se unicamente um material heterogéneo sem unidades bem definidas.

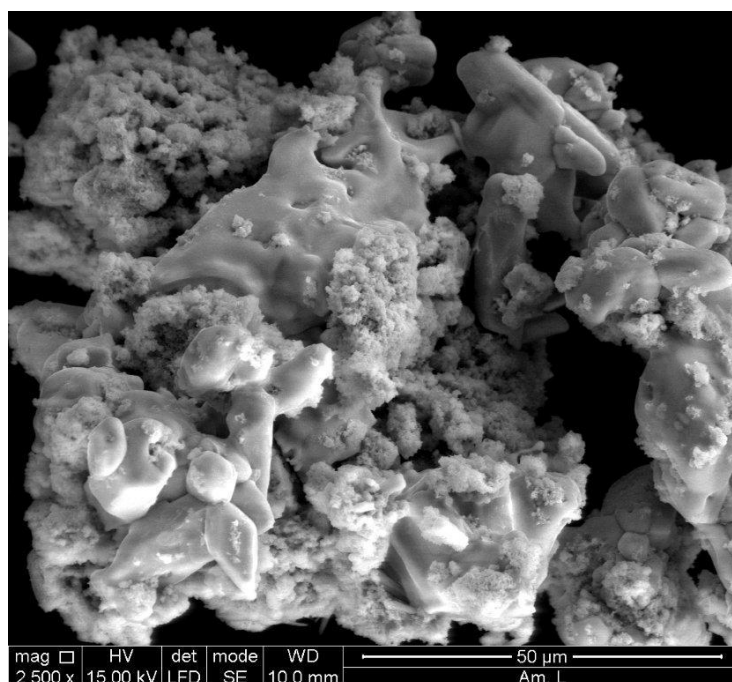


Figura 3.29 Imagem de SEM de nanopartículas de sílica após funcionalização

A destruição do material das nanopartículas de sílica foi também confirmada por IV, uma vez que as bandas características da sílica não são observadas no espectro, na região de $400\text{--}1100\text{ cm}^{-1}$: ν_{as} (Si-O-Si), ν_{s} (Si-O-Si) e δ (O-Si-O) (Esquema 3.30).⁵⁰

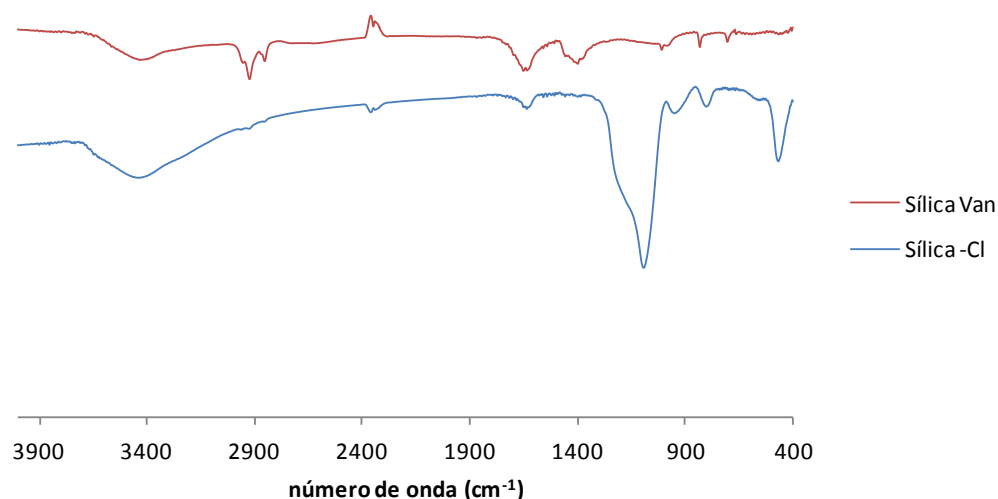


Figura 3.30 Espectros de IV do material após funcionalização (Sílca -Cl) e após imobilização (Sílca Van).

3.3.3.3 Imobilização de Vanilina em MCM-41

O outro material testado, trata-se de uma estrutura mesoporosa, com canais bem definidos e de paredes robustas: o MCM-41. Com este suporte obtiveram-se melhores resultados, uma vez que este mostrou ser estável às condições do meio reacional, tal se verifica pelos dados obtidos na caracterização por IV e SEM.

O espectro de IV (Figura 3.31) apresenta as bandas características da silica na região de 400-1100 cm^{-1} : ν_{as} (Si-O-Si), ν_{s} (Si-O-Si) e δ (O-Si-O). Para além das bandas características do suporte, observam-se ainda as bandas correspondentes ao organossilano na superfície do material, nomeadamente a 2900-3000 cm^{-1} duas bandas de fraca intensidade correspondentes a ν_{s} (CH_2) e ν_{as} (CH_2). A banda larga a 3200-3600 cm^{-1} é atribuída à ν_{s} (OH).^{51,52}

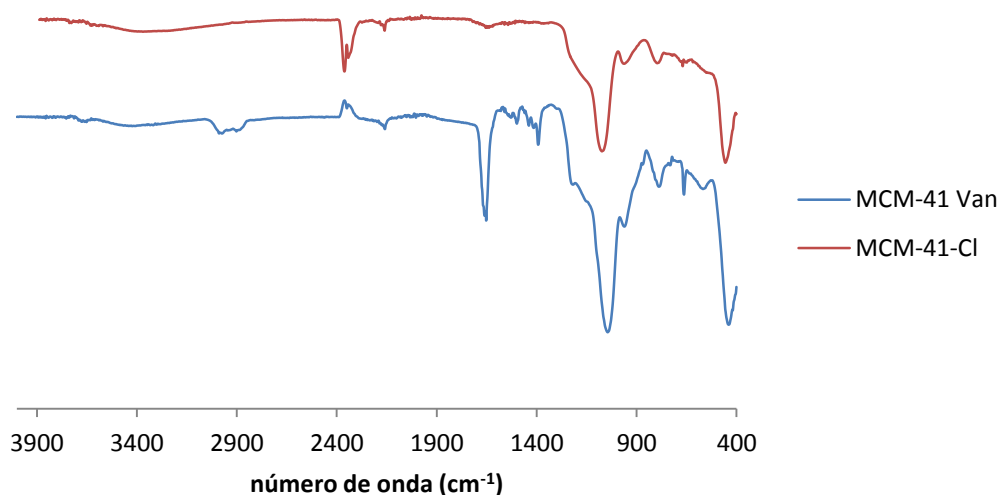


Figura 3.31 Espectros de IV do material após funcionalização (MCM-41-Cl) e após imobilização (MCM-41 Van).

As imagens de SEM obtidas para o material MCM-41 antes e logo após imobilização da vanilina apresentam-se do ponto de vista da sua morfologia bastante idênticas (Figura 3.32 e Figura 3.33). Indicando que durante esta experiência, ao contrário da anterior, o material de suporte não foi destruído. Sendo a vanilina uma molécula relativamente pequena a imagem após imobilização não mostra diferenças significativas.

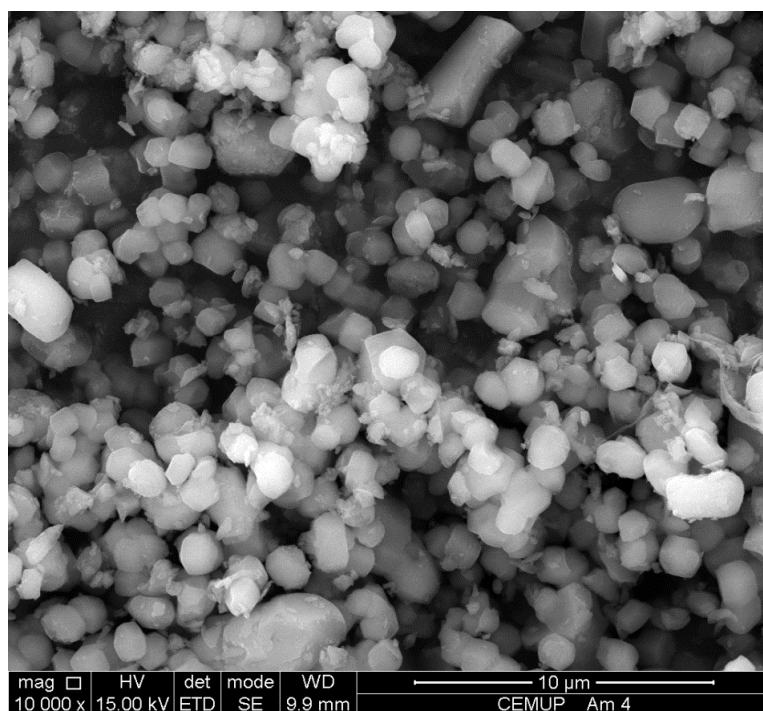


Figura 3.32 Imagem de SEM de MCM-41 após funcionalização.

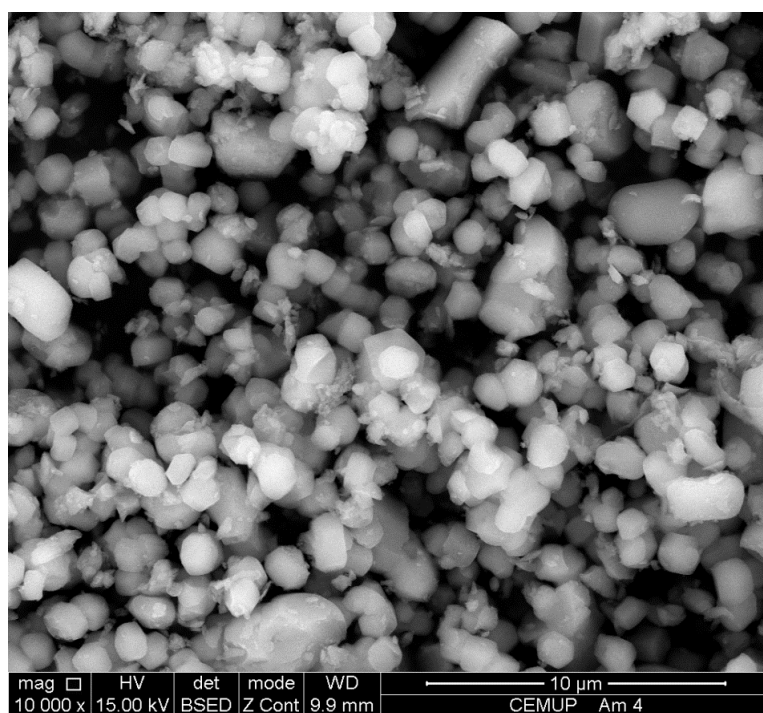


Figura 3.33 Imagem de SEM de MCM-41 após imobilização da vanilina.

3.3.3.4 *Análise Elementar*

Realizaram-se análises elementares de C e H das amostras MCM-41-Cl e para MCM-41 Van, ou seja, do material funcionalizado e do material após imobilização da vanilina, respectivamente. A partir da quantidade de carbono encontrada para o material funcionalizado, foi possível determinar a quantidade de organossilano presente na superfície do material MCM-41-Cl, sendo esta de $1,08 \times 10^{-4}$ mol. Da análise de carbono efectuada ao MCM-41 após imobilização da vanilina e atendendo à quantidade de organossilano previamente determinada, foi possível conhecer a quantidade de vanilina imobilizada no suporte MCM-41 funcionalizado, sendo esta de $0,89 \times 10^{-4}$ mol.

Os estudos de síntese em fase sólida foram desenvolvidos em estreita colaboração com a investigadora Doutora Salete Balula, que gentilmente disponibilizou os materiais suporte utilizados, bem como, ajudou na realização das experiências.

Capítulo 4

Considerações finais

4. Considerações finais

Este trabalho teve como objetivo principal a preparação de novos fluoróforos do tipo rosamina, estes compostos foram preparados através de reação de condensação entre benzaldeídos – com grupos hidroxilo nas posições 2 e 3 e 3 e 4, respetivamente – e naftaldeídos – ligados pelas posições 1 e 2 – com 3-dietilamonofenol, em condições ácidas. Pretendeu-se também comparar dois tipos de aquecimento: aquecimento convencional (banho de óleo) e radiação micro-ondas, verificando-se que com este último se conseguem tempos de reação significativamente mais reduzidos (horas vs. minutos) e de um modo geral, com rendimentos superiores.

Outra componente importante deste trabalho consistiu no estudo de metodologias mais limpas e eficientes nomeadamente na etapa de oxidação da preparação das rosaminas. Os resultados obtidos permitem-nos concluir que existem metodologias que futuramente merecem ser exploradas como são exemplo, a oxidação catalítica com peróxido de hidrogénio e a oxidação recorrendo ao óxido de grafeno. Ainda com o objetivo de implementar protocolos mais limpos foi preparada uma rosamina recorrendo ao método de aquecimento óhmico utilizando água como solvente sendo de salientar o sucesso dos resultados aqui obtidos: redução do tempo de reação quando comparado com o aquecimento convencional e também o uso de um solvente benigno na preparação de uma rosamina.

Algumas das rosaminas preparadas neste trabalho, contendo grupos hidroxilo, mostraram propriedades espectralógicas, nomeadamente UV-Vis e fluorescência, sensíveis às alterações do pH do meio. Estas características sugerem uma potencial aplicação no desenvolvimento e construção de novos sensores óticos de pH.

Referências bibliográficas

- ¹ L. D. Lavis, R. T. Raines, *ACS Chem. Biol.*, **2008**, 3, 142.
- ² J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer, Third Edition, **2006**, USA.
- ³ M. Sameiro, T. Gonçalves, *Chem. Rev.*, **2009**, 109, 190.
- ⁴ M. Beija, C. A. M. Afonso, J. M. G. Martinho, *Chem. Soc. Rev.*, **2009**, 38, 2410.
- ⁵ M. Formica, V. Fusi, L. Giorgi, M. Micheloni, *Coord. Chem. Rev.*, **2012**, 256, 170.
- ⁶ S. Merouani, O. Hamdaoui, F. Saoudi, M. Chiha, *Chem. Eng. J.*, **2010**, 158, 550.
- ⁷ J. H. Clark, *Green Chem.*, **1999**, 1, 8.
- ⁸ A. A. S. C. Machado, *Química – Bol. S. P.Q.*, **2007**, 110, 33.
- ⁹ J. H. Clark, *Green Chem.*, **2006**, 8, 17.
- ¹⁰ A. A. S. C. Machado, *Quím. Nova*, **2011**, 34, 1291.
- ¹¹ J. M. Osepchuk, *IEEE MTT-S Internacional Microwave Symposium Digest*, **2009**, 5165967, 1397.
- ¹² R. Gedye, F. Smith, K. Westaway, H. Ali, L. Baldisera, L. Laberge, J. Rousell, *Tetrahedron Lett.*, **1986**, 27, 279.
- ¹³ R. J. Guiguere, T. L. Bray, S. M. Duncan, G. Majetich, *Tetrahedron Lett.*, **1986**, 27, 4945.
- ¹⁴ A. M. G. Silva, V. L. M. Silva, C. Queirós, J. Pinto, *Química – Bol. S. P.Q.*, **2012**, 125, 61.
- ¹⁵ C. O. Kappe, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2004**, 43, 6250.
- ¹⁶ J. Stancl, R. Zitry, *J. Food Eng.*, **2010**, 99, 437.
- ¹⁷ C. Chen, K. Abdelrahim, I. Beckerich, *J. Food Eng.*, **2010**, 98, 257.
- ¹⁸ S. Ghnimi, N- Flach-Malaspina, M. Dresch, G. Delaplace, J. F. Maingonnat, *Chem Eng. Res. and Des.*, **2008**, 86, 626.
- ¹⁹ M. R. Zareifard, H. S. Ramaswamy, M. Trigui, M. Marcotte, *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, **2003**, 4, 45.
- ²⁰ Patente de Invenção Nacional “Reactor para síntese química com aquecimento ôhmico, método e suas aplicações” (N/Ref.: PAT 43149-11)
- ²¹ V. L. Eifler-Lima, C. S. Graebin, F. T. Uchoa, P. S. Duarte, A. G. Corrêa, *J. Braz. Chem. Soc.*, **2010**, 21, 1401.
- ²² D. Tiebes, “Combinatorial Chemistry” - *Combinatorial Chemistry – Synthesis, Analysis, Screening*, Wiley-VCH, Ed. Günther Jung, **1999**, Alemanha.

- ²³ L. Feliu, P. Vera-Luque, F. Albericio, M. Álvarez, *J. Comb. Chem.*, **2007**, 9, 521.
- ²⁴ F. Guillier, D. Orain, M. Bradley, *Chem. Rev.*, **2000**, 100, 2091.
- ²⁵ N. T. Srinivasa, P. Gupta, B. Kundu, *Tetrahedron Lett.*, **2001**, 42, 5993.
- ²⁶ M. Wainwright, *Biotech. Histochem.*, **2003**, 78, 147.
- ²⁷ L. D. Lavis, *J. Histochem. Cytochem.*, **2011**, 59, 139.
- ²⁸ E. Evangelio, J. Hernando, I. Imaz, G. G. Bardají, R. Alibés, F. Busqué, D. Ruiz-Molina, *Chem. Eur. J.*, **2008**, 14, 9754.
- ²⁹ D. Aigner, S. M. Borisov, F. J. O. Fernández, J. F. F. Sánchez, R. Saf, I. Klimant, *Talanta*, **2012**, in press.
- ³⁰ D. W. Domaille, E. L. Que, C. J. Chang, *Nature Chem. Biol.* **2008**, 4, 168.
- ³¹ Xiaoqiang Chen, Tuhin Pradhan, Fang Wang, Jong Seung Kim, and Juyoung Yoon, *Chem. Rev.*, **2012**, 112, 1910.
- ³² C. Queirós, A. M. G. Silva, S. C. Lopes, G. Ivanova, P. Gameiro, M. Rangel, *Dyes Pigment.*, **2012**, 93, 1447.
- ³³ V. M. S. Gil, C. F. G. Geraldês, *Ressonância Magnética Nuclear, Fundamentos, Métodos e Aplicações*, Fundação Calouste Gulbenkian, Gráfica de Coimbra, 1987.
- ³⁴ A. M. d'A. R. Gonsalves, T. M. V. D. P. Melo, *Espetroscopia de Ressonância Magnética Nuclear*, Imprensa da Universidade de Coimbra, **2007**, 57.
- ³⁵ Y. H. Ahn, J. S. Lee, Y. T. Chang, *J. Amer. Chem. Soc.*, **2007**, 129, 4510.
- ³⁶ B. F. O. Nascimento, A. M. R. Gonsalves, M. Pineiro, *Inorg. Chem. Comm.*, **2010**, 13, 395.
- ³⁷ S. L. H. Rebelo, M. M. Q. Simões, M. G. P. M. S. Neves, J. A. S. Cavaleiro, *J. Mol. Catal. A: Chem.*, **2003**, 201, 9.
- ³⁸ S. L. H. Rebelo, M. M. Pereira, M. M. Q. Simões, M. G. P. M. S. Neves, J. A. S. Cavaleiro, *J. Catal.*, **2005**, 234, 76.
- ³⁹ S. Pei, H.-M. Cheng, *Carbon*, **2012**, 50, 3210.
- ⁴⁰ A. Lerf, H. He, M. Forster, J. Klinowski, *J. Phys. Chem. B*, **1998**, 102, 4477.
- ⁴¹ H. He, J. Klinowski, M. Forster, A. Lerf, *Chem. Phys. Lett.*, **1998**, 287, 53.
- ⁴² H.P. Jia, D. R. Dreyer, C. W. Bielawski, *Tetrahedron*, **2011**, 67, 4431.
- ⁴³ B. Bacsá, K. Horváti, S. Bosze, F. Andrae, C. O. Kappe, *J. Org. Chem.*, **2008**, 73, 7532.
- ⁴⁴ V. L. Eifler-Lima, C. S. Graebin, F. T. Uchoa, P. D. Duarte, A. G. Corrêa, *J. Braz. Chem. Soc.*, **2010**, 21, 1401.

-
- ⁴⁵ C. T. Kresge, M. E. Leonowicz, W. J. Roth, J. C. Vartuli, J. S. Beck, *Nature*, **1992**, 359, 710.
- ⁴⁶ B. Hatton, K. Landskron, W. Whitnall, D. Perovic, G. A. Ozin, *Acc. Chem. Res.*, **2005**, 38, 305.
- ⁴⁷ http://www.zeolite.utm.my/?Research:Projects:ZNMG_Project_4, 2012.
- ⁴⁸ A. Vinu, K. Z. Hossain, K. Ariga, *J. Nanosci. Nanotech.*, **2005**, 5, 347.
- ⁴⁹ C. Pereira, *J. Mol. Catal. A Chem.*, **2009**, 312, 53
- ⁵⁰ X. Luo, C. Yang, *Phys. Chem. Chem. Phys*, **2011**, 13, 7892
- ⁵¹ J. A. A. Sales, *J. Colloids Int. Sci.*, **2006**, 95, 297
- ⁵² M. I. Kovic, *Polymer*, **2009**, 50, 2544